



Cinétique de détachement de microorganismes modèles adsorbés sur des surfaces d'acier inoxydable : effet de la rugosité et de l'orientation cristallographique

Magali Demilly

► To cite this version:

Magali Demilly. Cinétique de détachement de microorganismes modèles adsorbés sur des surfaces d'acier inoxydable : effet de la rugosité et de l'orientation cristallographique. Biophysique [physics.bioph]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT : . tel-00095379

HAL Id: tel-00095379

<https://theses.hal.science/tel-00095379>

Submitted on 15 Sep 2006

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

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

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER GRENOBLE I
UFR DE BIOLOGIE

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER GRENOBLE I

Discipline : Biologie Cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par

Magali DEMILLY

Le 8 juin 2006

**Cinétique de détachement de microorganismes modèles
adsorbés sur des surfaces d'acier inoxydable :
Effet de la rugosité et de l'orientation cristallographique**

Co-direction de thèse :

**Mme Laurence BOULANGE
Mr Yves BRECHET
Mr Franz BRUCKERT**

Membres du Jury :

**Mr Bernard BLANZAT
Mr Bertrand FOURCADE
Mr Philippe LEJEUNE
Mr Michel NARDIN**

**Examineur
Examineur
Rapporteur
Rapporteur**

**Thèse préparée au sein du laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés
Sous la direction de Mr Michel SATRE
DRDC/CEA-Grenoble**

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse s'est déroulé au sein du laboratoire de Biochimie et biophysique des Systèmes Intégrés (BBSI) au Commissariat de l'Energie Atomique (CEA) de Grenoble, sous la co-direction de Laurence Boulangé, Yves Bréchet et Franz Bruckert. Je tiens à les remercier pour la confiance dont ils m'ont fait part durant ces trois années ainsi que pour leurs précieux conseils. Merci à Franz d'avoir supporté (et répondu à) mes nombreuses questions ainsi que mes moments de panique (!). Laurence, merci de m'avoir montré et fait partager tes multiples connaissances lors des réunions notamment au MacDo'(!). Quant à Yves, merci de m'avoir fait partagé tes connaissances de la Métallurgie, elles m'ont éclairées tout au long de ces trois années. J'espère que cette thèse t'a permis de connaître davantage le monde des « bêtes », aussi diverses soient-elles : les gros durs, les petits mous...

Je souhaite également remercier Michel Nardin et Philippe Lejeune d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Merci également à Bertrand Fourcade et Bernard Blanzat d'avoir pu se libérer afin de faire parti de mon jury de thèse.

Merci à Michel Satre de m'avoir acceptée au sein de son laboratoire.

Un très très grand merci à toute l'équipe Dicty qui m'a permis de mener cette thèse dans la bonne humeur et la bonne ambiance: Laurence, merci pour tes discussions et ta joie de vivre; Gérard, merci de ta bonne humeur et de tes blagues sur les blondes dès le matin (!), mais maintenant tu vas devoir trouver quelqu'un d'autre à qui les faire ! (elles me manqueront quand même un peu...). Merci à Sébastien K. et Karine pour les discussions, pas toujours scientifiques mais tellement relaxantes, que nous avons eues ainsi que pour leur gentillesse. Merci également à Nelly, Michel, le secrétariat BBSI (merci pour votre patience et gentillesse !). Je n'oublie pas ceux partis du laboratoire : Sara, Sébastien F. et Jérémy, merci pour votre gentillesse.

Merci à Florence Robault, Grégory Berthomé de l'ENSEEG pour leur aide lors des expériences. Merci également à l'équipe du « Research Center » d'Ugine-Alz : Peggy, Audrey, Jean-Philippe, Richard...

Cette thèse est dédiée à mes parents : merci pour votre aide continue, votre confiance en moi sans borne même lorsque je doutais, merci également de tout l'amour que vous m'avez donné et me donnez quotidiennement, je vous en suis infiniment reconnaissante. Merci également à tous les membres de ma famille pour leur soutien et leurs visites à Grenoble ! J'ai une pensée particulière pour mes grands-parents paternels et ma grand-mère maternelle adorée, disparus : vous serez toujours dans mon cœur.

Merci enfin à Fabien, pour sa patience au cours de ces trois années de thèse. Cela n'a pas toujours été facile surtout en vivant loin l'un de l'autre... Merci pour ton amour, ton soutien lors des moments de doute, tes bons petits plats et ta musique qui, le week-end, me permettaient de me détendre...

Que tous ceux que j'ai oubliés me pardonnent...

DEFINITION DU TRAVAIL DE THESE	7
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	10
Chapitre I : Les aciers inoxydables	12
I. Composition et classification des aciers inoxydables	12
I.1. Définition	12
I.2. Les principales catégories	14
II. Le film passif	15
II.1. Définition et composition	15
II.1.1. Définition	15
II.1.2. Composition	16
II.2. Stabilité du film passif	18
II.3. Phénomène de corrosion	18
III. Contrôle de la structure granulaire	19
III.1. Théories de la croissance du grain	20
III.2. L'attaque des joints de grain	20
IV. Techniques d'études des surfaces et de l'adhérence des cellules au substrat	21
IV.1. Physico-chimie des surfaces	21
IV.2. Adhésion cellulaire	22
V. Facteurs pouvant modifier l'adhésion au niveau du solide	22
V.1. La charge de surface du solide	23
V.2. Le nettoyage des surfaces	24
V.3. La rugosité du matériau	24
VI. Nouvelles surfaces fonctionnelles	25
I. Les Bactéries et Archaeobactéries	27
I.1. Composition de la paroi des bactéries de type Gram ⁻ et Gram ⁺	27
I.1.1. Les bactéries de type Gram ⁺	28
I.1.2. Les bactéries de type Gram ⁻	28
I.1.3. Le rôle de la paroi	30
I.2. Les appendices des surfaces bactériennes et substances polymériques extracellulaires (EPS)	30
I.3. Exemples d'une bactérie Gram ⁻ (<i>Escherichia coli</i>) et Gram ⁺ (<i>Staphylococcus epidermidis</i>)	32
I.3.1. <i>Escherichia coli</i>	32
I.3.2. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	34
II. Les Eucaryotes	35
II.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
II.1.1. Généralités	35
II.1.2. La paroi des levures	36
II.2. <i>Dictyostelium discoideum</i>	38
III. Etude de l'adhésion et de la quantification du nombre de cellules adhérentes	38

III.1. Méthodes expérimentales d'observation	38
III.2. Paramètres affectant l'adhérence cellulaire aux matériaux	40
III.2.1. Le caractère hydrophobe des cellules	40
III.2.2. La présence d'appendices (pili, flagelle) ou de substances polymériques extra-cellulaires	41
III.2.3. Le mode de culture	42
III.2.4. Le temps de contact entre le microorganisme et son substrat	42
III.2.5. Le milieu de suspension	43
Chapitre III : Interactions physico-chimiques mises en jeu lors de l'adhésion	44
I. Interactions électrostatiques	44
II. Approche thermodynamique	45
II.1. Notions de l'approche thermodynamique	45
II.1.1. La tension superficielle d'un liquide	46
II.1.2. Energie libre superficielle d'un solide	46
II.1.3. Energie libre interfaciale	47
II.1.4. Exemple d'adhésion d'une bactérie, immergée dans un milieu, sur un solide	47
II.2. Mouillabilité et capillarité	48
II.2.1. La méthode de la goutte posée	48
II.2.2. Modèles physico-chimiques des énergies de surface	49
II.2.2.a. Modèle d'Owens et Wendt (Owens and Wendt, 1969)	49
II.2.2.b. Modèle de Van Oss, Good et Chaudhury (van Oss and Good, 1988):	49
Conclusion de la synthèse bibliographique	51
MATERIEL ET METHODES	52
Chapitre IV : Obtention et analyses des aciers inoxydables	53
I. Préparation des matériaux	53
II. Traitements thermiques et analyses des grains obtenus	53
II.1. Traitement thermique	53
II.2. Evaluation de la taille des grains	54
II.3. La technique Electron Back Scattering Diffraction (EBSD)	56
III. Les traitements de surface	59
III.1. Obtention des échantillons de surface polie attaquée (PA) et polie miroir (PM)	59
III.2. Analyse de profilométrie des échantillons	60
III.3. La Spectroscopie de photoélectrons X (XPS)	60
III.4. Les mesures d'angles de contact	61
III.5. Nettoyage des échantillons avant l'adhésion bactérienne	62
Chapitre V : Les microorganismes	64
I. Choix des microorganismes	64
II. Modes de culture des microorganismes	65
II.1. La levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : mode de culture	65
II.2. <i>Escherichia coli</i> : mode de culture et visualisation du mode de détachement	66
II.2.1. Mode de culture	66
II.2.2. Visualisation du mode de détachement d' <i>E. coli</i>	66
II.3. <i>Staphylococcus epidermidis</i> : mode de culture	67

III. Analyse physiologique des surfaces bactériennes à l'aide de la technique MATS (Microbial Adhesion to Solvents ; (Bellon-Fontaine et al., 1996))	68
Chapitre VI : Chambre à flux radial et modélisation des cinétiques de détachement	70
I. Description	70
II. Contrainte à la paroi et acquisition des images	72
III. Modélisation des cinétiques de détachement	74
RESULTATS	78
Chapitre VII : Physico-chimie des surfaces d'acier inoxydable	79
I. Energie de surface des aciers inoxydables	79
II. Composition du film passif	80
III. Topographie des surfaces	81
IV. Métallurgie des surfaces	82
V. Conclusion	83
Chapitre IX: Cinétique de détachement de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> à des surfaces d'acier inoxydable	84
I. Analyse physiologique de <i>S. cerevisiae</i> à l'aide du test MATS	84
II. Cinétiques de détachement de <i>S. cerevisiae</i> adsorbé sur un substrat d'acier inoxydable avec un fini de surface poli miroir (PM) et poli attaqué (PA)	85
III. Etude de l'influence de la taille et de la profondeur des joints de grain sur le détachement de <i>S. cerevisiae</i>	87
IV. Effet de l'orientation cristallographique sur l'adhésion de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> à des surfaces d'acier inoxydable	89
V. Conclusion	90
Chapitre X : Cinétiques de détachement d'<i>Escherichia coli</i> adsorbée sur des surfaces d'acier inoxydable	91
I. Analyse physiologique d'<i>E.coli</i> à l'aide du test MATS	91
II. Cinétiques de détachement d'<i>E.coli</i> à une surface d'acier inoxydable poli attaqué et poli miroir	92
III. Etude de l'influence de la profondeur des joints de grain sur le détachement d'<i>Escherichia coli</i>	94
IV. Influence de l'orientation cristallographique des grains sur l'adhésion d'<i>E. coli</i>	96
V. Visualisation du détachement d'<i>E. coli</i>	96
Chapitre XI : Cinétiques de détachement de <i>Staphylococcus epidermidis</i> à des surfaces d'acier inoxydable	98
I. Analyse physiologique de <i>S. epidermidis</i> à l'aide du test MATS	98
II. Cinétiques de détachement de <i>S. epidermidis</i> adsorbés sur des aciers inoxydables poli attaqué et poli miroir	99
III. Influence de la profondeur des joints de grain sur le détachement de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	100

IV. Influence de l'orientation cristallographique des grains sur l'adhésion de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	101
V. Conclusion	102
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	104
I. Equivalence de l'efficacité de détachement, pour les trois microorganismes, sur un échantillon poli miroir PM et poli attaqué PA	106
II. Sensibilité à l'orientation cristallographique des grains	107
III. Interprétation des cinétiques de détachement	108
III.1. Propriétés mécaniques des cellules étudiées	108
III.2. Thermodynamique et adhésion	108
III.3. Energie cinétique et adhésion	110
III.4. Comparaison entre les trois microorganismes	111
IV. Influence de la profondeur du gravage des joints de grain sur le détachement des microorganismes	113
V. Recommandations	113
VI. Autres domaines d'applications envisageables	115
CONCLUSION GENERALE	116
BIBLIOGRAPHIE	119
ANNEXES	134

DEFINITION DU TRAVAIL DE THESE

Cette thèse s'est déroulée au **CEA de Grenoble** en partenariat avec le groupe sidérurgique **Ugine-Alz** dont le centre de recherches dédié aux aciers inoxydables est basé à Isbergues (62, Ugine-Alz, Research Center). Leader mondial dans la production d'acier inoxydable, Ugine-Alz développe de nouveaux produits avec des surfaces fonctionnelles à nettoyabilité (aptitude au nettoyage) améliorée. A l'heure actuelle, de nombreux tests d'évaluation de la nettoyabilité des surfaces existent consistant à encrasser les surfaces et à appliquer un cycle de nettoyage. Les surfaces les plus nettoyables seront évidemment celles où le dépôt résiduel est le plus faible. Dans le cas des micro-organismes, il est important d'inclure des tests de viabilité pour évaluer l'efficacité du nettoyage et d'inclure un paramètre de la cinétique pour l'encrassement et le nettoyage des différentes surfaces. **Le premier objectif pratique de cette thèse** était donc de faire rentrer ce paramètre de cinétique dans les procédures standards d'évaluation du nettoyage industriel. Il pourra ensuite être appliqué à la définition de nouvelles surfaces, de nouveaux agents nettoyants ou de procédures de nettoyage innovantes plus sûres et plus économes en temps et en énergie. Les dispositifs expérimentaux mis au point à Grenoble sont destinés à étudier la formation de la première couche du biofilm (cellules adhérentes mais non agrégées).

Par ailleurs, il a été démontré que le détachement cellulaire par des forces de cisaillement, produites par un flux de liquide, présente un seuil et procède par un mécanisme de pelage (Décavé et al., 2002). Ce travail est venu apporter, pour les cellules à parois déformables, le support théorique et la validation expérimentale pour la mesure quantitative de l'adhérence cellulaire avec les chambres à flux. De plus, il met l'accent sur la nécessité d'étudier la cinétique de détachement des cellules pour caractériser un couple cellule-matériau.

Notre second objectif était donc de valider un cadre théorique pour le détachement de cellules présentant des caractéristiques mécaniques du type de celles des levures ou des microorganismes à coque. De la sorte, nous aurons à disposition une méthode pour systématiser et analyser, d'une manière quantitative, l'interaction entre un micro-organisme et un matériau. Ces informations permettront de décrire la formation de la première couche de microorganismes dans un biofilm (**voir figure 1**), la plus profonde, et la plus difficile à enlever (**étape adhésion figure 1**).

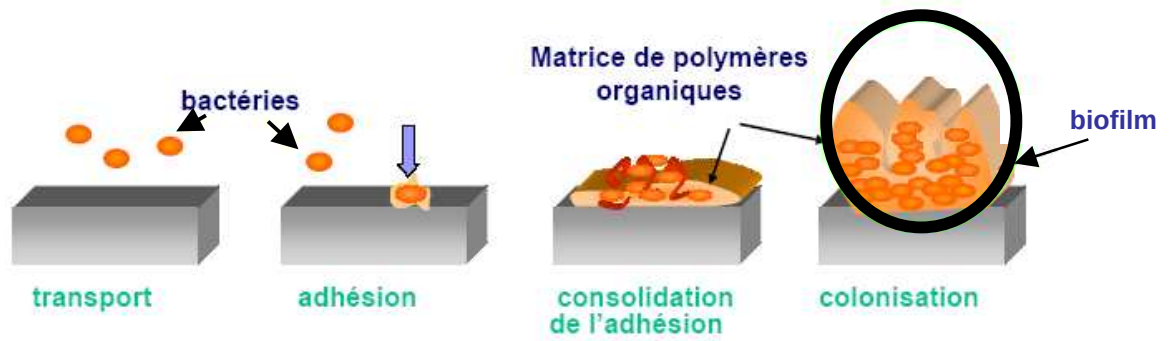


Figure 1 : Etapes de formation d'un biofilm. D'après (Fontaine-Aupart, 2005)

Lors de ce travail de thèse, trois microorganismes ont été choisis pour leur taille et leur classification différentes: une bactérie Gram⁻, *Escherichia coli*, une bactérie Gram⁺, *Staphylococcus epidermidis* et une levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Afin d'étudier l'influence de la rugosité du substrat, plusieurs états de surface, en acier AISI 304, ont été élaborés au sein du Centre de Recherches d'Ugine-Alz : un acier inoxydable avec une finition polie miroir et des surfaces gravées aux joints de grains avec des tailles de grain de 20, 40 et 100µm d'une profondeur de 100 ± 50 nm, 150 ± 50 nm et 650 ± 150 nm.

Les recherches se sont portées sur la cinétique de détachement de ces microorganismes adhérents aux aciers inoxydables, ceci sous contrainte exercée à l'aide d'une chambre à flux radial. Le but final était de visualiser quel type de matériau était le plus adéquat pour limiter l'adhésion des microorganismes sur des appareils agroalimentaires et/ou médicaux.

Dans la première partie de ce manuscrit, nous effectuerons une synthèse bibliographique des données concernant les aciers inoxydables, les microorganismes et les facteurs influençant leur adhésion. La deuxième partie décrit les modes d'obtention des surfaces d'acier inoxydable, les méthodes utilisées et développées au cours de ce travail de thèse. La troisième partie présente les résultats obtenus pour les trois microorganismes sélectionnés, ainsi que les discussions et perspectives.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

La bioadhésion sur des surfaces d'acier inoxydable est un phénomène courant dans l'industrie, particulièrement dans l'agroalimentaire (laiterie, vinification, brasserie...), la restauration collective mais également dans des applications médicales ou pharmaceutiques. Les bactéries et les champignons microscopiques représentent une source chronique de contamination pour les produits alimentaires (Barnes et al., 1999) ou le matériel médical. Cela pose un problème d'hygiène et de santé publique chronique conséquent auquel il est urgent d'apporter des solutions.

Ainsi, dans cette synthèse bibliographique, nous étudierons les aciers inoxydables, puis les microorganismes, et enfin, les interactions physico-chimiques mises en jeu lors de l'adhésion.

Chapitre I : Les aciers inoxydables

I. Composition et classification des aciers inoxydables

I.1. Définition

Les aciers inoxydables jouent un grand rôle dans d'innombrables domaines : vie quotidienne, industrie mécanique, agroalimentaire, chimie, transports, médecine et chirurgie, etc.

Les aciers inoxydables sont des alliages métalliques dans lesquels le fer représente l'élément majoritaire, le carbone et le chrome y sont généralement présents à un taux respectivement inférieur à 2 % et au moins 12% en poids. A ceci viennent s'ajouter d'autres éléments, notamment le nickel, mais aussi parfois le molybdène et le vanadium, afin d'améliorer la résistance à la corrosion et à l'oxydation (Lacombe et al., 1990).

Par ailleurs, le terme d'«acier inoxydable» est impropre pour deux raisons : ce type d'acier contient des éléments d'alliage (chrome, nickel) qui s'oxydent. C'est cette couche passive, composée d'oxydes, qui protège l'acier mais uniquement pour certains types d'environnement, comme en milieu neutre. Il y aura corrosion dans d'autres environnements comme les milieux chlorurés ou autres.

Il existe de multiples nuances d'aciers dits «inoxydables» désignées, par la normalisation américaine AISI (American Iron and Steel Institute), « 304», «304L», «316L», etc. qui correspondent à des compositions différentes. Chaque nuance est préconisée pour certains types d'environnements, son utilisation dans d'autres environnements serait déconseillée car ceci pourrait entraîner une corrosion du matériau (**voir table 1**).

Applications	Microorganismes	Type de microorganisme	Aciers inoxydables
Industrie agro-alimentaire	<i>Listeria monocytogenes</i>	Gram ⁺	AISI 304 AISI 316L*
	<i>Salmonella typhimurium</i>	Gram ⁻	
	<i>Escherichia coli</i>	Gram ⁻	
Restauration collective	<i>Listeria monocytogenes</i>	Gram ⁺	AISI 304
	<i>Escherichia coli</i>	Gram ⁻	
Domaine hospitalier	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram ⁻	AISI 304 AISI 316L*
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Gram ⁺	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram ⁺	
	<i>Escherichia coli</i>	Gram ⁻	

Table 1: Types d'aciers inoxydables utilisés dans différents domaines rencontrant des contaminations avec certaines bactéries. (*) : utilisé en cas d'exposition à des milieux chlorurés ou à des protocoles de nettoyage et de désinfection potentiellement corrosifs

En plus de la résistance à la corrosion, les aciers inoxydables possèdent une qualité déterminante qui est la résistance mécanique. D'autres éléments d'alliage, pour l'essentiel des métaux relativement « nobles » comme le nickel, le molybdène, le cuivre, améliorent encore la résistance chimique, en particulier dans les milieux non oxydants. Les propriétés de résistance de ces alliages ont été découvertes en 1913 lorsque l'on s'aperçut que des échantillons polis en vue d'examens de laboratoire ne subissaient pas d'oxydation. En fait, on peut dire que les aciers inoxydables ne peuvent pas être corrodés à froid en présence d'humidité. L'action des solutions aqueuses est telle que la corrosion électrochimique prend le pas sur la corrosion chimique directe; la bonne tenue du matériau dépend donc des potentiels électrochimiques en surface. Le dépôt de particules ferreuses étrangères sur les surfaces d'acier inoxydable devient catalyseur pour le développement d'une corrosion localisée en milieu humide (Baroux et al., 1990).

Ainsi, une bonne utilisation des aciers inoxydables nécessite donc un métal d'une très grande homogénéité chimique pour éviter des corrosions locales et un passage de l'état actif à l'état passif en tous les points de la surface exposée.

I.2. Les principales catégories

Il existe différentes catégories d'acier inoxydable qu'on distingue en fonction de l'usage mais également en fonction des éléments additionnés qui sont partagés en éléments α - et γ -gènes. Les éléments α -gènes sont appelés ainsi en raison de leur propension à favoriser, pour le fer, une structure cristallographique cubique centrée (**figure 2a**) (i.e que les atomes occupent les sommets et le centre d'un cube). C'est le cas du Cr, Mo, Nb, V, Ta. Dans les éléments γ -gènes, le réseau cristallin du fer favorisé est du type cubique à faces centrées, c'est-à-dire que les atomes sont disposés aux sommets du cube et au centre de ses faces (**figure 2b**). Dans cette catégorie, on trouve le C, N, Mn, Co, Ni, etc... (Lacombe and Béranger, 1990).

Les aciers **martensitiques** sont souvent choisis autant pour leurs propriétés mécaniques que pour leur résistance à la corrosion. Ils ne sont pas altérés par un certain nombre de réactifs: eau et sa vapeur, air, acides faibles, solutions de sels neutres... Au-delà d'un pourcentage de 16% de chrome (avec du nickel), ils résistent à de l'eau de mer et à des atmosphères marines. Ils sont employés, en particulier, dans les aubages de turbines à vapeur, pour des pièces mécaniques en coutellerie et pour les instruments de chirurgie. Ces aciers inoxydables sont constitués d'une teneur équivalente en α et γ -gènes. Cette teneur est calculée en effectuant la somme des pourcentages en poids des diverses additions α et γ -gènes et en affectant, à chaque pourcentage, un coefficient correcteur pour tenir compte du fait que le pouvoir α et γ -gènes des divers éléments n'est pas identique. Les plus courants titrent 13 % de chrome avec au moins 0,08 % de carbone.

Les aciers **ferritiques** : Cette catégorie possède une forte teneur en éléments α -gènes. Leurs caractéristiques mécaniques sont beaucoup moins favorables que la catégorie « martensitique ». En revanche, leur résistance à la corrosion est très améliorée. Ils se comportent bien dans l'acide nitrique dilué (2HNO_3 , $3\text{H}_2\text{O}$) jusqu'à 60 à 70°C, dans certains acides organiques, au contact des produits alimentaires, dans les atmosphères rurales et urbaines.

Les aciers **austénitiques** sont de loin les plus nombreux, en raison de leur résistance chimique très élevée et aussi de leurs bonnes caractéristiques mécaniques. Ils possèdent une forte teneur en éléments γ -gènes. Les teneurs en éléments d'addition avoisinent

les 18 % de chrome et 10 % de nickel. La teneur en carbone est très basse et la stabilité améliorée par des éléments tels que le titane ou le niobium.

Les aciers **austéno-ferritiques** ont des propriétés intermédiaires entre les deux catégories précédentes et parmi eux se trouvent des alliages particulièrement aptes à la soudure et d'autres très résistants à la corrosion inter-granulaire.

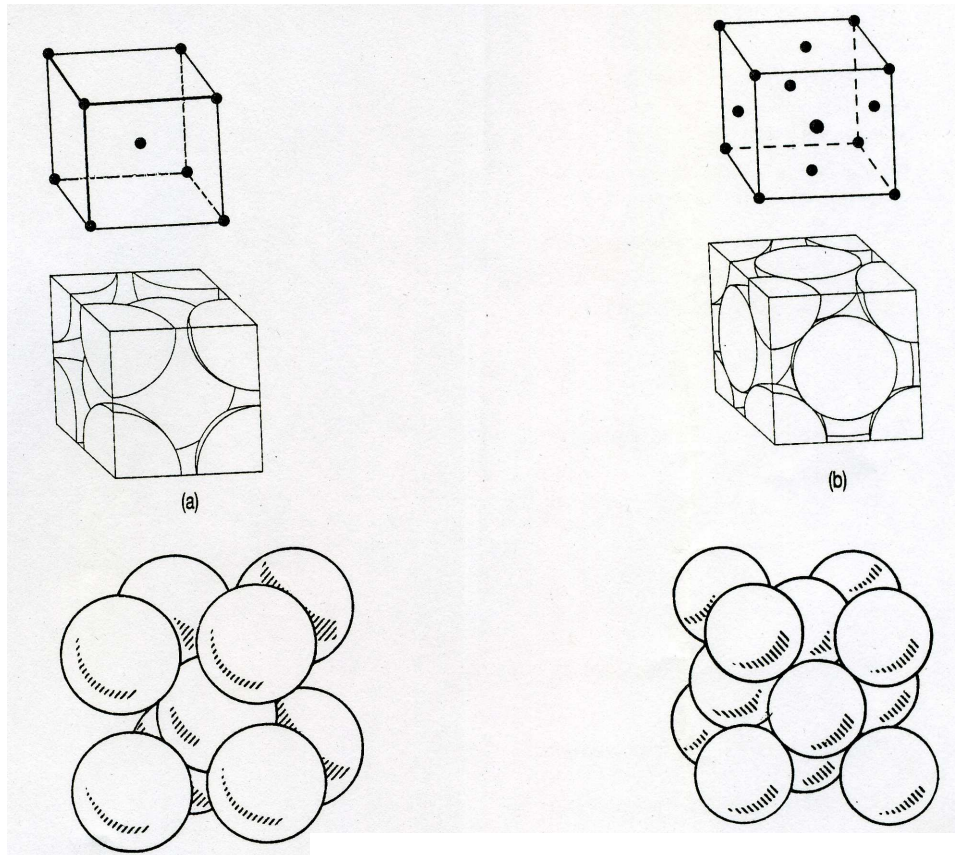


Figure 2 : Structure des métaux de symétrie cubique : (a) structure cubique centrée ; (b) : structure cubique à faces centrées (Lacombe and Béranger, 1990)

II. Le film passif

II.1. Définition et composition

II.1.1. Définition

La représentation classique des aciers inoxydables comprend des couches successives de métal, oxydes et hydroxydes, le tout recouvert par une couche de contamination résultant

généralement de l'adsorption de matériaux carbonés de l'air ambiant ou des phases d'élaboration (**figure 3**). Cette couche protectrice de quelques nanomètres d'épaisseur, appelée film passif, se forme soit à l'air, soit en solution aqueuse de manière naturelle sous le pouvoir oxydant de l'eau (Dubois, 2000).

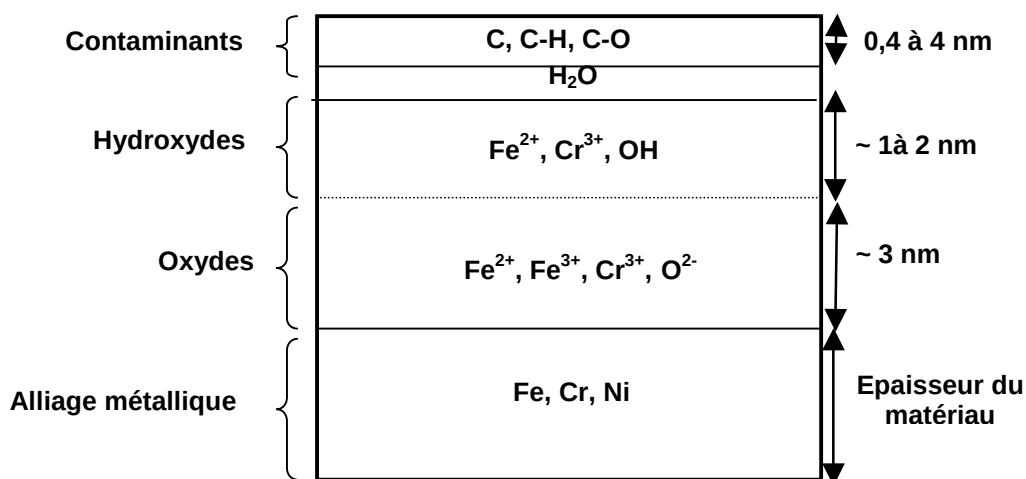


Figure 3 : Représentation schématique des différentes couches composant un acier inoxydable. La quantité d'eau présente est d'environ 3% selon la technique XPS (Dubois, 2000)

II.1.2. Composition

Le film passif est composé majoritairement de molécules d'eau, d'anions et de cations de métaux oxydables comme le fer, le chrome. Ces cations sont sous forme d'oxydes, hydroxydes (situés en extrême surface) et d'oxyhydroxydes plus ou moins hydratés (Vittoz, 1997). Par ailleurs, on y note un maximum relatif de concentration en chrome. La composition de la couche passive dépend à la fois du substrat métallique, des traitements de surface subis par le métal i.e. l'histoire du métal et du milieu dans lequel le matériau est immergé (Boulangé-Petermann, 1997a). Plusieurs modèles existent pour expliquer la structure des films passifs. Okamoto (Okamoto, 1973) propose un mécanisme de déprotonation de l'eau : les molécules d'eau s'adsorbent sur la surface métallique, un cation métallique est dissous puis le site $M(OH_2)$ se déprotone (**figure 4**).

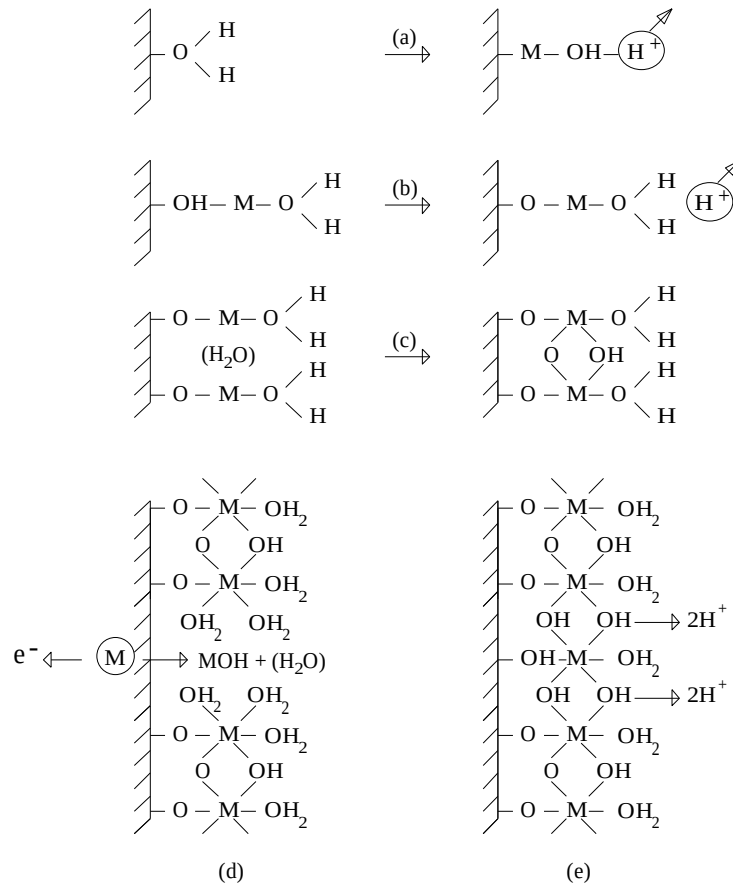


Figure 4 : Formation d'un film passif selon Okamoto. Dissolution et déprotonisation d'un cation (a), répétition du processus (b), formation de ponts entre les sites (c), formation et consolidation du film (d) (Okamoto, 1973)

Le second modèle (**figure 5**) utilise une adsorption de l'oxygène de l'eau sur la surface métallique (b), il y a ensuite changement de position avec l'oxygène (c) puis le processus se répète (d, e) et produit un film passif composé uniquement d'oxydes métalliques (Sato and Cohen, 1964).

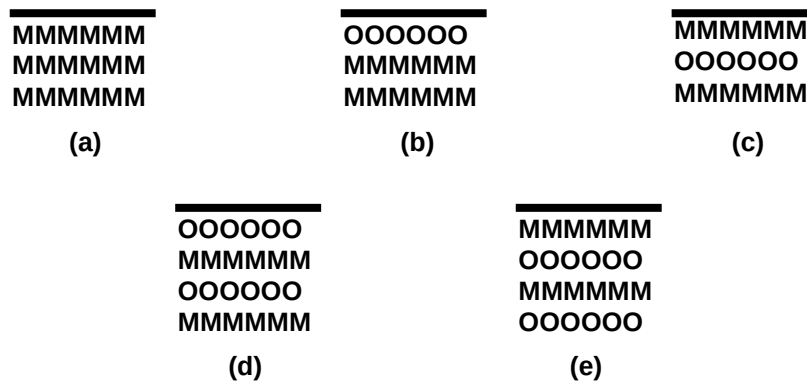


Figure 5 : Naissance d'un film passif à partir d'un métal (a), puis adsorption d'oxygène (b), changement de place (c), répétition du phénomène (d + e) (d'après (Sato and Cohen, 1964))

II.2. Stabilité du film passif

Dans certaines conditions, le film passif peut être détruit. Sa stabilité dépend, en effet, du pH, de la teneur en chlorures et du pouvoir oxydant. En milieu neutre, par exemple, et en absence de chlorures, il n'y a pas de problème de corrosion.

Les facteurs provoquant une dépassivation peuvent être des acides forts qui créent une corrosion généralisée ou inter-granulaire ; des milieux chlorurés qui induisent une corrosion inter-granulaire ou par piqûres ; la température qui augmente l'affinité du chrome pour l'oxygène et, dans le cas de traitement thermique ou lors d'un soudage, favorise la formation de carbure de chrome aux joints de grain : l'acier inoxydable contient une certaine quantité de carbone se combinant au chrome sous forme de carbures Cr_{23}C_6 . Ceux-ci précipitent de préférence le long des joints de grain et appauvrissent en chrome la matrice avoisinante. Ces zones appauvries sont très étroites mais leur teneur en chrome descend en dessous du seuil d'inoxidabilité. La rupture du film passivant est à l'origine de la corrosion inter-granulaire.

Les films passifs ne doivent donc pas être considérés comme « inertes » car ils sont en constante modification et restructuration face aux conditions environnementales comme nous l'avons vu ci-dessus.

II.3. Phénomène de corrosion

Comme tous les métaux, ces aciers peuvent subir soit une corrosion chimique uniforme qui attaque les surfaces de manière régulière, soit d'autres formes de corrosion localisée comme celles caractérisant les aciers inoxydables.

L'un des types de corrosion pouvant affecter les aciers inoxydables est **la corrosion inter-granulaire** (Béranger and Charbonnier, 1990). Celle-ci se déroule au niveau des joints de grain qui sont, d'une façon générale, des zones désordonnées séparant des grains d'orientations cristallographiques différentes. Ces zones inter-granulaires présentent une forte sensibilité aux attaques localisées dans certains milieux corrosifs. Le plus fréquemment, cette corrosion est due à l'état sensibilisé de l'acier. Cet état résulte d'une précipitation de composés riches en chrome qui entraîne un appauvrissement de la matrice en cet élément au

voisinage des joints de grain (**figure 6**). L'autre cause de cette corrosion peut être la ségrégation d'éléments mineurs aux joints de grain comme le silicium, le soufre et le phosphore.

Un autre exemple de corrosion est **la corrosion par piqûres** qui se déroule en général en présence d'un milieu agressif. Le métal subit une forte dissolution localisée qui conduit au développement de piqûres sur la surface passive (Oltra and Keddam, 1990). Par définition, ceci intervient lorsqu'une dissolution anodique importante apparaît sur une zone restreinte de la surface de l'acier ; il y a rupture locale du film passif qui conduit à un début de corrosion si celui-ci ne se reconstruit pas. Les milieux les plus courants susceptibles de produire la corrosion par piqûres sont chlorurés, comme l'eau de mer où la concentration des ions chlorures Cl^- est de l'ordre de 0,5M (Baroux et al., 1990).

Enfin, les aciers inoxydables peuvent être sujets à **une corrosion sous contrainte**. Ce phénomène de fissuration des matériaux est dû à la présence d'un environnement et d'un régime de contraintes statiques (Combrade, 1990). Il se produit même dans des milieux très peu agressifs.

Pour information, la corrosion peut-être également activée par la présence de microorganismes. Les micro-organismes qui sont impliqués, principalement les bactéries du type aérobie et anaérobie, modifient l'environnement où l'acier inoxydable se trouve, créant des crevasses, des zones différentielles d'aération ou un environnement plus agressif avec la présence des métabolites. **Ce type de corrosion est appelée MIC** (Microbiologically Influenced Corrosion) (Ibars et al., 1992) (Costerton et al., 1995).

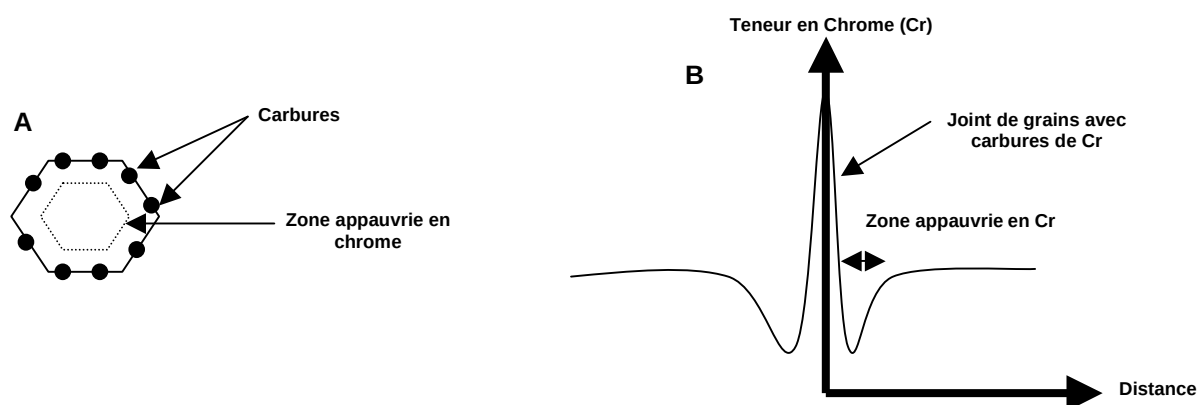


Figure 6 : A : Schéma de la corrosion inter-granulaire au joint de grain; B : Profil de concentration en Chrome (Cr) au niveau d'un joint de grain lors d'une attaque inter-granulaire

III.1. Théories de la croissance du grain

La croissance de grain est le processus par lequel la taille moyenne des grains augmente au cours d'un recuit. Cela s'explique par la nécessité pour le système de diminuer l'énergie libre associée à la surface des joints de grain.

Dans une publication des années 1950, Burke et Turnbull (Burke and Turnbull, 1952) ont expliqué la cinétique parabolique de croissance de grain. Ils modélisent la migration des joints de grain comme la conséquence d'un transport atomique à travers ces joints, sous l'effet d'une pression due à la courbure de la surface. Les joints de grain tendent à migrer vers le centre de leur courbure et donc à réduire leur aire, donc l'énergie qui y est associée. La force motrice de croissance pour un grain de taille R est $2\gamma/R$ où γ est l'énergie du joint de grain. En supposant une relation linéaire entre la vitesse et la force motrice, on obtient $dR/dt = M^*(2\gamma/R)$ d'où une croissance parabolique. En fait, la croissance de grain résulte du comportement collectif d'un ensemble de joints de grain.

C.S. Smith (Smith, 1952) produisit une seconde publication dans laquelle il définit que « la croissance normale d'un grain résulte d'interactions entre les contraintes topologiques du remplissage de l'espace et les besoins géométriques de l'équilibre des tensions de surface ». Cette constatation a donné naissance à toute une famille de théories et de simulations numériques qui s'attachent à prédire non seulement l'évolution temporelle de la taille moyenne, mais aussi celle de la distribution de la taille des grains (Feltham, 1957) (Hilbert et al., 2003) (Hunderi and Ryum, 1980).

III.2. L'attaque des joints de grain

Dans une attaque électro-nitrique, on observe la formation de sillons aux joints de grain car ils se dissolvent plus vite que l'intérieur des grains. Cela arrive même quand il n'y a pas de carbures intergranulaires. Cette attaque préférentielle des joints est liée en partie à d'éventuelles ségrégations chimiques (S, P,...) mais surtout au fait que le joint de grain est une zone désordonnée dans laquelle les atomes sont moins liés au réseau et donc plus faciles à « décrocher » par dissolution anodique. L'éventualité d'une précipitation de carbures et d'une déchromisation associée ne fait qu'amplifier le phénomène.

Afin d'étudier cette surface mais également l'adhérence de cellules sur celle-ci, quelques techniques sont couramment utilisées. En voici quelques-unes présentées dans le paragraphe suivant.

IV. Techniques d'études des surfaces et de l'adhérence des cellules au substrat

Lors de cette thèse, l'analyse de la surface des différents états de surface d'acier inoxydable a été, entre autre, effectuée à l'aide de **la technique XPS (Spectroscopie de Photoélectrons à rayons X)**. Le détachement des cellules a, quant à lui, été étudié grâce à l'utilisation **d'une chambre à flux radial**.

IV.1. Physico-chimie des surfaces

Parmi les techniques se prêtant à l'analyse chimique des surfaces, **la Spectroscopie de Photoélectrons à rayons X (XPS)** est particulièrement attractive car elle combine une information qualitative, quantitative et de la sélectivité de la surface utilisée. Les résultats obtenus donnent donc une analyse élémentaire (qualitative et quantitative), une analyse de surface et une information sur la concentration des fonctions chimiques présentes en surface (Bosquillon et al., 2004).

La technique peut-être appliquée à l'étude de la composition chimique de surfaces microbiennes et de la surface exposée par des biofilms. L'analyse étant réalisée sous atmosphère lyophilisée, elle requiert une déshydratation préalable de l'échantillon qui doit être donc bien contrôlée (Dufrene et al., 1999).

Une autre technique, **la Microscopie à Force Atomique (AFM)**, permet également d'effectuer une topographie de la surface étudiée et ainsi de mesurer sa rugosité. Cette technique permet l'étude de surfaces planes à très haute résolution. Elles utilisent une sonde de faible dimension (pointe) maintenue à proximité immédiate de l'échantillon. Un déplacement relatif sonde-surface permet une cartographie point par point de l'échantillon. Le problème de cette technique est que la résolution se dégrade rapidement lorsque la surface

n'est pas parfaitement plane (plus de 1 μ m de relief). La technique AFM emploie une sonde mécanique, pour amplifier les caractéristiques topographiques de la surface d'un facteur 10⁸, et produit des images 3D de la surface.

IV.2. Adhésion cellulaire

Par ailleurs, afin d'étudier le détachement de microorganismes en fonction d'une contrainte appliquée par un flux, **une chambre à flux radial** peut être utilisée (voir matériel et méthodes). On peut ainsi obtenir une cinétique de détachement en fonction de la contrainte appliquée (Cozens-Roberts et al., 1990) (Cozens-Roberts et al., 1990).

Dans ce même type d'étude, Bowen mesure le détachement de bactéries du substrat par le biais d'une technique de rotation d'un disque (Bowen et al., 2002). Le désavantage de cette technique, par rapport à la chambre à flux radial, est que la rotation du disque entraîne un échauffement de ce dernier et ainsi une élévation de la température du substrat. Ceci peut donc affecter le détachement des cellules adhérentes.

A l'inverse, l'équipe de Olofsson étudie les étapes initiales de l'interaction avec le substrat à l'aide **d'une microbalance à cristal de quartz** (Olofsson et al., 2005). A l'aide de cette technique, il peut détecter de très petits changements de masse comme les propriétés viscoélastiques durant l'adhésion des cellules sur la surface du cristal ce qui rend possible de suivre l'interaction et le processus d'adhésion au cours du temps.

Par ailleurs, il existe de nombreux facteurs affectant l'adhésion microbienne aux aciers inoxydables : la nature physique et chimique et la location du substrat, le type de matériel organique et de microorganismes potentiels recouvrant la surface et la nature de l'interface (solide-liquide dans le corps ; solide-air dans les surfaces environnementales) (Verran and Whitehead, 2005) (Donlan, 2002). Dans le paragraphe suivant, quelques-uns de ces facteurs, liés au solide et pouvant modifier cette adhésion, seront présentés.

V. Facteurs pouvant modifier l'adhésion au niveau du solide

Selon Meltzer (Meltzer and, 1993), « on n'a pas encore trouvé de surface exempte de biofilms. La structure de la surface peut influencer la quantité de films déposée, mais

seulement lors des toutes premières heures de l'exposition. En général, les surfaces lisses montrent un taux initial plus faible que les surfaces rugueuses mais la formation du biofilm après une période de quelques jours, est inévitable. ».

V.1. La charge de surface du solide

A un pH physiologique, virtuellement toutes les bactéries portent une charge de surface nettement négative. L'acier inoxydable est également chargé négativement engendrant ainsi des forces électrostatiques de répulsion lors de l'approche de la bactérie. Cette charge de surface peut-être modifiée par le **pH et la composition ionique de la solution environnante**. Plus la force ionique du milieu augmente, plus l'adhésion bactérienne et l'adsorption moléculaire sont importantes (Tidswell, 2005).

De même, **l'adsorption générale de protéines** (ayant lieu pendant les premières étapes de l'adhésion) augmente avec l'hydrophobicité du substrat (Pamula et al., 2004) (Nath et al., 2004). Cette adsorption de composés organiques entraîne des modifications des propriétés physicochimiques de surface des corps en présence telles que la charge (Boulangé-Petermann et al., 1995) ou l'énergie libre (Boulangé-Petermann et al., 1993) (Boulangé-Petermann, 1996). Ces modifications, en transformant les liaisons physiques à l'interface, peuvent favoriser ou au contraire inhiber l'adhésion de microorganismes (Bellon-Fontaine et al., 1999).

La composition du film passif est également primordiale dans l'adhésion bactérienne. Ainsi, certains auteurs ont démontré que la rugosité ne semblait pas être un facteur prépondérant, à l'opposé, la physico-chimie des surfaces d'acier polarisées semblait gouverner l'adhésion de certaines souches comme *L. mesenteroïdes* (Boulangé-Petermann et al., 1998) mais également la composition du film passif (Boulangé-Petermann et al., 2004). Redy et al. (Redey et al., 1999) (Redey et al., 2000) ont également montré que l'énergie de surface jouait un rôle important dans l'attachement de cellules osseuses sur un biomatériau.

Lerebour G. (Lerebour et al., 2004) a démontré que *S. aureus* était moins adhérent au substrat Episkin® (bipolaire, hydrophile) que sur un acier inoxydable (unipolaire, basique et hydrophile). Ainsi, pour eux, est-il préférable de rendre **le substrat hydrophobe et apolaire** avec l'utilisation de traitements de surface appropriés afin de réduire l'adhésion microbienne et les liens adhésifs entre les microorganismes et le substrat.

De même, l'équipe de John (John et al., 1996) a démontré qu'un **traitement par plasma oxygène** augmentait significativement l'adhésion de *S. aureus* aux cathéters de polyuréthane enduits d'hydrogel, le traitement modifiant la charge et l'énergie de surface des cathéters en les rendant plus hydrophiles.

V.2. Le nettoyage des surfaces

Les traitements de nettoyage influencent énormément la charge et l'énergie de surface du matériau (Boulangé-Petermann, 1997a) (Boulangé-Petermann, 1996; Boulangé-Petermann et al., 1993). Ainsi, en nettoyant les surfaces avec de l'éthanol (95%), un détergent alcalin (RBS 35) ou une séquence soude (0,2M) - acide nitrique (0,5M), l'acier inoxydable peut présenter des surfaces plus ou moins chargées et des énergies de surface différentes, engendrant ainsi une adhésion différente du microorganisme. Dans certains cas, ces traitements peuvent permettre de diminuer l'adsorption des bactéries et de protéines sur la surface (Midelet and Carpentier, 2004). L'équipe de Busscher a conforté l'hypothèse que l'élimination de biofilms sur des surfaces métalliques peut être diminuée en utilisant un traitement nettoyant approprié (Busscher et al., 1990) comme l'oxazaborolidine par exemple (Jabbour et al., 2005).

V.3. La rugosité du matériau

La rugosité joue un rôle essentiel dans l'adhésion des microorganismes. Pedersen (Pedersen, 1990) rapporte qu'un plus grand nombre de microorganismes (facteur 1,5) colonise une surface d'un acier inoxydable d'un fini de surface rugueux qu'un acier inoxydable électropoli. Il explique cette différence dans le fait que les surfaces rugueuses ont de plus grandes surfaces disponibles pour la colonisation ou qu'elles engendrent plus de forces de cisaillement. D'autres données permettent de conforter cette idée que peu de cellules bactériennes adhèrent sur les surfaces lisses amenant à la conclusion que le polissage pourrait être utilisé pour limiter l'adhésion bactérienne (Flint et al., 1997) (Arnold and Bailey, 2000) (Arnold et al., 2004). D'autres montrent, au contraire, une influence de la rugosité sur l'adhésion bactérienne par une augmentation du nombre de cellules adhérentes (Gillis and Gillis, 1996) (Pereira da Silva et al., 2005) (Vanhaecke et al., 1990) (Medilanski et al., 2002), ou une diminution de l'adhésion (Baharloo et al., 2005) ou une meilleure différenciation

cellulaire (Marchisio et al., 2005). Cependant, certains auteurs, enfin, contrairement aux précédents, ont trouvé que la topographie de surface n'avait pas beaucoup d'influence sur l'adhésion bactérienne (Hilbert et al., 2003) (Eick et al., 2004) (Boulangé-Petermann et al., 1998) (Garry et al., 1995). En conclusion, il n'existe pas encore d'effet net de la rugosité sur l'adhésion bactérienne et, par conséquent, sur le détachement.

VI. Nouvelles surfaces fonctionnelles

Depuis quelques années, les unités de recherche et développement industrielles développent des surfaces fonctionnelles inhibant de plus en plus l'adhésion des microorganismes ou permettant leur élimination de manière plus aisée. Certains chercheurs ont mis au point des surfaces fonctionnelles recouvertes de plusieurs couches de poly-électrolyte (Shi et al., 2005). Celles-ci sont constituées de polyéthylèneimine quaternaire et d'un complexe d'argent-polyéthylèneimine. Ces couches possèdent un potentiel antibactérien très efficace. L'équipe de Hu a également prospecté sur la quaternisation de groupes pyridine au sein de groupes pyridinium placés sur des billes. Ceci confère à la surface des propriétés antifongiques et antibactériennes hautement efficaces et de longue durée. Les bactéries et les spores de champignons en contact avec les billes N-alkylées sont lysées et leur contenu intracellulaire libéré dans le milieu (Hu et al., 2005). D'autres auteurs ont transféré des propriétés stimuli-dépendantes à des surfaces de matériaux (verre, or, acier inoxydable) notamment en les conditionnant avec des couches de polymères sensibles au pH, comme le chitosan et le polystyrène-b-poly(acrylic acid) (PS-PAA), ou d'autres sensibles à la température comme le poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) (Callewaert, 2004; Callewaert, 2005; Callewaert et al., 2004). Afin de rendre l'acier inoxydable antibactérien et antiadhésif pour les protéines, certaines équipes de recherche combinent l'électro-greffage et la polymérisation radical de transfert d'atomes (Ignatova et al., 2006). Pour Ignatova, une "greffe en deux étapes" a été réalisée. Cette technique est basée sur l'électro-greffage de chaînes de polyacrylate contenant un initiateur pour la polymérisation radical de transfert d'atome (ATRP) du méthacrylate 2-(tert-butylamino)éthyl (TBAEMA) ou la copolymérisation de TBAEMA avec l'un ou l'autre méthacrylate monométhyl éther de poly(éthylène oxyde) (PEOMA) ou d'acide acrylique (AA) ou de styrène. Comparées à la surface nue d'acier inoxydable, les chaînes du polyTBAEMA, les poly(TBAEMA-Co-PEOMA) et les poly(TBAEMA-Co-AA) diminuent l'adhérence de bactéries par 3 à 4 unités d'ordre de

grandeur comme indiqué par des tests d'adhérence de *S. aureus* et de bactéries de type Gram⁺. Dans un autre registre, la destruction de biofilms peut être réalisée avec des surfaces recouvertes d'une couche de dioxyde de titane (TiO₂) photocatalytique sous forme anatase (Raulio et al., 2005) (Bekbolet and Araz, 1996) (Kim et al., 2003) (Kuhn et al., 2003) (Amezaga-Madrid et al., 2003). Cette technique repose sur l'oxydation photocatalytique de TiO₂ sous l'effet de rayonnement UVA. En présence d'eau et d'oxygène, des radicaux OH hautement réactifs sont générés par le TiO₂ et les UVA. En effet, les photocatalyseurs de TiO₂ sont capables de détruire les bactéries en décomposant la matière organique par oxydation en créant des trous dans la bande de valence et par le biais des radicaux OH⁻ produits par l'oxydation de l'eau.

Cependant, il reste des points techniques à améliorer pour ces méthodes : les surfaces fonctionnelles recouvertes de plusieurs couches de poly-électrolyte inhibent la croissance des bactéries mais sans les détacher ; la quaternisation de groupes pyridine au sein de groupes pyridinium placées sur des billes se révèle être difficile et lourd à réaliser sur des aciers inoxydables de fabrication industrielle, de même qu'une "greffe en deux étapes" ; les couches de polymères de chitosan, PS-PAA ou PNIPAAm, ne sont pas stables au cours du temps et sensibles à la contamination qui peut modifier l'énergie de surface des substrats en se mélangeant à ces couches de polymères ; enfin le TiO₂ nécessite une source de lumière et n'est donc utilisable que pour des surfaces exposées à la lumière.

A l'opposé, dans les milieux où l'adhésion de bactéries réductrices de sulfate est recherchée, la présence de nickel, dans la composition du substrat, est recommandée afin d'obtenir un taux d'adhésion plus important (Lopes et al., 2005).

Ainsi, après avoir présenté la physico-chimie des surfaces d'acier inoxydable, nous allons, dans le chapitre suivant, développer les données sur le microorganisme et son adhésion.

Chapitre II : Microbiologie et adhésion

La classification actuelle des espèces est divisée en trois domaines : les Bactéries (*E.coli*, *S. epidermidis*...), les Eucaryotes (*S. cerevisiae*) et les Archaeobactéries (**figure 7**).

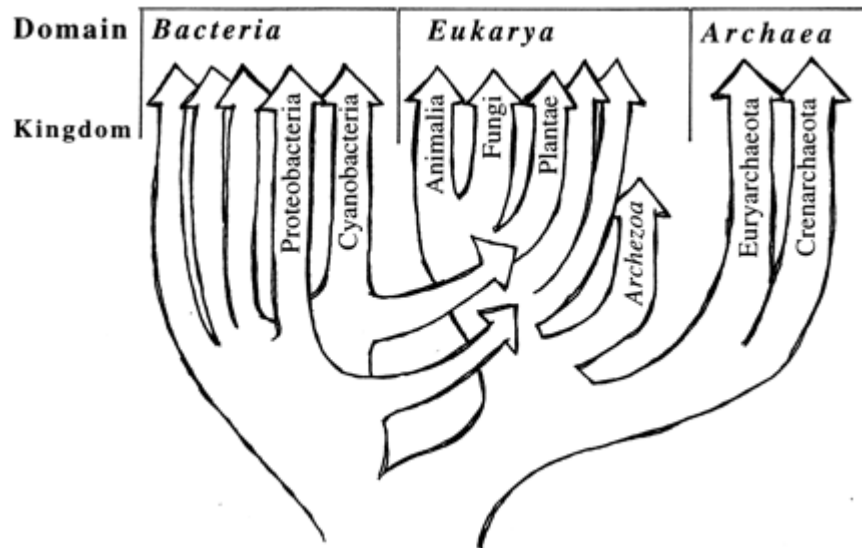


Figure 7: Classification phylogénétique. Seulement quelques exemples de Bactéries et Eucaryotes sont montrés. Des endosymbioses de mitochondrie et de chloroplaste sont indiqués par les flèches diagonales inférieures et supérieures (Doolittle, 1999)

I. Les Bactéries et Archaeobactéries

Les Bactéries et Archaeobactéries ne possèdent, dans la plupart des cas, qu'un seul chromosome circulaire (sauf exception), sans membrane nucléaire. La cellule se divise de manière simple (septation, scissiparité...) et la compartimentation cellulaire est élémentaire avec absence de mitochondries.

I.1. Composition de la paroi des bactéries de type Gram⁻ et Gram⁺

La paroi sert à la classification des micro-organismes et représente 20% de la masse sèche. Elle a un rôle majeur dans la résistance à la pression osmotique et aux déformations. La coloration de Gram (ou non-coloration) est révélatrice d'une différence structurale de la paroi. Cette coloration est une étape préliminaire pour la reconnaissance d'une bactérie. Réalisée en présence d'iode, suivie d'un lavage à l'alcool : on trouve alors deux cas distincts:

soit les bactéries sont décolorées, on les appelle alors bactéries de type Gram⁻ (cas d'*Escherichia coli*); soit les bactéries conservent la coloration, on les appelle alors des bactéries de type Gram⁺ (cas de *Staphylococcus epidermidis*). Le résultat de cette coloration de Gram s'explique par la composition des parois des deux types de bactéries.

1.1.1. Les bactéries de type Gram⁺

La paroi des bactéries Gram⁺ (**figure 8A**) est plus épaisse que celle des bactéries Gram⁻. Elle est généralement composée de muréine (peptidoglycane) et d'acide teïchoïque. Cette muréine peut représenter jusqu'à 50% du poids de la paroi. Elle est formée de chaînes polysaccharidiques linéaires composées d'une alternance de deux osamines N-AcetylGlucosamine (NAG) et de N-AcetylMuramique (NAM) liées à un peptide. Ce peptidoglycane assure un rôle structurant (résistance et pression). Il donne donc la forme cellulaire et empêche la lyse par un milieu hypotonique. A cette muréine sont associés, en plus faibles quantités, d'autres polymères comme les acides téïchoïques, teïchuroniques et lipoteïchoïques et des protéines de surface. Ces acides sont ancrés, soit dans la membrane, soit dans le peptidoglycane. Ils servent aussi à relier la membrane à la paroi. Plus le réseau formé est dense, plus la paroi est rigide.

1.1.2. Les bactéries de type Gram⁻

La paroi des bactéries Gram⁻ (**figure 8B**) est constituée de peptidoglycane recouvert d'une membrane externe dans laquelle sont insérés des lipoprotéines, des LipoPolySaccharides (LPS) et des trimères : c'est un réseau lâche et plus mince que la membrane des bactéries Gram⁺. Dans les parois des bactéries Gram⁻, on trouve plus d'acides aminés et de lipides. Ces bactéries Gram⁻ peuvent être hydrophobes, ceci étant lié à la présence des protéines de surface. Le LipoPolySaccharide (LPS) constitue les feuillets externes de la paroi externe de cette bactérie. Comme l'acide teïchoïque, il stimule la réponse immunitaire, possède un rôle d'ancrage et de structuration de la membrane externe. Ce LPS est composé de trois parties : **le lipide A**, qui ancre le LPS dans le feuillet externe de la membrane externe ; **une partie centrale (ou « core »)** constitué de sucres comprenant deux sucres caractéristiques, l'acide céto-désoxyoctonoïque (KDO) et un heptose ; **l'antigène O** constitué d'une longue chaîne glucidique d'environ 40 sucres (Neidhardt et al., 1994).

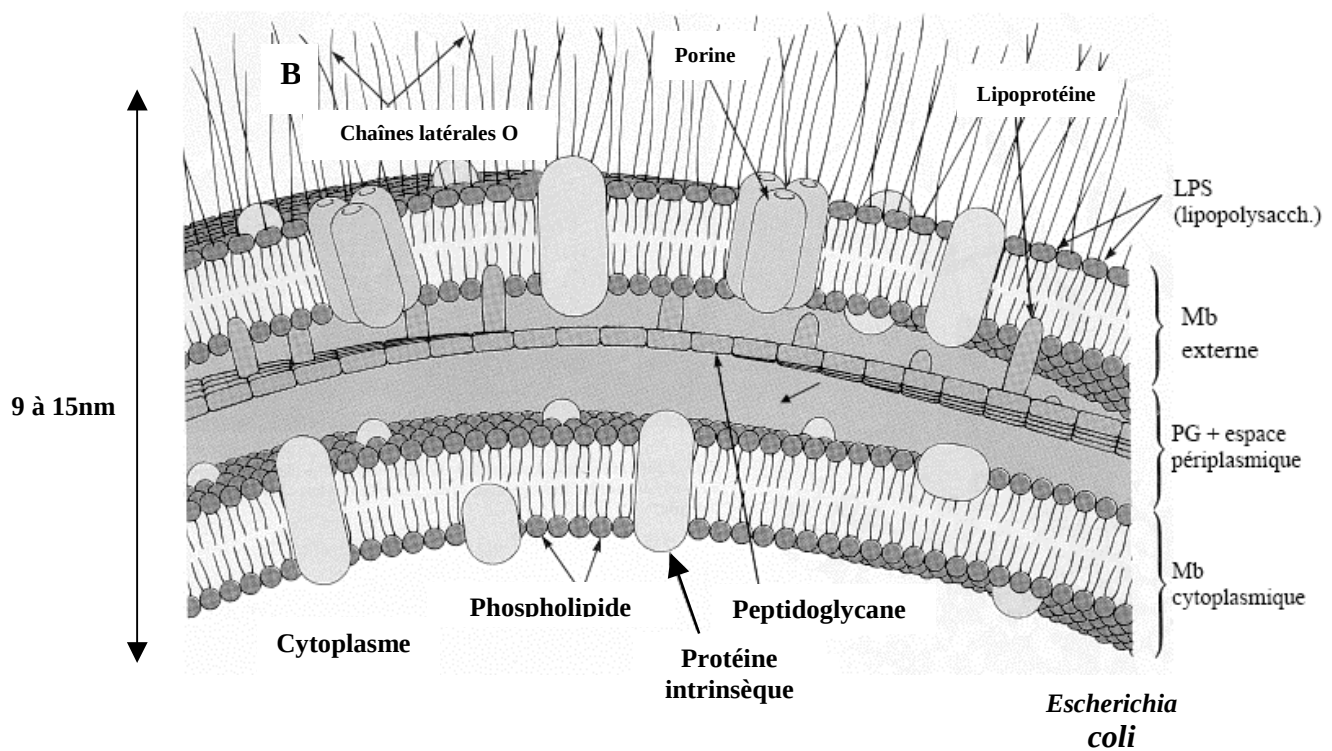
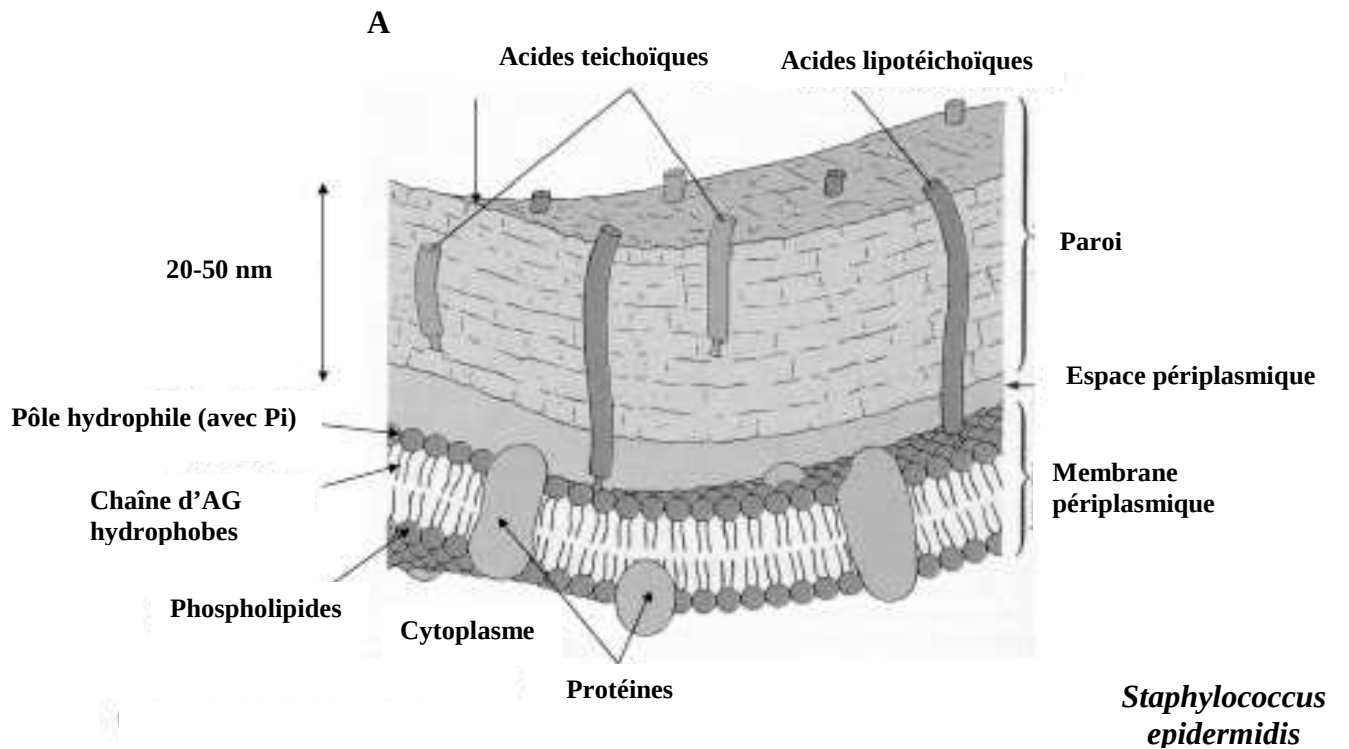


Figure 8 : Schémas de la composition des parois des bactéries Gram⁺ (A) (exemple *S. epidermidis*) et Gram⁻ (B) (exemple *E. coli*) (Prescott et al., 1999)

I.1.3. Le rôle de la paroi

C'est une barrière mécanique et chimique, active chez les bactéries Gram⁻ pour les transports de composés hydrophiles (sucres, acides aminés et ions) à l'aide de canaux, constitués de porines, permettant la diffusion passive (Neidhardt et al., 1994). Le peptidoglycane assure la forme cellulaire. La couche la plus externe a des propriétés antigéniques, i.e. que la présence de particules induit la production d'anticorps, on obtient alors une définition de sérotypie bactérienne (grâce à l'acide teïchoïque chez les bactéries Gram⁺, au LPS chez les bactéries Gram⁻).

I.2. Les appendices des surfaces bactériennes et substances polymériques extracellulaires (EPS)

Il existe différentes catégories d'appendices, constituants des surfaces bactériennes, non systématiquement présents. Parmi eux, **les cils ou flagelles**, éléments de nature protéique (la flagelline). Ce sont des unités sphériques en hélice et ancrées dans la membrane plasmique, et différents d'une espèce bactérienne à une autre. Ces appendices filamenteux peuvent mesurer de 6 à 15µm de long sur 12 à 30nm d'épaisseur. Ils permettent les déplacements microbiens : ils ont donc un rôle dans la chimiotaxie. Ils ont aussi des propriétés antigéniques car ils provoquent la formation d'anticorps que l'on peut mettre en évidence dans la plupart des cas et jouent également un rôle dans la réponse immunitaire innée. On trouve plusieurs types d'insertion des flagelles: halotriche ou lophotriche (une touffe de flagelles polaires), péritriche (flagelles répartis sur toute la surface de la bactérie), amphitriche (un flagelle à chaque pôle) et monotriche (un seul flagelle polaire) (**figure 9**).

Parmi les éléments de la surface bactérienne se trouvent également **les pili** (ou fimbriae) qui sont des éléments de la cellule des bactéries Gram⁻, de nature protéique, la piline, mais en général plus courts et plus fins que les flagelles. On distingue deux catégories de pili : les pili communs et les pili sexuels. Les pili communs mesurent 2 à 3µm de long, disposés régulièrement à la surface de la bactérie. Ils permettent la fixation de certaines bactéries sur les muqueuses, ce qui conditionne leur pouvoir pathogène. Les pili sexuels sont plus longs mais en nombre plus restreint (1 à 4) que les pili communs. Ils jouent un rôle

essentiel dans l'attachement des bactéries entre elles au cours de la conjugaison. Ils servent également de récepteurs de bactériophages spécifiques.

Autre structure de surface : **les curli**, composés d'un seul type de sous unité, la curline, qui diffère de tous les types de protéines de pilines connues et est ciblée sans peptide signal clivable. Sa synthèse se fait préférentiellement à des températures inférieures à 37°C (Olsen et al., 1989).

Enfin, il existe **des substances polymériques extracellulaires (EPS)** composées d'un mélange hétérogène de polysaccharides, protéines, acides nucléiques, lipides et recouvrant la surface des microorganismes. Les substances polymères extracellulaires microbiennes (EPS) sont les composantes clés pour l'agrégation des micro-organismes en biofilms, et floculations. Les EPS sont riches en polysaccharides de haut poids moléculaire (10 à 30 KDa) et possèdent généralement une composition hétéropolymérique. La chaîne de polysaccharide peut être non branchée ou branchée avec des chaînes d'autres composants attachés à la chaîne polymérique. Généralement, les polysaccharides sont formés de monosaccharides, avec des hexoses et des pentoses formant le cœur de l'EPS (Bhaskar and Bhosle, 2005).

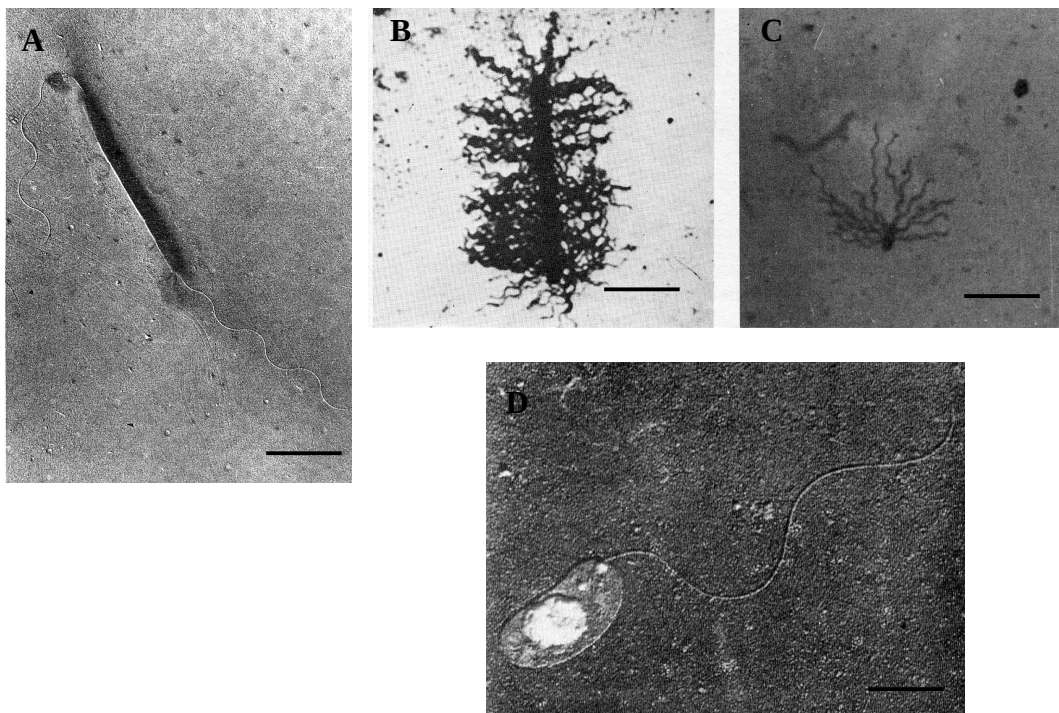


Figure 9 : Schéma de différents types d'insertion de flagelles. A : insertion amphitriche chez *Sphaerotilus natans* (barre d'échelle = 3 µm); B et C : insertion péritriche chez *Proteus vulgaris* (barre d'échelle = 2,5 µm) et *Escherichia coli* (barre d'échelle = 7,6 µm); D : insertion monotriche chez *Vibrio costicolus* (barre d'échelle = 1,2 µm) (Leclerc et al., 1983)

I.3. Exemples d'une bactérie Gram⁻ (*Escherichia coli*) et Gram⁺ (*Staphylococcus epidermidis*)

Afin d'étudier la cinétique de détachement de microorganismes sur un acier inoxydable, deux bactéries (*E. coli* et *S. epidermidis*) ont été sélectionnées pour leur différence de taille entre elles et avec *Saccharomyces cerevisiae*, leur classification respectivement de type Gram⁻ et Gram⁺ et les problèmes que ces deux bactéries engendrent dans les industries agroalimentaires et/ou les hôpitaux.

I.3.1. *Escherichia coli*

E. coli est une entérobactérie Gram⁻, anaérobie facultative qui colonise typiquement le système intestinal humain. D'une taille d'environ 2µm (**figure 10**), d'épaisseur environ de 0,7µm, de forme ovoïde, elle possède des pili adhésifs (**figure 11**) et des flagelles. Isolée, groupée par deux ou plus rarement en amas, *E. coli* peut apparaître sous forme coccobacillaire ou filamenteuse dans des cultures âgées. Cette bactérie possède une mobilité péritriche réduite, voire une immobilité et se trouve parfois encapsulée. Sa culture est très facile avec une grande tolérance de pH et un pH optimum de 7,5. Sa température optimale de croissance est 37°C mais est également possible entre 15 et 45°C.

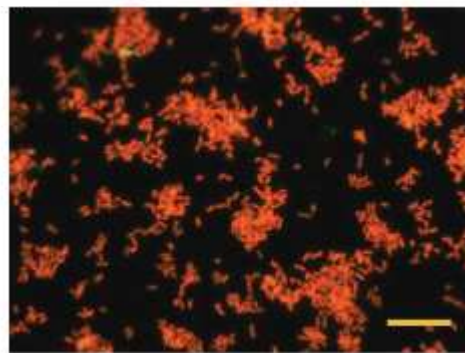


Figure 10: Image de microscopie épifluorescente d'*E. coli* après coloration avec un marqueur de viabilité. Barre d'échelle : 25µm. D'après Kugler et al. (Kugler et al., 2005)

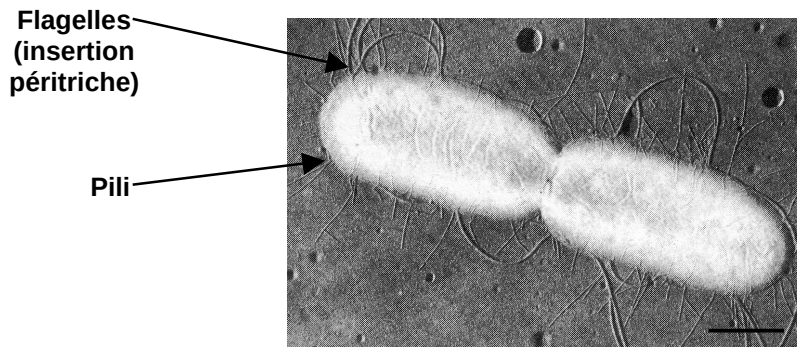


Figure 11 : Flagelles et pili chez *E. coli* (Leclerc et al., 1983)
Barre d'échelle : 0,2µm

E. coli est un germe commensal de l'intestin de tous les animaux y compris l'Homme et représente 80% de la flore intestinale aérobie. Ce germe se retrouve dans les matières fécales et, de là, se répand dans les sols et eaux. Normalement, *E. coli* a une fonction de suppression de bactéries nuisibles et permet de synthétiser de nombreuses vitamines. Cependant, il existe une minorité d'*E. coli* capables de causer des infections humaines. Il peut, s'il arrive à franchir les muqueuses intestinales, devenir pathogène et déterminer des infections urinaires, biliaires, génitales et très rarement une septicémie. C'est un pathogène opportuniste.

Ce microorganisme peut être présent dans certains aliments, comme le bœuf haché, et dans l'eau où ils trahissent une contamination fécale. Aux Etats-Unis, la grande majorité des infections dues à *E. coli* a été causée par la consommation de bœuf haché insuffisamment cuit (ASPC, 2000). En octobre 1996, dans le Connecticut et l'Etat de New-York, des cas de gastro-entérite ont été liés à la consommation de cidre ou de jus de pommes non pasteurisés, mettant en cause, pour certaines contaminations, la contamination des pommes par du fumier (ASPC, 1997). En 1995, dans le Peel Memorial Hospital, dans l'Ontario, une vingtaine de personnes ayant un lien avec l'hôpital, ont souffert d'une colite hémorragique aiguë due à la consommation de salade (ASPC, 1997).

1.3.2. *Staphylococcus epidermidis*

S. epidermidis est une bactérie de type Gram⁺, isolée ou en amas ayant la forme de grappe de raisin de 0,8 à 1µm de diamètre (**figures 12 et 13**). La grande majorité des souches sont capsulées mais certaines perdent leur capsule lors de la culture. La température optimale de croissance est de 37°C.

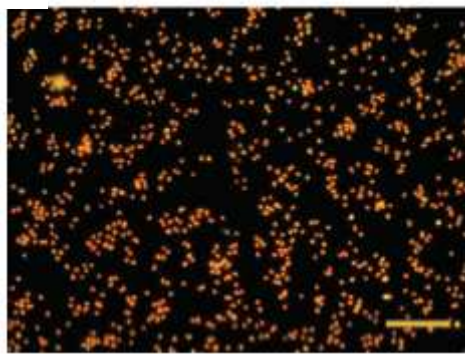


Figure 12: Image de microscopie fluorescente de *S. epidermidis* après coloration avec un marqueur de viabilité. Barre d'échelle : 25µm. D'après Kugler et al. (Kugler et al., 2005)

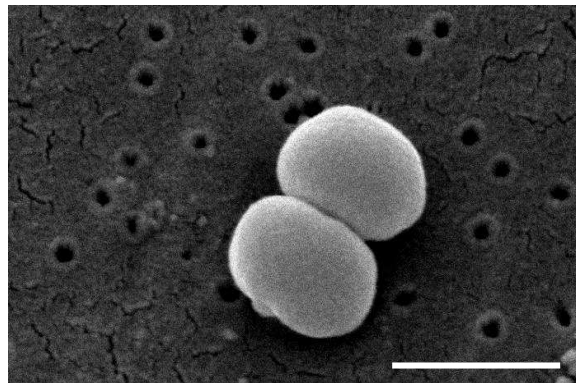


Figure 13 : Micrographie électronique à balayage de *S. epidermidis* (Harin, 2005). Barre d'échelle : 1µm

Cette bactérie opportuniste est responsable essentiellement d'infections nosocomiales, favorisées par la présence de cathéters veineux, de matériaux prothétiques, l'immunodépression et la multirésistance de ce type de bactérie aux antibiotiques. Espèce la plus fréquemment isolée en milieu hospitalier, *S. epidermidis* peut provoquer des infections (septicémies) chez les sujets porteurs de matériel étranger (cathéters intra-vasculaires,

prothèses ostéo-articulaires, boîtiers de stimulation cardiaque, valves de dérivation du liquide céphalo-rachidien...). La production d'exopolysaccharides (EPS) augmente sa capacité d'adhésion aux biomatériaux et empêche la pénétration d'antibiotiques.

II. Les Eucaryotes

Les Eucaryotes constituent un groupe d'organismes unicellulaires ou pluricellulaires assez différent des Bactéries et Archaeobactéries : ils possèdent un noyau entouré d'une membrane, des chromosomes linéaires, une division de la cellule pouvant se faire par méiose (menant à la formation des gamètes) et mitose (réplication de la cellule), une compartimentation cellulaire élémentaire plus ou moins complexe, comprenant notamment des mitochondries. Les Eucaryotes regroupent les plantes, les animaux et champignons ainsi que diverses espèces unicellulaires tels que les amibes ou les paramécies. Au cours de ces travaux de thèse, nous avons choisi d'étudier un eucaryote appartenant au règne des champignons : *Saccharomyces cerevisiae*, la levure de bière.

II.1. *Saccharomyces cerevisiae*

II.1.1. Généralités

Saccharomyces cerevisiae est une levure utilisée depuis l'aube de l'humanité dans l'élaboration du pain, du vin et de la bière de haute fermentation. Ainsi, dans ces domaines, elle est appelée « levure de boulanger » ou « levure de bière ». Elle appartient au règne des champignons et à la division des Ascomycètes. De forme ovoïde et d'une taille de 4 à 5µm (**voir figure 14**), sa reproduction est optimale à une température comprise entre 28 et 30 degrés. Elle se divise par bourgeonnement d'où son nom de « budding yeast », contrairement à d'autres levures comme *S. pombe*, qui se divisent par fission et sont donc appelées « fission yeast ».

Saccharomyces cerevisiae, organisme modèle en biologie cellulaire et en génétique, fut le premier eucaryote dont le génome ait été séquencé en 1996. Son génome de 16

chromosomes est composé de 13 millions de paires de bases et de 6 275 gènes. On estime que cette levure partage 23 % de son génome avec l'Homme.

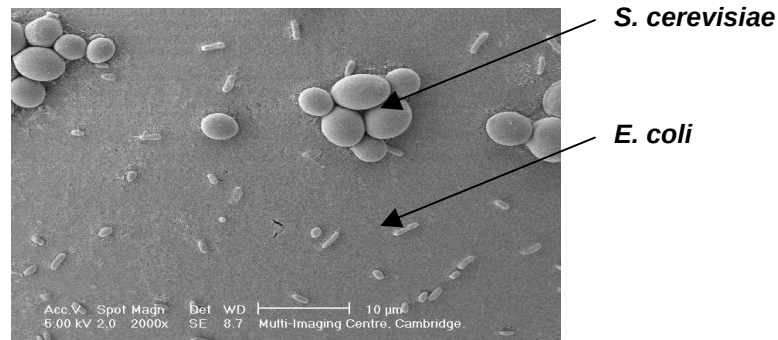


Figure 14 : Amas de *Saccharomyces cerevisiae* accompagnés d'*Escherichia coli* (Wikipédia, 2006)

II.1.2. La paroi des levures

La paroi des levures détermine la forme de la cellule et l'intégrité de l'organisme durant sa croissance et sa division cellulaire. Trois groupes de polysaccharides forment la paroi : des polymères de mannose liés de manière covalente à des peptides (mannoprotéines, 40%), des polymères de glucose (β -glucans, 60%) et des polymères de N-acetyl-glucosamine (chitine, 2%) (Orlean, 1997).

& Les mannoprotéines : la couche externe de la paroi de cellules de levure se compose de protéines qui sont liées, par l'intermédiaire d'une sérine, de thréonine ou d'asparagine, à un complexe de polysaccharide de 150 unités ou plus de D-mannose (les mannanes). La structure de polysaccharide peut atteindre jusqu'à 50% de la masse sèche de la paroi cellulaire. Ces protéines peuvent être reliées à des β 1,6 glucanes par un reste de l'ancre de GPI (glycosylated phosphatidylinositol ou GPI-anchor) qu'ils ont reçue pendant la maturation dans le réticulum endoplasmique. Le manque de l'ancre de GPI a comme conséquence la sécrétion de protéines de la paroi cellulaire (cell wall proteins ou CWPs) dans le milieu (Shimoi et al., 1995) (Kollar et al., 1997). Une autre classe de mannoprotéines est directement liée aux β -1,3-glucans, ce sont les PIR-CWP ou protein with internal repeats-cell wall proteins.

- & Les β -glucanes : deux sous-types de β -glucanes existent : les β -1,3-glucanes les plus abondants; ils forment une structure fibrillaire, composée de trois chaînes linéaires hélicoïdales enlacées, d'environ 1500 $\beta(1\rightarrow3)$ liés à des unités de glucose (Krainer et al., 1994); les β -1,6-glucanes moins abondants et plus courts composés d'un polymère de 100-350 $\beta(1\rightarrow6)$ liés à des unités de glucose (Magnelli et al., 2002).
- & La chitine est un composant essentiel de la paroi cellulaire des levures même si elle ne représente que 1-2% du poids de la masse sèche de la paroi. C'est un homopolymère linéaire composé d'environ 120 résidus de N-acetylglucosamine liés par des ponts $\beta(1\rightarrow4)$. Dans *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*, il a été démontré que la chitine était attachée de manière covalente à des β -1,3 et des β -1,6-glucanes (Kapteyn et al., 1997) (Klis et al., 2001). L'ensemble de ces données est résumé dans **la figure 15**.

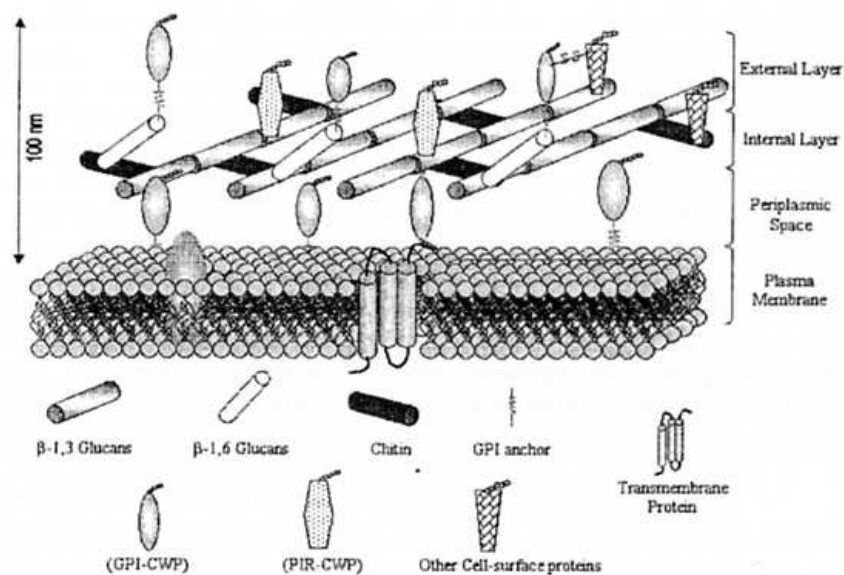


Figure 15 : Modèle moléculaire de la paroi cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* (Martin-Yken et al., 2002)

Un autre exemple d'eucaryote est celui de l'amibe *Dictyostelium discoideum* dont la cinétique de détachement a été étudiée par Décavé et al. (Décavé et al., 2002) (Décavé et al., 2002). Le paragraphe suivant résume quelques-unes de ses caractéristiques.

II.2. *Dictyostelium discoideum*

D. discoideum est un organisme reconnu par le NIH (*National Institutes of Health*, USA) comme modèle pour la recherche biomédicale. C'est un microorganisme pouvant se déformer et avancer en émettant des pseudopodes. En conditions nutritives, *Dictyostelium discoideum* se présente sous forme d'une petite cellule d'environ 10µm de diamètre se nourrissant par phagocytose de bactéries ou de levures et se divisant de manière mitotique (Kessin, 2001). En cas de carence nutritive, les cellules s'engagent dans un processus de différenciation et de morphogenèse conduisant à la formation d'une structure pluricellulaire. Ceci débute par l'émission d'un chimio-attractant : l'AMPc qui attire les autres amibes du voisinage. Celles-ci produisent à leur tour de l'AMPc. Cela aboutit à des agrégats d'amibes qui vont, par la suite se différencier en une sorte de "limaçon" (16h de culture), dont la taille peut atteindre jusqu'à 1 millimètre et qui peut se déplacer pendant plusieurs heures sur le substrat. Vers 24h de culture, une fructification a lieu avec l'apparition d'une tige et d'une masse de spores, le tout reposant sur un disque basal. Les cellules de *Dictyostelium discoideum* n'ont qu'une simple membrane plasmique dans laquelle sont insérées des protéines transmembranaires comme les intégrines. Il n'y a pas d'intégrines, au sens strict, chez *D. discoideum* mais trois classes de protéines d'adhérence : phg IA et IB (Cornillon et al., 2000), sad A (Fey et al., 2002) et phg 3 (=sib A) qui présente des similitudes avec les intégrines (Cornillon et al., 2006).

Depuis quelques années, de nouvelles méthodes d'étude et de détection des cellules adhérentes, présentées dans le paragraphe suivant, sont apparues permettant d'élargir le panel des techniques existantes.

III. Etude de l'adhésion et de la quantification du nombre de cellules adhérentes

III.1. Méthodes expérimentales d'observation

Lors de cette thèse, nous avons utilisé **la microscopie à fluorescence** afin de détecter et compter le nombre de cellules adhérentes sur le substrat. Cet outil d'analyse permet de

détecter, quantifier et fournir des images aussi bien des composants naturels des systèmes biologiques que des sondes extrinsèques (antibiotiques, désinfectants, marqueurs d'activité...). La résolution de la distribution d'intensité de fluorescence peut être effectuée de manière spectrale et temporelle permettant ainsi de sonder localement les biofilms (Lacroix-Gueu et al., 2005). Certains marqueurs fluorescents comme l'acridine orangée, se liant à l'ADN et aux ARN cellulaires (McFeters et al., 1991), ou le DAPI (4',6-diamidio-2-phenylindole dihydrochloride) se liant spécifiquement à l'ADN, sont couramment utilisés afin de dénombrer et de visualiser les cellules adhérentes. C'est, par ailleurs, cette technique que nous allons utiliser lors des expériences menées au cours de cette thèse. Les marqueurs fluorescents permettent également de distinguer certaines espèces bactériennes au sein de populations pluri-bactériennes (Shapiro, 2000) ou de visualiser la viabilité des cellules étudiées (Allion, 2004) (Bunthof et al., 1999) (Mortimer et al., 2000).

Une autre technique de microscopie, **la microscopie électronique à balayage (MEB)** permet, entre autre, de visualiser les appendices (pili et flagelles) des bactéries qui jouent un rôle aussi bien dans la mobilité des cellules que dans leur adhésion (Beveridge and Graham, 1991; Prigent-Combaret et al., 2000). Cette technique permet également de mesurer les variations de concentrations de certaines espèces chimiques importantes pour évaluer et comprendre l'activité des micro-organismes étudiés. Néanmoins, l'observation par la technique MEB pose certains problèmes liés à la préparation et à la déshydratation pouvant engendrer la perte de certains appendices comme les pili. De plus, elle ne permet pas d'observer, en continu, des phénomènes dynamiques.

Récemment, le développement de nouvelles approches de **biologie moléculaire** telles que les puces à ADN, la protéomique, l'hybridation soustractive d'ADNc, ont permis aujourd'hui de commencer à dresser un inventaire des différences d'expression génique des bactéries incluses en biofilms et ou en suspension (Vilain et al., 2004) (Vilain et al., 2004). On peut ainsi obtenir et caractériser des mutants bactériens avec des propriétés d'adhésion altérés (Le Thi et al., 2001).

Une autre technique, **la technique ATR-FTIR** (Attenuated Total Reflectance- Fourier Transform Infrared spectroscopy), offre des avantages significatifs tels que l'investigation du développement *in situ* de microorganismes, non-destructurant, en temps réel et en condition hydratée (Schmitt and Flemming, 1998). Cependant, cette technique n'offre qu'une mesure globale du nombre de cellules et non les variations existantes sur l'ensemble d'une surface.

Enfin, on peut utiliser **la technique AFM (Microscopie à Force Atomique)** qui apporte des indications précieuses sur les propriétés physico-chimiques et mécaniques des

enveloppes bactériennes, notamment la variation de structure des enveloppes bactériennes selon différentes valeurs de pH (Gaboriaud et al., 2005). Récemment, la technique AFM s'est avérée être un outil très puissant pour explorer la surface, à l'échelle nanométrique, de microorganismes, que ce soit du point de vue structural, des propriétés physiques ou des interactions moléculaires (Dufrene, 2002) (Dufrene, 2003; Dufrene, 2004; Nunez et al., 2005; Touhami et al., 2006). Par ailleurs, cette technique permet de cartographier, à l'échelle du nanomètre, des propriétés de surface comme l'adhésion, la charge (Ahimou et al., 2003), l'hydrophobie (Dufrene, 2000) et l'élasticité.

Cette liste est loin d'être exhaustive... Cependant, cette étude de l'adhérence et du détachement de cellules peut être affectée dès le départ par des paramètres liés au microorganisme lui-même, son mode de culture.

III.2. Paramètres affectant l'adhérence cellulaire aux matériaux

De nombreux facteurs peuvent modifier l'adhésion cellulaire sur des surfaces de matériau. Parmi ceux-ci, certains sont liés à la physiologie du microorganisme lui-même, la présence d'appendices (pili, flagelle...), le mode de culture, le temps de contact avec le substrat et la composition du milieu de suspension.

III.2.1. Le caractère hydrophobe des cellules

L'hydrophobie globale d'un microorganisme peut être mesurée à l'aide de la technique MATS (Microbial Adhesion To Solvents ;(Bellon-Fontaine et al., 1996)). En effet, il a été démontré que cette caractéristique du microorganisme se révèle importante du point de vue de l'adhésion. Faille et al. (Faille et al., 2002) ont démontré, par exemple, que le nombre de spores hydrophobes adhérentes de *Bacillus cereus* et leur résistance aux procédures de nettoyage étaient dix fois plus élevés par rapport à des spores hydrophiles de *Bacillus subtilis*. Cette hydrophobie peut être également dépendante de l'état physiologique des cellules. Ainsi, l'équipe de Bellon-Fontaine (Bellon-Fontaine et al., 1990) a démontré des souches non encapsulées étaient sensibles à l'énergie de surface du substrat, tandis que les souches encapsulées n'y étaient pas sensibles.

III.2.2. La présence d'appendices (pili, flagelle) ou de substances polymériques extra-cellulaires

La stabilité des biofilms peut être due à la présence d'appendices. Plusieurs auteurs ont décrit l'influence positive de la présence de flagelles et de la mobilité sur les différentes étapes de formation du biofilm (Lejeune, 2003) (O'Toole and Kolter, 1998) (Piette and Idziak, 1991) (Gavin et al., 2003) (Soutourina and Bertin, 2003) (Vatanyoopaisarn et al., 2000) (Moreira et al., 2003). Les flagelles peuvent, en effet, faciliter le contact avec le substrat en franchissant la zone de répulsions électrostatiques (Herald and Zottola, 1988) et ceci peut aider à former une couche plus importante de cellules directement en contact avec la surface. Les pili jouent également un rôle primordial dans l'adhésion et/ou l'autoaggrégation des microorganismes (Bieber et al., 1998), les bactéries n'ayant pas de pili étant moins adhérentes que les autres (Fletcher et al., 1993). L'expression de certains types de pili, comme le type IV (Park et al., 2002) (Rakotoarivonina et al., 2002) ou le type III (Di Martino et al., 2003), peut être corrélée avec la capacité de la bactérie à coloniser l'homme, aussi bien en adhérant au tissu épithélial, ou en permettant la motilité ou la compétence pour la transformation naturelle et l'autoagglutination. Le rôle des appendices dans l'adhérence explique la capacité des cellules, aux propriétés de surface différentes, à coloniser le même type de surface.

La synthèse et la présence de composés extra-cellulaires influencent l'adhésion. Ainsi, il a été mis en évidence que les rhamnolipides, glycolipides extracellulaires, peuvent faciliter la motilité, notamment de *P. aeruginosa* (Deziel et al., 2003) (Kohler et al., 2000), affecter l'architecture du biofilm, en permettant les interactions cellules-cellules et l'attachement des cellules aux substrats (Davey et al., 2003), et altérer la polarité de la surface cellulaire (Zhang and Miller, 1994). L'adhésion cellulaire initiale aux surfaces matérielles est modulée, également, par la présence de substances polymériques extracellulaires (EPS) produites microbiologiquement et comprenant différentes macromolécules (Beech et al., 2005). Ces EPS sont les matériaux de construction pour les agrégats microbiens tels que les biofilms, les floculations (« biofilms planctoniques »). Leurs composants majeurs ne sont pas uniquement des polysaccharides mais également des protéines et dans certains cas des lipides, avec une minorité d'acides nucléiques et d'autres biopolymères. La matrice EPS est un système dynamique construit par les organismes et répondant aux changements environnementaux (Flemming and Wingender, 2001).

Les rôles des EPS sont multiples : protection cellulaire contre des facteurs non favorables (Ryu and Beuchat, 2005) (Ryu et al., 2004), rôle dans le métabolisme des microorganismes, interactions avec d'autres organismes, adhésion à des objets de nature inorganique (Pyrog, 2001) (Tsuneda et al., 2003) et rôle dans l'architecture du biofilm (Danese et al., 2000).

III.2.3. Le mode de culture

Le mode de culture est une caractéristique importante qui peut modifier fortement l'adhésion des organismes. Il a été démontré que la température de croissance avait un effet significatif sur la mobilité électrophorétique cellulaire et la production de flagelles (Briandet et al., 1999) et, par conséquent, sur l'adhésion.

La température de croissance et la phase de croissance peuvent modifier la composition de la paroi et donc les propriétés électriques de surface, l'hydrophilie et le caractère électron donneur, électron accepteur des bactéries (Chavant et al., 2002) (Briandet et al., 1999) (Santiago et al., 1999) (Toren et al., 1998) et l'expression des gènes d'adhésion (Toren et al., 1998). La composition de la paroi cellulaire peut être affectée par l'aération de la culture. En utilisant un flux d'air de 0,5 l/min, Aguilar-Uscanga a ainsi pu maintenir un taux d'oxygène constant de 50% ($pO_2 > 50\%$) et comparer à une pression partielle en O_2 nulle : le taux de croissance et de chitine était nettement meilleur quand la pression partielle en O_2 était supérieure à 50% (Aguilar-Uscanga and Francois, 2003).

La vitesse de rotation lors des centrifugations modifie l'hydrophobie des cellules : Pour *E. coli*, lorsque la vitesse de rotation augmente, l'hydrophobie des cellules augmente et donc l'adhésion aux substrats diminue ; à l'opposé pour *S. epidermidis*, l'adhésion se trouve renforcée. Ceci s'explique par le fait que les cellules endommagées par les contraintes élevées, dues aux forces de cisaillement de centrifugation, relarguent leur matériel intracellulaire qui contribue à une modification de la surface cellulaire des cellules vivantes restantes et à une modification de leur hydrophobie.

III.2.4. Le temps de contact entre le microorganisme et son substrat

Le temps de contact entre le microorganisme et son substrat est également très important et très influent sur l'adhésion. Ainsi, certains auteurs ont pu mettre en évidence un

adhésion plus forte des cellules sur une plaque de verre après un temps de contact (Mercier-Bonin et al., 2004) (Beresford et al., 2001) ou d'incubation plus longs (Fletcher et al., 1993).

III.2.5. Le milieu de suspension

Le milieu de suspension présente de nombreux paramètres tous aussi importants les uns que les autres. Parmi eux, la composition et la force ionique influent nettement sur la capacité cellulaire à adhérer. En effet, les énergies interfaciales entre la bactérie, le milieu et le substrat jouent, comme nous l'avons vu précédemment (chapitre III) sur l'adhésion (Stanley, 1983). Ainsi, en augmentant la concentration de plusieurs cations du milieu ou des nutriments, l'adhésion se trouve modifiée (Fletcher, 1988) (Cowan et al., 1991).

A l'opposé, certains auteurs n'ont pas trouvé d'influence de la force ionique du milieu sur l'adhésion bactérienne. Par exemple, l'équipe de Mercier-Bonin a testé des solutions salines de 0,2; 0,9 et 2% w/v correspondant à une force ionique de 33, 150 et 330 mM respectivement. Ceci n'a pas eu de réelle influence sur l'adhésion de levures initialement emballées sous formes d'agrégats secs en forme de tiges (Mercier-Bonin et al., 2004). Vallido-Rodriguez a trouvé une adhésion similaire sur des surfaces hydrophobes et hydrophiles avec des forces ioniques variant de 10 à 100 mM (solution tampon de KCl) (Vadillo-Rodriguez et al., 2005). Le pH du milieu est aussi un facteur pouvant changer l'adhésion cellulaire (Briandet et al., 1999).

La combinaison de méthodes microscopiques, microscopie à balayage d'électrons, microanalyse de sondes à électrons et la microscopie à force atomique permettent d'évaluer et de corréliser les formes et les fonctions des modifications de surfaces et d'étudier ainsi leur influence sur l'adhésion des microorganismes (Arnold et al., 2004). Par ailleurs, lors de cette adhésion, des interactions physico-chimiques ont lieu. Celles-ci sont expliquées dans le chapitre III.

Chapitre III : Interactions physico-chimiques mises en jeu lors de l'adhésion

Durant le transport d'un microorganisme d'un fluide à une surface, celui-ci est soumis à des modifications de forces intervenant lors de son dépôt sur la surface et lors de son détachement.

I. Interactions électrostatiques

Une particule en suspension et une surface immergée acquièrent une charge de surface due à l'adsorption ionique ou l'ionisation des groupements chargés présents en surface (James, 1991). La concentration d'ions diffère aux interfaces par rapport à l'intérieur de chaque phase (solide, liquide) engendrant une double couche ionique associée aux surfaces bactériennes et solides souvent qui sont négatives (Verhnet et al., 1992). Cette double couche présente deux régions : une dite compacte appelée **couche de Stern**, d'épaisseur 1 nm, matérialisant la distance minimum d'approche des ions, hydratés ou non et possédant un potentiel ψ_0 ou potentiel de surface (**figure 16**) ; la deuxième partie de l'interface est constituée par la couche diffuse. Elle s'étend jusqu'au centre de la solution. La distribution ionique n'y est pas uniforme car un champ électrique la traversant favorise une nette attraction des cations vers la surface chargée. Le plan séparant ces deux couches est appelé **plan de Helmholtz**. Dans la couche diffuse, le potentiel ψ décroît de manière exponentielle en fonction de la distance. La distance caractéristique est appelée distance de Debye (d).

Pour de fortes concentrations en électrolytes, l'épaisseur de la double couche est faible et les interactions électrostatiques liées au recouvrement de cette couche seront faibles. L'effet des charges de surface est masqué. On observe le phénomène inverse lors de solutions faiblement chargées.

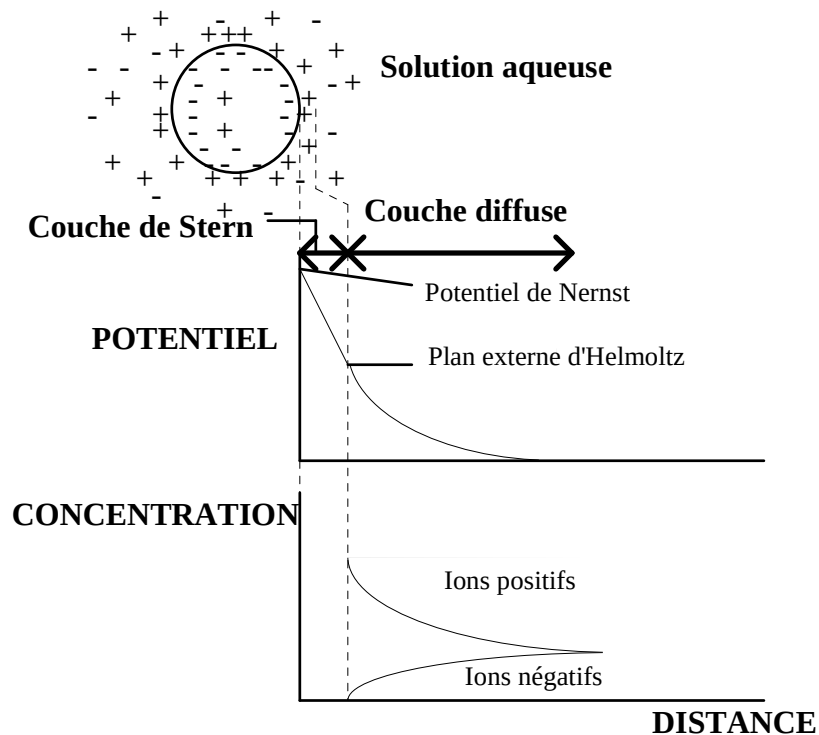


Figure 16 : Modèle de Stern. Représentation schématique de la variation de potentiel en fonction de la distance de la particule chargée (d'après (Boulangé-Petermann, 1993))

II. Approche thermodynamique

II.1. Notions de l'approche thermodynamique

La base de l'adhésion, selon la théorie thermodynamique, est constituée par les interactions entre atomes et molécules. A l'échelle moléculaire, l'adhésion est assurée grâce aux interactions de van der Waals, constituées essentiellement d'interactions dispersives et aux interactions acido-basiques, aux forces électrostatiques, liaisons hydrogènes et hydrophobie de la surface. Ces interactions sont dépendantes de la tension et de l'énergie libre superficielle du liquide et du solide.

Les forces de van der Waals ont plusieurs origines. On dénombre trois effets : les forces de Keesom ou effets d'orientation, les forces de Debye ou effets d'induction et les forces de London ou effets de dispersion. Les forces de Keesom résultent d'une interaction intermoléculaire entre dipôles permanents et sont principalement liées à l'électronégativité. Elles apparaissent entre au moins deux molécules polaires (dipôles dits permanents), d'où leur

ancien nom d'interaction « dipôle-dipôle ». Les forces de Keesom, tout comme les forces de Debye (dipôle permanent /dipôle induit) et de London (dipôle induit /dipôle induit) ne sont qu'une composante des forces de Van der Waals. Les forces de dispersion de London sont des forces faibles intermoléculaires créées par des dipôles induits. Elles sont comprises dans les forces de van der Waals et existent du fait que la densité électronique des molécules est probabiliste : il y a une forte chance à tout moment pour que celle-ci ne soit pas équitablement répartie à travers la molécule, ce qui crée un léger moment dipolaire. Les moments dipolaires vont varier très rapidement au cours du temps. Ainsi à chaque distribution hétérogène se crée un moment dipolaire induit qui peut interagir avec les moments dipolaires induits des molécules voisines et une force s'exerce entre les molécules. Naturellement, ces dipôles induits peuvent également réagir avec un dipôle permanent (molécule polaire) mais les forces qui en résultent prennent alors le nom de forces de Debye. L'effet apparaît également dans les molécules polaires, mais ce sont alors les forces de Keesom qui prennent le dessus le plus souvent et les forces de London jouent alors un rôle souvent minime dans les interactions entre dipôles (Parsegian, 2005).

II.1.1. La tension superficielle d'un liquide

Pour un liquide, les molécules internes du liquide et du gaz attirent de manière respectivement forte et faible, un atome situé à la surface de ce liquide. Ceci entraîne la création d'une tension superficielle γ_L . Pour pouvoir augmenter la surface d'une quantité dS , il faudra un travail $dW = \gamma_L dS$ (Dubois, 2000). Si on considère la tension entre deux liquides, on parle de tension interfaciale.

II.1.2. Energie libre superficielle d'un solide

Pour un solide, on ne parle plus de tension superficielle mais d'énergie libre superficielle γ_s . Celle-ci résulte d'un déséquilibre entre les liaisons atomiques libres en surface auquel viennent s'ajouter les déséquilibres dus aux espèces adsorbées.

Les interactions entre les atomes peuvent être de nature dispersives (γ^d), covalentes (γ^c), ioniques (γ^i), polaires (γ^p) ou métalliques (γ^m). On peut donc écrire :

$$\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^c + \gamma_s^i + \gamma_s^p + \gamma_s^m + \dots \quad (1)$$

Fowkes, en 1964, réduisit cette équation aux forces de dispersion de London et aux interactions acide-base d'où :

$$\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p \quad (2)$$

Avec γ_s^d composante dispersive de l'énergie superficielle du solide et γ_s^p composante polaire.

II.1.3. Energie libre interfaciale

Lorsqu'on considère l'énergie entre deux interfaces (solide-liquide), les molécules de chaque phase subissent des attractions au sein même de leur phase. Cette énergie libre γ_{SL} est différente de γ_s et γ_L . Elle peut être décomposée également en interactions dispersives et polaires :

$$\gamma_{SL} = \gamma_{SL}^d + \gamma_{SL}^p \quad (3)$$

II.1.4. Exemple d'adhésion d'une bactérie, immergée dans un milieu, sur un solide

Pour un système bactérie-liquide-solide où les effets de charges électriques ou d'interactions biochimiques spécifiques peuvent être négligés (Absolom et al., 1983), le changement de la fonction d'énergie libre (ΔF^{adh}), est, par aire de surface :

$$\Delta F^{adh} = \gamma_{BS} - \gamma_{BL} - \gamma_{SL} \quad (4)$$

où F^{adh} est l'énergie libre de surface d'adhésion, γ_{BS} est la tension interfaciale bactérie-substrat, γ_{BL} est la tension interfaciale bactérie-liquide et γ_{SL} est la tension interfaciale substrat-liquide. L'adhésion pourra avoir lieu si F^{adh} est négative.

II.2. Mouillabilité et capillarité

La mouillabilité caractérise la facilité avec laquelle une goutte de liquide s'étale sur une surface solide. C'est une méthode couramment utilisée dans l'étude des phénomènes d'adhésion qui permet, entre autre, de déterminer l'énergie thermodynamique d'adhésion et, donc, de manière indirecte l'énergie libre superficielle du solide.

II.2.1. La méthode de la goutte posée

Suivant les interactions ayant lieu entre un solide et un liquide, une goutte de liquide déposée sur un substrat solide prend une configuration plus ou moins étalée. En 1805, Young décrit l'équilibre thermodynamique d'une goutte liquide sur un solide dans un système solide/liquide/vapeur (**figure 17**) par :

$$\gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos\theta \quad (5)$$

où γ_{SV} est l'énergie libre superficielle du solide en présence de la vapeur du liquide ;

γ_{LV} est la tension superficielle du liquide en présence de sa vapeur ;

γ_{SL} est l'énergie libre interfaciale entre le liquide et le solide ;

θ est l'angle de contact du liquide sur le solide.

et

$$\gamma_{SV} = \gamma_S - \pi_e \quad (6)$$

avec γ_S énergie de surface du solide sous vide

et π_e pression d'étalement

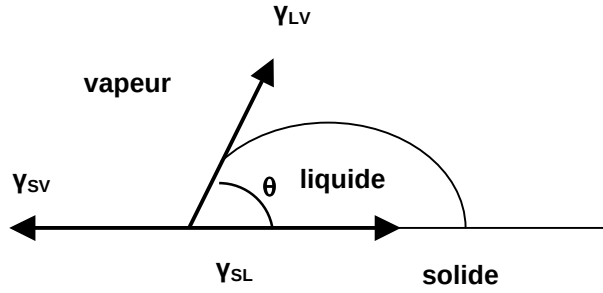


Figure 17 : mouillage d'un solide par une goutte liquide (de Gennes et al., 2003)

Ainsi, si une surface est hydrophobe, l'affinité de l'eau et le solide sera faible et les angles de contact à l'eau seront élevés ($\theta > 90^\circ$). Sur une surface hydrophile, l'affinité entre l'eau et le solide sera importante d'où des mesures d'angles de contact faibles ($\theta < 90^\circ$).

II.2.2. Modèles physico-chimiques des énergies de surface

II.2.2.a. Modèle d'Owens et Wendt (Owens and Wendt, 1969)

Dans ce modèle, les composantes polaire γ_s^p et dispersive γ_s^d de l'énergie de surface des solides sont exprimées selon l'équation géométrique :

$$\gamma_{SL} = \gamma_s + \gamma_L - 2(\gamma_s^d \gamma_L^d)^{1/2} - 2(\gamma_s^p \gamma_L^p)^{1/2} \quad (7)$$

II.2.2.b. Modèle de Van Oss, Good et Chaudhury (van Oss and Good, 1988):

Dans le modèle Van Oss, Good et Chaudhury, l'énergie interfaciale entre un solide et un liquide s'écrit avec :

$$\gamma_{SL} = \gamma_s + \gamma_L - 2(\gamma_s^{LW} \gamma_L^{LW})^{1/2} - 2(\gamma_s^+ \gamma_L^-)^{1/2} - 2(\gamma_L^+ \gamma_s^-)^{1/2} \quad (8)$$

avec γ_{LW} composante des interactions de Lifshitz-van-der-Waals, γ^+ et γ^- le caractère donneur ou accepteur d'électrons des surfaces. Par ailleurs,

$$\gamma^{\text{AB}} = 2(\gamma^+ \gamma^-)^{1/2} \quad (9)$$

$$\text{et } \gamma = \gamma^{\text{LW}} + \gamma^{\text{AB}} \quad (10)$$

avec γ^{AB} composante acido-basique de la surface.

En utilisant des liquides différents dont les composantes dispersives et polaires sont connues, on peut obtenir l'énergie de surface du solide.

Conclusion de la synthèse bibliographique

La bio-adhérence est, en partie, expliquée par les forces interfaciales directement liées à la surface du solide, au liquide de suspension et au micro-organisme. Concernant le micro-organisme adhérent, la possession d'appendices, de composants extracellulaires, l'hydrophobicité, la charge de surface et la taille de cellules peuvent clairement modifier l'adhésion. La température peut changer la structure de la paroi cellulaire et par conséquent les forces interfaciales mises en jeu dans les mécanismes d'adhésion.

Les propriétés de surface d'un acier telle que la composition chimique, la rugosité, trous, inclusions et recouvrement par des films d'oxyde ou des revêtements organiques, jouent un rôle dans l'adhésion. La topographie et la composition du film passif de l'acier inoxydable influent sur l'adhérence du micro-organisme. La mouillabilité et l'énergie de surface sont également d'une importance non négligeable. Enfin, la composition moyenne aqueuse du liquide de suspension, la présence des macromolécules, de nutriments, le pH et la température sont des variables importantes.

MATERIEL ET METHODES

Chapitre IV : Obtention et analyses des aciers inoxydables

I. Préparation des matériaux

Lors de ces travaux de thèse, le matériau utilisé est un acier inoxydable austénitique AISI 304. En industrie, les tôles d'acier austénitique sont obtenues à partir d'une coulée continue directe en brame d'épaisseur voisine de 8mm. Ensuite, ces tôles subissent un laminage à chaud les ramenant à 3mm d'épaisseur. Elles subissent ensuite un recuit et un laminage à froid qui les amènent à une épaisseur de $1,5 \pm 0,1$ mm. La tôle obtenue est alors à l'état écroui. Pour finir, un recuit final de recristallisation et d'adoucissement est réalisé sous atmosphère protectrice dans le cas d'un fini recuit brillant (ou 2R) ou sous atmosphère oxydante suivie d'un décapage chimique pour un fini recuit décapé (ou 2B).

Les essais d'adhérence cellulaire sont réalisés sur des échantillons de $39 * 45 \text{ mm}^2$ découpés dans une tôle d'acier inoxydable AISI 304 d'épaisseur $1,5 \pm 0,1$ mm. L'analyse du métal est présentée dans la **table 2** ci-dessous.

Composition chimique (% massique)										Dureté (HRC)
C	Cr	Ni	Mn	Si	Mo	Cu	Co	N2	Ti	
0	18	8	0,8	0,4	0,2	0,1	0,1	0,1	0	43

Table 2 : Caractérisations effectuées sur le métal de base

II. Traitements thermiques et analyses des grains obtenus

II.1. Traitement thermique

Après la découpe, les échantillons (exceptés ceux avec un état de surface poli miroir PM) subissent un traitement thermique dans un four (Nagat[®]) à 1150°C. Ce recuit conduit à une croissance de grain (**voir figure 18**) de taille définie en fonction du temps passé dans le four.

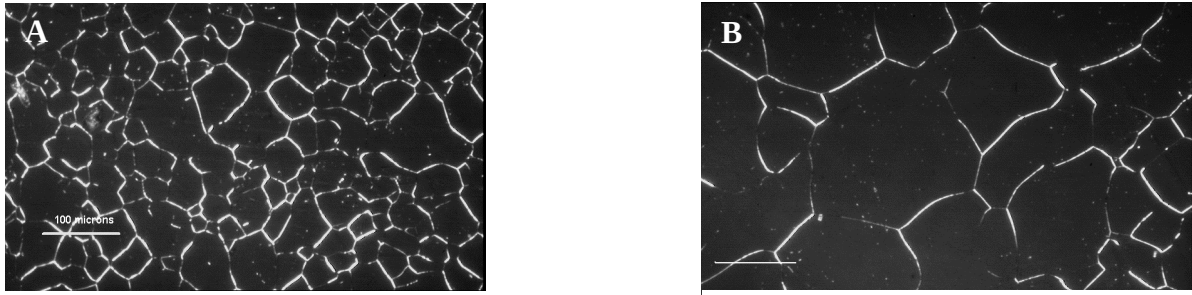


Figure 18 : Visualisation de la croissance de grains. Photos en lumière réfléchie (G x20) d'échantillons polis attaqués. A : d'une taille de grain 40µm (barre d'échelle 100µm) ; B : d'une taille de grain de 100µm (barre d'échelle 100µm)

II.2. Evaluation de la taille des grains

L'évaluation de la taille du grain s'effectue selon la norme ASTM E.112 ; cette méthode de l'intercepte circulaire à un cercle se trouve être la méthode la plus couramment utilisée. Elle consiste à comptabiliser le nombre de joints de grains d'un échantillon, appelés interceptes, que coupe un cercle, appelé champ, de diamètre de 79,58 mm disposé sur le verre dépoli du microscope ou de diamètre de 7,95 mm situé dans les oculaires de grossissement x10. Le nombre de champs n'est pas imposé, mais il est recommandé d'effectuer 5 mesures avec un minimum de 20 à 25 interceptes par champ. Les champs doivent être sélectionnés au hasard. Le grossissement du microscope (SME Olympus® Tokyo) doit être adapté pour avoir au moins 20 interceptes. Pour obtenir l'indice ASTM de la taille du grain, on applique la formule ci-dessus :

$$\text{Indice ASTM} = 6.644 \times \log_{10} [(N \text{ moyen} \times g)/250] - 3.288 \quad (11)$$

Avec N moyen la valeur moyenne du nombre total d'interceptes divisé par le nombre de champ observés ; g, le grossissement utilisé pour les mesures du nombre d'interceptes ; 250, la circonférence en mm du cercle de diamètre de 79,58. Le résultat de l'indice ASTM est arrondi au dixième supérieur ou inférieur.

Cependant, par gain de temps, l'évaluation de la taille du grain est récapitulée dans la **table 3** comprenant les mesures réalisées à un grossissement x100 et x200. L'indice ASTM est connecté à la taille réelle des grains suivant la relation :

$$d = \frac{1000}{\sqrt{2^{(G+3)}}}$$

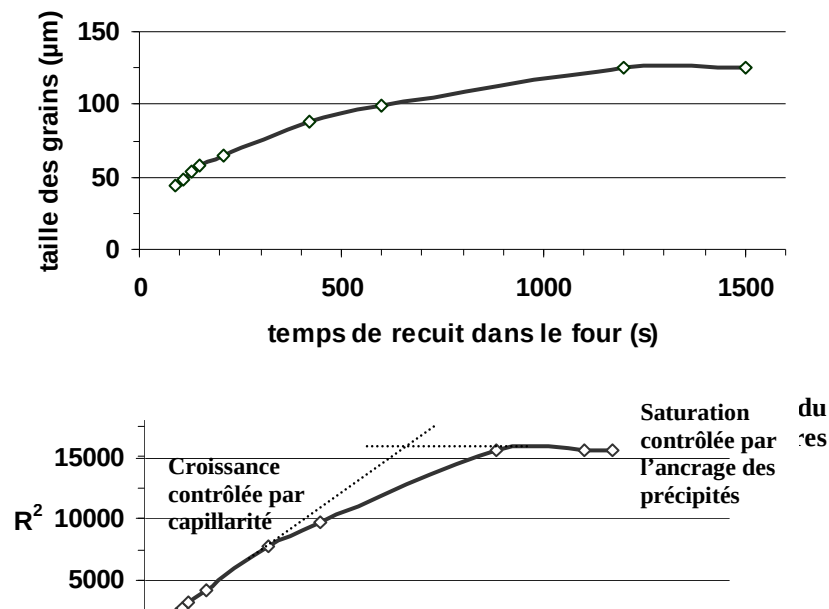
(12)

Avec d correspondant au diamètre moyen des grains (en μm) et G l'indice ASTM des grains.

temps de recuit (s)	Grossissement x100		Grossissement x200		taille des grains (μm)
	Nbre moyen d'interceptes	Indice ASTM	Nbre moyen d'interceptes	Indice ASTM	
30	-	-	69	8,29	20
80	-	-	34,5	6,29	40
90	-	-	31	5,98	44,5
110	-	-	29	5,78	47,7
130	-	-	26	5,47	53,1
150	-	-	24	5,24	57,5
210	-	-	21	4,85	65
420	31,5	4,02	-	-	87,8
600	28	3,68	-	-	98,8
610	29,5	3,83	-	-	100
900	25,5	3,41	-	-	108,5

Table 3: Evaluation de la taille du grain à un grossissement x100 et x200 selon la norme ASTM. Les caractères en gras (20, 40 et 100 μm) sont les tailles de grain utilisées, par la suite, lors des expériences

On obtient ensuite la courbe de croissance des grains en fonction du temps de recuit (**figure 19**). Cependant, cette croissance de grain en fonction du temps de recuit n'est pas infinie. On constate que la croissance commence avec une cinétique parabolique – le carré de la taille de grain est une fonction affine du temps de recuit (**figure 20**) – qui est caractéristique d'une évolution contrôlée par la réduction de surface de joints de grain. Cette cinétique ralentit ensuite jusqu'à saturation des tailles de grain, due aux particules ancrant les joints de grain.



II.3. La technique Electron Back Scattering Diffraction (EBSD)

Afin de visualiser l'orientation cristallographique des grains, une analyse EBSD (Electron Back Scattering Diffraction) a été effectuée. L'analyse EBSD a été réalisée en utilisant un filament en Tungstène et en balayant les électrons avec un microscope (Jeol 840A) opérant à 20 kV avec une distance de travail de 20 mm. Le faisceau d'électrons est diffracté et les profils sont capturés à l'aide d'une caméra analogique CCD et indexés avec un système OIMTM TSL. L'orientation des grains est caractérisée par la normale de la surface exposée. Le dispositif expérimental est décrit aux **figures 21 et 22**.

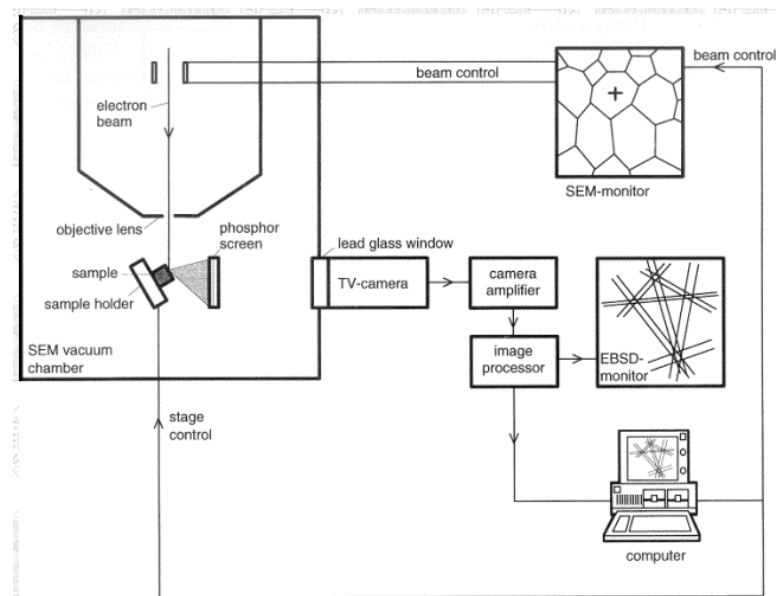


Figure 21: Schéma du dispositif expérimental de la technique EBSD

Le schéma de la **figure 21** représente le dispositif expérimental général de la technique EBSD. La **figure 22** représente le schéma et la photo de la zone encadrée à la **figure 21** où a lieu la capture des électrons diffractés.

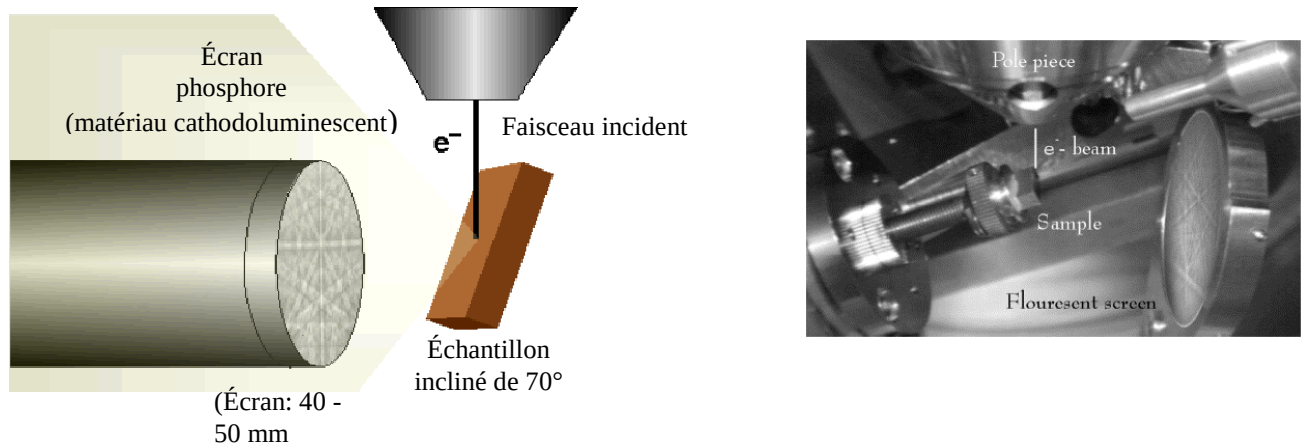


Figure 22 : Schéma et photo du dispositif de bombardement de l'échantillon par un faisceau d'électrons dont les électrons diffractés sont capturés sur un écran de phosphore

Un grain a une orientation cristallographique donnée. Le diagramme de diffraction des électrons sera donc caractéristique de la structure cristalline et de l'orientation cristallographique de chaque grain. Au passage d'un joint de grain, cette orientation cristallographique change ainsi que, par conséquent, la position du faisceau d'électrons diffracté également. Cette position du faisceau d'électrons étant connue pour chaque diagramme, on obtient en fin d'acquisition une cartographie d'orientation des grains qui révèle la microstructure de l'échantillon (morphologie, taille des grains...) (**figure 23**).

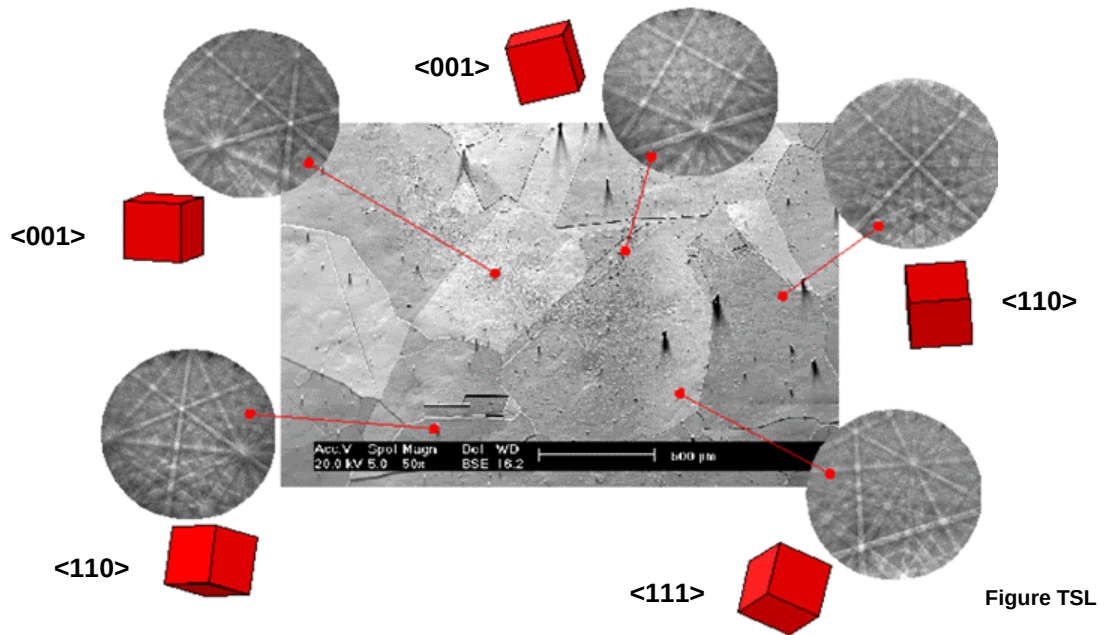


Figure 23: Obtention des différents faisceaux d'électrons et des orientations cristallographiques correspondantes

Il existe trois orientations cristallographiques privilégiées (**figure 24**), déterminées par les indices de Miller (h,k,l) : <001>, <110> et <111>. Pour chacun de ces plans, on peut calculer la distance réticulaire i.e. la distance séparant deux plans de même orientation :

$$d_{hkl} = a / (h^2 + k^2 + l^2)^{1/2}$$

avec a = paramètre de maille

L'orientation <001> correspond aux faces du cube et sa distance réticulaire $d_{<001>} = a$. La distance réticulaire des orientations <110> et <111> vaut, respectivement $d_{<110>} = a / \sqrt{2}$ et $d_{<111>} = a / \sqrt{3}$. L'orientation cristallographique <001> possède donc la distance réticulaire la plus grande. Ainsi, les plans <001> seront les moins denses et leur énergie de surface sera la plus importante.

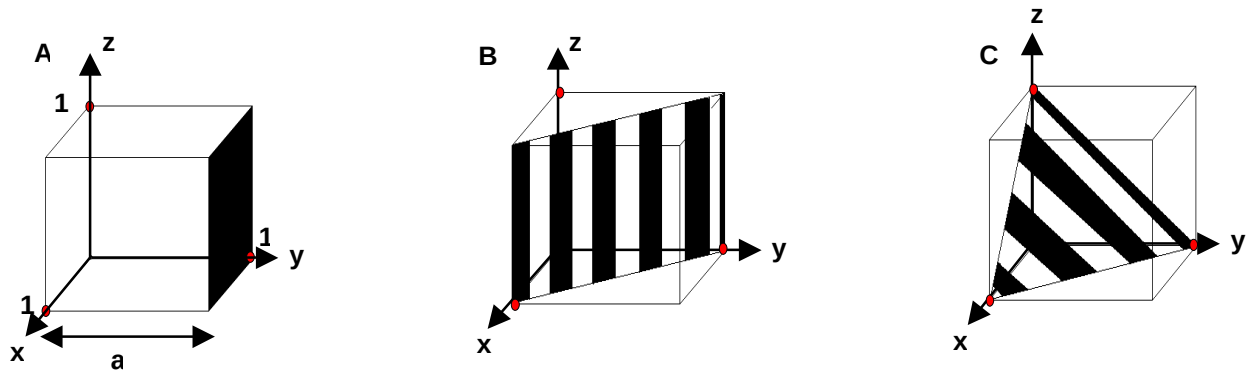


Figure 24: Schémas des différentes orientations cristallographiques. ●: repère égal à 1 pour les axes x, y et z. a = paramètre de maille. A : Orientation cristallographique $\langle 001 \rangle$ correspondant à toutes les faces du cube et ne coupant seulement que l'un des trois axes. B : Orientation cristallographique $\langle 110 \rangle$ coupant deux des trois axes. C : Orientation cristallographique $\langle 111 \rangle$ coupant les trois axes

III. Les traitements de surface

III.1. Obtention des échantillons de surface polie attaquée (PA) et polie miroir (PM)

Lors de cette thèse, deux états de surface vont être mis au point : une surface polie miroir (PM) et une surface polie attaquée (PA), ce dernier traitement étant appliqué à des alliages avec des tailles de grain différentes (20, 40 et 100 μm).

Après le traitement thermique et la vérification de la taille des grains, les échantillons sont ensuite polis et les joints de grain sont découpés lors d'une attaque électro-nitrique (mélange 60% HNO_3 – 40% H_2O) sous une intensité de courant de 0,6A pendant 2 min 30s (générateur de tension Polipower[®] Struers). Ce décapage chimique crée un réseau de canaux de profondeur variant en fonction du temps d'attaque (voir chapitre I, §III, B).

Le polissage des échantillons s'effectue à l'aide d'une polisseuse Abramin[®]. Sur le disque porte-échantillons, 4 échantillons d'acier inoxydable sont fixés à l'aide d'un ruban adhésif double face, puis on effectue le polissage avec un papier d'une taille de grain de 800 μm , sous une pression de 1,8B pendant 2 minutes sous eau, puis avec un papier d'une taille de grain de 1200 μm , sous une pression de 1,8B pendant 2 minutes sous eau. Les échantillons d'acier inoxydable sont ensuite polis avec un drap « SAT[®] » de 6 μm , vaporisé au préalable avec une poudre de diamant de 6 μm , pendant 5 min sous pression 1,8B puis avec un drap « SAT[®] » de 3 μm , vaporisé au préalable avec une poudre de diamant de 3 μm , pendant 3

min sous pression 1,5B et enfin avec un drap « SAT[®] » de 1µm, vaporisé au préalable avec une poudre de diamant de 1µm, pendant 1,5 min sous pression 1B.

Trois types de surface polie attaquée PA ont été réalisés: des échantillons polis attaqués PA avec une taille de grain de 20µm, 40µm et 100µm obtenus avec un temps de traitement thermique respectivement de 30s, 80s et 610s. La profondeur de grain obtenus, mesurée par analyse profilométrique, est de 100nm +/- 20. En ce qui concerne les surfaces polies miroir PM, le traitement thermique et l'attaque électro-nitrique ne sont pas nécessaires. Les échantillons sont uniquement polis après le découpage.

Ceci permet donc d'avoir une topographie de surface différente avec soit un échantillon poli miroir PM, soit un échantillon poli attaqué PA (avec des tailles de grain différentes). Par ailleurs, les chimies de surface des aciers inoxydables polis attaqués PA et polis miroir PM peuvent être éventuellement différentes et doivent être contrôlées (XPS, mouillage) avant les expériences d'adhésion.

III.2. Analyse de profilométrie des échantillons

Les analyses de profilométrie ont été réalisées au centre d'Ugine-Alz à Isbergues, à l'aide d'un profilomètre HOMMEL[®] T 8000 équipé d'une pointe en diamant de 2µm de diamètre. Les images tridimensionnelles obtenues ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel TalyMap Universal 2.0.21[®].

III.3. La Spectroscopie de photoélectrons X (XPS)

La spectroscopie de photoélectrons X (XPS) repose l'utilisation de l'effet photoélectrique découvert par Hertz en 1887 et expliquée par Einstein en 1905. Cette technique est couramment utilisée dans le domaine des aciers inoxydables pour la caractérisation des couches passives. Elle permet non seulement l'identification et le dosage des éléments présents en surface mais également la détermination des états chimiques dans lesquels ils se trouvent.

Tous les échantillons ont été analysés après un traitement de nettoyage au plasma froid afin de réduire la contamination de surface et pour montrer les pics venant des couches intérieures. Les traitements plasma sous argon ont été effectués dans une unité March I

Instrument Plasmod®. La puissance de radiofréquence était de 50 W et la durée du traitement 10min. Après avoir subi le même traitement de nettoyage au RBS que celui fait avant l'adhésion (voir partie IV ; C), les échantillons étaient transférés dans les trois minutes dans les instruments de Spectroscopie de Photoélectrons X (XPS). L'appareil utilisé pour les analyses réalisées lors de cette thèse est le modèle XR3E2 de Vacuum Generators® employant une source de rayons X achromatique MgK_{α} (1253.6eV) avec une puissance de 300 W. Les spectres sont obtenus avec un passage d'énergie 30 eV afin de déterminer quels éléments sont présents dans les quelques nm en surface. La valeur de l'angle d'incidence entre la surface et la direction de la détection des électrons était de 30°. La pression typique d'analyse était de 10^{-10} Torr et la zone analysée était de 10 x 4 mm². Toutes les énergies de liaison sont référencées par rapport au pic de carbone C-H à 285.0 eV.

Les courbes utilisées pour l'ajustage des analyses étaient gaussienne/Lorentzienne avec C 1s et O 1s et des espèces métalliques comme Cr 2p et Fe 2p. L'erreur absolue lors des mesures des concentrations atomiques peut être estimée à 10%.

III.4. Les mesures d'angles de contact

Les angles de contact (θ) ont été mesurés sur les surfaces solides (S) en utilisant un goniomètre Krüss® G-10, et la technique de la goutte sessile avec différents liquides purs (L): diiodomethane, formamide et eau. L'énergie libre de surface a été estimée par (Owens and Wendt, 1969).

$$\gamma_{LV}(\cos \theta + 1) / 2(\gamma_L^d)^{1/2} = (\gamma_S^p)^{1/2}(\gamma_L^p / \gamma_L^d)^{1/2} + (\gamma_S^d)^{1/2} \quad (13)$$

γ^d est la composante apolaire de Lifshitz-van der Waals et γ^p la composante polaire incluant les interactions ioniques, hydrogène et acide-base.

Les énergies libres de surface des différents liquides sont répertoriées dans **la table 4** ci-dessous.

Liquides	γ_L (mJ/m ²)	γ_L^d (mJ/m ²)	γ_L^p (mJ/m ²)	$\gamma_L^+(mJ/m^2)$	$\gamma_L^-(mJ/m^2)$
Eau	72,8	21,8	51	25,5	25,5
Formamide	58	39	19	2,28	39,6
Diiodométhane	50,8	50,8	0	0	0

Table 4 : Composante totale (γ_L), composante apolaire de van der Waals (γ_L^d), composante polaire (γ_L^p), accepteur d'électrons (γ_L^+) et donneur d'électrons (γ_L^-) de l'énergie libre de surface des solvants utilisés pour mesurer les angles de contact des différents substrats

Les mesures ont été effectuées, pour chaque échantillon et chaque liquide, avec 5 gouttes différentes pour lesquelles les deux angles de contact sont pris en compte. Pour un même liquide, la différence de mesure ne doit pas excéder 5° entre les deux angles d'une même goutte, de même entre les mesures de gouttes différentes.

III.5. Nettoyage des échantillons avant l'adhésion bactérienne

Avant de déposer les cellules sur l'acier inoxydable, ce dernier est nettoyé selon un protocole bien défini afin d'homogénéiser le film passif pour l'ensemble des aciers inoxydables. Les échantillons sont trempés dans un mélange éthanol/acétone 50/50 à température ambiante pendant 10 min ; puis essuyés avec du papier Kimwipes (Kimberly-Clark®); immergés dans un bain de RBS 35 à une concentration finale de 2% (détergent alcalin commercial, Société des Traitements de Surface, Lille) durant 10 min au bain-marie à 60°C ; rincés dans trois béciers successifs d'eau distillée à 60°C et dans de l'eau distillée à température ambiante puis essuyés avec du papier Kimwipes.

Les traitements de surface et méthodes expérimentales permettent d'obtenir et de caractériser les matériaux souhaités (**table 5**).

Traitements de surface des échantillons	Effets des traitements de surface sur les échantillons
Traitement thermique Polissage Attaque électro-nitrique	croissance de grains élimination des oxydes en surface création de sillons, aux joints de grains, de profondeur variable en fonction du temps d'attaque
Méthodes expérimentales	Objectifs des méthodes expérimentales
Calcul indice ASTM EBSD	évaluation de la taille des grains visualisation de l'orientation cristallographique des grains
Profilométrie	mesure de la topographie des échantillons PM et PA, de la taille des grains et de la profondeur aux joints de grains.
XPS	caractérisation et homogénéité du film passif des différents échantillons
Angles de contact	calcul de l'énergie libre de surface des aciers inoxydables PM et PA
Nettoyage avec le détergent alcalin d'une concentration de 2%	homogénéisation du film passif et propreté des échantillons

Table 5 : Effets des traitements de surface sur les échantillons et objectifs des méthodes expérimentales

Chapitre V : Les microorganismes

I. Choix des microorganismes

Trois types de microorganismes ont été choisis afin de visualiser l'impact sur l'adhésion. Ainsi, chacun d'entre eux possède un impact important dans le secteur agroalimentaire, comme la levure *Saccharomyces cerevisiae*, ou hospitalier comme *Staphylococcus epidermidis* et *Escherichia coli*. De plus, plusieurs critères, résumés dans la **table 6**, permettent de diversifier l'étude de cette adhésion sur les aciers inoxydables :

	Type	Taille	Forme	Présence d'appendices et surfactants
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Eucaryote	4-5 µm	ovale	non
<i>Escherichia coli</i>	Gram ⁻	1-1,5µm	ovoïde	pili-curli-EPS-flagelle
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Gram ⁺	<1µm	ovoïde	EPS

Table 6 : Caractéristiques des microorganismes utilisés. EPS = Exopolysaccharides

Il est cependant important de noter que pour obtenir une quantité importante d'EPS (exopolysaccharides) produites par *E. coli* et *S. epidermidis*, il faut attendre, en moyenne, 24 à 48 h d'adhésion. Lors des expériences faites au cours de cette thèse, les microorganismes sont lavés avec la solution tampon adéquate et laissés adhérer pendant seulement 35 min. L'influence des EPS sur l'adhésion et donc sur le détachement des cellules peut être considérée comme négligeable. De plus, pour *E. coli*, les curli ne sont exprimés de manière optimale qu'à des températures inférieures à 30°C, avec peu de nutriments, une osmolarité du milieu basse et durant la phase stationnaire de croissance (Olsen et al., 1993) (Olsen et al., 1989). Toutes ces conditions, exceptée la phase stationnaire de croissance, ne sont pas requises dans notre mode de culture utilisé pour *E. coli*. La production de curli sera donc limitée.

II. Modes de culture des microorganismes

II.1. La levure *Saccharomyces cerevisiae* : mode de culture

La levure *S. cerevisiae* étudiée YB4741 (fournie par le laboratoire IBCP UMR5086 CNRS, Lyon) était conservée à -80°C dans du glycérol à 30%. Toutes les expériences ont été réalisées avec des cultures cellulaires en phase stationnaire lancées à partir d'une seule colonie nouvellement isolée. Une fraction de la solution du stock cellulaire était étalée sur des boîtes de YPD-agar (1% extrait de levures; 2% peptone; 2% dextrose et 1,5% agar) et incubées pendant 24 heures à 30°C. Le jour suivant, une seule colonie de *S. cerevisiae* était transférée dans du milieu YPD (1% extrait de levures; 2% peptone; 2% dextrose) et incubée à 37°C sous agitation (pour moins de 20h). Les cellules sont prélevées en phase stationnaire lors des expériences. La culture en phase stationnaire était entretenue pendant une semaine à l'aide de dilutions de la suspension de levures chaque matin avec du milieu YPD afin d'obtenir une densité optique à 600nm (DO_{600nm}) de 0,1. La densité cellulaire était calculée après mesure de la densité optique de la suspension diluée à une longueur d'onde λ de 600 nm. Une courbe de calibration a été effectuée en utilisant la chambre de Malassez afin de déterminer la relation entre la DO_{600nm} et la densité cellulaire.

Les cellules de *S. cerevisiae* étaient ensuite centrifugées (3500 rpm, 5 min), lavées trois fois dans du tampon KNO_3 (60 mM nitrate de potassium, pH 7, conductivité 6,90 mS/cm) et resuspendues dans le même tampon à une concentration de 10^6 cellules/ml. Afin d'obtenir une répartition homogène des cellules sur l'échantillon d'acier inoxydable, la suspension de levures était mixée avec un vortex et l'échantillon d'acier inoxydable était recouvert avec 3 ml de la suspension diluée de levures. L'adhésion des levures dépend de nombreux paramètres, en outre celui du nombre de repiquages réalisés avant l'expérience sous flux radial qui doit être constant (ici 3 repiquages étaient imposés avant l'expérimentation) afin de ne pas engendrer une modification dans la composition de la paroi cellulaire de la levure et donc des forces d'adhésion différentes. Ce nombre de repiquages a également été respecté lors des manipulations avec *E. coli* et *S. epidermidis*.

II.2. *Escherichia coli* : mode de culture et visualisation du mode de détachement

II.2.1. Mode de culture

Les bactéries utilisées sont issues de la souche XL1-blue (Stratagene®, Amsterdam, Pays-Bas) résistante à la tétracycline. Celles-ci sont conservées à -80°C. Une anse est prélevée après décongélation de l'éppendorf etensemencée sur du milieu LB-agar (1% Bacto-tryptone, 1% NaCl, 0.5% Bacto-yeast extract, 1,5% agar, qsp 1 litre). La boîte de Petri est laissée pendant une nuit à 37°C. Une colonie est ensuite mise en culture dans du milieu LB (1% Bacto-tryptone, 1% NaCl, 0.5% Bacto-yeast extract, qsp 1 litre). Les bactéries sont prélevées en phase stationnaire de croissance (déterminée au préalable en effectuant une courbe de la croissance d'*E. coli* lors d'une mise en culture à 37°C sous agitation), il faut environ 13h30 ± 30 min pour que cette phase soit atteinte. Chaque soir, 1µl de la culture est dilué dans 10mL de LB. Ainsi, le lendemain matin, la culture est à une densité optique de 600nm d'environ 2,4 en phase stationnaire. La mesure de la turbidité au spectrophotomètre a été calibrée avec une cellule de Malassez afin d'établir la correspondance entre la densité optique à 600 nm DO_{600nm} et la concentration cellulaire en cellules/mL. Une culture fraîche était effectuée toutes les semaines. Les cellules étaient ensuite centrifugées (3500 rpm, 5 min), lavées trois fois dans du tampon KH_2PO_4 (10mM, pH 7) et resuspendues dans le même tampon à une concentration de 10^7 cellules/ml. Afin d'obtenir une répartition homogène des cellules sur l'échantillon d'acier inoxydable, la suspension d'*E. coli* était mixée avec un vortex et l'échantillon d'acier inoxydable était recouvert avec 3 ml de la suspension diluée.

II.2.2. Visualisation du mode de détachement d'*E. coli*

Pour cette expérience, une nouvelle chambre a été réalisée (**voir figure 25**) afin de visualiser directement, sous microscope, le détachement de cellules d'*E. coli* et ainsi filmer ce processus.

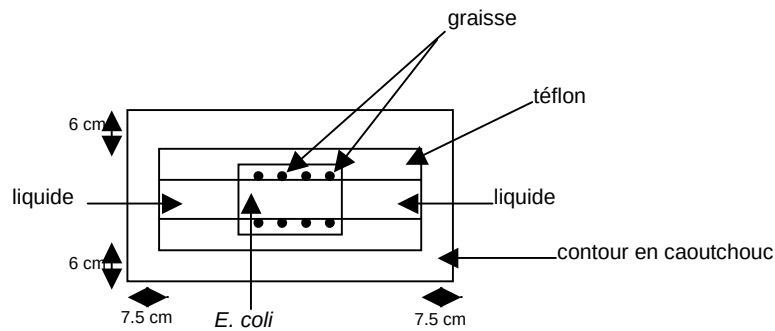


Figure 25 : Schéma de la chambre de visualisation du mode de détachement d'*E. coli*

Après centrifugation et resuspension dans le tampon KH_2PO_4 (voir §III.A ci-dessus), 260 μl de la solution sont placés sous la lamelle et laissés adhérer pendant 35 min. Du tampon KH_2PO_4 10 mM est placé de chaque côté de la lamelle afin de ne pas assécher la lamelle. Après ce laps de temps, à l'aide de deux pipettes placées de part et d'autre de la lamelle, une contrainte de flux de 2 Pa est exercée par des inspirations et refoulements de tampon. La durée de l'expérience est de 50 s. Pendant cette durée, un film du mode de détachement, composé de 100 prises (1 prise/0,5 s) est enregistré à l'aide de la caméra RTcolor, avec un gain de 16, une ouverture de diaphragme de 4 x 4 et un objectif de grossissement x100 à immersion.

II.3. *Staphylococcus epidermidis* : mode de culture

Les bactéries utilisées sont issues de la souche ATCC-12228 (LGC Promochem®). Les bactéries sont réhydratées en utilisant une pipette pasteur avec 0,5 mL du milieu TSB (Tryptone Soja Bouillon ; Biomérieux® référence 42100). Le tout est vortexé et agité avant transfert du contenu entier dans un tube de 5 mL de TSB. Les dernières gouttes de la suspension sont transférées sur une boîte de TSB-agar (Biomérieux, référence 43011) mise en incubation pendant 24 h à 37°C. Le reste des bactéries réhydratées est ensuite conservé, pour une nouvelle inoculation, à -80°C dans du milieu TSB. Le lendemain, une colonie est isolée de la boîte de Petri est mise en culture dans du milieu TSB à 37°C sous agitation pendant 12 h 30 $\pm$ 30 min. Les bactéries sont prélevées en phase stationnaire de croissance (déterminée au préalable en effectuant une courbe de la croissance de *S. epidermidis* lors d'une mise en culture à 37°C sous agitation). Chaque soir, 1 μl de la culture est dilué dans 10 mL de TSB. La mesure de la turbidité au spectrophotomètre a été calibrée avec une cellule de Malassez afin d'établir la correspondance entre la densité optique à 620 nm ($\text{DO}_{620\text{nm}}$) et la concentration

cellulaire en cellules/mL. Une culture fraîche était effectuée toutes les semaines. Les cellules de *S. epidermidis* étaient ensuite centrifugées (3500 rpm, 5 min), lavées trois fois dans du tampon PBS (10mM potassium phosphate; 15mM NaCl ; pH 7) et resuspendues dans le même tampon à une concentration de $2,6.10^7$ cellules/ml. Afin d'obtenir une répartition homogène des cellules sur l'échantillon d'acier inoxydable, la suspension était mixée avec un vortex et l'échantillon d'acier inoxydable était recouvert avec 3 ml de la suspension diluée. La **table 7** récapitule les principales caractéristiques des microorganismes utilisés.

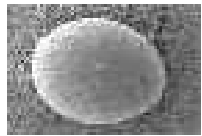
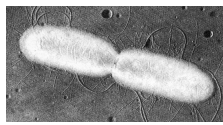
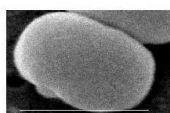
Nom	Classe	Observation par microscopie électronique à balayage
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Eucaryote/champignon	 4μm
<i>Escherichia coli</i>	Procaryote/Gram ⁻	 1μm
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Procaryote/Gram ⁺	 1μm

Table 7 : Récapitulatif des microorganismes utilisés

III. Analyse physiologique des surfaces bactériennes à l'aide de la technique MATS (Microbial Adhesion to Solvents ; (Bellon-Fontaine et al., 1996))

La technique MATS permet de caractériser le caractère hydrophobe/hydrophile et les propriétés Lewis acide/base du microorganisme étudié. Cette méthode est basée sur la comparaison entre l'affinité d'une cellule microbienne pour un solvant monopolaire et un solvant apolaire. Le solvant monopolaire peut être acide ou basique mais les deux solvants doivent avoir des composantes de tension de surface de Lifshitz-van der Waals similaires. Les solvants utilisés sont le chloroforme (acide), l'acétate d'éthyle (basique), le décane et l'hexadécane qui sont des solvants apolaires. Leurs différentes composantes sont récapitulées dans **la table 8** ci-dessous. Les cellules sont diluées à une densité optique comprise entre 0,8 et 0,9. Une quantité de 0,4 mL de chaque solvant est mise en présence de 2 mL de solution bactérienne. Le tout est vortexé pendant 1min afin d'obtenir une élution qui est laissée au repos pendant 15min. Après ces 15min, on prélève la solution aqueuse et on mesure sa densité optique. Le calcul de l'affinité des cellules pour ce solvant est obtenu grâce à l'équation :

$$\% \text{ d'affinité} = (1-A/A_0) * 100$$

A étant la densité optique finale et A_0 la densité optique initiale.

Solvants	$\gamma^{LW}(\text{mJ/m}^2)$	$\gamma^+(\text{mJ/m}^2)$	$\gamma^-(\text{mJ/m}^2)$
Chloroforme	27,2	3,8	0
Hexadécane	27,7	0	0
Acetate d'Ethyle	23,9	0	19,4
Décane	23,9	0	0

Table 8 : Composantes van der Waals (γ^{LW}), accepteur d'électrons (γ^+) et donneur d'électrons (γ^-) de l'énergie libre de surface des solvants utilisés pour le test MATS

Chapitre VI : Chambre à flux radial et modélisation des cinétiques de détachement

La chambre à flux radial permet d'appliquer, via un écoulement aqueux dans une géométrie contrôlée, une contrainte de cisaillement constante dans le temps et de mesurer la vitesse de détachement des cellules qui en résulte.

I. Description

Le dispositif expérimental est décrit à la **figure 26**. Le dispositif de détachement de cellules sous écoulement hydrodynamique dans une chambre à flux radial est inspiré du dispositif original utilisé par Cozens-Roberts (Cozens-Roberts et al., 1990) (Cozens-Roberts et al., 1990) pour étudier l'adhérence de billes de latex ou de cellules vivantes. Le substrat, un échantillon d'acier inoxydable AISI 304 poli miroir PM ou poli attaqué PA nettoyé au préalable (voir chapitre IV C), est déposé sur le support se trouvant dans le réservoir inférieur. 3 ml de chaque solution de microorganismes sont étalés sur la lame d'acier. Après un temps de sédimentation et d'adhérence de 35 minutes, la lame est recouverte du tampon adéquat (voir ci-dessus) pour chaque microorganisme jusqu'au niveau des évacuations du réservoir inférieur, reliées à une pompe à eau, qui maintient constant le niveau de tampon dans le réservoir. Un disque en acier inoxydable de 80 mm de diamètre est ensuite posé délicatement sur le substrat. Le disque est percé en son centre d'un trou de 1,5 mm de diamètre. La distance e entre le substrat et le disque est fixée à l'aide de vis micrométriques ($0,20 \pm 0,01$ mm). L'orifice central du disque est relié par un tuyau à un réservoir supérieur contenant le tampon adéquat. L'écoulement est alors généré par gravité entre les réservoirs supérieur et inférieur. Une pompe péristaltique alimentée par un troisième réservoir maintient le niveau de fluide constant dans le réservoir supérieur. Ainsi, le débit reste constant au cours de l'expérience. Le débit volumique est mesuré par le volume de fluide pompé pendant la durée de l'expérience. La symétrie radiale du dispositif d'injection de fluide sur le substrat permet de générer un écoulement à symétrie radiale.

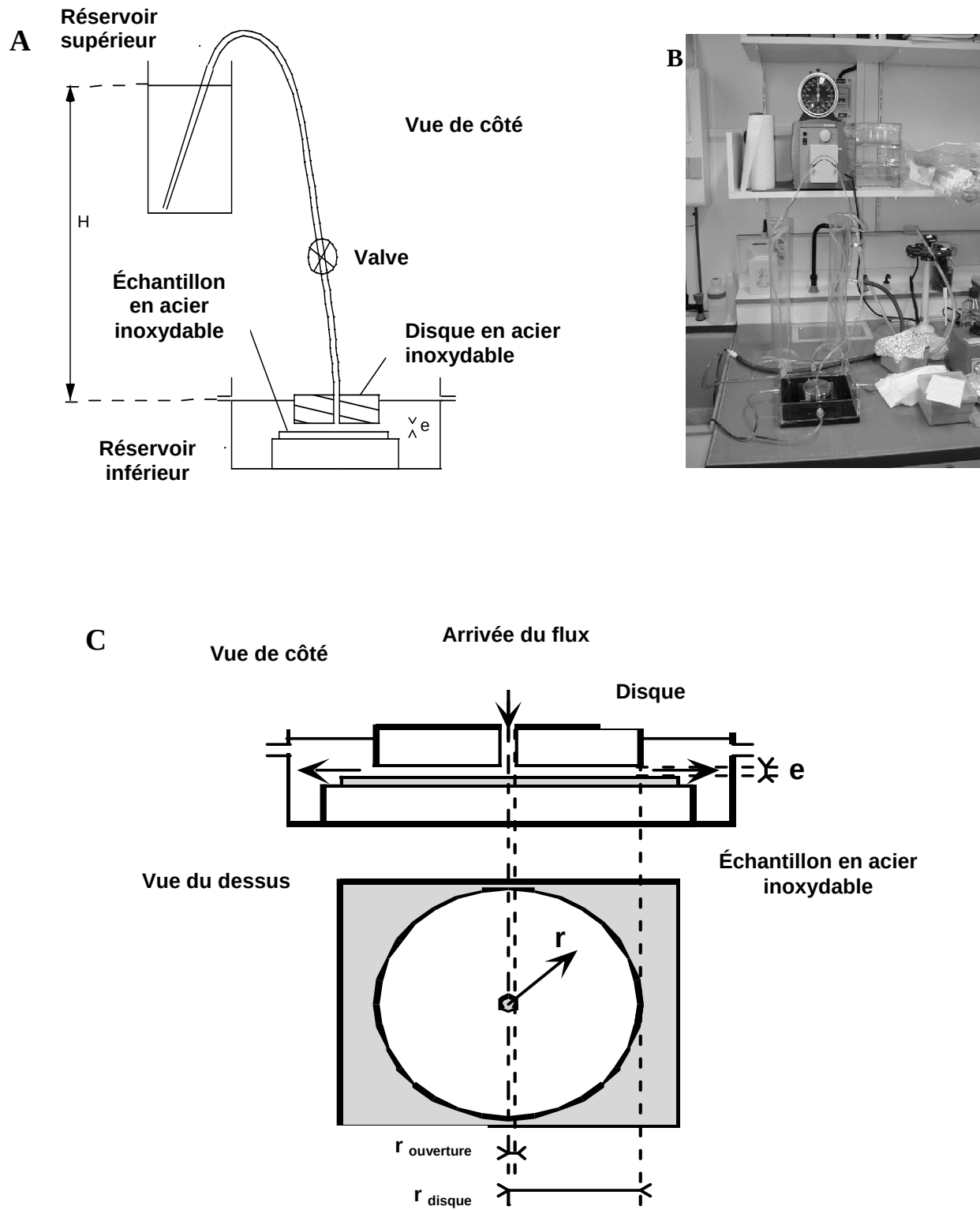


Figure 26 : A et B: Vue générale et photo du dispositif expérimental de la chambre à flux radial.
C : Vue détaillée de la chambre d'écoulement (Décavé et al., 2002)

II. Contrainte à la paroi et acquisition des images

Lors de chaque expérience, 1 ml de la solution de *S. cerevisiae*, d'*E. coli* ou de *S. epidermidis*, en phase stationnaire, est prélevé. La densité optique est mesurée afin de connaître le nombre de cellules par mL. Les cellules sont récupérées par centrifugation à 3500 rpm pendant 5 min. Après avoir enlevé le surnageant, elles sont suspendues dans 1 ml de KNO₃ 60mM pH7 pour *S. cerevisiae*, dans du KH₂PO₄ 10mM pH7 pour *E. coli*, dans du tampon phosphate (10mM potassium phosphate; 15mM NaCl ; pH 7) pour *S. epidermidis* et à nouveau centrifugées. Cette procédure de lavage est répétée deux fois puis les cellules sont diluées dans du KNO₃ 60mM (pour *S. cerevisiae*), du KH₂PO₄ 10mM pH7 ou du tampon phosphate (10mM potassium phosphate; 15mM NaCl ; pH 7) à une concentration respectivement de 10⁶ cel/ml pour *S. cerevisiae* ; 10⁷ cel/ml pour *E. coli* ; 2,6.10⁷ cel/ml pour *S. epidermidis*. 3mL de la dilution sont déposés sur la lame d'acier de 16 cm². Pour chaque expérience, des cellules nouvellement lavées sont utilisées et aucun 'stock' de *S. cerevisiae*, d'*E. coli* ou de *S. epidermidis* lavées n'est conservé.

Après avoir laissé adhérer les cellules, l'échantillon d'acier inoxydable est placé 5 min dans du KNO₃, du KH₂PO₄ ou du tampon phosphate (suivant les cellules étudiées) ceci afin d'enlever les cellules non adhérentes, puis 10 min dans de l'acridine orangée à 25mM (qui colore les cellules vivantes) et, à nouveau, 5 min dans du KNO₃, du KH₂PO₄ ou du tampon phosphate afin de laver le surplus d'acridine orangée. L'observation de *S. cerevisiae*, d'*E. coli* ou de *S. epidermidis* s'effectue au microscope à épifluorescence (Nikon Labophot-2) sous un grossissement x 40. L'excitation s'effectue à l'aide d'une lumière bleue ($\lambda_{\text{ex}} = 450\text{-}490\text{nm}$) et une verte pour l'émission ($\lambda_{\text{em}} > 510\text{nm}$). Plusieurs images de 650 μm x 525 μm sont enregistrées en fonction de la distance du point d'impact (Diagnostic Instrument SPOT RT Color digital camera). La distance du point d'impact est mesurée en utilisant la règle dont est équipé le microscope. Le nombre de cellules sur chaque image est déterminé en utilisant le programme Media Cybernetics Image Pro Plus. Typiquement, chaque aire contient, suivant le type cellulaire, 200 cellules de *S. cerevisiae*, 600 cellules d'*E. coli* et 1000 cellules de *S. epidermidis*. A cause de la symétrie de la chambre, le même stress est appliqué des deux côtés du point d'impact. Comme la visualisation des cellules adhérentes est effectuée des deux côtés du centre, la même contrainte est obtenue deux fois. Une moyenne des deux pourcentages de cellules adhérentes à une même contrainte est effectuée.

On calcule ensuite le pourcentage de cellules détachées en fonction de la contrainte hydrodynamique locale et du temps. La densité cellulaire initiale est déterminée sur une plaque « témoin », de même nature que l'échantillon, non soumise à un flux et traitée comme l'échantillon. La contrainte hydrodynamique vaut :

$$\sigma = 3D\eta/\pi r d^2 \quad (\text{Cozens-Roberts et al., 1990}) \quad (14)$$

où D = débit en m^3/s ; η = viscosité de l'eau ($=0,001 \text{ Pa.s}$) ; r représente la distance par rapport au centre (en mètre) ; d représente la distance entre l'échantillon et le disque ($= 10^{-8}$ mètre).

Pour chaque expérience, le nombre de cellules détachées (N) en fonction de la contrainte appliquée (σ) et du temps (t) est calculé. Les données sont reportées sur un graphique (**figure 27**), à σ constant, et le pourcentage de cellules détachées en fonction du temps est ajusté par une cinétique du premier ordre, qui définit deux paramètres, en fonction de la contrainte, l'efficacité de détachement des levures $e(\sigma)$ et la cinétique de détachement $k(\sigma)$:

$$N(\sigma, t) = e(\sigma) [1 - \exp(-k(\sigma).t)] \quad (15)$$

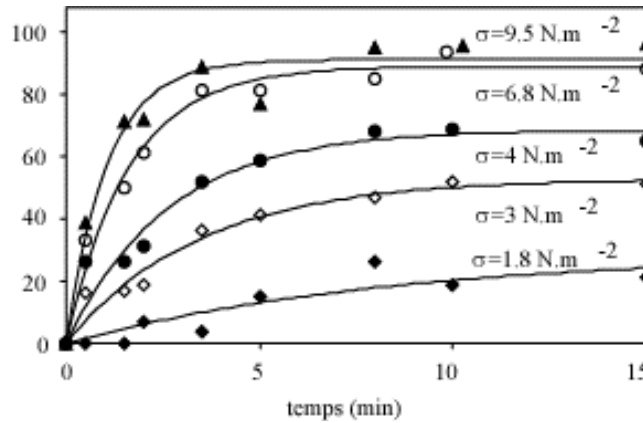


Figure 27 : Pourcentage de cellules détachées en fonction du temps à des contraintes définies. Exemple de cellules de *D. discoideum* adhérentes sur du verre (Décavé, 2002)

Les dépendances $e(\sigma)$ et $k(\sigma)$ peuvent alors être déterminées et interprétées à l'aide du modèle développé par B. Fourcade, D.Garrivier et E.Décavé (Décavé, 2002) et établissant les expressions :

$$e(\sigma) = \frac{1}{2} \left[1 + \text{Erf} \left(\frac{\ln \left(\frac{\sigma}{\sigma_{50\%}} \right)}{\sqrt{2} \tilde{\sigma}} \right) \right] \quad (16)$$

et

$$k(\sigma) = k_0 (\sigma/4\sigma_0)^{1/4} \exp [(\sigma/4\sigma_0)^{1/2}] \quad (17)$$

Ceci conduit à caractériser l'adhérence par quatre paramètres : $\sigma_{50\%}$, la contrainte hydrodynamique requise pour détacher 50% des cellules, $\bar{\sigma}$ la variance non dimensionnelle de la distribution log-normale, k_0 le taux de détachement intrinsèque, et σ_0 la contrainte de référence pour le détachement à laquelle la contrainte appliquée doit être comparée.

Le paragraphe suivant développe la modélisation des cinétiques de détachement suivant le modèle physique de Décavé et al. (Décavé et al., 2005; Décavé et al., 2002).

III. Modélisation des cinétiques de détachement

Dans le cadre de cette thèse, le modèle utilisé pour l'analyse quantitative de la cinétique de détachement est celui de Décavé (Décavé et al., 2002). Il décrit le pelage d'une cellule adhérente sur un substrat et soumise de nature hydrodynamique.

Afin de mesurer l'adhésion cellulaire, deux paramètres doivent être déterminés : la force d'adhésion, i.e. le stress mécanique nécessaire pour détacher une cellule à partir d'un substrat, et la cinétique de détachement, i.e. le temps nécessaire à une cellule pour quitter le substrat en fonction du stress appliqué.

Le flux est appliqué pendant un temps t puis, après que le disque ait été enlevé, la densité de cellules décollées $N(t,r)$ est déterminée en fonction de la distance r à partir du centre du disque. Expérimentalement, on observe un phénomène à seuil (**figure 27**). Le temps caractéristique nécessaire pour atteindre le plateau diminue lorsque la contrainte augmente, la valeur de ce plateau augmentant lorsque la contrainte augmente également. Ces courbes de cinétique sont ajustées avec une cinétique de premier ordre. Le pourcentage de cellules décollées n vérifie alors la relation

$$dn/dt = -k(\sigma) (n-e(\sigma)) \quad (18)$$

qui correspond à l'équation (19).

L'efficacité de détachement est le pourcentage de cellules détachées après une période de temps longue ; l'inverse de la constante du taux de détachement est le temps caractéristique pour le détachement d'une cellule du substrat.

On peut interpréter l'équation 8 de la façon suivante : chaque cellule possède une contrainte critique de détachement σ_c . A une contrainte donnée σ , les cellules dont la contrainte critique σ_c est inférieure à σ se détachent. Expérimentalement, la distribution de taille des seuils individuels des cellules σ_c suit une loi log-normale i.e. suivant une équation de la forme :

$$f(\sigma_c) = (1/\sqrt{2\pi} \tilde{\sigma}) \exp[-(\ln^2(\sigma_c / \sigma_{1/2})/2 \tilde{\sigma}^2)] \quad (20)$$

Par conséquent, l'efficacité est l'intégrale de cette loi log-normale et est donnée par l'équation (16) où Erf est la fonction erreur. Deux paramètres sont définis : $\sigma_{50\%}$, la contrainte hydrodynamique requise pour détacher 50% des cellules et $\tilde{\sigma}$, la variance non dimensionnelle de la distribution log-normale.

Par ailleurs, pour une contrainte donnée, la constante du taux de détachement $k(\sigma)$ sera égale à l'équation (17). Deux paramètres sont définis: le taux de détachement intrinsèque k_0 et σ_0 , la contrainte de référence à laquelle la contrainte appliquée doit être comparée.

Expliquons plus en détail l'origine, dans cette constante du taux de détachement $k(\sigma)$, de l'exponentielle et de la puissance 1/2. Dans le modèle présenté par Décavé, en première approximation, les sites d'adhésion d'une cellule sont modélisés par des contacts individuels ayant un comportement mécanique dépendant d'une raideur k (modélisée par un ressort) et une attache non-covalente représentée par le triangle noir (figure 28).

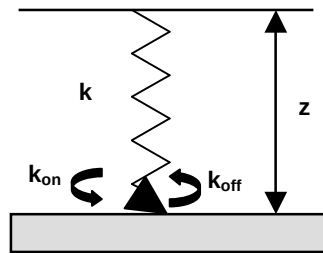


Figure 28 : Modélisation d'un pont adhésif par l'association d'un ressort de raideur k et d'une attache non-covalente

Lorsque le lien est attaché, il existe une force tirant vers le haut, exercée sur l'attache non-covalente, égale à $f_b = kz$ avec z l'extension du pont adhésif. Les ponts adhésifs se

tendent afin de lutter contre la force appliquée sur les liens. Cependant, quand cette force extérieure devient trop importante, il y a rupture du pont adhésif.

Un pont adhésif possède donc deux états : un état détaché et un état attaché, plus bas en énergie du fait de l'affinité intrinsèque des ponts adhésifs pour le substrat. Un pont adhésif évolue dans une moyenne de potentiel dont l'allure (**figure 29**) est composée de deux puits (état attaché et détaché).

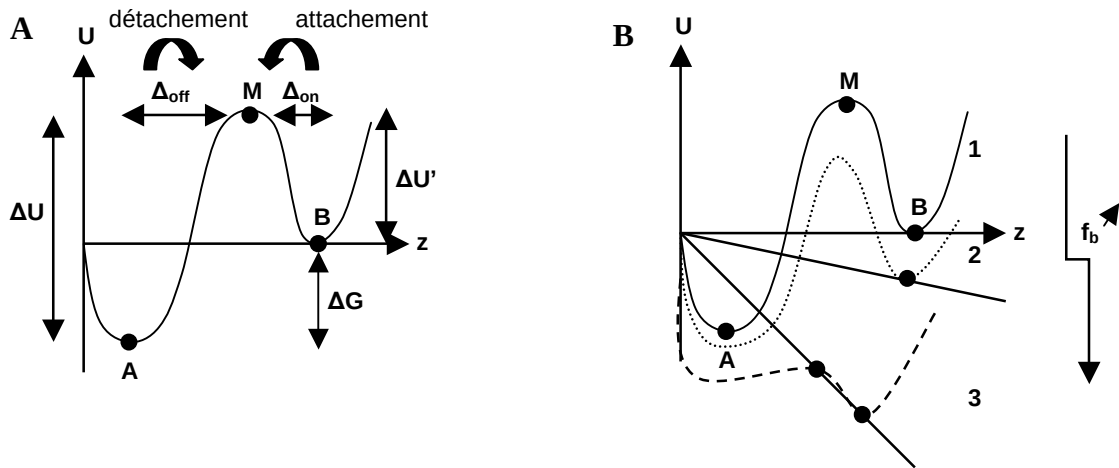


Figure 29 : Allure d'un potentiel d'un pont adhésif à deux états. A : sans force extérieure ; B : avec une force extérieure croissante de 1 à 3

En absence de force, dans un régime thermo-activé, l'expression microscopique de détachement et d'attachement est donc, selon les expressions de Kramers (Hänggi, 1990):

$$k_{\text{off}}^0 = \omega_A \omega_M / 2\pi\gamma \exp[\Delta U / k_B T] \quad (21)$$

et

$$k_{\text{on}}^0 = \omega_B \omega_M / 2\pi\gamma \exp[\Delta U' / k_B T] \quad (22)$$

avec $\Delta U = V_M - V_A$ et $\Delta U' = V_M - V_B$ les hauteurs des barrières de potentiel vues respectivement à l'état attaché (A) et détaché (B). ω_A , ω_B et ω_M sont les courbures, dues aux barrières de forme parabolique, des deux minima d'énergie (en A et B) et du maximum (en M). Par ailleurs, la constante d'équilibre locale K_e , entre ponts adhésifs attachés et détachés, s'écrit :

$$K_e = k_{\text{on}}^0 / k_{\text{off}}^0 = \omega_B / \omega_A \exp[\Delta G / k_B T] \quad (23)$$

avec $\Delta G = V_B - V_A$.

Pour simplifier, on admet que $\omega_A = \omega_B$, on a donc :

$$K_e = k_{on}^0 / k_{off}^0 = \exp[\Delta G / k_B T] \quad (24)$$

En présence d'une force fb , le travail cette force extérieure appliquée sur le lien adhésif s'écrit $W = k(z + \delta)\delta \approx kz\delta = fb\delta$; δ étant la coordonnée de réaction suivant z . L'énergie du pont adhésif sous une force extérieure s'écrit $U^* = U - W = U - fb\delta$. Les hauteurs des barrières de potentiel valent donc :

$$\text{à l'état détaché,} \quad \Delta U^* = U_M^* - U_A^* = \Delta U - fb\Delta_{off} \quad (25)$$

$$\text{à l'état attaché,} \quad \Delta U'^* = U_M^* - U_B^* = \Delta U' - fb\Delta_{on} \quad (26)$$

Les taux de détachement et d'attachement s'écrivent donc :

$$k_{off}(z) = k_{off}^0 \exp[fb\Delta_{off} / k_B T] \quad (27)$$

$$\text{et } k_{on}(z) = k_{on}^0 \exp[-fb\Delta_{on} / k_B T] \quad (28)$$

Pour simplifier, on pose $\Delta_{on} = \Delta_{off} = \Delta$, et $\Delta / k_B T = f_o$ (force exercée sur un lien), on a donc, en généralisant :

$$k = k_o \exp[fb / f_o] \quad (29)$$

Cette relation est valable dans le cas d'un seul pont adhésif. Pour des liens multiples, suite à la courbure R_c présentée par la cellule au contact du substrat, l'extension des liens z décroît en $\sqrt{x}$, x étant la distance séparant le lien considéré et le lien le moins distendu. Le rapport fb/f_o est alors remplacé par le rapport $[fb/f_o]^{1/2} = [\sigma/\sigma_o]^{1/2}$ car la force locale fb sur le lien le plus tendu est proportionnelle à σ .

La formule exacte est :

$$k(\sigma) = k_o [\exp(\sigma/4\sigma_o)^{1/2} / (\sigma/4\sigma_o)^{1/4}] \quad (30)$$

Celle-ci a été obtenue par Garrivier et Décavé en déterminant la relation vitesse de pelage-force appliquée (chapitre 4.4.3. de la thèse de Décavé).

RESULTATS

Chapitre VII : Physico-chimie des surfaces d'acier inoxydable

Dans cette partie, nous analyserons les caractéristiques des aciers inoxydables que ce soit l'énergie de surface obtenue à partir de mesures d'angles de contact, la composition du film passif déterminée à partir de spectres XPS, la rugosité mesurée par des analyses de profilométrie, et enfin, l'orientation cristallographique obtenue grâce à la technique EBSD.

I. Energie de surface des aciers inoxydables

Les mesures d'angles de contact obtenues sur l'acier AISI 304 d'état de surface poli miroir et poli attaqué avec une taille de grain de 20, 40 et 100µm ont été réalisées, après nettoyage au détergent alcalin d'une concentration finale de 2%, en utilisant la méthode de la goutte posée. Les résultats sont récapitulés dans la **table 9**.

	eau	formamide	diiodomethane	γ_s^d	γ_s^p	γ^{LW}	γ^+	γ^-	γ^{AB}
PA 20 µm	67,4° (0,4)	41° (1)	46,5° (3,5)	36 (5,4)	10 (1,5)	36 (3,6)	2,1 (0,2)	8,1 (0,8)	8 (0,8)
PA 40 µm	68,2° (1,2)	40,4° (2,6)	47° (2)	36 (5,4)	9 (1,3)	36 (3,6)	2,3 (0,2)	7,2 (0,7)	8 (0,8)
PA 100 µm	67,4° (1,4)	42° (2)	46,9° (2,1)	36 (5,4)	10 (1,5)	36 (3,6)	1,9 (0,2)	8,5 (0,8)	8 (0,8)
PM	62,7° (1,3)	40,5° (1,5)	44,5° (1,5)	36 (5,4)	12 (1,8)	37 (3,7)	1,5 (0,1)	12 (1,2)	9 (0,9)

Table 9 : Mesures de l'énergie de surface des aciers inoxydables polis miroir (PM), polis attaqués (PA) avec une taille de grains de 20, 40 et 100µm selon la méthode d'Owens et Wendt (Owens and Wendt, 1969) et van Oss, Good et Chaudhury (Good et al., 1993). γ_s^d composante dispersive, γ_s^p composante polaire, γ^{LW} composante de Lifshitz-van-der-Waals, γ^+ et γ^- caractère accepteur ou donneur d'électrons de la surface et γ^{AB} composante acido-basique

Les résultats présentés ci-dessus montrent une homogénéité de surface entre les échantillons polis miroir PM et ceux polis attaqués PA. Les échantillons possèdent une hydrophilie de surface similaire et une énergie de surface quasi-identique également. Le nettoyage au détergent alcalin d'une concentration de 2% nous assure bien une homogénéisation des surfaces avant les expériences de détachement sous flux, ceci à une

échelle de 10-100 μm . En effet, les angles de contact permettent l'estimation des énergies de surface au niveau macroscopique et non microscopique.

II. Composition du film passif

La technique XPS est utilisée afin d'analyser le film passif recouvrant les différents états de surface polis miroir (PM), et polis attaqués (PA) avec des tailles de grain de 20, 40 et 100 μm . Les résultats de ces analyses sont résumés dans **la table 10**.

	PM	PA20	PA40	PA100
Fe/Cr 90°	0,2	1	0,3	0,4
OH/Ox90°	1,7	0,75	1,2	0,8
OH/Ox30°	1,2	1	1,1	1,2
d (nm)	2	1,5	3	2
D (nm)	2	2	2	3

Table 10 : Analyse XPS d'un poli miroir (PM) et des polis attaqués (PA) 20, 40 et 100 μm
D = épaisseur de la couche de contamination (nm) ; d = épaisseur du film passif (nm)

Les échantillons ont été, au préalable, nettoyés avec le détergent alcalin d'une concentration de 2% afin de s'assurer de l'homogénéité des films passifs avant l'adhésion des microorganismes. L'analyse par XPS montre une homogénéité de l'épaisseur du film passif entre 2 nm et 3 nm pour les échantillons polis miroir PM et polis attaqués PA. La couche de contamination est sensiblement équivalente pour des échantillons polis miroir PM et polis attaqués PA (1,5 à 3 nm d'épaisseur). La teneur en fer (Fe) et chrome (Cr) est homogène (rapport de $0,3 \pm 0,1$). Pour la surface polie attaquée avec une taille de grain de 20 μm , la différence observée peut s'expliquer par une attaque un peu plus importante pour cet échantillon mais cela reste conforme aux résultats obtenus par Dubois (Dubois, 2000). Pour les teneurs en hydroxydes (OH) et oxydes (Ox), les teneurs sont homogènes (rapport de $1,2 \pm 0,4$) et également en accord avec ceux obtenus par Dubois.

III. Topographie des surfaces

Le profil topographique de chaque type d'échantillon a été réalisé, au sein du Centre de Recherche d'Ugine-Alz, afin de vérifier la profondeur des joints de grain des échantillons polis attaqués PA et la planéité de l'échantillon poli miroir PM. Les résultats sont montrés dans la figure 30.

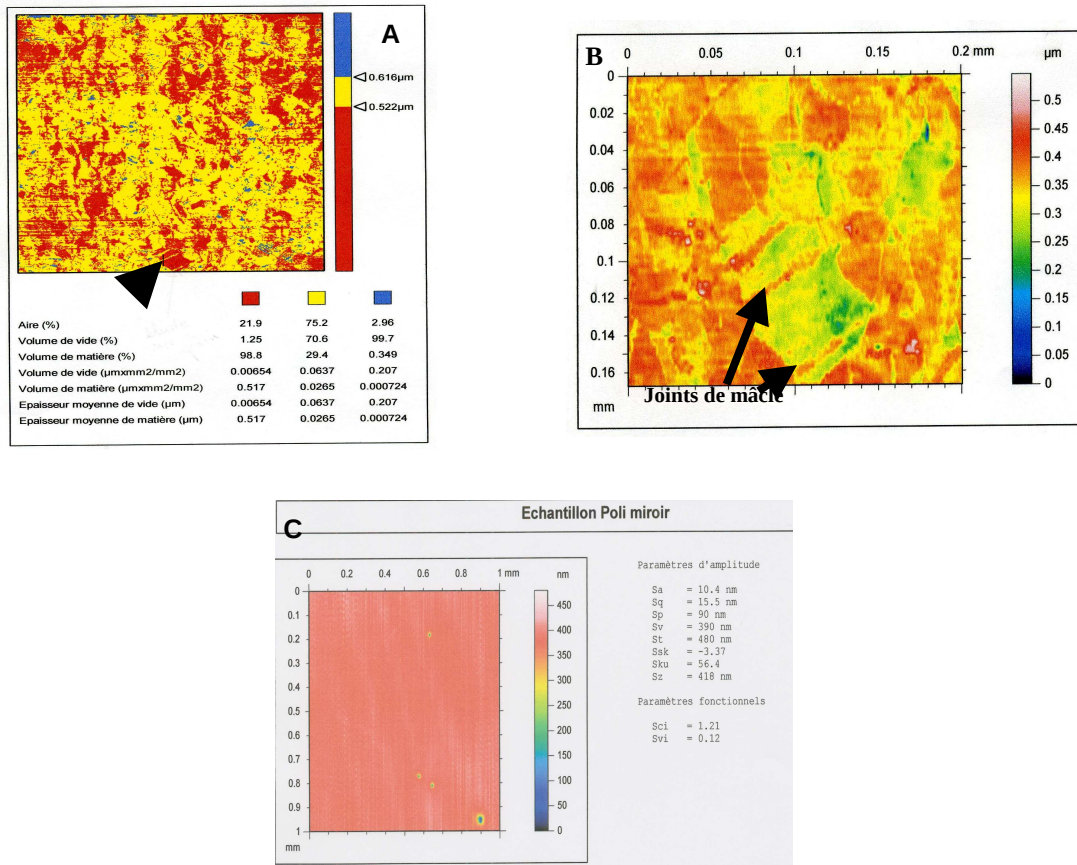


Figure 30: Profil topographique d'un échantillon poli attaqué (PA) avec une taille de grain de 20µm (figure A). Grossissement du grain fléché en figure A. (figure B). Profil topographique d'un échantillon poli miroir (figure C). Les différentes couleurs correspondent à différentes profondeurs notées dans la légende. On peut donc noter une différence très nette: l'échantillon poli miroir (C) est lisse avec une amplitude maximale de 400nm, obtenue sur 1mm², correspondant à la planéité de l'échantillon, tandis que, pour l'échantillon poli attaqué PA 20µm (A et B) les grains sont visibles et présentent différentes profondeurs ce qui révèle des grains plus ou moins attaqués lors de l'attaque électro-nitrique. La mesure est obtenue sur une aire de 0,04 mm² et l'échelle en z présente un écart de 150 ± 50 nm. En figure B, on peut noter la présence de joints de macle (flèches) i.e. que les plans, de part et d'autre du joint sont parallèles

Les profils topographiques des aciers inoxydables poli attaqués avec des grains de taille 20µm (PA 20µm) - ainsi que ceux avec des grains de taille 40 et 100µm (data non montrés) - et de l'échantillon poli miroir PM sont différenciables et reproductibles. La visualisation des

jointes de grain attaquées sur l'échantillon d'acier inoxydable poli attaqué PA avec une taille de grain de $20\mu\text{m}$ est très nette. Sur ce dernier, l'analyse des joints de grain montre une hétérogénéité de la profondeur d'attaque des différents grains. **Sur la figure 30A**, deux types de grains de profondeurs différentes (rouges et jaunes) peuvent être observés principalement, ceux-ci ont donc été attaqués différemment lors de l'attaque électro-nitrique. Certains grains (rouges) sont moins attaqués de manière moins profonde que d'autres (jaunes) avec respectivement une profondeur de $0,522\mu\text{m}$ contre $0,616\mu\text{m}$ (**légende figure A**). On a donc une différence de profondeur maximale, représentée en jaune sur la légende, de $0,1\mu\text{m}$. Les grains d'une profondeur de $0,616\mu\text{m}$ (jaunes) représentent environ 80% de la surface totale analysée, ceux de $0,522\mu\text{m}$ de profondeur (rouges) étant présents à environ 20%. On a donc la présence d'hauteurs différentielles, pouvant être schématisées par des « marches », sur ces aciers inoxydables polis attaqués (**figure 31**).

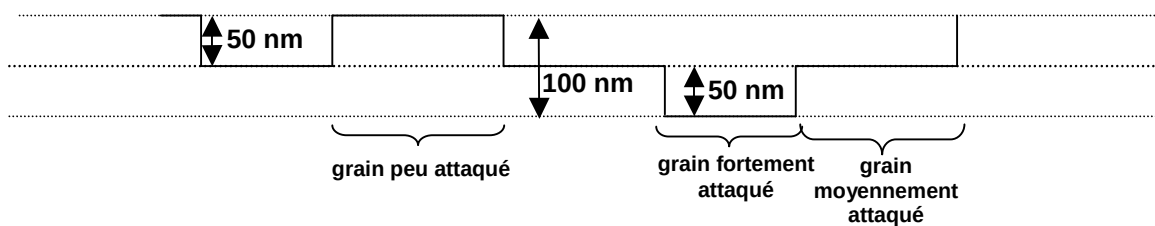


Figure 31 : Schématisation des attaques différentielles (« marches ») visibles en figure 30A

Par ailleurs, grâce à des analyses de topographie, la profondeur des joints de grain des échantillons polis attaqués avec une taille de grain de 20, 40 ou $100\mu\text{m}$ a été estimée à 150 ± 50 nm avec un temps d'attaque électro-nitrique de 2min 30s. Afin de visualiser l'influence de la profondeur de gravage sur la cinétique de détachement des microorganismes, des aciers inoxydables polis attaqués PA, avec une taille de grain de $100\mu\text{m}$, ont subi une attaque électro-nitrique de 1 et 4 min. Les profondeurs de grain obtenues sont, respectivement, 100 ± 50 nm et 650 ± 150 nm.

IV. Métallurgie des surfaces

L'hypothèse d'une orientation cristallographique différente des grains plus fortement attaqués a été émise et vérifiée grâce à des analyses d'EBSD (Electron BackScattering Diffraction) réalisées au CMTC-INPG (Consortium des Moyens Technologiques Communs –

Institut National Polytechnique de Grenoble). Ces expériences permettent de mettre en évidence les orientations cristallographiques différentes des grains grâce à des couleurs différentes (**figure 32A**). Afin de comparer les orientations cristallines et les profondeurs des grains, une zone de 1 mm² a été délimitée (cercles noirs) à l'aide de marques faites avec une pointe en diamant. L'analyse profilométrique est visualisée à **la figure 32B**.

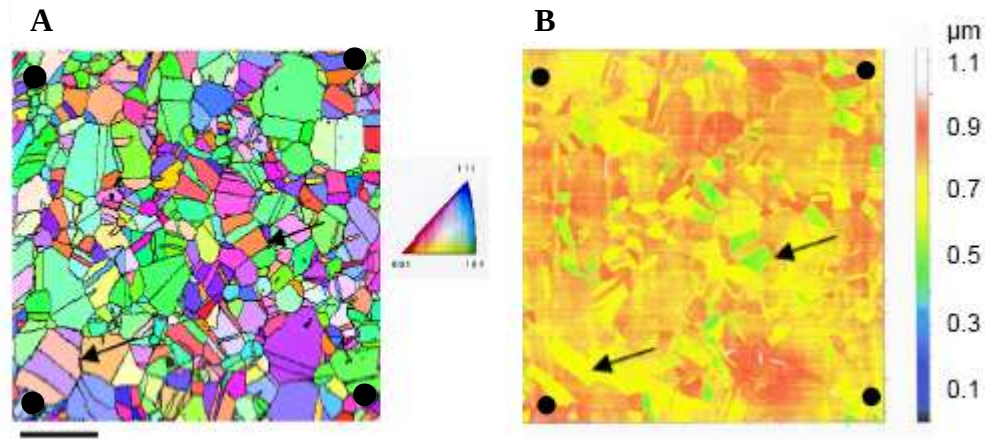


Figure 32 : A : Analyse en EBSD des orientations cristallographiques de la zone délimitée. ● : Marques faites au diamant. B : Analyse profilométrique de la zone délimitée. La profondeur d'un grain (voir légende) peut donc être associée avec son orientation cristallographique

Quatre classes principales attaquées plus fortement sont visibles: des grains à 200 nm de profondeur, correspondant à des couleurs rose et rose saumon, et d'autres à 400 nm de profondeur, correspondant aux couleurs rouge, rose foncé et orange. Ces grains plus attaqués correspondent à une orientation $\langle 001 \rangle$ (à 25° près), perpendiculaire à la surface. Par la suite, cette attaque nous permettra de repérer des grains et de montrer que le nombre de cellules adhérentes dépend de l'orientation cristallographique des grains.

V. Conclusion

Cette élaboration des échantillons d'acier inoxydable nous permet donc d'obtenir une topographie différente, avec des surfaces polies miroir et polies attaquées avec des tailles de grain de 20, 40 et 100 μm, mais une chimie et une énergie de surface équivalentes, mesurées à l'aide de la technique XPS et des angles de contact. De plus, des orientations cristallographiques différentes sont obtenues grâce à des attaques préférentielles des joints de grain. Ceci apporte un nouvel élément d'étude pour l'adhérence cellule-substrat associant la technique ElectronBackScattering, ou EBSD, à l'analyse topographique.

Chapitre IX: Cinétique de détachement de *Saccharomyces cerevisiae* à des surfaces d'acier inoxydable

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un champignon de 4 à 5µm, de forme ovale, se cultivant à 30°C sous agitation. Cet organisme est un modèle en biologie cellulaire et en génétique et fut le premier eucaryote dont le génome ait été séquencé en 1996.

I. Analyse physiologique de *S. cerevisiae* à l'aide du test MATS

Le test MATS a été réalisé avec des cellules cultivées à 30°C sous agitation, température requise pour leur croissance optimale, mais également à 21°C et 37°C afin d'étudier l'influence de la température de culture sur la physiologie des cellules. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 33. Le test MATS est un moyen simple de s'assurer que les propriétés physico-chimiques de surface des cellules n'évoluent pas.

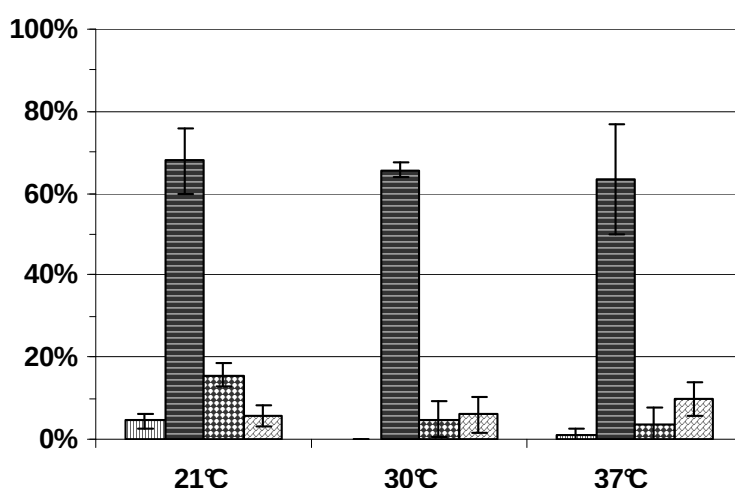


Figure 33 : Test MATS pour *S. cerevisiae* cultivée à 21, 30 et 37°C. [] : Hexadécane; [] : Chloroforme ; [] : Décane ; [] : Acétate d'Ethyle

Pour *S. cerevisiae* cultivée à 30°C, les résultats du test MATS montrent une grande affinité pour le Chloroforme (66%) tandis que celle pour le Décane (5%) et l'Acétate d'Ethyle (6%) est faible et celle pour l'Hexadécane est nulle. La différence d'affinité entre le Chloroforme et l'Hexadécane révèle le caractère nettement basique de cette souche (66%).

Les cellules sont aussi un peu acides (affinité pour l'Acétate d'Ethyle 6%) mais le caractère Lewis-base est nettement prononcé. Elles sont très hydrophiles (faible affinité à l'Hexadécane et au Décane). Lorsque l'on diminue la température de culture à **21°C**, les cellules deviennent un peu moins hydrophiles qu'à 30°C (plus d'affinité pour l'Hexadécane et le Décane), mais restent très basiques (64%). A **37°C**, les cellules de *S. cerevisiae* sont acido-basiques et très hydrophiles. Ces résultats sont en accord avec ceux d'Aguilar-Uscanga (Aguilar-Uscanga and Francois, 2003) qui démontre une influence de la température sur la composition de la paroi. La masse sèche de β -glucanes totaux, en particulier, va dans le sens de l'augmentation d'hydrophilicité de 21 à 37°C. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les β -glucanes constituent 60 % de la paroi des cellules de levures et qu'une augmentation de leur quantité au sein de la paroi modifierait l'hydrophilie des cellules et son énergie de surface.

II. Cinétiques de détachement de *S. cerevisiae* adsorbé sur un substrat d'acier inoxydable avec un fini de surface poli miroir (PM) et poli attaqué (PA)

Les cellules de *S. cerevisiae*, cultivées à 30°C sous agitation, dans un milieu YPD, sont placées, après avoir adhéré pendant 35min, dans la chambre à flux radial remplie de tampon KNO_3 60mM. Les résultats des tests sont présentés dans les figures 34 et 35.

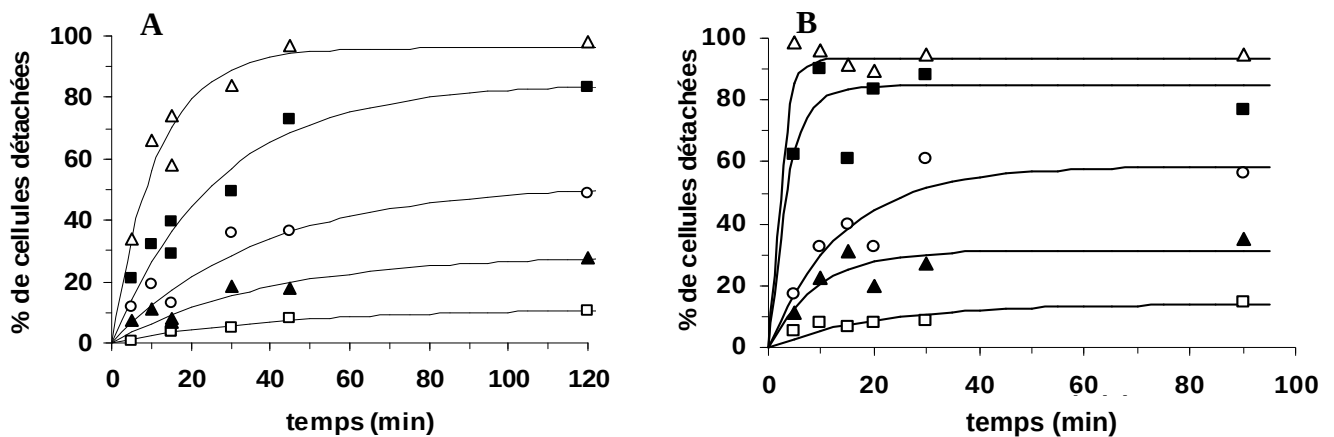


Figure 31 : Cinétique de détachement pour un échantillon d'acier inoxydable poli miroir (A) et un poli attaqué (B) (20 μm de taille de grain, 0 à 100nm de profondeur) sous différentes contraintes σ . $\square$: $\sigma = 25\text{Pa}$; $\blacktriangle$: $\sigma = 35\text{Pa}$; $\circ$: $\sigma = 50\text{Pa}$; $\blacksquare$: 90Pa ; $\triangle$: 180Pa . Les données ont été ajustées avec une cinétique du premier ordre, déterminant l'efficacité de détachement et le taux de détachement constant

Sur la figure 34, on peut noter que la cinétique de détachement est plus rapide pour un acier inoxydable poli attaqué (PA), de taille de grain $20\mu\text{m}$, que pour un poli miroir (PM). Par exemple, à 200Pa , le plateau est atteint à 45 min pour l'échantillon poli miroir PM mais à 10 min pour l'échantillon poli attaqué PA. La cinétique de détachement de l'ensemble des échantillons polis attaqués PA est homogène, le plateau étant atteint à 10 min pour une contrainte de 200Pa . Il est à noter que, quelque soit la contrainte appliquée, la valeur maximale de détachement est la même pour les deux échantillons présentés ici ainsi que les échantillons polis attaqués PA avec une taille de grain de 40 et $100\mu\text{m}$.

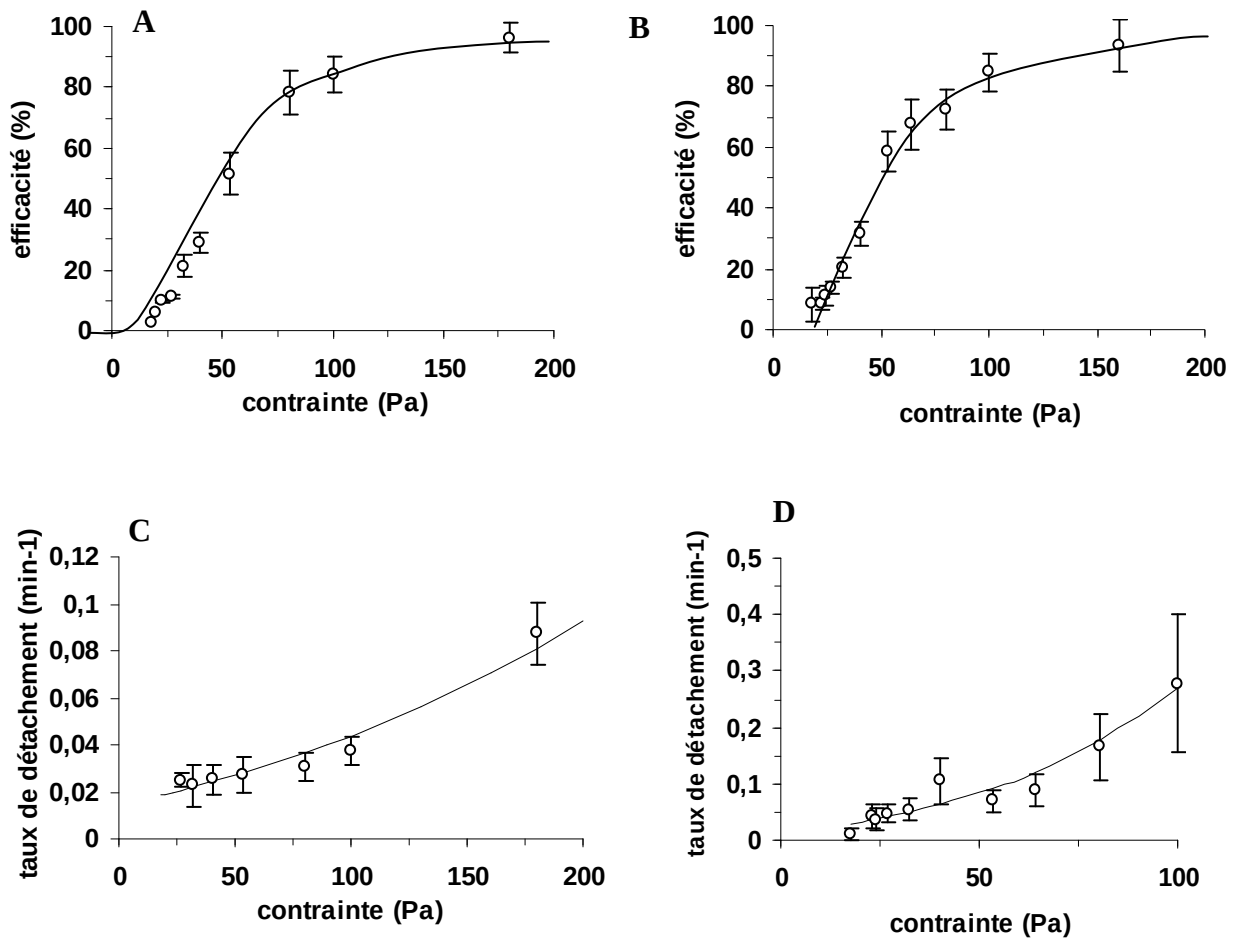


Figure 35 : Taux de détachement $k(\sigma)$ et efficacité de détachement $e(\sigma)$ de *S. cerevisiae* pour un échantillon poli miroir (A,C) et poli attaqué avec une taille de grain de $20\mu\text{m}$ (0 à 100nm de profondeur) (B,D). Ces courbes ont été ajustées avec $\sigma_{50\%} = 53\text{Pa}$ et σ , la variance non-dimensionnelle de la distribution log-normale, = 0,58. C et D : constante du taux de détachement $k(\sigma)$. Ces courbes ont été ajustées avec $k_0 = 7.10^{-3} \text{ min}^{-1}$ et $\sigma_0 = 5\text{Pa}$ pour l'échantillon poli miroir PM ; $k_0 = 6.10^{-3} \text{ min}^{-1}$ et $\sigma_0 = 1,2\text{Pa}$ pour l'échantillon poli attaqué PA. La détermination des paramètres donnant le meilleur fit des données expérimentales et une estimation de l'erreur associée à cette détermination ont été réalisées à l'aide du programme Kaleidagraph

Sur la figure 35, l'efficacité de détachement $e(\sigma)$ montre, **en 35A et 35B**, une valeur seuil de détachement. En dessous de 15Pa, le taux de détachement est négligeable. Tandis qu'au dessus de cette valeur, l'efficacité de détachement augmente linéairement avec la contrainte et, au dessus de $\sigma = 100\text{Pa}$, plus de 80% des cellules sont détachées. La constante du taux de détachement montrée sur les figures **35C** et **35D** croît de manière quasi-exponentielle avec la contrainte σ . Ces résultats expérimentaux ont été ajustés à l'aide de l'expression décrite par Décavé et al. (Décavé et al., 2002) reliant le mode de pelage d'une cellule sur un substrat. Ceci sera plus amplement expliqué au chapitre XII traitant de la modélisation.

Afin de comprendre la petite mais significative différence du taux de détachement de *S. cerevisiae* à partir d'un échantillon poli miroir ou poli attaqué, deux composantes gouvernant les cinétiques de détachement ont été considérées, à savoir, le pelage d'une aire adhésive adhérent sur un substrat, et le processus de réattachement de *S. cerevisiae* qui mène au glissement des cellules plutôt qu'à leur départ irréversible. Le premier processus a été décrit dans Décavé et al. (Décavé et al., 2002) et dépend seulement de la physico-chimie de la surface et des caractéristiques des cellules. Comme le second processus est étroitement lié à la topographie de la surface et à la texture cristallographique, nous avons réalisé une série d'échantillons à topographie contrôlée. La composition était identique pour l'ensemble du lot mais la taille des grains (via le traitement thermique) et les profondeurs des joints de grain (via la durée d'attaque électro-nitrique) étaient différentes.

III. Etude de l'influence de la taille et de la profondeur des joints de grain sur le détachement de *S. cerevisiae*

Lors de l'élaboration des aciers inoxydables polis attaqués (PA), les échantillons subissent, après le recuit, une attaque électro-nitrique afin de creuser les joints de grain. Pour les surfaces polies attaquées PA étudiées dans le paragraphe II de ce chapitre, le temps d'attaque était de 2 min 30s amenant à une profondeur de grain de $150\text{nm} \pm 50$. Afin de modifier la profondeur des joints de grain, pour cette étude, l'attaque a été effectuée pendant 1 min et 4 min amenant à des profondeurs respectives de $100\text{nm} \pm 50$ et $650\text{nm} \pm 150$. **La figure 36** résume les résultats obtenus.

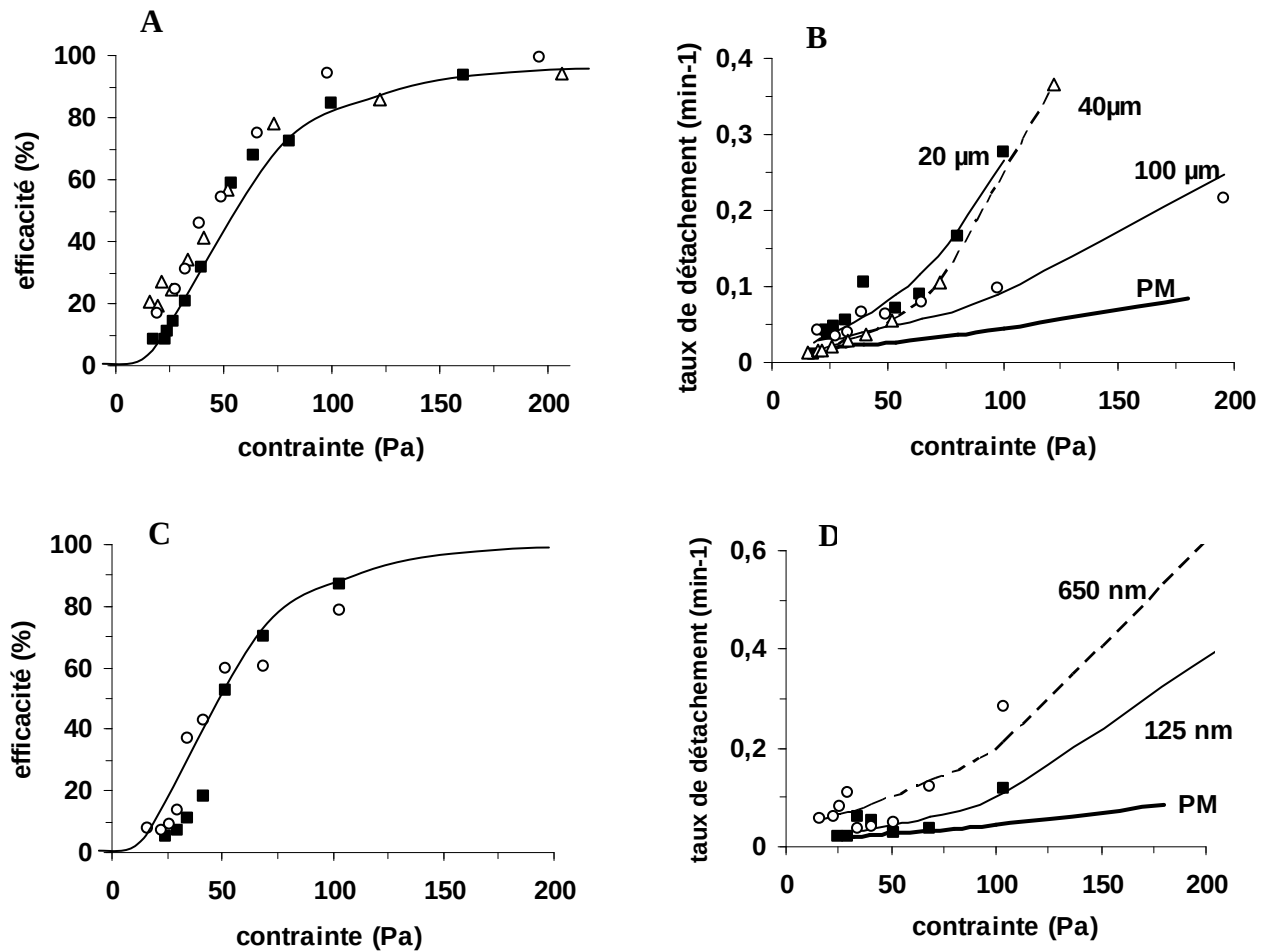


Figure 36 : Effet de la rugosité sur le détachement de *Saccharomyces cerevisiae* adhérent sur une surface d'acier inoxydable poli attaqué. A et B : effet de la taille des grains : ■ 20µm ; △ 40µm ; ○ 100µm. C et D effet de la profondeur de gravage pour un échantillon poli attaqué avec une taille de grains de 100µm : ■ 125nm et ○ 650nm. L'efficacité de détachement des cellules est montré en A et C, la constante du taux de détachement $k(\sigma)$ est montrée en B et D. La détermination des paramètres donnant le meilleur « fit » des données expérimentales et une estimation de l'erreur associée à cette détermination ont été réalisées à l'aide du programme Kaleidagraph

L'efficacité de détachement $e(\sigma)$ de *S. cerevisiae* adhérente sur des échantillons variés d'acier inoxydable poli attaqué est à peu près comparable : 20 à 30% de variations ont été observés pour $\sigma_{50\%}$, la contrainte hydrodynamique de détachement requise pour détacher 50% des cellules adhérentes, et $\tilde{\sigma}$, la variance non-dimensionnelle de la distribution log-normale, ce qui n'est pas corrélable avec la taille des grains et la profondeur de gravage (**figures 36A et 36C**). Ces variations sont étroitement liées à la variabilité intrinsèque des échantillons biologiques et/ou à la reproductibilité expérimentale.

En contraste, le taux de détachement $k(\sigma)$ varie de manière importante (3 à 5 fois) et systématique avec les caractéristiques topographiques (**figures 36B et 36D**). La tendance

générale est que $k(\sigma)$ est plus important quand la taille des grains est plus petite et la profondeur des joints de grain plus grande. La densité des joints de grain et la hauteur des niveaux générés par l'attaque électro-nitrique faciliteraient le détachement des levures à partir des surfaces d'acier inoxydable.

IV. Effet de l'orientation cristallographique sur l'adhésion de *Saccharomyces cerevisiae* à des surfaces d'acier inoxydable

La possibilité d'identifier l'orientation cristallographique des grains avec la technique de l'EBS (Electron BackScattering Diffraction) permet, en plus, d'examiner si la nature cristallographique de la surface exposée influence l'adhésion des cellules. Ainsi, une expérience sous flux a été réalisée avec l'échantillon montré **en figure 32**, où la forme et l'orientation cristallographique de chaque grain ont été enregistrées dans une zone prédéfinie. La taille des grains est de $100\mu\text{m}$ et la profondeur de gravage de 100nm . Le centre de la chambre à flux radial est positionné de telle sorte que la contrainte exercée sur les cellules, dans la zone étudiée, soit d'environ 50Pa . La durée de l'expérience est de 15min . A partir de la cinétique de détachement **figure 34**, on s'attend à ce que, en moyenne, environ 40% des cellules soient détachés. Les cellules restantes sont colorées avec de l'acridine orangée et visualisées au microscope à épifluorescence (**figure 37A, coloration rouge**). La structure granulaire et cristallographique du substrat est superposée avec la distribution spatiale des cellules restantes. La plupart des cellules ne se situent pas dans les joints de grain. Les cellules restantes ne sont pas réparties de manière homogène et on note une adhésion préférentielle sur des grains appartenant à la classe d'orientation cristallographique $\langle 001 \rangle$: 1700 ± 130 cellules/ mm^2 sur cette classe comparé à 1020 ± 40 cellules/ mm^2 sur les autres orientations cristallographiques. L'expérience, réalisée deux fois, donne un résultat reproductible. L'adhésion de *S. cerevisiae* sur les aciers inoxydables est donc sensible à l'orientation cristallographique.

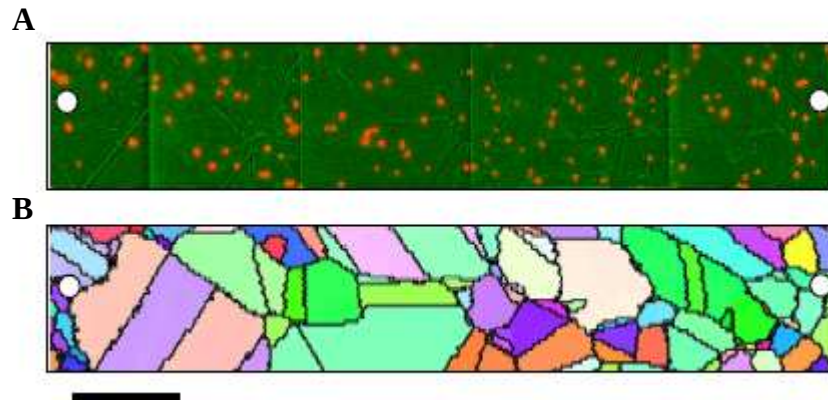


Figure 37 : Visualisation simultanée des cellules adhérant sur le substrat poli attaqué et les joints de grain. L'échantillon correspond à la figure 10 (100 μm de taille de grain et 100nm de profondeur de gravage). Après application d'un flux, les cellules restantes sont colorées avec l'acridine orangée (en rouge). Les joints de grain sont visualisés en microscopie avec lumière réfléchie (en vert). B : analyse EBSD de la même aire. Les cercles blancs indiquent les marques d'indentation. Les grains correspondant sont facilement reconnaissables (par exemple, le plus gros sur la gauche). La barre d'échelle représente 120 μm

La cinétique de détachement de *Saccharomyces cerevisiae* est plus rapide sur un échantillon poli attaqué PA que sur un échantillon poli miroir PM. Cependant, le pourcentage de cellules détachées au plateau est le même quelque soit le type de traitement de surface, poli miroir ou poli attaqué, et la taille de grain considérée. La constante du taux de détachement k_0 et σ_0 valent, respectivement pour les échantillons polis miroir et polis attaqués, $7.10^{-3} \text{ min}^{-1}$ et 5Pa ; 6.10^{-3} et 1,2Pa. L'efficacité $e(\sigma)$ est équivalente pour l'ensemble des échantillons étudiés avec un $\sigma_{50\%}$, la contrainte hydrodynamique requise pour détacher 50% des cellules, égale à 53Pa et un $\tilde{\sigma}$, la variance non-dimensionnelle de la distribution log-normale, égale à 0,58.

La profondeur des joints de grain a une nette influence sur le détachement des levures : la constante de détachement k_0 augmente 3 à 5 fois quand la taille de grain diminue et la profondeur des attaques de grain croît. Les levures se révèlent être sensibles à l'orientation cristallographique des grains avec une adhésion préférentielle sur ceux appartenant à l'orientation $\langle 001 \rangle$.

Chapitre X : Cinétiques de détachement d'*Escherichia coli* adsorbée sur des surfaces d'acier inoxydable

E. coli est une bactérie Gram⁻ mesurant environ 2µm et de forme ovoïde. La souche retenue pour les expériences est XLI-blue, souche résistance à la tétracycline. Celle a été choisie non pour cette caractéristique mais pour son homogénéité de taille par rapport à d'autres souches comme JM109. En choisissant un microorganisme plus petit et de forme ovoïde, les résultats attendus étaient une modification de la cinétique de détachement des cellules avec une influence plus forte de la rugosité et de la profondeur de gravage.

I. Analyse physiologique d'*E.coli* à l'aide du test MATS

Le test MATS a été réalisé sur des cultures d'*E. coli* cultivées dans un milieu LB, sous agitation, à 37°C, température optimale pour leur croissance. Les résultats sont présentés dans la figure 38 dans laquelle sont regroupés, pour effectuer une comparaison, les résultats du test MATS obtenu avec *S. cerevisiae* cultivée à 30°C.

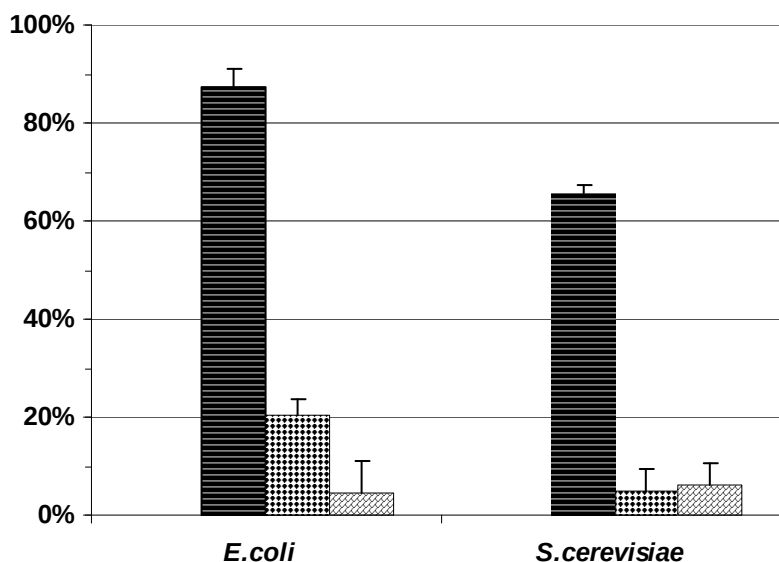


Figure 38 : Test MATS pour *E. coli* cultivée à 37°C et comparaison les résultats du test MATS obtenus pour *S. cerevisiae* à 30°C ■■■ : Chloroforme ■■■■ : Décane ; ▨ : Acétate d'Ethyle

Pour *E. coli* à 37°C, les résultats du test MATS montrent une très grande affinité pour le Chloroforme (87%) tandis que celle pour le Décane est assez faible (20%) et celles pour l'Acétate d'Ethyle (4%) et pour l'Hexadecane (0%) sont respectivement infime et nulle. La différence d'affinité entre le Chloroforme et l'Hexadecane révèle le caractère très basique de cette souche (87% environ) encore plus que *S. cerevisiae* (66%). Les cellules sont peu acides (affinité pour l'Acétate d'Ethyle 4%), ce résultat était un peu plus faible que pour *S. cerevisiae* (6%). Cependant, le caractère Lewis-base est nettement prononcé. Elles sont très hydrophiles (faible affinité à l'Hexadecane et au Décane). Les bactéries *E. coli* sont donc très hydrophiles et encore plus basiques que *S. cerevisiae*.

II. Cinétiques de détachement d'*E.coli* à une surface d'acier inoxydable poli attaqué et poli miroir

Les expériences sous flux ont été réalisées, à l'aide de la chambre à flux radial remplie de tampon KH_2PO_4 0,001 M, avec *E. coli* sur des surfaces d'acier inoxydable poli miroir et poli attaqué avec des tailles de grain de 20, 40 et 100 μm . Les résultats sont présentés dans la figure 39.

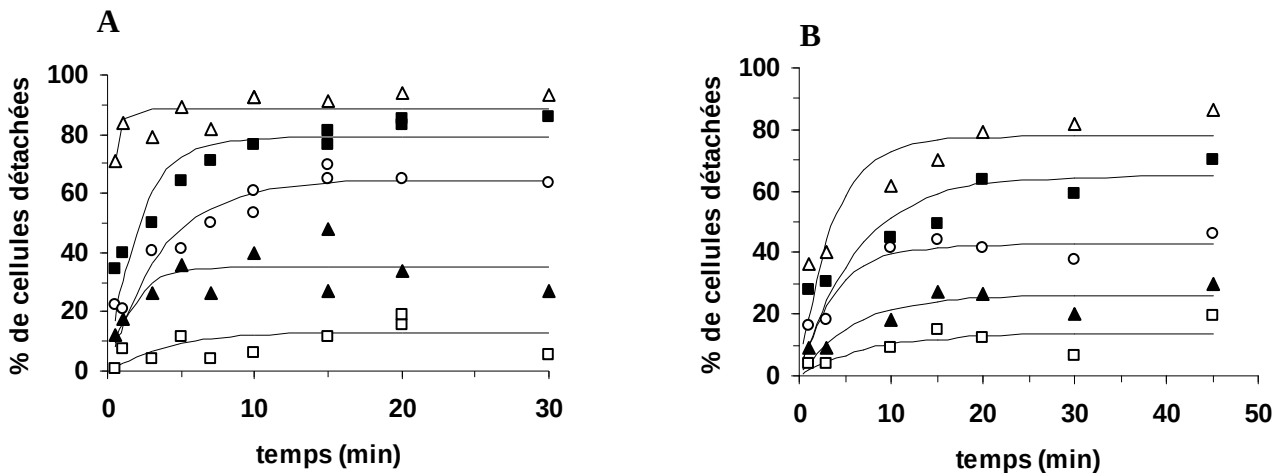


Figure 39 : Cinétique de détachement d'*E. coli* pour un échantillon d'acier inoxydable poli miroir (A) et poli attaqué avec une taille de grain de 20 μm (B) (0 à 100nm de profondeur) sous différentes contraintes σ . $\square$: $\sigma = 0,25\text{Pa}$; $\blacktriangle$: $\sigma = 0,37\text{Pa}$; $\circ$: $\sigma = 0,62\text{Pa}$; $\blacksquare$: $0,92\text{Pa}$; $\triangle$: $1,8\text{Pa}$. Les données ont été ajustées avec une cinétique du premier ordre, déterminant l'efficacité de détachement et le taux de détachement

Sur la figure 39, on peut noter que la cinétique de détachement est plus rapide pour un acier inoxydable poli miroir PM que pour un échantillon poli attaqué PA avec une taille de grain de 20 μm . Par exemple, à 1,8Pa, le plateau est atteint à 5min pour l'échantillon poli

miroir PM mais à 15min pour celui poli attaqué PA. La cinétique de détachement de l'ensemble des échantillons polis attaqués PA est homogène. Il est à noter que quelle que soit la contrainte appliquée, la hauteur du plateau est équivalente pour les deux échantillons présentés ici ainsi que ceux avec une taille de grain de 40 et 100 μ m.

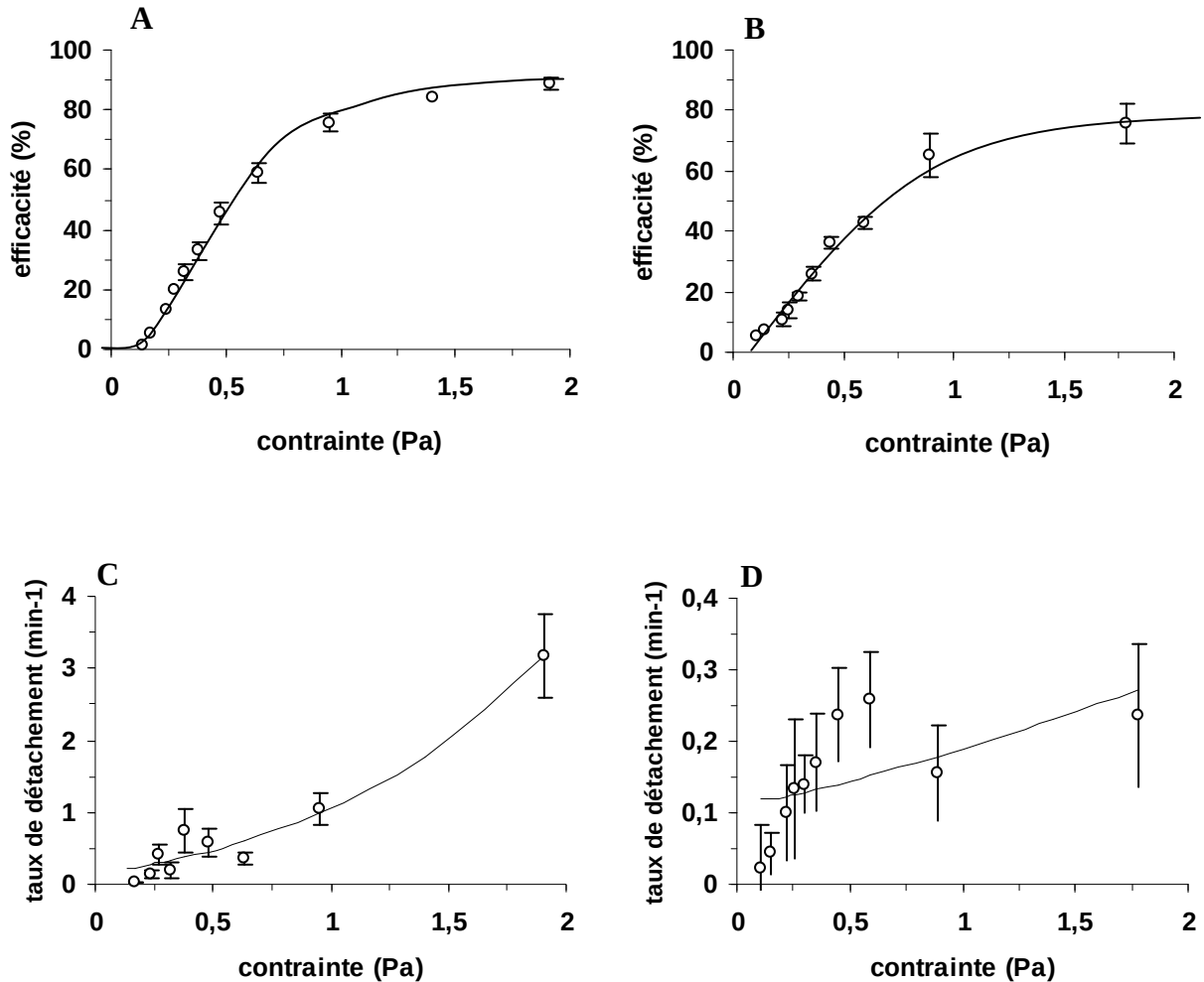


Figure 40 : Taux de détachement $k(\sigma)$ et efficacité de détachement $e(\sigma)$ d'*E. coli* pour un échantillon poli miroir (A,C) et poli attaqué 20 μ m (0 à 100nm de profondeur) (B,D). A et B : les courbes $e(\sigma)$ ont été ajustées, pour le PM, avec $\sigma_{50\%} = 0,54\text{Pa}$ et $\tilde{\sigma} = 0,8$ et pour le PA20 μ m avec $\sigma_{50\%} = 0,7\text{Pa}$ et $\tilde{\sigma} = 1,03$. C et D : les courbes $k(\sigma)$ ont été ajustées avec $k_0 = 0,07\text{min}^{-1}$ et $\sigma_0 = 0,022\text{Pa}$ pour le PM ; $k_0 = 0,05\text{min}^{-1}$ et $\sigma_0 = 0,11\text{Pa}$ pour le PA20 μ m. La détermination des paramètres donnant le meilleur fit des données expérimentales et une estimation de l'erreur associée à cette détermination ont été réalisées à l'aide du programme Kaleidagraph

D'après la **figure 40**, on peut noter que, tout comme les levures, l'efficacité de détachement aux temps longs ne dépend pas de la topographie de surface. En effet, $\sigma_{50\%}$, la contrainte hydrodynamique requise pour détacher 50% des cellules, est à peu près semblable (0,54 et 0,7Pa) pour un échantillon poli miroir PM ou poli attaqué PA (**figure 40 et 41A**). Par contre, la cinétique de détachement $k(\sigma)$ est considérablement ralentie sur les échantillons

polis attaqués PA avec k_0 et σ_0 respectivement égaux à $0,05 \text{ min}^{-1}$ et $0,11 \text{ Pa}$, contre $0,07 \text{ min}^{-1}$ et $0,022 \text{ Pa}$ pour un échantillon poli miroir PM (**figures 40C, 40D et 41B**). L'hypothèse de ce constat est que cet effet soit dû au piégeage des bactéries dans les joints de grain. Les bactéries étant plus petites et plus allongées que les levures, elles pourraient être retenues dans les joints de grain ou, du moins, gênées par ceux-ci. Les résultats montrés ici correspondent aux échantillons polis attaqués PA avec une taille de grain de $20 \mu\text{m}$, les résultats étant similaires pour les échantillons avec une taille de grain de 40 et $100 \mu\text{m}$ (**figure 41**). Il n'y a donc pas d'effet net de la taille de grain sur la cinétique de détachement des bactéries *E. coli*.

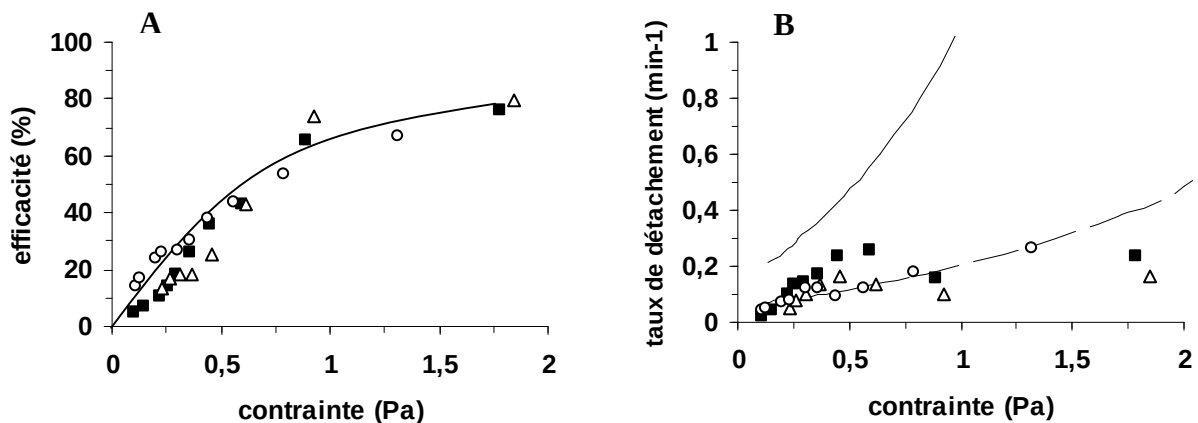


Figure 41 : Influence de la taille de grain sur l'efficacité $e(\sigma)$ (A) et le taux de détachement $k(\sigma)$ (B) d'*E. coli*. En B, courbe pleine — = fit pour l'échantillon poli miroir PM, ■ = PA20μm, ○ = PA100μm, △ : PA40μm et courbe hachurée — — = fit pour le PA100μm

III. Etude de l'influence de la profondeur des joints de grain sur le détachement d'*Escherichia coli*

L'influence de la profondeur des joints de grain sur le détachement des cellules d'*E. coli* a été étudiée avec, comme pour *S. cerevisiae*, des échantillons d'acier inoxydable poli attaqué (PA) dont le temps d'attaque électro-nitrique était de 1 et 4 min correspondant respectivement à des profondeurs de grains de $100 \text{ nm} \pm 50$ et de $650 \text{ nm} \pm 150$.

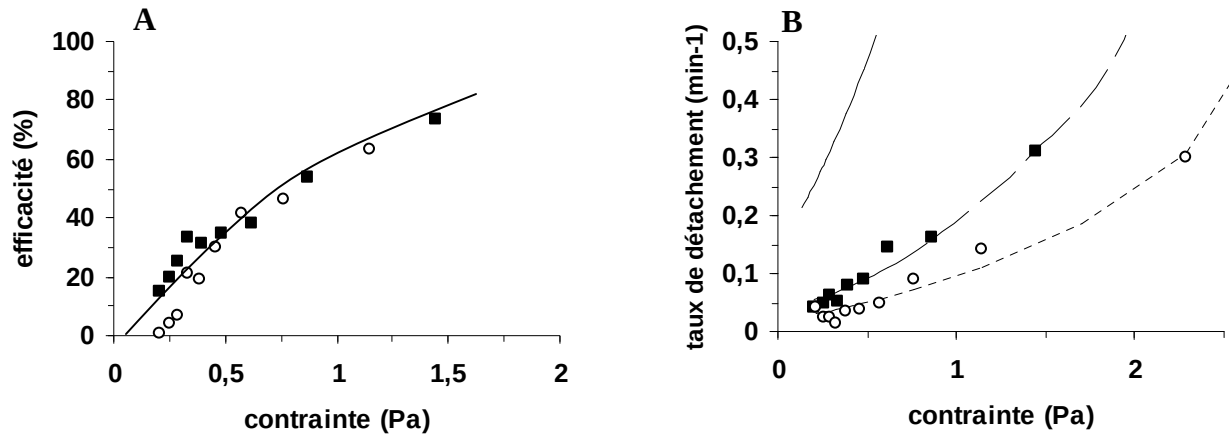


Figure 42 : Effet de la profondeur de gravage sur l'efficacité (A) et le taux de détachement (B) d'*E. coli* sur un PA100µm. ■ : PA100µm attaqué pendant 1min ; ○ : PA100µm attaqué pendant 4min ; en B : courbe pleine — : fit pour le PM ; courbe grands tirets — — : fit pour le PA100µm attaqué pendant 1min ; courbe petits tirets : fit pour le PA100µm attaqué pendant 4min

D'après ces résultats, on peut en déduire que l'efficacité est la même quelle que soit la profondeur de gravage. Cependant, plus la profondeur de gravage augmente, plus la cinétique de détachement est ralentie (**fig.42B et 43A**). Il semble, par ailleurs, que k_0 diminue quand la profondeur de gravage augmente. Ceci est confirmé en **figure 43B** avec la représentation de k_0^{-1} en fonction de la profondeur de gravage. La constante de détachement est donc moins importante quand la profondeur des grains augmente. σ_0 n'évolue pas en fonction de la profondeur de gravage (**figure 43B**). Ce résultat est logique car σ_0 ne dépend que de la géométrie de la cellule et du nombre de liens adhésifs et non pas de la rugosité de la surface sur laquelle le microorganisme adhère.

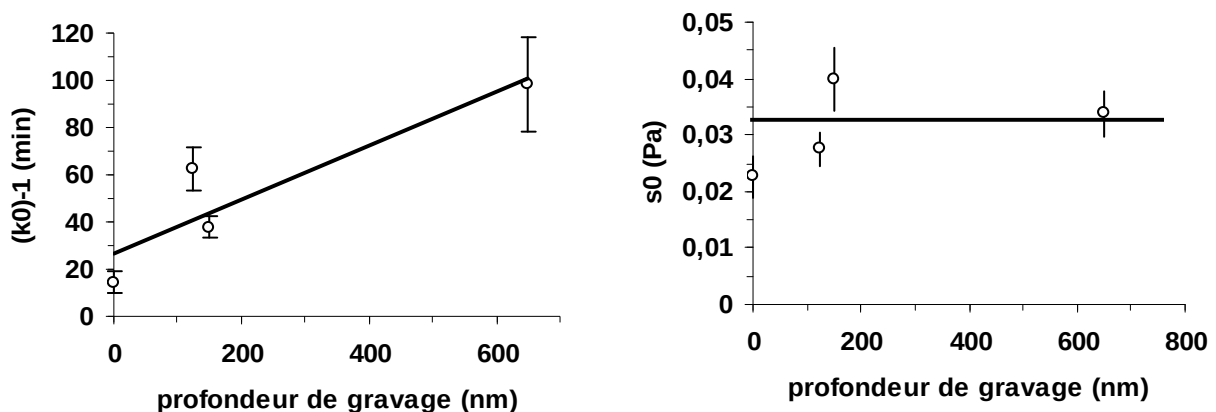


Figure 43 : Influence de la profondeur de gravage (nm) d'un échantillon poli attaqué PA avec une taille de grain de 100µm sur k_0 (A) et σ_0 (B)

IV. Influence de l'orientation cristallographique des grains sur l'adhésion d'*E. coli*

Comme au chapitre IX, paragraphe IV, une expérience sous flux a été réalisée avec l'échantillon montré **en figure 32**, où la forme et l'orientation cristallographique de chaque grain a été enregistré dans une zone prédéfinie (taille des grains $100\mu\text{m}$; profondeur de gravage 100nm ; contrainte environ 50Pa ; durée de l'expérience 15 min). Comme pour les levures, les bactéries *E. coli* sont répartis de manière hétérogène (**figure 44**) après l'application du flux. Les cellules restantes sont plus nombreuses sur les grains d'orientation cristallographique $\langle 001 \rangle$: 3000 ± 100 cellules/ mm^2 sur cette classe comparé à 2400 ± 250 cellules/ mm^2 pour les autres classes. L'expérience a été réalisée deux fois. Le résultat est reproductible.

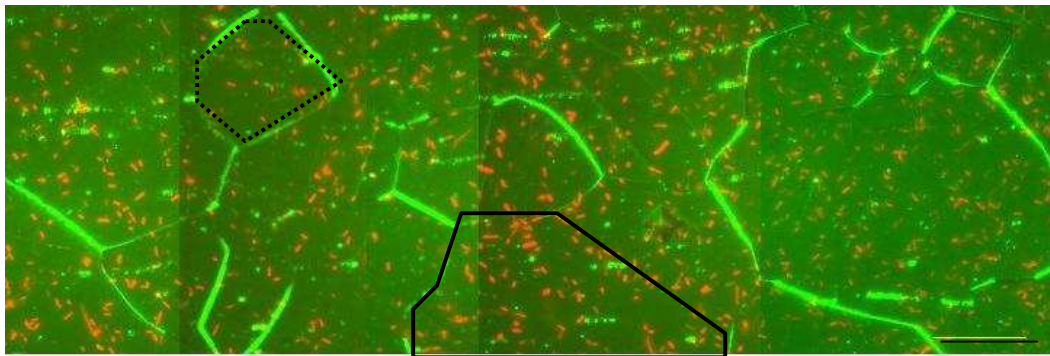


Figure 44 : Répartition hétérogène des bactéries *E. coli* après l'application d'un flux. En pointillés, un grain d'orientation cristallographique $\langle 111 \rangle$, sur lequel on dénombre peu de cellules adhérentes comparé au grain d'orientation cristallographique $\langle 001 \rangle$ en trait plein. Image obtenue par superposition de photos des joints de grain (en vert) prises en lumière réfléchie et des cellules (en rouge) prises en épifluorescence. Barre d'échelle: $40\mu\text{m}$

V. Visualisation du détachement d'*E. coli*

Le détachement sous flux d'*E. coli* a été visualisé sous microscopie à épifluorescence avec caméra. Le dispositif expérimental mis au point soumettait les cellules adhérentes à des contraintes, appliquées à l'aide d'un flux de liquide émanant d'une pipette, et permettant leur détachement. La **figure 45**, permet de résumer le mode de détachement d'*E. coli*.

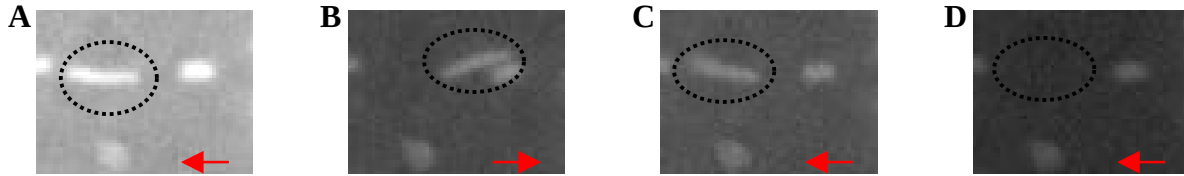


Figure 45 : Mode de détachement d'une cellule *E. coli* (en pointillés) soumise un flux (direction notée par la flèche)

Comme nous pouvons le voir, le détachement d'*E. coli* peut se décomposer en quatre étapes : la cellule est d'abord bien adhérente, sur le substrat, sur toute sa longueur (**figure 45A** ; $t = 1s$) ; certains des points d'attache se rompent, la cellule n'est plus fixée que par l'une de ses extrémités et se réoriente suivant le sens du flux (**figure 45B**, $t = 18s$; **45C**, $t = 22s$). Enfin, la cellule se détache et se trouve emportée par le flux (**figure 45D**, $t = 32s$). Ainsi, la cellule d'*E. coli* n'est pas fixée sur toute la surface en contact avec le substrat et le nombre de ponts adhésifs n'est pas élevé ce qui permet ce mode de détachement. Le fait que la cellule reste attachée un moment à une de ses extrémités laisserait supposer l'implication d'appendices (flagelles, pili) dans ce mode d'attachement.

Par ailleurs, lors de cette expérience, nous avons pu mettre en évidence un renforcement de l'adhérence après application du flux. En effet, avant l'expérience, les cellules sont soumises au mouvement brownien et, après application du flux, elles sont immobiles.

VI. Conclusion

La cinétique de détachement d'*E. coli* est trois fois plus rapide sur un échantillon poli miroir que sur un échantillon poli attaqué contrairement à ce qui avait été observé avec les levures : la constante du taux de détachement k_0 est équivalente à $0,05 \text{ min}^{-1}$ pour un échantillon poli attaqué et $0,022 \text{ min}^{-1}$ pour un échantillon poli miroir. La cinétique de détachement pour l'ensemble des surfaces polies attaquées est homogène et quelle que soit la contrainte appliquée, la valeur du plateau est la même pour l'ensemble des échantillons étudiés. Comme pour les levures, l'efficacité de détachement ne dépend pas de la topographie de surface. Ainsi, le $\sigma_{50\%}$ et similaire pour un échantillon poli miroir et poli attaqué (0,54 et 0,7Pa). De même que pour *S. cerevisiae*, la taille des grains n'a pas d'influence nette sur la cinétique de détachement d'*E. coli* qui est, par ailleurs, sensible à l'orientation cristallographique des grains avec une adhésion préférentielle sur ceux d'orientation $\langle 001 \rangle$.

Chapitre XI : Cinétiques de détachement de *Staphylococcus epidermidis* à des surfaces d'acier inoxydable

Nous avons poursuivi nos expériences en choisissant un microorganisme encore plus petit qu'*E. coli* à savoir *S. epidermidis*. Cette bactérie est une bactérie Gram⁺, de forme ovoïde et mesurant moins de 1µm, elle est responsable de la plupart des infections nosocomiales favorisées par la présence de matériel étranger chez le patient (cathéter, prothèses...).

I. Analyse physiologique de *S. epidermidis* à l'aide du test MATS

Les bactéries *S. epidermidis* ont été cultivées à 37°C dans du TSB sous agitation. Les résultats obtenus avec le test MATS sont représentés sur la figure 46.

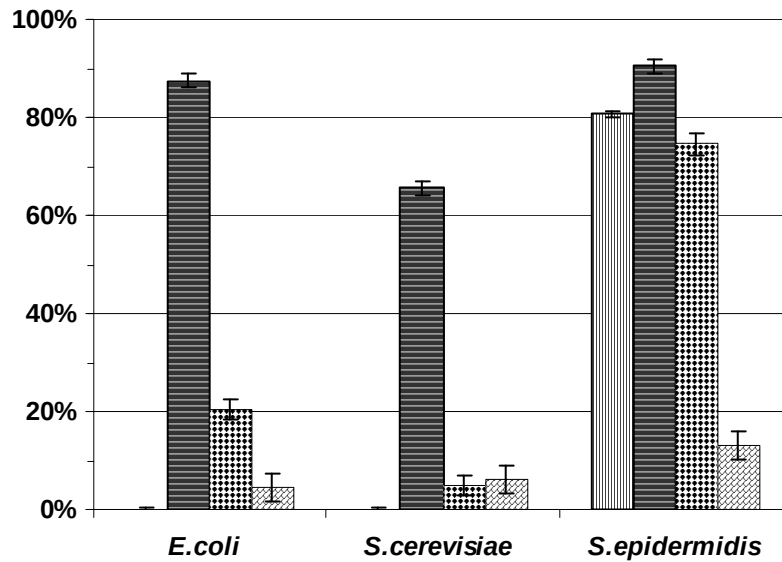


Figure 46 : Test MATS effectué pour *S. epidermidis* cultivé à 37°C et comparé aux résultats obtenus avec *E. coli* et *S. cerevisiae*.
 □ Hexadécane; ■ :Chloroforme ; ▨ : Décane ; ▩ : Acétate d'Ethyle

D'après ces résultats, *Staphylococcus epidermidis* on peut noter une grande affinité pour le Chloroforme (90%). Les affinités pour l'Hexadecane et le Décane sont également

assez importantes (respectivement 81% et 75%) tandis que celle pour l'Acétate d'Ethyle est assez faible (13%). La différence d'affinité entre le Chloroforme et l'Hexadecane révèle le caractère acido-basique de cette souche et son hydrophobie peut être estimée avec l'affinité pour le Décane et l'Hexadecane. Ces résultats sont très différents de ceux obtenus pour *S. cerevisiae* et *E. coli*, plus basiques et hydrophiles. *S. epidermidis* est hydrophobe et acido-basique. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse d'une influence de cette physiologie bactérienne sur l'adhésion.

II. Cinétiques de détachement de *S. epidermidis* adsorbés sur des aciers inoxydables poli attaqué et poli miroir

Des expériences similaires à celles faites avec *S. cerevisiae* et *E. coli* ont été réalisées avec *S. epidermidis*, à l'aide de la chambre à flux radial remplie de tampon phosphate. Les résultats sont donnés dans la **figure 47**.

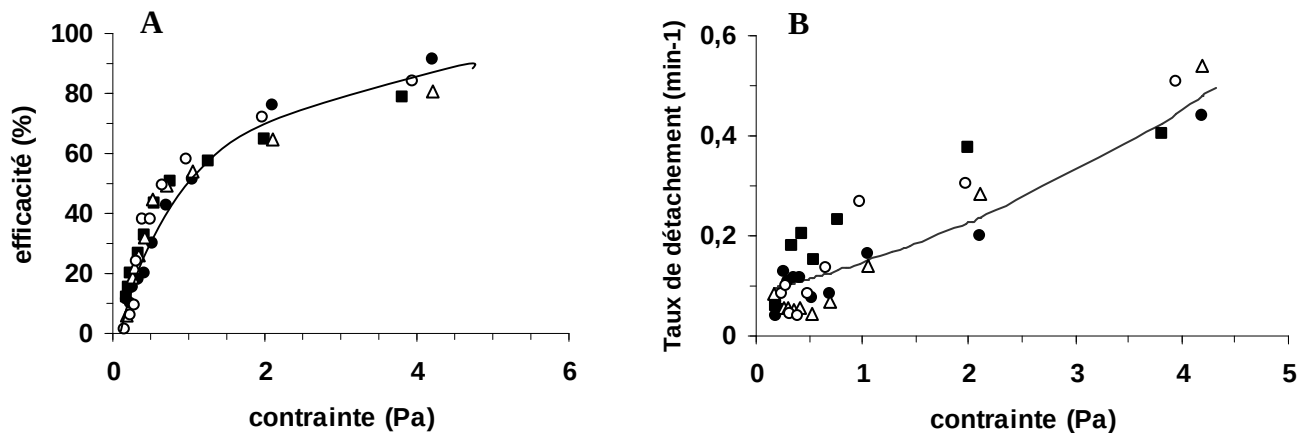


Figure 47 : Efficacité (A) et taux de détachement $k(\sigma)$ (B) pour *S. epidermidis* sur un acier inoxydable poli attaqué (PA) avec différentes tailles de grain ou poli miroir (PM). ■ : PA20μm ; △ : PA40μm ; ○ : PA100μm ; ● : échantillon poli miroir PM. En B, le fit représente la tendance moyenne de l'ensemble des données (voir figure 48B)

D'après la **figure 47**, on note que la cinétique de détachement de *S. epidermidis* sur un échantillon poli attaqué PA est équivalente à celle sur un échantillon poli miroir PM. La rugosité n'influence donc pas le détachement de *S. epidermidis*, tout comme la taille des grains : aucune différence n'est remarquée entre une surface polie attaquée avec une taille de grain de 100μm, 40 ou 20μm. Ces résultats seront discutés dans le chapitre XII. Les valeurs de $\sigma_{50\%}$ et $\tilde{\sigma}$ sont respectivement, pour l'échantillon poli miroir PM : 0,94Pa et 1,15; et pour

les échantillons polis attaqués PA, avec une taille de grains de $20\mu\text{m}$: 0,88Pa et 1,60, de $40\mu\text{m}$: 0,92Pa et 1,58 et $100\mu\text{m}$: 0,81Pa et 1,19. Il n'y a donc aucune différence significative entre l'ensemble de ces types d'acier inoxydables.

III. Influence de la profondeur des joints de grain sur le détachement de *Staphylococcus epidermidis*

La cinétique de détachement de *S. epidermidis* a également été étudiée sur une surface d'acier inoxydable poli attaqué avec une taille de grain de $100\mu\text{m}$ et une profondeur de $100\text{nm} \pm 50$ et $650\text{nm} \pm 150$ (respectivement 1 et 4 min d'attaque électro-nitrique). Les résultats de ces expériences sont visualisés dans la figure 48.

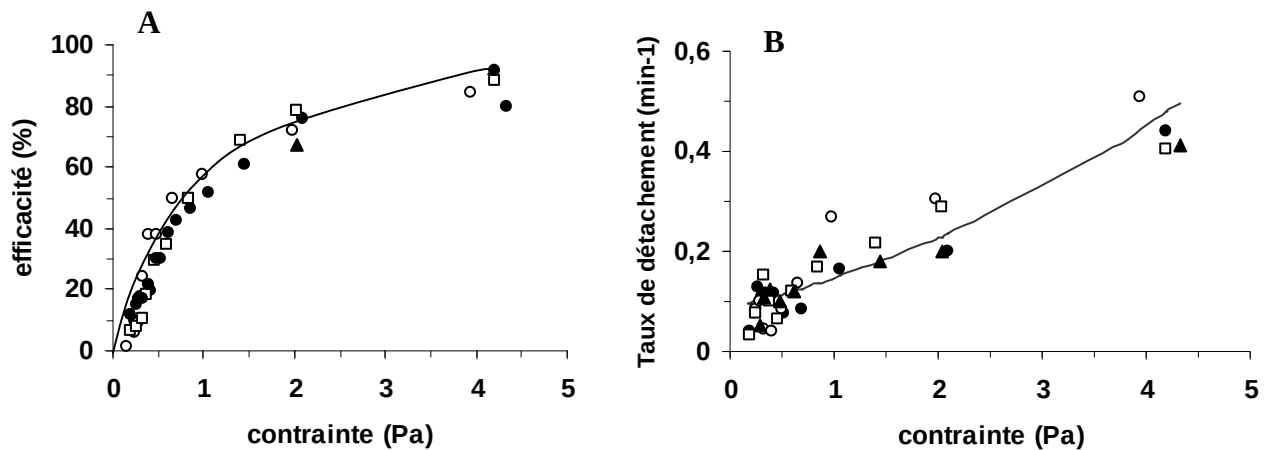


Figure 48 : Influence de la profondeur de gravage sur la cinétique de détachement de *S. epidermidis*. Efficacité (A) et taux de détachement (B) en fonction de la contrainte. ▲ : échantillon poli attaqué avec une taille de grain de $100\mu\text{m}$ (PA100µm) attaqué pendant 4min ; □ : PA100µm attaqué pendant 1min ; ○ : PA100µm et ● : échantillon poli miroir PM. Les courbes ont été ajustées avec, pour l'échantillon PA100µm 1min, $\sigma_{50\%} = 0,89$ et $\tilde{\sigma} = 0,99\text{Pa}$ et pour le PA100µm 4min, $\sigma_{50\%} = 1,06$ et $\tilde{\sigma} = 1,42\text{Pa}$. En B, le fit représente la tendance moyenne de l'ensemble des données (voir figure 45B). Pour plus de lisibilité, les barres d'erreur ont été omises

On peut noter que *S. epidermidis* a une efficacité de détachement sur un échantillon poli attaqué PA avec une taille de grain de $100\mu\text{m}$ quasi-identique quelles que soient la profondeur de gravage et le taux de détachement similaire sur les échantillons polis attaqués avec une taille de grain de $100\mu\text{m}$ (PA100µm) attaqués pendant 4min et 1min. Ainsi, *S. epidermidis* n'est pas sensible à la profondeur des joints de grain. L'efficacité de détachement étant la même sur une surface polie miroir PM ou polie attaquée avec une taille de grains de 20, 40 ou $100\mu\text{m}$ (quelle que soit la profondeur de gravage), on peut donc regrouper l'ensemble de ces données sur un graphique (figure 49).

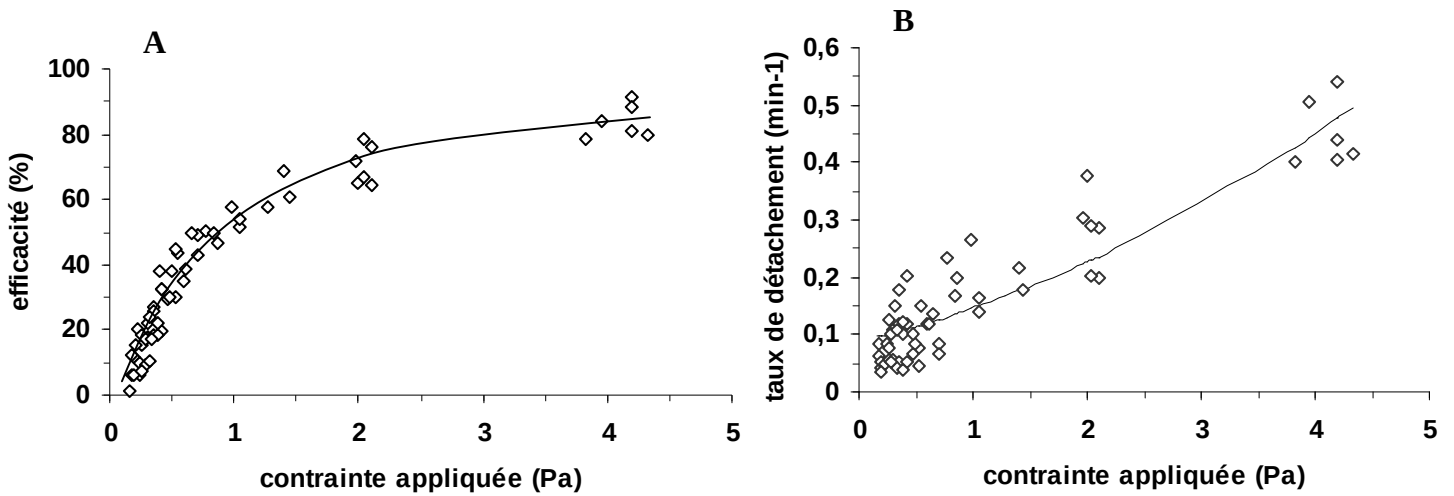


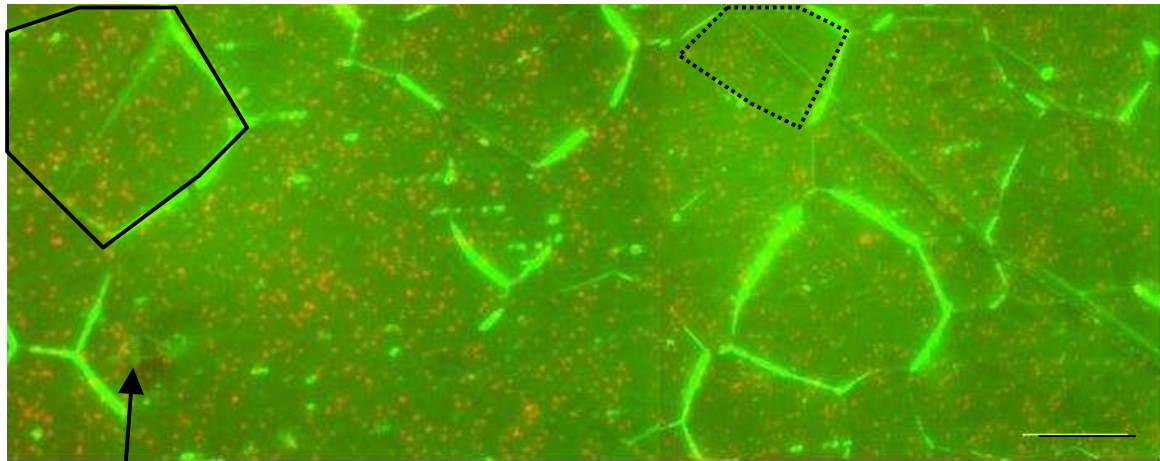
Figure 49 : Efficacité et cinétique de détachement (A et B) pour l'ensemble des échantillons polis attaqués PA et polis miroir PM pour *S. epidermidis*. Les courbes ont été ajustées avec $\sigma_{50\%} = 0,92$ Pa, $\bar{\sigma} = 1,32$, $\sigma_0 = 0,11$ Pa et $k_0 = 0,040$ Pa

D'après la figure 49, on voit nettement une efficacité et une cinétique de détachement similaires pour l'ensemble des types d'acier inoxydables utilisés pour *S. epidermidis*.

IV. Influence de l'orientation cristallographique des grains sur l'adhésion de *Staphylococcus epidermidis*

Pour *S. epidermidis*, l'étude de l'influence de l'orientation cristallographique a également été étudiée comme pour *S. cerevisiae* et *E. coli*. Après une adhésion de 35min sur un échantillon poli attaqué PA de taille de grain 100 μ m sur lequel une zone a été repérée, les bactéries sont soumises à une contrainte sous flux d'environ 0,15Pa pendant 15min. Les cellules restantes sont ensuite colorées à l'acridine orangée et observées au microscope à épifluorescence. Tout comme pour *S. cerevisiae* et *E. coli*, l'adhésion de *S. epidermidis* est plus importante sur des grains appartenant à la classe d'orientation cristallographique <001>. On note, en effet, une répartition hétérogène (voir figure 50) des cellules restantes après l'expérience de détachement sous flux.

On note environ $13\,150 \pm 115$ cellules/mm² pour la classe <001> contre 9450 ± 90 cellules/mm² pour les autres classes. Les cellules sont donc sensibles à l'orientation cristallographique.



Marque
d'indentation

Figure 50 : Répartition hétérogène des *S. epidermidis* après l'application d'un flux. En pointillés, grain d'orientation cristallographique $\langle 110 \rangle$ sur lequel on note peu de cellules adhérentes comparé au grain d'orientation cristallographique $\langle 001 \rangle$, en trait plein. La marque de repérage faite avec une pointe en diamant est visible. Image obtenue par superposition de photos des joints de grain (en vert) prises en lumière réfléchie et des cellules (en rouge) prises en épifluorescence. Barre d'échelle : 40 μm

V. Conclusion

La cinétique de détachement de *S. epidermidis* est similaire pour un échantillon poli miroir ou poli attaqué et ceci quelle que soit la taille des grains. L'efficacité de détachement est similaire pour l'ensemble des échantillons. La profondeur de gravage n'a pas d'influence sur le détachement de *S. epidermidis* : sa cinétique de détachement n'est pas ralentie quand la profondeur de gravage augmente. Comme pour les deux précédents microorganismes, *S. epidermidis* est sensible à l'orientation cristallographique des grains avec une adhésion préférentielle sur ceux appartenant à l'orientation $\langle 001 \rangle$. L'ensemble des résultats obtenus pour les trois microorganismes est récapitulé dans la **table 11**.

Microorganisme	détachement plus aisé sur PM ou PA	Influence de la taille de grain	Influence de la profondeur d'attaque des joints de grain	Influence de l'orientation cristallographique
<i>S. cerevisiae</i>	PA	Détachement facilité sur un PA20	Cinétique de détachement augmente quand profondeur plus importante	Adhésion préférentielle sur les grains d'orientation <001>
<i>E. coli</i>	PM	Aucune	Cinétique de détachement ralentie quand profondeur plus importante	Adhésion préférentielle sur les grains d'orientation <001>
<i>S. epidermidis</i>	Equivalent	Aucune	Aucune	Adhésion préférentielle sur les grains d'orientation <001>

Table 11 : Récapitulatif des résultats obtenus pour *S. cerevisiae*, *E. coli* et *S. epidermidis*

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse utilise le modèle de Garrivier et Décavé (Décavé et al., 2002) portant sur le mode de détachement, par pelage, d'une cellule adhérente à un substrat. Ces auteurs s'étaient intéressés au microorganisme *Dictyostelium discoideum*, une amibe présentant la particularité de pouvoir se déformer par émission de pseudopodes contrairement aux microorganismes étudiés ici. *S. cerevisiae*, *E. coli* et *S. epidermidis* possèdent des tailles différentes entre eux, nettement plus petite que *D. discoideum*, et appartiennent à des classes différentes de microorganismes.

Les principaux résultats obtenus dans le cadre de cette thèse peuvent être résumés ainsi :

- L'efficacité de détachement ne dépend ni de la rugosité ni de la taille des grains.
- L'orientation cristallographique des grains influence leur détachement : on note une répartition hétérogène des cellules après passage d'un flux, avec une adhésion préférentielle sur les grains appartenant à l'orientation $\langle 001 \rangle$, qui expose une surface d'énergie plus importante.
- *S. cerevisiae*, une levure, présente une cinétique de détachement plus rapide sur un acier inoxydable poli attaqué (PA) que poli miroir (PM). *S. cerevisiae* est sensible à la profondeur d'attaque des joints de grain et à la densité des grains.
- *E. coli*, bactérie Gram⁻ plus petite que *S. cerevisiae*, présente une cinétique de détachement plus rapide sur un échantillon poli miroir PM que sur un échantillon poli attaqué PA. *E. coli* est sensible à la profondeur des joints de grain. Sa cinétique de détachement est ralentie sur un échantillon poli attaqué PA avec une taille de grain de 100µm attaqué pendant 4 min par rapport à un échantillon poli attaqué avec la même taille de grain mais attaqué pendant 1min.
- *S. epidermidis*, bactérie Gram⁺ dont la taille est encore plus petite qu'*E. coli*, se détache aussi rapidement d'une surface d'acier inoxydable poli attaqué PA que d'une surface d'acier inoxydable poli miroir PM. Sa cinétique de détachement n'est pas ralentie lorsqu'on augmente la profondeur de gravage sur les surfaces polies attaquées PA.

Dans cette partie, nous allons interpréter ces différents points, puis nous proposerons des améliorations dans l'élaboration des surfaces d'acier inoxydable pouvant réduire l'adhésion des microorganismes.

I. Equivalence de l'efficacité de détachement, pour les trois microorganismes, sur un échantillon poli miroir PM et poli attaqué PA

L'efficacité est le pourcentage de cellules détachées à une contrainte σ donnée, pour un temps « infini ». Afin d'expliquer l'équivalence de celle-ci, pour les trois microorganismes, sur un échantillon poli miroir PM ou poli attaqué PA, rappelons que, dans le modèle de Décavé et al. (Décavé et al., 2002), expliqué au Chapitre VI §III, elle est interprétée dans le cadre d'un modèle de pelage de l'aire de contact entre le microorganisme et le substrat.

La cellule est attachée au substrat par un ensemble de liens adhésifs qui fluctuent entre un état lié et un état libre. La différence d'énergie entre ces deux états est appelée ΔG_{adh} . Lorsqu'une force extérieure est appliquée sur un lien, la probabilité de détachement (lié $\rightarrow$ libre) augmente et la probabilité d'attachement (lié $\rightarrow$ libre) diminue. Il existe une force maximale fb^* , exercée sur le lien, pour laquelle les états libre et lié ont la même énergie :

$$fb^* = \Delta G_{adh} / \Delta = f_o (\Delta G_{adh} / k_B T) \quad (31)$$

Avec Δ , l'énergie nécessaire pour passer de l'état attaché, ou détaché, à l'état d'équilibre.

Ceci est valable à l'échelle microscopique d'un lien. Transposé à l'échelle d'une cellule, il existe une contrainte externe σ_c telle que, pour le lien le plus tendu, l'énergie de l'état libre soit égale à celle de l'état attaché. Ce lien se dissocie donc et la même situation se reproduit avec le lien voisin qui devient le lien le plus tendu. On a donc un mode détachement par pelage lorsque $\sigma > \sigma_c$.

Le modèle de Décavé et al. montre, par ailleurs, que :

$$\sigma_{50\%} / \sigma_o = (\Delta G_{adh} / k_B T)^2 + (\pi^2/3 - 2) \quad (32)$$

La constante d'échelle σ_o est fonction des paramètres géométrique (taille R de la cellule) et biologique (densité n_o des liens). Le paramètre $\Delta G_{adh} / k_B T$ représente l'énergie d'interaction par lien adhésif. De ce fait, on comprend l'indépendance de $\sigma_{50\%}$ vis-à-vis de la présence et du nombre de grain. En effet, les propriétés chimiques de surface des échantillons d'acier inoxydable utilisés sont essentiellement les mêmes quel que soit le traitement de surface (comme l'indiquent les mesures avec la technique XPS et les angles de mouillage), ΔG_{adh} ne change donc pas. Comme mentionné précédemment, σ_o dépend de la taille de la cellule et de la densité des liens et non pas de la topographie de surface du matériau. Ainsi, l'efficacité sera semblable pour un acier inoxydable poli attaqué ou poli miroir avec un microorganisme considéré.

Les différences de valeurs de l'efficacité d'un microorganisme à un autre sont dues à des valeurs, pour $\sigma_{50\%}$, non similaires (50Pa pour *S. cerevisiae* ; 0,7Pa pour *E. coli* et 1Pa pour *S. epidermidis*). L'effet du gravage sur la cinétique de détachement est dû à des temps de pelage prolongés, pour *E. coli*, diminués pour *S. cerevisiae* et inchangés pour *S. epidermidis*. L'interprétation des cinétiques de détachement sera effectuée au paragraphe III.

La forme de la courbe d'efficacité de détachement est liée à la distribution statistique des contraintes seuils σ_c . A une contrainte donnée σ , pour les cellules dont la contrainte σ_c est inférieure à σ , le lien le plus tendu se détache et le pelage débute, conduisant au détachement de la cellule. Décavé et al. (Décavé et al., 2002) ont montré que pour une population cellulaire donnée de *D. discoideum*, les contraintes cinétiques sont liées à la taille de la cellule, les plus grosses se détachant à des contraintes plus faibles. La distribution des contraintes seuils reflète la distribution des tailles cellulaires présentes dans une population cellulaire donnée. Ainsi, δ , la variance non-dimensionnelle de la distribution log-normale, ne dépend pas de la topographie de la surface ni du type cellulaire utilisé. Pour les trois microorganismes étudiés, δ est compris entre 0,6 et 1,3 et la forme de la courbe d'efficacité est similaire.

II. Sensibilité à l'orientation cristallographique des grains

Lors des expériences menées lors de cette thèse, nous avons remarqué l'influence de l'orientation cristallographique des grains sur le détachement de chacun des trois microorganismes. En effet, après le passage d'un flux, la répartition des cellules était hétérogène et avait lieu préférentiellement sur les grains appartenant à l'orientation cristallographique $\langle 001 \rangle$. Ces grains présentent comme surface libre une face de plus haute énergie que les surfaces les plus denses telles que celles d'orientation $\langle 111 \rangle$. Il est donc naturel que les cellules y adhèrent mieux car l'énergie de la surface masquée par la cellule contribue à ΔG_{adh} , l'énergie par unité de surface lors d'un contact cellule/substrat : plus cette énergie est élevée, plus difficile sera le détachement.

III. Interprétation des cinétiques de détachement

III.1. Propriétés mécaniques des cellules étudiées

Le « comportement mécanique » des microorganismes étudiés, dans le cadre de cette thèse, diffèrent entre eux. En effet, *S. cerevisiae* est un microorganisme mesurant entre 4 et 5µm, de forme ovale, possédant une coque assez épaisse (100nm) et donc, par conséquent, peu déformable. *S. epidermidis* est une bactérie Gram⁺ ayant donc une paroi plus épaisse (50nm), et se présentant sous forme coccobacillaire la plupart du temps donc peu déformable également. Cette bactérie mesure moins de 1µm et est de forme ovale. *E. coli* est une bactérie Gram⁻, ayant donc une paroi plus fine (15nm) et étant donc plus facilement déformable que les deux précédents microorganismes. Sa taille est de 1 à 2µm et sa forme est ovoïde.

Dans les sections suivantes, nous allons interpréter les différences entre le comportement de *S. cerevisiae*, *E. coli* et *S. epidermidis* vis-à-vis de la rugosité de surface. Dans la première section (III.2), nous montrons que la déformabilité cellulaire explique le fait que la cinétique de détachement d'*E. coli* soit ralentie sur des surfaces rugueuses. Nous calculerons aussi l'énergie d'adhésion maximale par cellule. Dans la seconde section (III.3), nous montrons que l'énergie cinétique acquise par une cellule lorsqu'elle franchit un obstacle, est considérablement plus grande pour une grosse cellule et peut donc expliquer que la cinétique de détachement de *S. cerevisiae* est accélérée sur les surfaces rugueuses.

III.2. Thermodynamique et adhésion

Sur un échantillon poli attaqué PA, contrairement à un échantillon poli miroir PM, la topographie est caractérisée par la présence d'hauteurs différentielles (« marches »). Au voisinage d'une marche, la cellule ne pourra épouser la topographie locale qu'au prix d'une distorsion d'autant plus coûteuse que la cellule est plus rigide. Pour qu'une adhésion d'une cellule bactérienne sur un solide ait lieu, la différence d'énergie, ΔF , entre l'énergie dépensée lors d'une adhérence cellule/solide, W_{adh} , et l'énergie dépensée lors de la déformation de la cellule au niveau du joint de grain, $W_{déf}$, doit être négative:

$$\Delta F = -W_{adh}.\Delta A + W_{déf}.\Delta A \quad (33)$$

Avec ΔF la différence d'énergie, W_{adh} l'énergie par unité de surface lors d'un contact cellule/solide (adhérence), $W_{déf}$ l'énergie dépensée par unité de surface lors de la déformation et ΔA la variation d'aire de la cellule. Par ailleurs, $W_{adh} \cdot \Delta A$ représente donc l'énergie d'adhésion E_{adh} .

Si la déformation de la cellule bactérienne est facile, comme dans le cas d'*E. coli*, l'adhésion des cellules lors d'un gravage sera facilitée et la cinétique de détachement sera ralentie sur les aciers inoxydables polis attaqués PA par rapport à ceux polis miroir PM (**figure 51**) et $W_{adh} > W_{déf}$ d'où ΔF négatif. Pour *S. cerevisiae* et *S. epidermidis*, $W_{déf}$ sera important et supérieur à W_{adh} donc ΔF sera positif, l'adhésion ne sera pas facilitée par la rugosité.

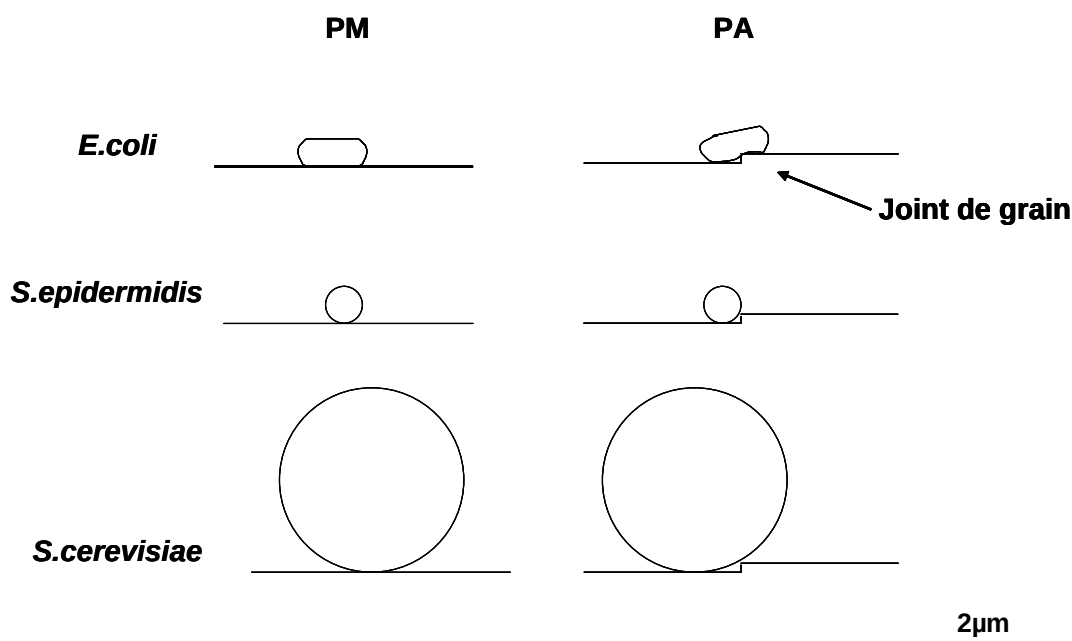


Figure 51 : Comportement des trois microorganismes à l'échelle sur un acier inoxydable poli miroir (PM) et au niveau d'un joint de grain de 150nm sur un acier inoxydable poli attaqué (PA)

D'après la thèse de Décavé (Décavé, 2002):

$$\sigma_{50\%} / \sigma_0 = (\Delta G / k_B T)^2 + [(\pi^2/3) - 2] \quad (34)$$

Avec ΔG est l'énergie par lien adhésif et $k_B T = 4 \times 10^{-21}$ J.

En prenant l'exemple du poli miroir PM, les valeurs de $\sigma_{50\%}$ et σ_0 sont respectivement, pour *S. cerevisiae* : 53 et 5Pa, pour *E. coli* : 0,54 et 0,022Pa et pour *S. epidermidis* : 0,94 et 0,11Pa. Avec ce calcul, on aboutit à la valeur de ΔG . Le nombre de liens adhésifs est donné par:

$$\text{nbre de liens} = S_{\text{contact}}/S_{\text{lien}} = (\pi R_{\text{contact}}^2) / S_{\text{lien}} = (2\pi Rh) / S_{\text{lien}} \quad (35)$$

Avec S_{contact} la surface de la zone de contact, R le rayon du microorganisme, h la hauteur du lien, estimée ici à 1nm, et S_{lien} , la surface d'un lien adhésif (**figure 52**).

R est estimé à 2,5 μm pour *S. cerevisiae*, 0,7 μm pour *E. coli* et 0,4 μm pour *S. epidermidis*.

La surface d'un lien est estimée à 4 nm². On aboutit à un nombre de liens de 980, 280 et 160 pour *S. cerevisiae*, *E. coli* et *S. epidermidis*.

Comme : $E_{\text{adh}} = \Delta G \times \text{nbre de liens} \quad (36)$

Ainsi, l'application numérique de E_{adh} , l'énergie d'adhésion, donne 3,6 $\times 10^{-17}$ J/cellule pour *S. cerevisiae*, 2,5 $\times 10^{-17}$ J/cellule pour *E. coli* et 4,5 $\times 10^{-18}$ J/cellule pour *S. epidermidis*.

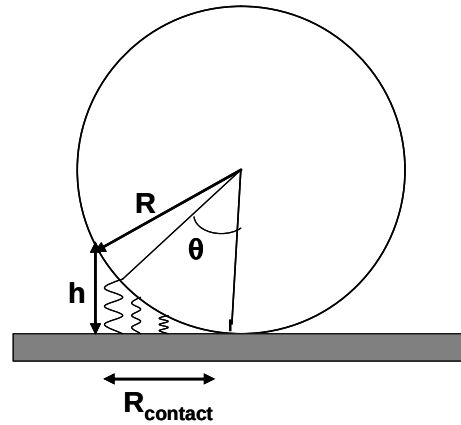


Figure 52 : Schématisation de la surface de contact d'une cellule. h = hauteur d'un lien, θ = angle entre le point de contact de la cellule et le lien le plus tendu, R = rayon du microorganisme, R_{contact} = rayon de contact. Le calcul, pour aboutir à la surface de contact (S_{contact}), est :

$$h = R - R \cos \theta = R * (\theta^2/2) \quad \text{car } \cos \theta \sim 1 - (\theta^2/2)$$

$$\text{et } \theta = 2(h/R)^{1/2}$$

$$R_{\text{contact}} = R \sin \theta \sim R \theta = R * 2(h/R)^{1/2}$$

$$S_{\text{contact}} = \pi R_{\text{contact}}^2 = 2\pi Rh$$

III.3. Energie cinétique et adhésion

D'un point de vue cinétique, sur une surface polie attaquée (PA), le mouvement d'entraînement des cellules par le liquide permet de les faire rouler jusqu'aux joints de grain où elles peuvent se détacher plus facilement lorsque l'énergie de contact est plus faible (cellule peu déformable). Les arguments que nous avons avancés, jusqu'à présent, négligent

l'énergie cinétique propre de la cellule en mouvement, pouvant la conduire à se détacher au niveau de la « marche » comme si elle « trébuchait ». Pour rester au contact avec la surface au-delà du joint de grain, la cellule doit posséder une énergie cinétique (E_c) inférieure ou équivalente à l'énergie d'adhésion E_{adh} . Or, E_c vaut :

$$E_c = \frac{1}{2} m v^2 \quad (37)$$

Avec m la masse de la cellule et v la vitesse avec laquelle la cellule est entraînée par le fluide. On peut évaluer la vitesse du fluide au niveau de la cellule à partir de la contrainte exercée à la paroi :

$$\sigma(r) = \eta (\Delta v / \Delta z)_{z=0} \quad (38)$$

avec η la viscosité dynamique = 10^{-3} Pa/s, Δz la différence de hauteur entre le substrat et le centre de la cellule (soit le rayon R de cette cellule) et $\sigma(r)$ la contrainte appliquée à une distance r du centre du disque (on prendra $\sigma_{50\%}$). Comme la vitesse au niveau de la paroi ($z = 0$) est nulle, on aboutit à :

$$v = R \sigma_{50\%} / \eta \quad (39)$$

La masse de la cellule est estimée à partir de son volume pour une densité de 1. Ainsi, l'application numérique d' E_c donne $5,8 \times 10^{-16}$ J pour *S. cerevisiae*, 10^{-22} J pour *E. coli* et $1,4 \times 10^{-23}$ J pour *S. epidermidis*. E_{adh} , l'énergie d'adhésion, est de l'ordre de 10^{-17} à 10^{-18} J. La composante d'énergie cinétique ne peut donc jouer un rôle important que sur *S. cerevisiae* pour lequel elle vaut $5,8 \cdot 10^{-16}$ J.

III.4. Comparaison entre les trois microorganismes

Dans le cas de *S. cerevisiae*, E_c est plus importante que E_{adh} , la cellule sera donc détachée aux joints de grain et le détachement sera facilité sur un échantillon poli attaqué PA par rapport à un échantillon poli miroir PM. Pour *E. coli*, E_c est plus petite que E_{adh} , cette bactérie ne se détachera donc pas aux joints de grain, la cinétique de détachement sera donc plus rapide sur un acier inoxydable poli miroir PM que sur un acier inoxydable poli attaqué PA. Enfin, pour *S. epidermidis*, E_c et E_{adh} sont petites toutes les deux et la rugosité ne modifiera pas la cinétique de détachement. En effet, E_c et E_{adh} ont un ordre de grandeur trop petit pour, respectivement, obtenir un détachement de *S. epidermidis* aux joints de grain et pour favoriser l'adhésion. On ne notera donc pas de différence de cinétique de détachement sur un échantillon poli miroir PM ou poli attaqué PA (**table 12**).

	E_c	E_{adh}	déformabilité	comportement aux joints de grain
<i>S. cerevisiae</i>	$5,8 \times 10^{-16}$ J	$3,6 \times 10^{-17}$ J	-	détachement
<i>E. coli</i>	10^{-22} J	$2,5 \times 10^{-17}$ J	+	adhésion
<i>S. epidermidis</i>	$1,7 \times 10^{-23}$ J	$4,5 \times 10^{-18}$ J	-	probabilité équivalente pour les deux cas

Table 12: Comportement des trois microorganismes étudiés aux joints de grain. E_c = énergie cinétique et E_{adh} = énergie d'adhésion

Lors de la synthèse bibliographique, nous avons noté un certain désaccord entre les auteurs au sujet de l'influence de la rugosité sur l'adhésion initiale et le détachement de microorganismes. Après ce travail de thèse, nous pouvons émettre l'hypothèse que la rugosité augmente davantage l'adhésion des bactéries Gram⁻ comme *P. aeruginosa* (Vanhaecke et al., 1990) et, dans notre cas, *E. coli* (Terada et al., 2005), que les bactéries Gram⁺ comme *S. mutans* (Eick et al., 2004), *S. thermophilus* (Boulangé-Petermann et al., 1997), *B. cereus* et *B. subtilis* (Garry et al., 1995) et, lors de nos études, *S. epidermidis* (Ha et al., 2005). Néanmoins, cela va à l'encontre des résultats de certains auteurs comme Pereira da Silva et al (Pereira da Silva et al., 2005) qui trouvent une augmentation de l'adhésion de *S. sanguis* (Gram⁺) sur des surfaces rugueuses de titane mais pour lesquels la rugosité était nettement plus importante que dans le cas de nos échantillons. Barnes et al. démontrent, quant à eux, une adhésion plus importante de *S. aureus* (Gram⁺) sur un acier inoxydable rugueux (2B) que sur un acier inoxydable poli miroir (Barnes et al., 1999) contrairement à Allion et al. (Allion et al., 2006) pour lesquels l'adhésion de *S. aureus* est plus importante sur un acier moins rugueux. Il faut cependant prendre en considération les énergies de surface (angles de contact) de ces substrats qui peuvent être très différents de celles calculées lors de ce travail de thèse. Enfin, pour *Saccharomyces cerevisiae*, peu de travaux sur l'influence de la rugosité sur l'adhésion de ce microorganisme ont été réalisés. On peut citer, néanmoins, les travaux de Boulangé et al. qui ont démontré un détachement facilité de *S. cerevisiae* et d'*Acetobacter aceti* sur des échantillons d'acier inoxydable (Ugiclean®), plus rugueux que ceux employés dans le cadre de cette thèse, par rapport à des échantillons poli miroir (2R) (Boulangé-Petermann et al., 1999).

IV. Influence de la profondeur du gravage des joints de grain sur le détachement des microorganismes

Lorsqu'on augmente la profondeur des joints de grain en prolongeant du temps de l'attaque électro-nitrique, la cinétique de détachement d'*E. coli* ralentit contrairement à celle de *Saccharomyces cerevisiae* et *Staphylococcus epidermidis*. Pour *S. cerevisiae*, le détachement est facilité lorsque la profondeur d'attaque des joints de grain est importante (650 ± 50 nm). En ce qui concerne *E. coli*, sa sensibilité vis-à-vis de la profondeur du gravage des joints de grain peut s'expliquer par le fait que cette bactérie possède une adhésion favorisée aux joints de grain et que, même si les conditions de culture les limitent, elle possède des pili (100 à 300) et curli mais également une dizaine de flagelles. Ces appendices peuvent favoriser l'adhésion aux joints de grain et donc ralentir le détachement. Plus la profondeur du joint de grain sera importante, plus la cinétique de détachement sera ralentie. *S. epidermidis* ne possède pas de flagelle ni de pili et son adhésion n'est pas favorisée aux joints de grain, cela pourrait expliquer le fait que cette bactérie ne soit pas sensible à la profondeur du gravage des joints de grain comme l'est, à l'opposé, *E. coli*.

V. Recommandations

L'influence de l'état métallurgique du substrat sur l'adhésion cellulaire dépend du type de cellules et les recommandations seront donc différenciées : pour *S. cerevisiae*, il est préconisé d'utiliser une surface d'acier inoxydable poli attaqué, avec des joints de grain d'environ 650 ± 50 nm ; concernant *E. coli*, l'emploi de surfaces d'acier inoxydable poli miroir est souhaité afin de faciliter son détachement; enfin, pour *S. epidermidis*, nous avons noté aucune différence significative entre le détachement cellulaire d'un substrat en acier inoxydable poli miroir ou poli attaqué avec une faible profondeur des joints de grain, l'utilisation de l'un ou l'autre sera donc possible. Au niveau de nos résultats, nous pouvons donc dégager une méthode d'analyse en fonction des microorganismes dont on souhaite diminuer l'adhésion sur le substrat. Cette démarche est synthétisée par l'arborescence **figure 53**. Pour une cellule donnée, nous pouvons identifier le comportement type attendu et les recommandations métallurgiques afférentes. Il est, néanmoins, important de noter que ces recommandations sont valables dans le cas de l'étude de la première couche du biofilm et non

pas pour un biofilm déjà bien formé. La couche de cellules, au contact direct avec le matériau, reste la plus difficile à enlever dans le cas de la décontamination.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons montré que la taille de grain n'influe pas, de manière significative, sur les cinétiques de détachement et n'a aucune influence sur les seuils de détachement. Il n'est donc pas nécessaire d'inclure ce paramètre pour la conception de surfaces facilement nettoyables.

Nous avons noté également que la profondeur d'attaque des joints de grain joue un rôle déterminant dans le détachement cellulaire au moins pour les cellules suffisamment grandes. Ce paramètre peut être contrôlé industriellement par les conditions et la durée de l'attaque électro-nitrique. C'est en effet sur ces procédés que l'on doit jouer, une attaque plus prolongée conduisant à la formation de marches plus importantes. Dans cette optique, le nouveau décapage chimique UGCO[®], à base d'acide chlorhydrique, mis au point au sein du centre de recherche d'Ugine-Alz, pourra être utilisé.

Enfin, nous avons montré que la surface d'orientation cristallographique <001> exposée était favorable à l'adhésion pour l'ensemble des cellules étudiées. Afin de contrôler ce paramètre, les conditions de laminage (texture de déformation) et de recuit (texture de recristallisation) peuvent être modulées. Ugine-Alz peut alors améliorer la nettoyabilité des aciers laminés à froid. Ceci présente un grand intérêt économique puisque l'adhésion des bactéries sur les aciers pose de nombreux problèmes dans le secteur de l'agro-alimentaire où l'hygiène est primordiale.

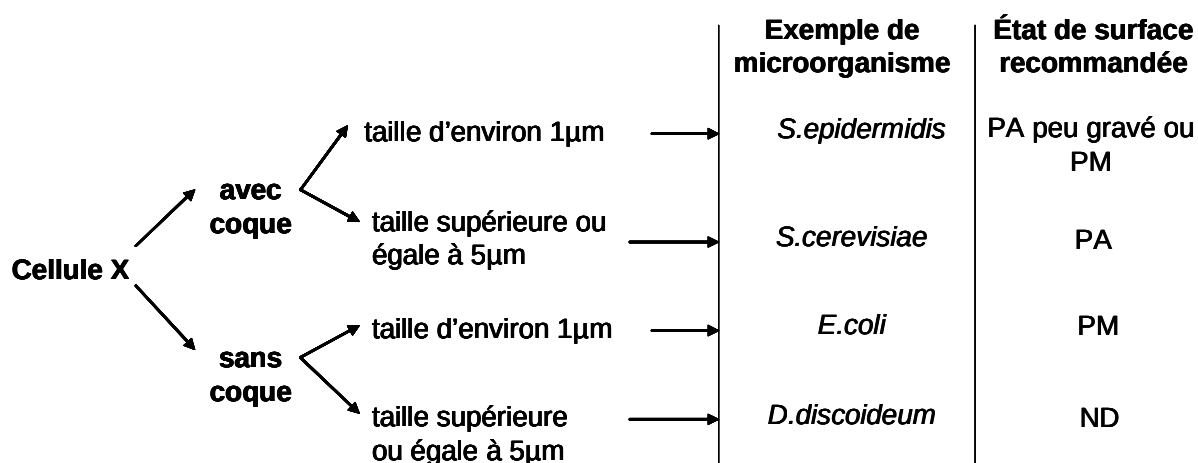


Figure 53 : Type de surfaces en acier inoxydable recommandées suivant les caractéristiques de la cellule étudiée
PM = surface polie miroir (ou 2R industriel), PA = surface polie attaquée (ou 2B industriel), ND = non déterminé

VI. Autres domaines d'applications envisageables

Au niveau des applications possibles des données obtenues lors de cette thèse, on peut citer, dans le domaine médical, les problèmes d'infections, dues à la pose de cathéters ou à des piqûres accidentelles avec des seringues contaminées, qui pourraient être diminuées en modifiant le type d'acier inoxydable utilisé pour les pointes en contact direct avec le milieu sanguin.

Par ailleurs, dans le domaine des centrales nucléaires, l'encrassement des surfaces des condenseurs de l'échangeur thermique tertiaire dans les centrales par les biofilms pose un problème de santé publique auquel le CEA, même s'il n'est concerné qu'indirectement, peut répondre dans le cadre de sa mission d'aide technique à EDF. En effet, les amibes libres du genre *Naegleria*, *Acanthamoeba* et *Balamuthia* trouvent dans les eaux de refroidissement du circuit tertiaire des centrales nucléaires des conditions favorables à leur développement en se nourrissant de diverses bactéries, telles que *Legionella* (Gram⁻) ou *Xanthomonas maltophilia* (Gram⁻), tapissant, sous forme de biofilms, les parois de l'échangeur et fournissant toute la nourriture nécessaire à la prolifération de ces amibes. Libérées dans l'environnement, certaines de ces amibes peuvent causer des maladies graves. Actuellement, la chloration est la solution la plus adaptée, néanmoins, le taux d'acide hypochloreux qui doit être maintenu (0,5 à 1 mg/ml) entraîne un déséquilibre de l'écosystème en aval. L'usage de nouvelles surfaces d'acier plus facilement nettoyables pourrait donc, en réduisant fortement la taille du biofilm bactérien, diminuer significativement le nombre des amibes présentes. Par ailleurs, ce problème se rencontre également au sein des industries laitières, brasseries, où la perte d'efficacité des équipements de types échangeurs thermiques et la dégradation esthétique ou fonctionnelle des matériaux, dues aux microorganismes, sont fréquentes.

Enfin, dans le secteur de l'industrie agro-alimentaire, les toxi-infections dues à l'encrassement de surfaces en acier inoxydable, telles que les plans de travail, conditionneurs d'air, convoyeurs, cuves, fûts (brasseries, domaine viticole) et autres machines (ensacheuse, gerbeuse, mélangeur), pourraient être réduites en utilisant des surfaces d'acier inoxydable mieux nettoyables. Ces remarques sont également valables dans les domaines de la biopharmaceutique, de l'industrie chimique, de l'environnement (processus d'évacuation des eaux usées), de la marine et de l'industrie pétrochimique (pose de câbles sous-marins et souterrains).

CONCLUSION GENERALE

La nettoyabilité des surfaces d'acier inoxydable, ayant une application dans les secteurs agroalimentaire et médical, est une motivation industrielle durable pour les types de travaux que nous avons menés. Actuellement, deux finis laminés à froid sont proposés sur ce marché, (2R recuit brillant et 2B recuit décapé) sans qu'aucune valorisation ne soit faite en termes de statut hygiénique de ces deux surfaces. Ainsi, avec un acier plus facilement nettoyable, de nouveaux marchés peuvent s'ouvrir pour Ugine-Alz et susciter l'intérêt de nouveaux clients. Inversement, la compréhension des mécanismes entrant en jeu permettra de produire des aciers favorisant l'adhésion d'autres microorganismes comme les levures dans les réacteurs de fermentation.

Dans le cadre de cette thèse, pour les trois microorganismes considérés, nous avons pu montrer que l'efficacité de détachement ne dépend pas de la rugosité et de la taille des grains. L'orientation cristallographique des grains, par ailleurs, influence le détachement des microorganismes avec une adhésion préférentielle sur les grains appartenant à l'orientation $\langle 001 \rangle$, présentant exposée une surface d'énergie plus importante. Les cinétiques de détachement sont différentes pour les trois microorganismes : *S. cerevisiae* présente une cinétique de détachement plus rapide sur un acier inoxydable poli attaqué (PA) que poli miroir (PM) ; pour *E. coli*, bactérie Gram⁻ plus petite que *S. cerevisiae*, la cinétique de détachement est plus rapide sur un échantillon poli miroir PM par rapport à un échantillon poli attaqué PA ; et *S. epidermidis*, bactérie Gram⁺ dont la taille est encore plus petite qu'*E. coli*, se détache aussi rapidement d'une surface d'acier inoxydable poli attaqué PA que d'une surface d'acier inoxydable poli miroir PM. Enfin, concernant l'influence de la profondeur de gravage des joints de grains, seul *E. coli* y est sensible, sa cinétique de détachement étant ralentie sur un échantillon poli attaqué PA avec une taille de grain de 100 μ m attaqué pendant 4min par rapport à un échantillon poli attaqué avec la même taille de grain mais attaqué pendant 1min.

Un certain nombre de perspectives sont donc envisageables à l'issue de ce travail, tant du point de vue de son application directe que de celui de la compréhension fondamentale de la biologie de l'adhésion. Dans le sillage immédiat de notre travail, la technique expérimentale de fluorescence peut être améliorée, en contournant le problème de sa durée limitée, par insertion d'une protéine GFP (Green Fluorescent Protein).

Un aspect directement utilisable de ce travail de thèse est la mise en oeuvre conjointe de la technique EBSD et de la topographie, afin d'étudier des surfaces industrielles et, ainsi d'aider à la mise au point du décapage industriel peu gravant.

A plus long terme, de nouveaux aspects de l'adhésion cellulaire peuvent être étudiés tels que l'effet de la structure cristalline de la surface exposée sur l'adhésion mérite d'être étudié soigneusement sur des microstructures. La réalisation d'aciers inoxydables monocristaux, avec une orientation cristallographique définie, validerait les résultats obtenus lors de ces travaux de thèse et faciliterait la compréhension de l'influence de l'orientation cristallographique sur l'adhésion bactérienne. Le développement d'une modélisation du type de celle de Décavé (Décavé et al., 2002) serait envisageable.

Du point de vue de la biologie cellulaire, il serait intéressant d'étudier le détachement de mutants d'*E. coli*, sans flagelle ni pili, sur les aciers inoxydables poli miroir et poli attaqué, mutation déjà réalisée par certains auteurs, comme Moreira et al (Moreira et al., 2003), sur des mono-couches de cellules HeLa et HEp-2. Des extractions et étalements de protéines flagellines seraient également envisageables sur des substrats divers afin d'étudier leur adsorption et de mettre au point le substrat adéquat limitant celle-ci.

Enfin, les mêmes approches et questionnements pourraient être effectués sur d'autres classes de matériaux, ayant éventuellement subi des traitements de surface (UV, bombardement d'électrons sous lumière pulsée), comme des polymères semi-cristallins.

BIBLIOGRAPHIE

Absolom, D. R., Lamberti, F. V., Policova, Z., Zingg, W., van Oss, C. J. and Neumann, A. W. (1983). Surface thermodynamics of bacterial adhesion.

Aguilar-Uscanga, B. and Francois, J. M. (2003). A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett Appl Microbiol* 37, 268-74.

Ahimou, F., Touhami, A. and Dufrene, Y. F. (2003). Real-time imaging of the surface topography of living yeast cells by atomic force microscopy. *Yeast* 20, 25-30.

Allion, A. (2004). Environnement des bactéries et sensibilité aux biocides. In *Unité de Recherche en Bioadhésion et Hygiène des Matériaux (UBHM) de l'INRA de Massy*, vol. Docteur de l'ENSIA, spécialité Sciences Alimentaires. Massy: Ecole doctorale Agriculture Biologie et Santé.

Allion, A., Baron, J.-P. and Boulangé-Petermann, L. (2006). Surface energy and roughness impact on cell distribution and viability. *Biofouling*.

Amezaga-Madrid, P., Silveyra-Morales, R., Cordoba-Fierro, L., Nevarez-Moorillon, G. V., Miki-Yoshida, M., Orrantia-Borunda, E. and Solis, F. J. (2003). TEM evidence of ultrastructural alteration on *Pseudomonas aeruginosa* by photocatalytic TiO₂ thin films. *J Photochem Photobiol B* 70, 45-50.

Arnold, J. W. and Bailey, G. W. (2000). Surface finishes on stainless steel reduce bacterial attachment and early biofilm formation: scanning electron and atomic force microscopy study. *Poult Sci* 79, 1839-45.

Arnold, J. W., Boothe, D. H., Suzuki, O. and Bailey, G. W. (2004). Multiple imaging techniques demonstrate the manipulation of surfaces to reduce bacterial contamination and corrosion. *J Microsc* 216, 215-21.

ASPC, A. d. S. P. d. C. (1997). Ecllosion d'infections à *Escherichia coli* 0157:H7 liée à un lysotype rare, en milieu hospitalier-Ontario. In *Relevé des maladies transmissibles au Canada*, vol. 23, pp. 33-37.

ASPC, A. d. S. P. d. C. (1997). Notes internationales: Ecllosions d'infections à *Escherichia coli* O157:H7 et de cryptosporidioses liées à la consommation de cidre non pasteurisé - Connecticut et Etat de New-York. Octobre 1996. *Agence de Santé Publique du Canada ASPC* 23.

ASPC, A. d. S. P. d. C. (2000). Lutte contre les infections dues à *Escherichia coli* O157:H7 associées au boeuf haché au Canada. *Agence de Santé Publique du Canada ASPC* 26.

Baharloo, B., Textor, M. and Brunette, D. M. (2005). Substratum roughness alters the growth, area, and focal adhesions of epithelial cells, and their proximity to titanium surfaces. *J Biomed Mater Res A* 74, 12-22.

Barnes, L. M., Lo, M. F., Adams, M. R. and Chamberlain, A. H. (1999). Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. *Appl Environ Microbiol* 65, 4543-8.

Baroux, B., Lemaitre, C. and Dabosi, F. (1990). Corrosion par piqûres et corrosion caverneuse. In *les aciers inoxydables*, (ed.s B. B. Lacombe P, Béranger B.), pp. 307-331. Les Ulis.

Beech, I. B., Sunner, J. A. and Hiraoka, K. (2005). Microbe-surface interactions in biofouling and biocorrosion processes. *Int Microbiol* 8, 157-68.

Bekbolet, M. and Araz, C. V. (1996). Inactivation of *Escherichia coli* by photocatalytic oxidation. *Chemosphere* 32, 959-65.

Bellon-Fontaine, M.-N., Benezech, T., Bitner, M. and Bouix, M. (1999). Nettoyage, désinfection et hygiène dans les bio-industries.

Bellon-Fontaine, M.-N., Rault, J. and van Oss, C. J. (1996). Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 7, 47-53.

Bellon-Fontaine, M. N., Mozes, N., van der Mei, H. C., Sjollem, J., Cerf, O., Rouxhet, P. G. and Busscher, H. J. (1990). A comparison of thermodynamic approaches to predict the adhesion of dairy microorganisms to solid substrata. *Cell Biophys* 17, 93-106.

Béranger, G. and Charbonnier, J. (1990). La corrosion intergranulaire des aciers inoxydables. In *Les aciers inoxydables*, (ed.s B. B. Lacombe P, Béranger B.), pp. 414. Les Ulis.

Beresford, M. R., Andrew, P. W. and Shama, G. (2001). *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. *J Appl Microbiol* 90, 1000-5.

Beveridge, T. J. and Graham, L. L. (1991). Surface layers of bacteria. *Microbiol Rev* 55, 684-705.

Bhaskar, P. V. and Bhosle, N. B. (2005). Microbial extracellular polymeric substances in marine biogeochemical processes. *Current Science* 88.

Bieber, D., Ramer, S. W., Wu, C. Y., Murray, W. J., Tobe, T., Fernandez, R. and Schoolnik, G. K. (1998). Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 280, 2114-8.

Bosquillon, C., Rouxhet, P. G., Ahimou, F., Simon, D., Culot, C., Preat, V. and Vanbever, R. (2004). Aerosolization properties, surface composition and physical state of spray-dried protein powders. *J Control Release* 99, 357-67.

Boulangé-Petermann. (1997a). Effect of cleaning treatment on surface properties of stainless steel. *Pittura Vernici Eur.* 73, 19-22.

Boulangé-Petermann, L. (1993). Etude physico-chimique et électrochimique de l'adhésion de *Leuconostoc mesenteroides* et *Streptococcus thermophilus* à des surfaces d'acier inoxydable. In *Nancy I*. Nancy: Nancy I.

Boulangé-Petermann, L. (1996). Processes of bioadhesion on stainless steel surfaces and cleanability: a review with special reference to the food industry. In *Biofouling*, vol. 10, pp. 275-300.

Boulangé-Petermann, L., Baroux, B. and Bellon-Fontaine, M.-N. (1993). The influence of metallic surface wettability on bacterial adhesion. *J. Adhesion Sci. Technol.* 7, 221-230.

Boulangé-Petermann, L., Bellon-Fontaine, M.-N. and Baroux, B. (1998). Electrochemical aspects of encapsulated bacteria adhesion to stainless steel surfaces.

Boulangé-Petermann, L., Doren, A., Baroux, B. and Bellon-Fontaine, M.-N. (1995). Zeta potentiel measurements on passive metals. *Journal of colloids and interface Science* 171, 179-186.

Boulangé-Petermann, L., Jullien, C., Dubois, P. E., Benezech, T. and Faille, C. (2004). Influence of surface chemistry on the hygienic status of industrial stainless steel. *Biofouling* 20, 25-33.

Boulangé-Petermann, L., Rault, J. and Bellon-Fontaine, M.-N. (1997). Adhesion of *Streptococcus thermophilus* to stainless steel with different surface topography and roughness. *Biofouling* 11, 201-216.

Boulangé-Petermann, L., Verhnet, A., Dupré, K., Moutounet, M. and Haegeli, F. (1999). Ugiclean: a new improved surface for cleaning tartrate deposits formed during the wine making process. In *Stainless steel'99 Science and Market - 3rd European congress*, vol. 1, pp. 323-332. Chia Laguna Sardinia, Italy.

Bowen, W. R., Fenton, A. S., Lovitt, R. W. and Wright, C. J. (2002). The measurement of *Bacillus mycoides* spore adhesion using atomic force microscopy, simple counting methods, and a spinning disk technique. *Biotechnol Bioeng* 79, 170-9.

Briandet, R., Meylheuc, T., Maher, C. and Bellon-Fontaine, M. N. (1999). *Listeria monocytogenes* Scott A: cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor

characteristics under different environmental growth conditions. *Appl Environ Microbiol* 65, 5328-33.

Bunthof, C. J., van den Braak, S., Breeuwer, P., Rombouts, F. M. and Abee, T. (1999). Rapid fluorescence assessment of the viability of stressed *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 65, 3681-9.

Burke, J. E. and Turnbull, D. (1952). *Prog. Metal Phys.* 3, 220.

Busscher, H. J., Bellon-Fontaine, M.-N., Mozes, N., van der Mei, H. C., Cerf, O. and Rouxhet, P. G. (1990). *biofouling* 67, 55-63.

Callewaert, M. (2004). Surface modification by stimuli-responsive polymers: from model systems to stainless steel cleanability. In *Faculté d'ingénierie biologique, agronomique et environnementale*, vol. docteur en sciences agronomiques et ingénierie biologique, pp. 208. Louvain la Neuve (Belgique): Université catholique de Louvain.

Callewaert, M. (2005). Modifying stainless steel surfaces with responsive polymers: effect of PS-PAA and PNIPAAm on cell adhesion and oil removal. *Journal of Adhesion Science and Technology*.

Callewaert, M., Grandfils, C., Boulange-Petermann, L. and Rouxhet, P. G. (2004). Adsorption of poly(N-isopropylacrylamide) on glass substrata. *J Colloid Interface Sci* 276, 299-305.

Chavant, P., Martinie, B., Meylheuc, T., Bellon-Fontaine, M. N. and Hebraud, M. (2002). *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Appl Environ Microbiol* 68, 728-37.

Combrade. (1990). Corrosion sous contrainte et fatigue-corrosion. In *les aciers inoxydables*, (ed.s B. B. Lacombe P, Béranger B.), pp. 335. Les Ulis.

Cornillon, S., Gebbie, L., Benghesal, M., Nair, P., Keller, S., Wehrle, B., Charette, S. J., Bruckert, F., Letourneur, F. and Cosson, P. (2006). An integrin-like Adhesion Molecule in Free-living Dictyostelium Amoebae. *EMBO reports* in press.

Cornillon, S., Pech, E., Benghezal, M., Ravanel, K., Gaynor, E., Letourneur, F., Bruckert, F. and Cosson, P. (2000). Phg1p is a nine-transmembrane protein superfamily member involved in dictyostelium adhesion and phagocytosis. *J Biol Chem* 275, 34287-92.

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. and Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49, 711-45.

Cowan, M., Warren, T. and Fletcher, M. (1991). Mixed species colonization of solid surfaces in laboratory biofilms. *Biofouling* 3, 23-34.

Cozens-Roberts, C., Quinn, J. A. and Lauffenberger, D. A. (1990). Receptor-mediated adhesion phenomena. Model studies with the Radical-Flow Detachment Assay. *Biophys J* 58, 107-25.

Cozens-Roberts, C., Quinn, J. A. and Lauffenburger, D. A. (1990). Receptor-mediated cell attachment and detachment kinetics. II. Experimental model studies with the radial-flow detachment assay. *Biophys J* 58, 857-72.

Danese, P. N., Pratt, L. A. and Kolter, R. (2000). Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol* 182, 3593-6.

Davey, M. E., Caiazza, N. C. and O'Toole, G. A. (2003). Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 185, 1027-36.

de Gennes, P.-G., Brocherd, F. and Quere, D. (2003). Capillarity and wetting Phenomena
Drops, Bubbles, Pearls, Waves: Springer.

Décavé, E. (2002). Comportement cellulaire sous écoulement hydrodynamique: aspects expérimentaux et théoriques. In *Grenoble I*, pp. 217. Grenoble: Université Joseph Fourier.

Décavé, E., Demilly, M., Fourcade, B., Bruckert, F., Boulangé-Petermann, L. and Brechet, Y. (2005). Biological cell detachment kinetics from an inert substrate. *Philosophical magazine* 85, 3173-3189.

Décavé, E., Garrivier, D., Brechet, Y., Bruckert, F. and Fourcade, B. (2002). Peeling process in living cell movement under shear flow. *Phys Rev Lett* 89, 108.

Décavé, E., Garrivier, D., Brechet, Y., Fourcade, B. and Bruckert, F. (2002). Shear flow-induced detachment kinetics of *Dictyostelium discoideum* cells from solid substrate. *Biophys J* 82, 2383-95.

Deziel, E., Lepine, F., Milot, S. and Villemur, R. (2003). rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* 149, 2005-13.

Di Martino, P., Cafferini, N., Joly, B. and Darfeuille-Michaud, A. (2003). *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. *Res Microbiol* 154, 9-16.

Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 8, 881-90.

Doolittle, W. F. (1999). Phylogenetic classification and the universal tree. *Science* 284, 2124-9.

Dubois, P.-E. (2000). Influence de l'acido-basicité de surface sur les propriétés d'adhésion et de durabilité d'oxydes métalliques. Application au système aciers inoxydables-époxydes. In *Ecole doctorale Matériaux et Génie des Procédés*. Grenoble: INPG.

Dufrene, Y. F. (2000). Direct characterization of the physicochemical properties of fungal spores using functionalized AFM probes. *Biophys J* 78, 3286-91.

Dufrene, Y. F. (2002). Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology. *J Bacteriol* 184, 5205-13.

Dufrene, Y. F. (2003). Recent progress in the application of atomic force microscopy imaging and force spectroscopy to microbiology. *Curr Opin Microbiol* 6, 317-23.

Dufrene, Y. F. (2004). Using nanotechniques to explore microbial surfaces. *Nat Rev Microbiol* 2, 451-60.

Dufrene, Y. F., Boonaert, C. J. and Rouxhet, P. G. (1999). Surface analysis by X-ray photoelectron spectroscopy in study of bioadhesion and biofilms. *Methods Enzymol* 310, 375-89.

Eick, S., Glockmann, E., Brandl, B. and Pfister, W. (2004). Adherence of *Streptococcus mutans* to various restorative materials in a continuous flow system. *J Oral Rehabil* 31, 278-85.

Faille, C., Jullien, C., Fontaine, F., Bellon-Fontaine, M. N., Slomianny, C. and Benezech, T. (2002). Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. *Can J Microbiol* 48, 728-38.

Feltham, P. (1957). *Acta Metall.* 5, 97.

Fey, P., Stephens, S., Titus, M. A. and Chisholm, R. L. (2002). SadA, a novel adhesion receptor in *Dictyostelium*. *J Cell Biol* 159, 1109-19.

Flemming, H. C. and Wingender, J. (2001). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part II: Technical aspects. *Water Sci Technol* 43, 9-16.

Fletcher, E. L., Weissman, B. A., Efron, N., Fleiszig, S. M., Curcio, A. J. and Brennan, N. A. (1993). The role of pili in the attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to unworn hydrogel contact lenses. *Curr Eye Res* 12, 1067-71.

Fletcher, M. (1988). Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance. *J Bacteriol* 170, 2027-30.

Flint, S. H., Bremer, P. J. and Brooks, J. D. (1997). Biofilms in dairy manufacturing plant_description, current concerns and methods of control. *biofouling* 11.

Fontaine-Aupart, M.-P. (2005). La Microscopie confocale et biphotonique pour l'étude des biofilms: ses performances et ses limites. In *Interfaces Microorganisme-Solution: de la cellule au biofilm*. Ramonchamp.

Gaboriaud, F., Bailet, S., Dague, E. and Jorand, F. (2005). Surface structure and nanomechanical properties of *Shewanella putrefaciens* bacteria at two pH values (4 and 10) determined by atomic force microscopy. *J Bacteriol* 187, 3864-8.

Garry, P., Andersen, T., Vendeuvre, J. L. and Bellon-Fontaine, M.-N. (1995). Influence de la rugosité de surfaces en polyuréthane sur l'adhésion de *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus*. In *Adhesion des microorganismes aux surfaces*, (ed.s J. F. M-N Bellon-Fontaine), pp. 21-30.

Gavin, R., Merino, S., Altarriba, M., Canals, R., Shaw, J. G. and Tomas, J. M. (2003). Lateral flagella are required for increased cell adherence, invasion and biofilm formation by *Aeromonas* spp. *FEMS Microbiol Lett* 224, 77-83.

Gillis, R. J. and Gillis, J. R. (1996). A comparative study of bacterial attachment to high-purity water systems surfaces. *Ultrapure water* 13, 27.

Good, A. C., Peterson, S. J. and Richards, W. G. (1993). QSAR's from similarity matrices. Technique validation and application in the comparison of different similarity evaluation methods. *J Med Chem* 36, 2929-37.

Ha, K. Y., Chung, Y. G. and Ryoo, S. J. (2005). Adherence and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* and *Mycobacterium tuberculosis* on various spinal implants. *Spine* 30, 38-43.

Hänggi, P. (1990). Reaction-rate theory: fifty years after kramers. *Rev. of Mod. Physics* 62, 251.

Harin, L. (2005). Scanning electron micrograph of *S.epidermidis*. The University of Iowa: Hardin Library for the health sciences.

Herald, P.-J. and Zottola, E.-A. (1988). Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. *J. Food Sci.* 53, 1549-1552.

Hilbert, L. R., Bagge-Ravn, D., Kold, J. and Gram, L. (2003). Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. *Int. Biodeterioration Biodeg.* 52, 175.

- Hu, F. X., Neoh, K. G., Cen, L. and Kang, E. T. (2005). Antibacterial and antifungal efficacy of surface functionalized polymeric beads in repeated applications. *Biotechnol Bioeng* 89, 474-84.
- Hunderi, O. and Ryum, N. (1980). *J. Mater. Sci.* 15, 1104.
- Ibars, J. R., Moreno, D. A. and Ranninger, C. (1992). Microbial corrosion of stainless steel. *Microbiologia* 8, 63-75.
- Ignatova, M., Voccia, S., Gilbert, B., Markova, N., Cossement, D., Gouttebaron, R., Jerome, R. and Jerome, C. (2006). Combination of electrografting and atom-transfer radical polymerization for making the stainless steel surface antibacterial and protein antiadhesive. *Langmuir* 22, 255-62.
- Jabbour, A., Srebnik, M., Zaks, B., Dembitsky, V. and Steinberg, D. (2005). Evaluation of oxazaborolidine activity on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Int J Antimicrob Agents* 26, 491-6.
- James, A.-M. (1991). Charge properties of microbial cell surfaces. New-York USA: VCH Publishers.
- John, S. F., Derrick, M. R., Jacob, A. E. and Handley, P. S. (1996). The combined effects of plasma and hydrogel coating on adhesion of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* to polyurethane catheters. *FEMS Microbiol Lett* 144, 241-7.
- Kapteyn, J. C., Ram, A. F., Groos, E. M., Kollar, R., Montijn, R. C., Van Den Ende, H., Llobell, A., Cabib, E. and Klis, F. M. (1997). Altered extent of cross-linking of beta1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall beta1,3-glucan content. *J Bacteriol* 179, 6279-84.
- Kessin, R. H. (2001). Dictyostelium-Evolution, cell biology and the development of multicellularity. Cambridge, UK.: Cambridge Univ. Press.
- Kim, B., Kim, D., Cho, D. and Cho, S. (2003). Bactericidal effect of TiO₂ photocatalyst on selected food-borne pathogenic bacteria. *Chemosphere* 52, 277-81.
- Klis, F. M., de Groot, P. and Hellingwerf, K. (2001). Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol* 39 Suppl 1, 1-8.
- Kohler, T., Curty, L. K., Barja, F., van Delden, C. and Pechere, J. C. (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol* 182, 5990-6.
- Kollar, R., Reinhold, B. B., Petrakova, E., Yeh, H. J., Ashwell, G., Drgonova, J., Kapteyn, J. C., Klis, F. M. and Cabib, E. (1997). Architecture of the yeast cell wall. Beta(1--

>6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-->3)-glucan, and chitin. *J Biol Chem* 272, 17762-75.

Krainer, E., Stark, R. E., Naider, F., Alagramam, K. and Becker, J. M. (1994). Direct observation of cell wall glucans in whole cells of *Saccharomyces cerevisiae* by magic-angle spinning ^{13}C -NMR. *Biopolymers* 34, 1627-35.

Kugler, R., Bouloussa, O. and Rondelez, F. (2005). Evidence of a charge-density threshold for optimum efficiency of biocidal cationic surfaces. *Microbiology* 151, 1341-8.

Kuhn, K. P., Chaberny, I. F., Massholder, K., Stickler, M., Benz, V. W., Sonntag, H. G. and Erdinger, L. (2003). Disinfection of surfaces by photocatalytic oxidation with titanium dioxide and UVA light. *Chemosphere* 53, 71-7.

Lacombe, P., Baroux, B. and Béranger, B. (1990). Les aciers inoxydables. Les Ulis: Les éditions de Physique.

Lacombe, P. and Béranger, B. (1990). Structures et diagrammes d'équilibre des diverses nuances d'aciers inoxydables. Conséquences sur leurs traitements thermiques. In *Les aciers inoxydables*, (ed.s B. B. Lacombe P, Béranger B.), pp. 11-58. Les Ulis.

Lacroix-Gueu, P., Briandet, R., Leveque-Fort, S., Bellon-Fontaine, M. N. and Fontaine-Aupart, M. P. (2005). In situ measurements of viral particles diffusion inside mucoid biofilms. *C R Biol* 328, 1065-72.

Le Thi, T. T., Prigent-Combaret, C., Dorel, C. and Lejeune, P. (2001). First stages of biofilm formation: characterization and quantification of bacterial functions involved in colonization process. *Methods Enzymol* 336, 152-9.

Leclerc, H., Izard, D., Husson, M.-O., Wattre, P. and Jakubczak, E. (1983). Microbiologie générale. Paris.

Lejeune, P. (2003). Contamination of abiotic surfaces: what a colonizing bacterium sees and how to blur it. *Trends Microbiol* 11, 179-84.

Lerebour, G., Cupferman, S. and Bellon-Fontaine, M. N. (2004). Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* to the Episkin reconstructed epidermis model and to an inert 304 stainless steel substrate. *J Appl Microbiol* 97, 7-16.

Lopes, F. A., Morin, P., Oliveira, R. and Melo, L. F. (2005). The influence of nickel on the adhesion ability of *Desulfovibrio desulfuricans*. *Colloids Surf B Biointerfaces* 46, 127-33.

Magnelli, P., Cipollo, J. F. and Abeijon, C. (2002). A refined method for the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall composition and beta-1,6-glucan fine structure. *Anal Biochem* 301, 136-50.

- Marchisio, M., Di Carmine, M., Pagone, R., Piattelli, A. and Miscia, S. (2005). Implant surface roughness influences osteoclast proliferation and differentiation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 75, 251-6.
- Martin-Yken, H., Lagorce, A. and François, J. (2002). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell wall: molecular architecture, regulatory pathways, remodelling mechanism in response to environmental conditions, and biotechnological values. In *Recent Research Development Microbiolgy*, vol. 6, pp. 503-526.
- McFeters, G. A., Singh, A., Byun, S., Callis, P. R. and Williams, S. (1991). Acridine orange staining reaction as an index of physiological activity in *Escherichia coli*. *J Microbiol Methods* 13, 87-97.
- Medilanski, E., Kaufmann, K., Wick, L. Y., Wanner, O. and Harms, H. (2002). Influence of the surface topography of stainless steel on bacterial adhesion. *Biofouling* 18, 193-203.
- Meltzer and. (1993). High purity Water Preparation for the Semi-conductor, Pharmaceutical, and Power Industries: Tall Oaks Publishing, Inc., Littleton CO.
- Mercier-Bonin, M., Ouazzani, K., Schmitz, P. and Lorthois, S. (2004). Study of bioadhesion on a flat plate with a yeast/glass model system. *J Colloid Interface Sci* 271, 342-50.
- Midelet, G. and Carpentier, B. (2004). Impact of cleaning and disinfection agents on biofilm structure and on microbial transfer to a solid model food. *J Appl Microbiol* 97, 262-70.
- Moreira, C. G., Carneiro, S. M., Nataro, J. P., Trabulsi, L. R. and Elias, W. P. (2003). Role of type I fimbriae in the aggregative adhesion pattern of enteroaggregative *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 226, 79-85.
- Mortimer, F. C., Mason, D. J. and Gant, V. A. (2000). Flow cytometric monitoring of antibiotic-induced injury in *Escherichia coli* using cell-impermeant fluorescent probes. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 676-81.
- Nath, N., Hyun, J., Ma, H. and Chilkoti, A. (2004). Surface engineering strategies for control of protein and cell interactions. *Surfaces Sciences* 570, 98-110.
- Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L. and Schaechtet, M. (1994). Physiologie de la cellule bactérienne. Une approche moléculaire.
- Nunez, M. E., Martin, M. O., Chan, P. H., Duong, L. K., Sindhurakar, A. R. and Spain, E. M. (2005). Atomic force microscopy of bacterial communities. *Methods Enzymol* 397, 256-68.

O'Toole, G. A. and Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30, 295-304.

Okamoto. (1973). passive film of 18-8 stainless steel structure and its function. *Corrosion Science* 13, 471-489.

Olofsson, A. C., Hermansson, M. and Elwing, H. (2005). Use of a quartz crystal microbalance to investigate the antiadhesive potential of N-acetyl-L-cysteine. *Appl Environ Microbiol* 71, 2705-12.

Olsen, A., Arnqvist, A., Hammar, M., Sukupolvi, S. and Normark, S. (1993). The RpoS sigma factor relieves H-NS-mediated transcriptional repression of *csgA*, the subunit gene of fibronectin-binding curli in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 7, 523-36.

Olsen, A., Jonsson, A. and Normark, S. (1989). Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature* 338, 652-5.

Oltra, R. and Keddam, M. (1990). Méthodes d'études électrochimiques de la corrosion localisée des aciers inoxydables à l'état passif. In *Les aciers inoxydables*, (ed.s B. B. Lacombe P, Béranger B.), pp. 217-253. Les Ulis.

Orlean, P. (1997). Biogenesis of yeast wall and surface components. In *In molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae, Cell cycle and biology*, vol. 3 (ed.s J. Pringle, Broach, J. and Jones, E., Eds), pp. 229-326. new york.

Owens, D. K. and Wendt, R. S. (1969). *J. Appl. Polym. Sci.* 13, 1740-7.

Pamula, E., De Cupere, V., Dufrene, Y. F. and Rouxhet, P. G. (2004). Nanoscale organization of adsorbed collagen: influence of substrate hydrophobicity and adsorption time. *J Colloid Interface Sci* 271, 80-91.

Park, H. S., Wolfgang, M. and Koomey, M. (2002). Modification of type IV pilus-associated epithelial cell adherence and multicellular behavior by the PilU protein of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* 70, 3891-903.

Parsegian, V. A. (2005). Van der Waals Forces - A Handbook for Biologists, Chemists, Engineers.

Pedersen. (1990). Biofilm deveelopment on stainless steel and PVC surfaces in drinking water. *water research* 24, 239.

Pereira da Silva, C. H., Vidigal, G. M., Jr., de Uzeda, M. and de Almeida Soares, G. (2005). Influence of titanium surface roughness on attachment of *Streptococcus sanguis*: an in vitro study. *Implant Dent* 14, 88-93.

Piette, J. P. and Idziak, E. S. (1991). Role of flagella in adhesion of *Pseudomonas fluorescens* to tendon slices. *Appl Environ Microbiol* 57, 1635-9.

- Prescott, L., Harvey, J. and Klein, D. (1999). Procaryotic cell structure and fonction. In *Microbiology 4/e*, (ed.s M. G. Hill), pp. Partie I chapitre III.
- Prigent-Combaret, C., Prensier, G., Le Thi, T. T., Vidal, O., Lejeune, P. and Dorel, C. (2000). Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ Microbiol* 2, 450-64.
- Pyrog, T. P. (2001). [Biological functions of microbial exopolysaccharides]. *Mikrobiol Z* 63, 80-101.
- Rakotoarivonina, H., Jubelin, G., Hebraud, M., Gaillard-Martinie, B., Forano, E. and Mosoni, P. (2002). Adhesion to cellulose of the Gram-positive bacterium *Ruminococcus albus* involves type IV pili. *Microbiology* 148, 1871-80.
- Raulio, M., Pore, V., Areva, S., Ritala, M., Leskela, M., Linden, M., Rosenholm, J. B., Lounatmaa, K. and Salkinoja-Salonen, M. (2005). Destruction of *Deinococcus geothermalis* biofilm by photocatalytic ALD and sol-gel TiO(2) surfaces. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 1-8.
- Redey, S. A., Nardin, M., Bernache-Assolant, D., Rey, C., Delannoy, P., Sedel, L. and Marie, P. J. (2000). Behavior of human osteoblastic cells on stoichiometric hydroxyapatite and type A carbonate apatite: role of surface energy. *J Biomed Mater Res* 50, 353-64.
- Redey, S. A., Razzouk, S., Rey, C., Bernache-Assollant, D., Leroy, G., Nardin, M. and Cournot, G. (1999). Osteoclast adhesion and activity on synthetic hydroxyapatite, carbonated hydroxyapatite, and natural calcium carbonate: relationship to surface energies. *J Biomed Mater Res* 45, 140-7.
- Ryu, J. H. and Beuchat, L. R. (2005). Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and Curli production on its resistance to chlorine. *Appl Environ Microbiol* 71, 247-54.
- Ryu, J. H., Kim, H. and Beuchat, L. R. (2004). Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel as influenced by exopolysaccharide production, nutrient availability, and temperature. *J Food Prot* 67, 2123-31.
- Santiago, N. I., Zipf, A. and Bhunia, A. K. (1999). Influence of temperature and growth phase on expression of a 104-kilodalton *Listeria* adhesion protein in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 65, 2765-9.
- Sato, N. and Cohen, M. (1964). The kinetics of anodic oxidation of iron in neutral solution. *Journal of Electrochemical Society* 111, 512-522.
- Schmitt, J. and Flemming, H. C. (1998). FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. *Int. Biodet. and Biod.* 41, 1-11.

- Shapiro, H. M. (2000). Microbial analysis at the single-cell level: tasks and techniques. *J Microbiol Methods* 42, 3-16.
- Shi, Z., Neoh, K. G., Zhong, S. P., Yung, L. Y., Kang, E. T. and Wang, W. (2005). In vitro antibacterial and cytotoxicity assay of multilayered polyelectrolyte-functionalized stainless steel. *J Biomed Mater Res A*.
- Shimoi, H., Iimura, Y. and Obata, T. (1995). Molecular cloning of CWP1: a gene encoding a *Saccharomyces cerevisiae* cell wall protein solubilized with *Rarobacter faecitabidus* protease I. *J Biochem (Tokyo)* 118, 302-11.
- Smith, C. S. (1952). Metal interfaces, pp. 65. Cleveland OH.
- Soutourina, O. A. and Bertin, P. N. (2003). Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 27, 505-23.
- Stanley, P. M. (1983). Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. *Can J Microbiol* 29, 1493-9.
- Terada, A., Yuasa, A., Tsuneda, S., Hirata, A., Katakai, A. and Tamada, M. (2005). Elucidation of dominant effect on initial bacterial adhesion onto polymer surfaces prepared by radiation-induced graft polymerization. *Colloids Surf B Biointerfaces* 43, 99-107.
- Tidswell, E. C. (2005). Bacterial adhesion: considerations within a risk-based approach to cleaning validation. *PDA J Pharm Sci Technol* 59, 10-32.
- Toren, A., Landau, L., Kushmaro, A., Loya, Y. and Rosenberg, E. (1998). Effect of Temperature on Adhesion of *Vibrio* Strain AK-1 to *Oculina patagonica* and on Coral Bleaching. *Appl Environ Microbiol* 64, 1379-1384.
- Touhami, A., Jericho, M. H., Boyd, J. M. and Beveridge, T. J. (2006). Nanoscale Characterization and Determination of Adhesion Forces of *Pseudomonas aeruginosa* Pili by Using Atomic Force Microscopy. *J Bacteriol* 188, 370-7.
- Tsuneda, S., Aikawa, H., Hayashi, H., Yuasa, A. and Hirata, A. (2003). Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *FEMS Microbiol Lett* 223, 287-92.
- Vadillo-Rodriguez, V., Busscher, H. J., van der Mei, H. C., de Vries, J. and Norde, W. (2005). Role of lactobacillus cell surface hydrophobicity as probed by AFM in adhesion to surfaces at low and high ionic strength. *Colloids Surf B Biointerfaces* 41, 33-41.
- van Oss, C. J. and Good, R. J. (1988). Orientation of the water molecules of hydration of human serum albumin. *J Protein Chem* 7, 179-83.

Vanhaecke, E., Remon, J. P., Moors, M., Raes, F., De Rudder, D. and Van Peteghem, A. (1990). Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to 304 and 316-L stainless steel: role of cell surface hydrophobicity. *Appl Environ Microbiol* 56, 788-95.

Vatanyoopaisarn, S., Nazli, A., Dodd, C. E., Rees, C. E. and Waites, W. M. (2000). Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *Appl Environ Microbiol* 66, 860-3.

Verhnet, A., Leveau, J. Y., Cerf, O. and Bellon-Fontaine, M. N. (1992). Role of electrostatic interactions in *Saccharomyces cerevisiae* adhesion to the inner surface of champagne bottles. *Biofouling* 5, 323-334.

Verran, J. and Whitehead, K. (2005). Factors affecting microbial adhesion to stainless steel and other materials used in medical devices. *Int J Artif Organs* 28, 1138-45.

Vilain, S., Cosette, P., Hubert, M., Lange, C., Junter, G. A. and Jouenne, T. (2004). Comparative proteomic analysis of planktonic and immobilized *Pseudomonas aeruginosa* cells: a multivariate statistical approach. *Anal Biochem* 329, 120-30.

Vilain, S., Cosette, P., Hubert, M., Lange, C., Junter, G. A. and Jouenne, T. (2004). Proteomic analysis of agar gel-entrapped *Pseudomonas aeruginosa*. *Proteomics* 4, 1996-2004.

Vittoz, C. (1997). Mouillabilité et acido-basicité de surface. Applications aux aciers inoxydables. In *INPG*. Grenoble.

Wikipédia. (2006). *Saccharomyces cerevisiae*, (ed. l. e. l. Wikipédia).

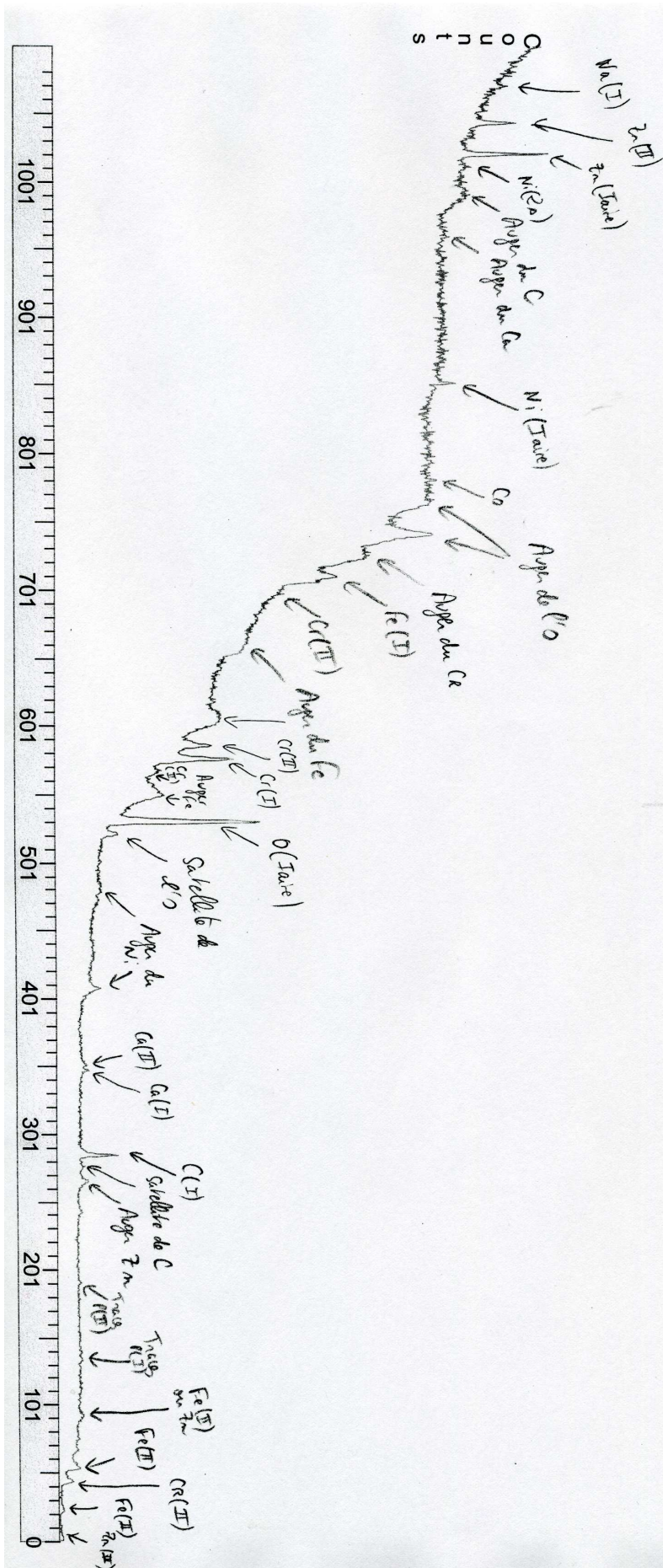
Zhang, Y. and Miller, R. M. (1994). Effect of a *Pseudomonas rhamnolipid* biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Appl Environ Microbiol* 60, 2101-6.

ANNEXES

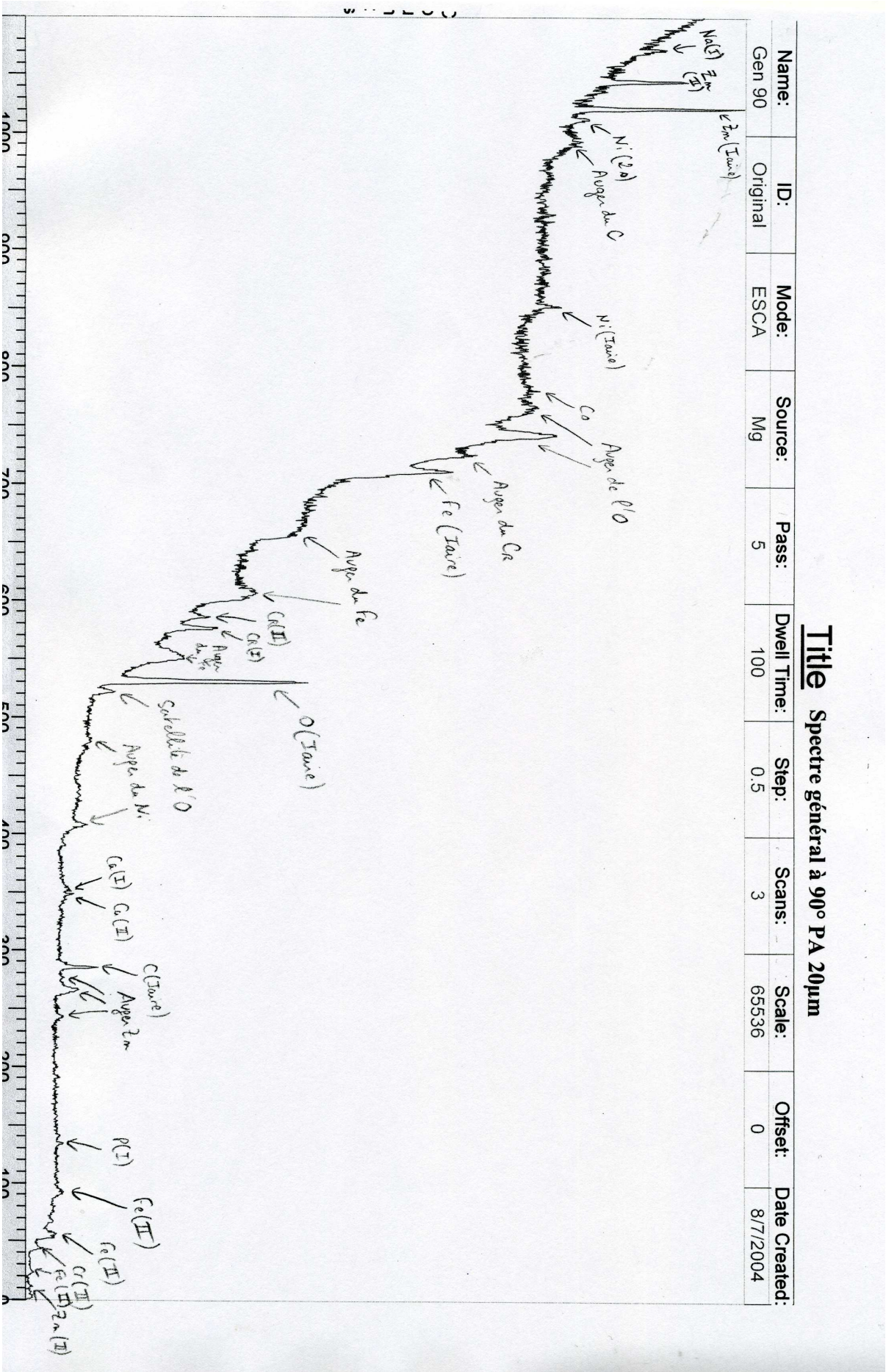
Annexe 1 : Spectre général XPS à 90° d'un échantillon poli miroir (PM)

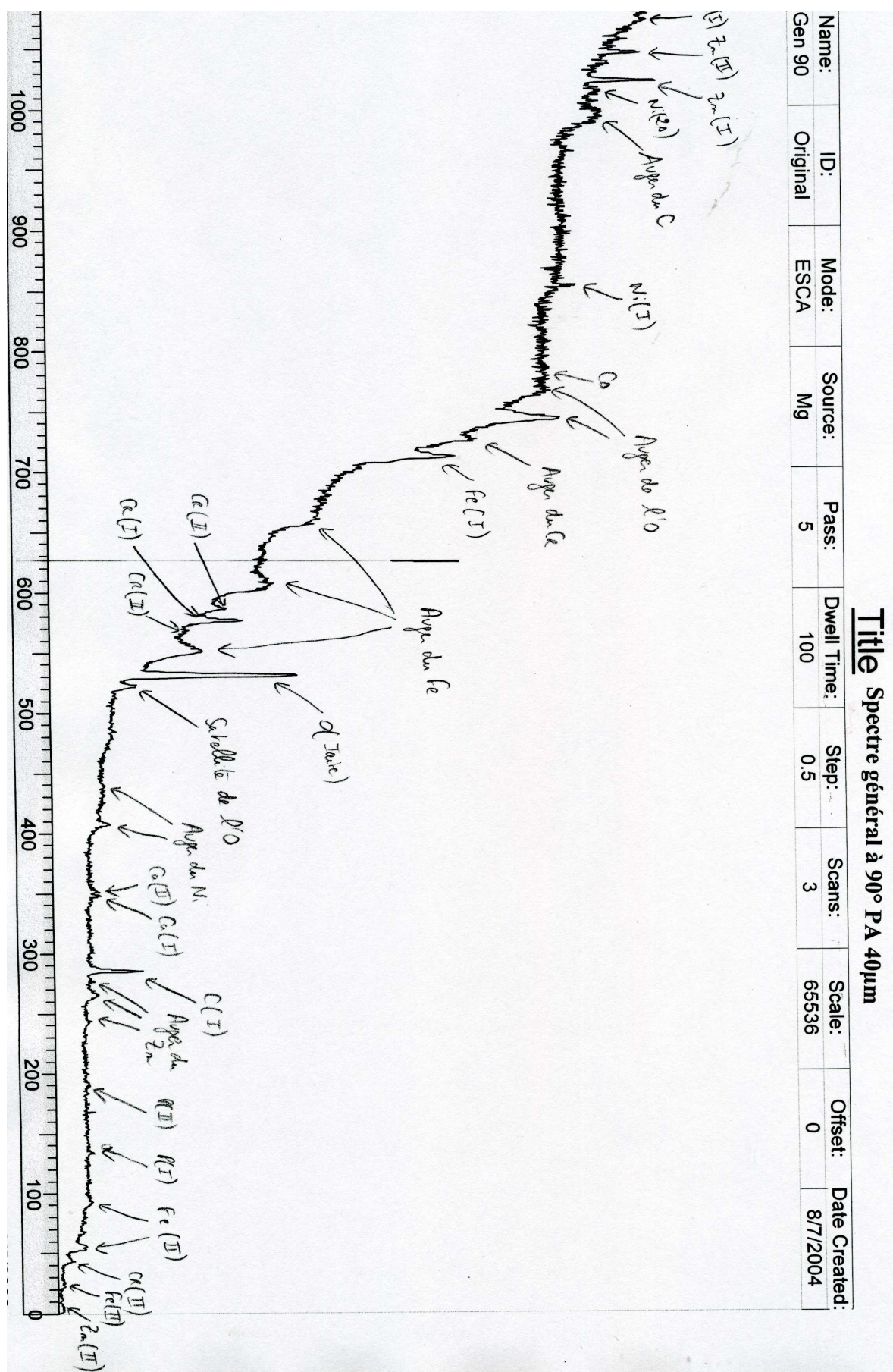
Title Spectre général à 90° PM

Name:	ID:	Mode:	Source:	Pass:	Dwell Time:	Step:	Scans:	Scale:	Offset:	Date Created:
Gen 90	Original	ESCA	Mg	5	100	0.5	3	131072	0	8/7/2004



Annexe 2 : Spectre général XPS à 90° d'un échantillon poli attaqué (PA) avec une taille de grain de 20µm





Annexe 4: Spectre général XPS à 90° d'un échantillon poli attaqué (PA) avec une taille de grain de 100µm

