



République Algérienne Démocratique et Populaire



Université du 20 Aout 1955 –SKIKDA-

Faculté des sciences

Département des Sciences de la Matière

Thèse de Doctorat

Présentée par :

Mme Krid Ferial

Pour obtenir le grade de docteur de l'université de Skikda.

**Spécialité :** Chimie

**Option :** Pollution chimique et Environnement

Développement de capteurs bactériens impédimétriques à base d'électrodes fonctionnalisées par des anticorps pour le suivi des effets biocides des traitements (Champ électrique, Electrochloration, ...) sur l'eau

Soutenue le : **24/10/2011**

**Jury composé de :**

<b>Pr. MEDJRAM</b> Med. Salah	Université du 20 Août 1955 Skikda	<b>Président</b>
<b>Dr. ABDERRAHMANE</b> Sihem	Université Badji-Mokhtar Annaba	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr. DJAZI</b> Fayçal	Université du 20 Août 1955 Skikda	<b>Examineur</b>
<b>Pr. SAMAR</b> Med El Hadi	Université Badji-Mokhtar Annaba	<b>Examineur</b>
<b>Dr. HAMLAOUI</b> Youcef	Centre universitaire de Souk-Ahras	<b>Examineur</b>

## Symboles et abréviations

**A** : Ampère.

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**Ag<sup>+</sup>** : ion d'argent.

**AGSD** : sulfadiazine d'Argent.

**AISI430** : l'acier inoxydable

**AIEC** : *E.Coli* adhérente invasive **ATP** : adénosine triphosphate.

**ATP** : adénosine triphosphate

**BF** : basses fréquences .

**CA** : Chlore actif.

**Ca<sup>++</sup>** : ion calcium.

**Ca(OCl)<sub>2</sub>** : hypochlorite de Calcium .

**CE** : Champ Electrique

**CEP** : Les Champs Electriques Pulsé

**CEI** : Champs Electrique Imposé

**C<sub>d</sub>** : double couche.

**C<sub>dl</sub>** : la capacité de la double couche

**CH<sub>3</sub>-CO-O-OH** : l'acide péracétique.

**C<sub>H</sub>** : couche d'Helmutz.

**CMI** : La concentration minimale inhibitrice .

**CML** : La concentration minimale létale.

**CO<sub>2</sub>** : le dioxyde de carbone.

**CO<sub>3</sub><sup>-</sup>** : les carbonates

**Cl<sup>-</sup>** : les chlorures.

**ClO<sup>-</sup>** : L'ion hypochlorite.

**CPEs** : les impédances généralisées ( constant phase élément).

**DAEC** : *E.Coli* à adhésion diffuse .

**D.O.** : densité optique.

**Eagg** : *E.Coli* entéro-agrégative.

**EAST** : entéroaggrégative *E. coli* heat stable enterotoxin).

**E. coli** : *Escherichia Coli*.

**EIS** : Spectroscopie d'impédances électrochimiques .

**EIEC** : *E.Coli* entéro-invasive.

**EPEC** : *E.Coli* entéro-pathogène.

**EHEC** : *E.Coli* entéro-hémorragique.

**E<sub>prot</sub>** : le Potentiel de protection.

**E<sub>piq</sub>** : le potentiel de piquration.

**ETEC** : *E.Coli* entéro-toxinogène.

**E<sub>R</sub>** : le Potentiel de rupture ou de piqûration.

**F/m<sup>2</sup>** : La capacité par unité de surface.

**HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>** : les bicarbonates .

**HClO<sup>-</sup>** : ion hypochloreux.

**HCl** : acide chloridrique .

**HF** : hautes-fréquences.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : le peroxyde d'hydrogène.

**LS** : des ions métalliques ( Fe, Cr et Ni) en solution.

**K<sup>+</sup>** : le potassium.

**KΩ.cm<sup>2</sup>** : kilohom par centimètre carré.

**KI** : iodure de potassium .

**Mg<sup>+</sup>** : le magnésium .

**MHB** : le bouillon Mueller Hinton.

**Na<sup>+</sup>** : le sodium.

**NaOH** : hydroxide de sodium .

**NaClO** : eau de javel .

**NaCl** : chlorure de sodium.

**NAG** : la N-acétylglucosamine.

**Nm** : nanometre.

**NAM** : l'acide N- acétylmuramique.

**Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.5 H<sub>2</sub>O** : solution de thiosulfate de sodium.

**NO<sub>3</sub><sup>-</sup>** : les nitrates SCP : staphylocoque coagulase positive .

**O<sub>3</sub>** : ozone.

**OM** : orbitale moléculaire.

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé.

**OPA** : o-phthalique aldehyde.

**PAA** : L'acide péracétique  $\text{CH}_3\text{COOOH}$ .

**PBM** : laboratoire Polymères, Biopolymères, Membranes UMR CNRS 6522 de l'Université de Rouen France.

**PBP** : potentiel bipolaire pulsée.

**PBS** : Phosphate Buffer Salin .

**PBH** : poly-b-hydroxybutyrate

**PIH** : plan interne d'Helmholtz .

**PEH** : plan externe d'Helmholtz.

**PCA** : Plate Count Agar, la gélose pour dénombrement.

**LPS** : lipopolysaccharides

**$L_D$**  : la longueur de Debye

**$q^M$**  : charge de l'électrode métallique.

**$q^S$**  : charge de la solution.

**$R_1$  ;  $R_2$  ;  $R_3$  ;  $R_4$**  : groupes alkyles.

**$R - \text{NH}_2$**  : formule générale d'une amines

**$R_s$**  : Résistance de la solution.

**$R_{tc}$**  : Résistance de transfert de charge.

**$R_t$**  : Résistance de transfert de charge

**SCN** : staphylocoque coagulase négative.

**$\text{SO}_4^{2-}$**  : les sulfates .

**SIEL** : La spectroscopie d'impédance électrochimique locale.

**TIAC** : les toxi-infections alimentaires collectives.

**THM** : trihalométhanes.

**UFC /ml** : nombre d'Unité Format Colonie par ml.

**UV** : ultra violet.

**UV-C** : Abréviation de l'ultraviolets C. Partie du rayonnement ultraviolet qui est arrêté par le quartz et par l'ozone de la stratosphère.

**V** : volt.

$V_H$  : le potentiel en solution au plan externe de Helmholtz.

$V_M$  : est le potentiel de l'électrode.

$V(x)$  : La chute de tension à travers la zone de charge d'espace.

$v_t$  : la tension thermique.

$V_S$  : le potentiel au sien de la solution.

$W$  : impédance de Warburg .

$Z_i(\text{ohm/cm}^2)$  : la partie imaginaire dans le plan complexe de Nyquist.

$Z_r(\text{ohm/cm}^2)$  : la partie réel dans le plan complexe de Nyquist.

## SOMMAIRE

Liste des tableaux.....	07
Liste des figures.....	08
Introduction bibliographique .....	12
CHAPITRE I : Bactériologie.....	14
I.1. Structure bactérienne.....	14
I.2. Structure cellulaire .....	14
I.2.1. Le génome bactérien.....	16
I.2.2. La membrane .....	16
I.3. Le métabolisme.....	17
I.4. Les contacts avec l'extérieur.....	17
I.5. La spore.....	17
I.6. La division cellulaire.....	17
I.7. Culture des bactéries.....	18
I.8. Paramètres influant la croissance microbienne .....	20
I.9. Les bactéries pathogènes, symbiotiques, utiles et saprophytes.....	20
I.10. Escherichia Coli.....	21
I.10.1. Présentation.....	21
I.10.2. Caractéristiques .....	22
I.10.3. Rôle pathogène et commensale de la bactérie« <i>Escherichia Coli</i> ».....	23
I.10.4. Pathogénie.....	24
I.10.4.1. <i>E.Coli</i> entéro-pathogène (EPEC).....	24
I.10.4.2. <i>E.Coli</i> entéro-invasive (EIEC ).....	24
I.10.4.3. <i>E.Coli</i> entéro-hémorragique (EHEC).....	24
I.10.4.4. <i>E.Coli</i> entéro-toxinogène (ETEC).....	24
I.10.4.5. <i>E.Coli</i> entéro-agrégative Eagg (EC ou EAEC).....	24
I.10.4.6. <i>E.Coli</i> à adhésion diffuse (DAEC).....	24
I.10.4.7. <i>E.Coli</i> adhérente invasive (AIEC).....	25
I.10.4.8. <i>E.Coli</i> K12 .....	25
I.11. Les Staphylocoques .....	26
I.11.1. Taxonomie .....	26
I.11.2. Le genre <i>Staphylococcus</i> .....	27
I.11.3. La classification des espèces .....	27
I.11.4. L'agent pathogène .....	28
I.11.4.1. Pathogénie .....	28

I.11.4.2. La coagulase.....	28
I.11.4.3. Staphylocoques coagulase-négative.....	29
I.11.5. Classification et habitat.....	29
I.11.6. Caractères bactériologiques.....	29
I.11.7. Pouvoir pathogène.....	30
I.11.8. Sensibilité des SCN aux antibiotiques.....	30
I.11.9. Viabilité et résistance physico-chimique.....	30
I.11.10. Incubation.....	31
I.11.11. Mode de transmission.....	31
I.12. Résultats et discussions.....	31
I.12.1. Souches bactériennes.....	31
I.12.2. préculture.....	31
I.12.3. Préparation du milieu de culture.....	31
I.12.4. Incubation.....	32
I.12.5. Mesure de la densité optique.....	32
I.12.6. Préparation des milieux d'étude contaminés.....	34
Références bibliographiques.....	35
CHAPITRE II : Désinfection et traitements biocides.....	37
II.1. Introduction.....	37
II. 2. Modes d'action des désinfectants.....	37
II.2.1. Notion de désinfection et d'antiseptique.....	37
II.2.2. Choix de l'agent antimicrobien.....	38
II.2.3. Activité bactéricide.....	38
II.2.4. Détermination de l'activité antibactérienne des désinfectants.....	38
II.2.4.1. Sur cellules planctoniques.....	38
II.2.4.2. Sur cellules fixées.....	38
II.2.4.3. Mécanisme d'action générale.....	39
II.2.5. Classification des principes actifs antimicrobiens.....	40
II.2.6. Sensibilités bactériennes aux agents antimicrobiens.....	40
II.2.6.1. Résistance intrinsèque.....	40
II.2.6.2. Résistance acquise.....	41
II.2.6.3. Résistance liée à l'état d'adhérant et / ou en biofilms.....	41
II.2.6.4. La capacité d'adaptation des microorganismes aux agents biocides.....	42
II.2.7. Formation des composés indésirables suite à la désinfection de l'eau.....	43
II.2.7.1. Les matières minérales.....	43
II.2.7.2. Les matières organiques.....	44
II.3. Traitements biocides chimiques.....	44

II.3.1. Halogènes et dérivés ...	44
II.3.1.1. Le Chlore.....	44
II.3.1.2. Désinfection à l'eau de Javel .....	48
II.3.1.3. L'acide hypochloreux .....	49
II.3.1.4. L'ion hypochlorite.....	49
II.3.1.5. Electrochloration.....	49
II.3.1.6. Dioxyde de chlore .....	50
II.3.1.7. Chloro-isocyanurates. ....	52
II.3.1.8. Chlorhexidine .....	52
II.3.1.9. L'iode et les iodophores. ....	52
II.3.1.10. L'ozone.....	53
II.3.1.11. Acides et bases .....	53
II.3.1.12. Acide péracétique .....	54
II.3.1.13. Peroxydes.....	54
II.3.1.14. Aldéhydes .....	54
II.3.1.15. Alcools.....	55
II.3.1.16. Dérivés phénoliques. ....	56
II.3.1.17. Bis-phénols .....	55
II.3.1.18. Halophénols .....	56
II.3.1.19. Ammoniums quaternaires .....	56
II.3.1.20. Diamidines .....	57
II.3.1.21. Composés d'Argent.....	57
II.2.4. Traitements physiques .....	58
II.4.1. Effets du champ électrique .....	58
II.4.2. Traitement par UV .....	60
II.5. Résultats et discussions.....	61
II.5.1. L'électrochloration .....	61
II.5.2. Matériels et méthodes .....	64
II.5.3. Etude du comportement de l'acier AISI 430 vis-vis de la corrosion en milieu chloruré.....	65
II.5.4. Méthodes de traitements biocides .....	71
II.5.5. Interprétations des résultats .....	79
Conclusion.....	80
Bibliographie .....	82
CHAPITRE III : Bioadhésion.....	87
III.1. Introduction .....	87
III.2. Où trouve-t-on les biofilms ?.....	90
III.2.1. Dans la nature.....	90
III.2.2. Des biofilms dangereux et pourtant.....	90
III.2.2.1. Dans l'industrie.....	91
III.2.2.2. Dans le monde médical.....	93
III.3. Organisation du biofilm.....	94
III.3.1. Phase 1 : Film initiateur et approche de la surface.....	95
III.3.2. Phase 2 : Adhérence, adhésion et site d'initiation.....	97
III.3.3. Phase 3 : Maturation du biofilm.....	100



III.4. Formation de biofilms .....	102
III.4.1. Conditionnement de la surface par le milieu .....	102
III.4.2. Adhésion des bactéries .....	103
III.4.3. Croissance du biofilm.....	103
III.4.4. Dispersion du biofilm .....	104
III.4.5. Propriétés des biofilms.....	104
III.5. Aspects positifs et négatifs des biofilms .....	105
III.5.1. Aspects positifs des biofilms.....	105
III.5.2. Aspect négatifs des biofilms.....	105
III.6. Infection bactérienne.....	106
III.7. Résistance et biofilms.....	106
III.7.1. Existence de microenvironnements.....	107
III.7.2. Bactéries résistantes.....	107
III.8 Dénombrement des cellules viables cultivables .....	107
III.8.1. Caractéristiques des cellules bactériennes.....	108
III.8.2. Caractéristiques des supports solides .....	108
III.9. Biofilm à E. Coli .....	109
III.9.1. Les surfaces anti-biofilm.....	109
III.9.1.1. Les produits anti-adhérentiels.....	110
III.10. Résultats et discussions.....	110
III.10.1 Adhésion sur un support en verre dans trois milieux d'études.....	110
IV.2. Biofilms sur support en platine.....	113
III.10.3.L'influence de la nature du support .....	117
Conclusion .....	119
Bibliographie .....	121
CHAPITRE IV : Spectroscopie d'impédance.....	125
IV.1.Introduction.....	125
IV.2.Théorie.....	125
IV.2.1. Réaction d'oxydoréduction à l'interface métal/solution .....	125
IV.2.2. Interface métal/solution.....	127
IV.2.3. Double couche : Modèles d'Helmoltz, Gouy-Chapmann et Stern.....	127
IV.2.4. Processus faradique et non faradique.....	130
IV.3.Mesure d'impédance électrochimique .....	131
IV.3.1.Principe .....	131
IV.3.2. Transfert de charge .....	131
IV.3.3.Résistance de la solution (Rs).....	133
IV.3.4.Résistance de transfert de charge Rtc.....	133
IV.3.5.Phénomène de diffusion et impédance de Warburg W.....	133
IV.4.Circuit électrique équivalent.....	134
IV.4.2.Résistance - condensateur en parallèle.....	135
IV.4.3.Circuit de Randels.....	137
IV.4.4. Diagramme d'impédance totale.....	138
IV.5.Résultats et discussions.....	139
IV.6.Conclusion.....	148
IV.7.Bibliographie.....	150
Conclusion générale.....	151
Annexes .....	153

Tableau	Titre	page
II.1	Composition chimique de l'acier AISI430	65
II.2	Effets synergiques des traitements biocides sur les Staphylocoques Coagulases Positives.	72
II.3	Effets synergiques des traitements biocides sur les Staphylocoques Coagulases Positives.	73
II.4		74
II.5	Effets synergiques des traitements biocides sur les Staphylocoques Coagulases Positives.	76
II.6	Calcul des efficacités après un temps de 15 minutes du champ électrique a potentiel pulse sur les SCP après 15 min.	78
III.1	Effets synergiques des traitements biocides sur les Staphylocoques Coagulases Négatives.	94
III.2	Liste partielle des infections humaines dues aux biofilms.	100
III.3	Facteurs impliqués dans la formation des biofilms.	109
III.4	Déterminant de surface requis pour les biofilms d'E.coli.	117
IV.1	Influence de la nature du support sur le phénomène d'adhésion des <i>E.Coli K12</i> dans le PBS .	148
	Paramètres électrochimiques déduits des courbes de Nyquist.	

Figure	Titre	Page
I.1.	Cellule bactérienne.	14
I.2.		16
I.3.	Structures des bactéries à gram positif et gram négatif.	18
I.4.		19
I.5.	Colonies bactériennes sur milieu solide gélosé en boîte de Pétri.  Courbe de croissance d'une bactérie.	21
I.6.	Culture bactérienne et fongique, lancée sur gélose enrichie en peptones et additionnée d'un bouillon Liebig. Les taches luisantes rouges, jaunes, beiges et blanches correspondent à des colonies bactériennes, les zones concentriques poudreuses sont des champignons.	22
I.7.	La bactérie <i>Escherichia coli</i> en cours de division, vue au microscope électronique à balayage et colorée artificiellement.	26
I.8.	La bactérie <i>Staphylococcus sp.</i> vue au microscope électronique à balayage et colorée artificiellement.	32
I.9.	La bactérie <i>Escherichia coli</i> K 12 cultivée sur gélose nutritive P.C.A.	33
II.1.	Préparation d'une solution à 0.5 D.O. ( $\lambda=546\text{nm}$ ) correspondant à $10^{+8}$ UFC/ml.	46
II.2.		47
II.3.	Evolution de la concentration en HClO en fonction de la température et du p H.	66
II.4.		69
II.5.	Chloration au break point.	69
II.6.		70
II.7.	Courbe potentiocinétique cyclique de l'acier inoxydable AISI 430 dans une solution à 0.5N de NaCl .	71
II.8.		73
II.9.	Concentration du chlore actif en fonction de la fréquence en PBP.  Vitesse de corrosion en fonction de la fréquence en PBP.  Variation du titre du Chlore actif en fonction du temps d'électrolyse sous un régime de PBP.	74
	Dispositif expérimental.	

II.10.	Influence de la polarisation Pulsée (-1000 ÷ +1600) mV aux fréquences ( $10^{+4}$ - $10^{+4}$ ) s <sup>-1</sup> sur le nombre de Staphylocoques Coagulase Positive en fonction du temps de contact.	75
II.11.		89
III.1.	Influence de la PBP (-1000 ÷ +1600)m V ,aux fréquences ( $10^{+5}$ - $10^{+5}$ ) s <sup>-1</sup> sur le nombre de Staphylocoques Coagulase Négative en fonction du temps de contact .	87
III. 2.		91
III. 3.		93
III. 4.	Adhésion d'une bactérie sur une surface.	96
III. 5.	Phénomène de biofouling sur la coque d'un navire.	97
III. 6.		98
III. 7.	Biofilm sur une plaque dentaire.	98
III.8.		99
III. 9.	Eléments caractéristiques d'un biofilm bactérien.	101
III.10.		102
III.11.	Formation du film de conditionnement sur la surface.	113
III.12.	L'adsorption. Recherche du site d'initiation.	115
III.13.	L'adhésion irréversible	116
III.14	La maturation du biofilm.	116
IV.1.	Représentation schématique des différentes étapes conduisant à la formation d'un biofilm.	126
	Observations aux microscopes optiques des biofilms obtenus sur support en verre dans le PBS à différentes concentrations de solution mère à 0,5 de D.O.	
	Nombre de cellules <i>E.Coli k12</i> adhérees en fonction de la concentration de la solution mère à 0.5de D.O. dans différents milieux.	
	Variation du nombre de Bactéries <i>E.Coli K12</i> adhérees sur un support en verre en fonction de la concentration de <i>E.Coli K12</i> dans le milieu PBS.	
	Variation du nombre de Bactéries <i>E.Coli K12</i> adhérees sur un support de Platine en fonction de la concentration de <i>E.Coli K12</i> dans le milieu PBS.	
	Représentation de la réduction (a) et de l'oxydation (b) d'une espèce A en solution.	



IV.2.	La variation du potentiel à l'interface conformément au modèle de Helmholtz.	131
IV.3.	Variation du potentiel avec la distance dans la couche diffuse.	132
IV.4.	La distribution du potentiel selon Stern.	133
IV.5.	Schéma d'un système électrochimique non linéaire soumis à une perturbation sinusoïdale.	135
IV.6.	Diagramme de Nyquist de l'impédance.	138
IV.7.	Diagramme de Bode	138
IV.8.	Circuit résistance - condensateur en parallèle.	138
IV.9.	Diagramme de Nyquist de l'impédance pour résistance - condensateur en parallèle.	139
IV.10.	Diagramme de Bode d'un circuit résistance - condensateur en parallèle.	139
IV.11.	Modèle électrique de l'interface métal/solution.	140
IV.12.	Diagramme de Nyquist de l'impédance pour un circuit de Randels.	141
IV. 13.	Dispositif expérimental.	142
IV.14.	Diagramme d'impédance d'un biofilm à $2 \times 10^5$ UFC /ml de <i>E.Coli K12</i>	144
IV.15.	dans le P.B.S.	145
IV.16.	Diagramme d'impédance d'un biofilm à $4 \times 10^5$ UFC /ml de <i>E.Coli K12</i>	145
IV.17.	dans le P.B.S.	146
IV.18.	Diagramme d'impédance d'un biofilm à $6 \times 10^5$ UFC /ml de <i>E.Coli K12</i>	147
IV.19.	dans le P.B.S.	147
IV.20.	Diagramme d'impédance d'un biofilm à $8 \times 10^5$ UFC /ml de <i>E.Coli k 12</i>	148
	dans le P.B.S.	
	Diagramme d'impédance d'un biofilm à $2 \cdot 10^5$ UFC/ml d'E.Coli K12	
	dans le PBS.	
	Diagramme d'impédance d'un biofilm à $4 \cdot 10^5$ UFC/ml d'E. Coli K12	
	le PBS.	
	Diagramme d'impédance d'un biofilm à $5 \cdot 10^5$ UFC/ml d'E Coli K12	
	le PBS.	

IV.21.	Diagramme d'impédance d'un biofilm à $6.10^5$ UFC/ml d'E. Coli K12 dans le PBS.	148
IV.22.		149
IV.23.	Diagramme d'impédance d'un biofilm à $7.10^5$ UFC/ml d'E. Coli K12 dans le PBS.	149
IV.24.	Diagramme d'impédance d'un biofilm à $8.10^5$ UFC/ml d'E. Coli K12 dans le PBS.	150
	Diagramme d'impédance d'un biofilm à différentes concentrations d'E .Coli K12 dans le PBS.	

# **Introduction générale**



## Introduction générale

La contamination de l'eau et des dispositifs médicaux par des bactéries pathogènes peut être à l'origine d'infections nosocomiales plus ou moins sévères. L'hygiène demeure une préoccupation constante des industriels de l'agro-alimentaire, ainsi que des responsables du secteur médical et hospitalier. Quel que soit le secteur impliqué, pour assurer un statut hygiénique acceptable, des traitements de désinfection de l'eau, du matériel et des matériaux sont régulièrement réalisés. Outre l'utilisation de procédés physiques (UV, traitement thermique ...), des traitements par des agents chimiques combinés sont largement appliqués aux appareils thermosensibles ; toutefois, l'efficacité de ces agents reste variable d'une application à une autre. En effet, si près de 100% des cellules se trouvant à l'état planctonique peuvent être éliminés, ce rendement est moindre sur les cellules adhérentes en biofilms. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette différence de sensibilité des bactéries vis-à-vis de désinfectants. Tout d'abord, les tests utilisés pour évaluer l'activité antimicrobienne des agents désinfectants restent, aujourd'hui, basés sur l'utilisation de cellules microbiennes en suspension ou sèches déposés sur support ; ces conditions sont en fait éloignées de celles généralement rencontrées in vivo (cellules adhérentes ayant ou non intégré une matrice microbienne et synthétisé des polymères exocellulaires). Cette variation de réponse des cellules aux biocides peut être aussi liée à : (a) des modifications physico-chimiques de leurs surfaces ;(b) un changement dans leurs physiologies (production de composés extracellulaires, morphologie, expression génétique..) ;(c) leur conditions de conservation et de mise en culture. Afin d'améliorer l'efficacité de ses produits et/ou optimiser les procédures d'hygiène qui y sont associées, il apparaît nécessaire de continuer à mettre en place de nouvelles ou innovantes méthodes de traitements des eaux et du matériel. La contribution de ce travail s'inscrit dans cet objectif; la thèse présentée est structurée en quatre chapitres :

Chapitre I : il décrit la communauté bactérienne et ces propriétés, particulièrement trois genres de bactéries, à savoir : les *Staphylocoques Coagulase Négative*, les *Staphylocoques Coagulase Positive* et l'*Escherichia. Coli. K12*.

Chapitre II : Désinfection et traitements biocides. Cette partie rapporte les principes et les propriétés de la désinfection de l'eau par, des traitements physiques (Champ électrique, chaleur, UV, irradiation...), chimiques (Chlore et ses dérivés,...), ou une combinaison des deux. Il décrit aussi une technique de désinfection rapide et peu coûteuse qui est

l'électrolocation en régime de polarisation pulsé où les paramètres suivants ont été exploités : effet du champ électrique pulsé ; effet du chlore actif ; effet des ions métalliques ; effets combinés des méthodes précédentes.

Chapitre III : La bioadhésion : Il traite le mode de vie favorisé par les micro-organismes où la population bactérienne se trouve fixée sur un support plutôt que libre et isolée dans le milieu environnemental. L'étude est faite sur la formation d'un biofilm de *E.Coli k12* sur deux supports solides inertes à savoir : le verre et le Platine, et cela en faisant varier la concentration des *E.Coli k12* dans les différents milieux d'étude : l'eau stérilisée, l'eau physiologique et le milieu P.B.S. (Peptone Buffer Saline).

Chapitre VI : Il donne une présentation fondamentale sur la méthode spectroscopique d'impédance électrochimique, ainsi que son utilisation pour la détection des bactéries *E.Coli k12* adhérees en biofilms sur une surface solide (platine), dans les différents milieux d'étude.

# **Chapitre I**

# **Bactériologie**

## I.1. Structure bactérienne

Les bactéries sont des organismes vivants unicellulaires procaryotes, caractérisées par une absence de noyau et d'organites. La plupart des bactéries possèdent une paroi cellulaire glucidique, le peptidoglycane. Les bactéries mesurent quelques micromètres de long et peuvent présenter différentes formes : Des formes sphériques (coques), des formes allongées ou en bâtonnets (bacilles), des formes plus ou moins spiralées. L'étude des bactéries est la bactériologie, une branche de la microbiologie. Les bactéries sont ubiquitaires et sont présentes dans tous les types de biotopes rencontrés sur Terre. Elles peuvent être isolées du sol, des eaux douces, marines ou saumâtres, de l'air, des profondeurs océaniques, de la croûte terrestre, sur la peau et dans l'intestin des animaux. Il y a quarante millions de cellules bactériennes dans un gramme de sol et un million de cellules bactériennes dans un millilitre d'eau douce. En tout, il y aurait cinq quintillions ( $5 \times 10^{30}$ ) de bactéries dans le monde. Cependant, un grand nombre de ces bactéries ne sont pas encore caractérisées, car non cultivables en laboratoire (Sutherland 2001).

La plupart de ces bactéries sont inoffensives ou bénéfiques pour l'organisme. Il existe cependant de nombreuses espèces pathogènes à l'origine de beaucoup de maladies infectieuses comme le choléra, la syphilis, la peste, l'anthrax, la tuberculose. Les infections bactériennes peuvent être traitées grâce aux antibiotiques qui le plus souvent inhibent une de leur fonction vitale (par exemple, la pénicilline bloque la synthèse de la paroi cellulaire). Les bactéries peuvent être très utiles à l'Homme lors des processus de traitement des eaux usées, dans l'agroalimentaire lors de la fabrication des yaourts ou du fromage et dans la production industrielle de nombreux composés chimiques.

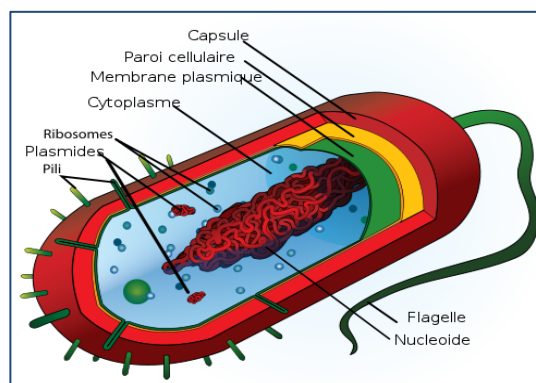


Figure I.1. Cellule bactérienne

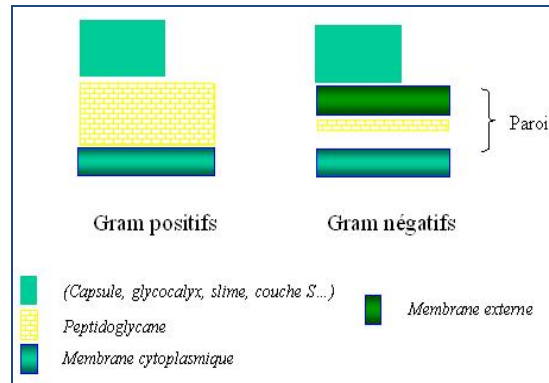
## I.2. Structure cellulaire

En tant que procaryote (organisme sans noyau), les bactéries sont des cellules relativement simples, caractérisées par une absence de noyau et d'organites comme les mitochondries et les chloroplastes. Une caractéristique importante des bactéries est la paroi cellulaire. Les bactéries peuvent être divisées en deux groupes (Gram négatif et Gram positif) figure I.2., basés sur la différence de la structure et de la composition chimique de la paroi cellulaire, mise en évidence grâce à la coloration de Gram. Les bactéries à coloration de Gram positif possèdent une paroi cellulaire contenant un peptidoglycane (ou muréine) épais et des acides teichoïques, alors que les bactéries à coloration de Gram négatif présentent un peptidoglycane fin localisé dans le périplasma entre la membrane cytoplasmique et une membrane cellulaire externe. La paroi donne à la bactérie sa forme et la protège contre l'éclatement sous l'effet de la très forte pression osmotique du cytoplasme. Le peptidoglycane assure la rigidité de la paroi. Il existe toutefois des bactéries sans paroi : ce sont les mycoplasmes. Au niveau intracellulaire, les bactéries possèdent un chromosome sous forme de filament d'ADN, support de l'hérédité. Les cellules contiennent aussi de nombreux ribosomes permettant la synthèse protéique grâce au mécanisme de la traduction. Le cytoplasme des procaryotes contient souvent des substances intracellulaires de réserve qui sont des stocks de nutriments sous forme de glycogène, amidon ou poly-b-hydroxybutyrate (PBH). Beaucoup de bactéries possèdent des structures extracellulaires comme des flagelles, utilisés pour la mobilité des cellules, et des fimbriaes permettant l'attachement ou le phénomène de conjugaison. Les bactéries hétérotrophes peuvent utiliser leurs flagelles pour se diriger vers des zones riches en substances organiques (nutriments) grâce au phénomène, appelé chimiotactisme.

Quelques bactéries peuvent fabriquer de fines couches externes à la paroi cellulaire, généralement constituées de polysaccharides (des sucres). Quand la couche est compacte, on parle de capsule. Les capsules constituent, par exemple, une barrière de protection de la cellule contre l'environnement externe. Elle facilite aussi l'attachement aux surfaces et la formation de biofilms. *Klebsiella*, *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pneumoniae* sont des exemples de bactéries capsulées. Quand la couche est diffuse, on parle de glycocalyx. Le glycocalyx permet aux bactéries d'adhérer à un support. Certaines bactéries, qualifiées de bactéries engainées, produisent une couche externe dense et rigide : la gaine. Ce phénomène est courant chez les bactéries de l'eau qui forment des chaînes filamenteuses (*Sphaerotilus natans*, par exemple). La gaine protège les cellules contre les turbulences de l'eau. Les bactéries du groupe *Cytophaga - Flavobacterium* produisent une couche muqueuse qui leur

permet de rester en contact étroit avec un milieu solide. D'autres bactéries comme les *Spirillum* peuvent s'envelopper d'une couche protéique, appelée la couche S.

Quelques bactéries comme *Bacillus* ou *Clostridium* peuvent fabriquer des endospores leur permettant de résister à certaines conditions de stress environnemental ou chimique.



**Figure I.2. Structures des bactéries à gram positif et gram négatif**

### I.2.1 .Le génome bactérien

L'ADN est formé d'une seule molécule, « circulaire ». Il se présente sous forme super enroulée (ex: *E. coli* mesure de 2 à 4  $\mu\text{m}$  et possède un ADN de 4500 kb, soit un périmètre de 1,5 mm). Il peut exister des anneaux d'ADN supplémentaires plus petits, qui sont les **plasmides**.

### I.2.2. La membrane

Chez les bactéries à Gram positif, la membrane cytoplasmique est recouverte par une zone épaisse de peptidoglycane (paroi). Certains constituants comme l'acide N-acétylmuramique ou l'acide diaminopimélique sont des composés spécifiques aux procaryotes. Chez les Gram négatif: membrane externe riche en lipopolysaccharides (LPS); périplasma contient des enzymes et des protéines qui fonctionnent comme transporteurs entre les deux membranes cytoplasmiques. Le glycocalyx est une enveloppe supplémentaire plus ou moins structurée et diffuse, parfois épaisse, très variable en fonction de l'état physiologique des cellules. Les principaux constituants sont des polysaccharides et des protéines. Quand cette couche est muqueuse, formée d'un gel très hydraté riche en polysaccharide, on parle de capsule (Aspect gluant ou muqueux sur gélose). Cet aspect peut disparaître au cours des repiquages sur gélose, comme si la bactérie n'avait plus à se défendre contre l'environnement et limitait sa dépense en énergie en économisant la synthèse des polysaccharides...

### **I.3. Le métabolisme**

Puissant et varié, il est dû à la petite taille des bactéries qui sont en prise directe avec l'extérieur: l'augmentation du rapport masse/surface facilite les échanges.

Particularité de la survie sans oxygène : anaérobie stricte, anaérobies facultatives, aérotolérantes, micro aérophiles; possibilité de développer des voies de fermentation et des chaînes respiratoires qui sont sans équivalents chez les eucaryotes (ex: possibilité de tirer de l'énergie à partir de l'oxydation de l'hydrogène par l'ion Nitrate).Les autotrophes peuvent utiliser le CO<sub>2</sub> comme seule source de carbone (sans photosynthèse).Les micro-organismes peuvent établir des relations interdépendantes qui leur permettent de subvenir à leur besoin. Exemples, Haemophilus influenza et Staphylocoques.

-Températures de croissance :

Bactéries « mésophiles » : 20 à 45°C ;

Bactéries psychrophiles: 0 à 25°C ;

Bactéries thermophiles: 35 à 70°C .

-Prolifération: Dans des conditions favorables de croissance, une bactérie peut engendrer une descendance d'un milliard d'individu en 10 heures....

### **I.4. Les contacts avec l'extérieur**

Relations statiques, si les bactéries sont liées à des supports ; relations dynamiques, quand ces bactéries sont libres dans un milieu. Les systèmes d'adhésion abondent chez les bactéries et peuvent être mis à profit par les germes pour investir les tissus; les adhésines sont localisées principalement sur les fimbriaes (filaments protéiques souples à la différence des pili qui sont des filaments rigides dont la fonction principale est la conjugaison).

### **I.5. La spore**

La spore est le moyen de survie le plus abouti qui confère à la bactérie une survie « indéfinie » au froid, à la dessiccation, à la chaleur (thermo-résistance) voire aux antibiotiques, antiseptiques et aux désinfectants.....

### **I.6.La division cellulaire**

Deux cellules identiques sont produites à partir d'une cellule mère. La croissance

cellulaire se manifeste par un accroissement du volume cellulaire, suivi de la synthèse d'un septum transversal au milieu de la cellule, aboutissant à la séparation des deux cellules filles. La division bactérienne est précédée par la duplication du chromosome bactérien grâce à la réplication de l'ADN. Quand elles se trouvent dans un milieu propice les bactéries peuvent se multiplier à une allure vertigineuse. Une population de bactérie peut doubler toutes les 20 minutes en fonction de la disponibilité en nutriments, la présence de bactéries concurrentes, la présence de prédateurs (par exemple des paramécies), la présence de bactériophages et la présence d'antibiotiques (inhibant par exemple la synthèse de la paroi bactérienne, entraînant donc leur mort) produits par des champignons ou des actinomycètes (bactéries filamenteuses).(Parot 2007).

### I.7. Culture des bactéries

Au laboratoire, les bactéries peuvent être cultivées en milieu de culture liquide ou en milieu solide. Le milieu de culture doit apporter les éléments nutritifs ou nutriments élémentaires à la bactérie. Les milieux de culture gélosés solides sont utilisés pour isoler des cultures pures de cellules bactériennes. Dans le cas des bactéries se divisant rapidement, une cellule bactérienne dispersée sur un milieu gélosé va se multiplier et, au bout de 24 à 48 heures, devenir un amas de bactéries visible à l'œil nu, appelé une colonie bactérienne.(Jubelin 2005)



**Figure I.3.** Colonies bactériennes sur milieu solide gélosé en boîte de Pétri

Le temps de génération est le temps nécessaire à une bactérie pour se diviser. Le temps de génération correspond donc au temps nécessaire pour qu'une population de cellules double en nombre. Ce temps est très variable selon les espèces de bactéries et les conditions environnementales. Au laboratoire, dans des conditions idéales, il est par exemple de 20 minutes pour *Escherichia coli*, 100 minutes pour *Lactobacillus acidophilus*, 1000 minutes pour *Mycobacterium tuberculosis*. La croissance d'une population bactérienne, dans un milieu



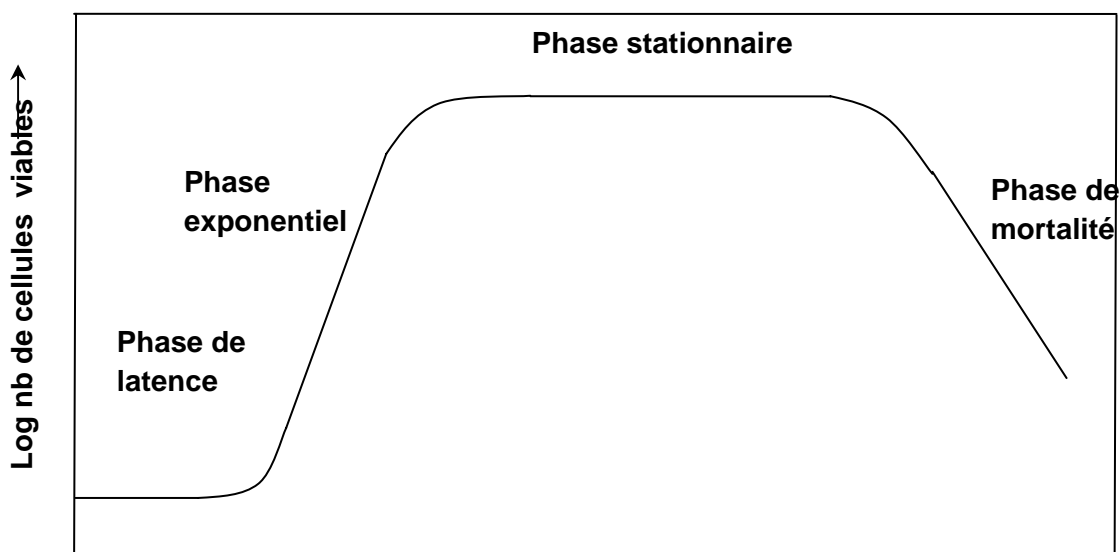
de culture liquide non renouvelé, peut être observée dans le temps. Les cellules se divisent, et leur nombre augmente avec le temps. Si on relève le nombre de bactéries à différents intervalles au cours de la croissance, on obtient une courbe de croissance. Elle présente quatre phases principales :

a- La phase de latence : Elle correspond à une période d'adaptation de la bactérie au milieu, pendant laquelle il n'y a pas d'augmentation immédiate du nombre ou de la masse cellulaire. La durée de cette phase varie selon les micro-organismes et la nature du milieu.

b- Au cours de la phase de croissance exponentielle, les bactéries se développent de façon maximale avec un taux de croissance maximal et constant ; les micro-organismes se divisent à la vitesse maximale possible en fonction de leur potentiel génétique, la nature du milieu et les conditions de culture.

c-La phase stationnaire : Où, la croissance de la population finit par s'arrêter et la courbe de croissance devient horizontale (concentration de bactéries de  $10^9$  cellules/ml en général). La taille de la population dépend de la disponibilité en éléments nutritifs et d'autres facteurs, aussi bien que du type de micro-organisme cultivé. Les divisions bactériennes, qui se font encore, sont compensées par la mort de bactéries.

d- La phase de mortalité : Les bactéries ne se divisent plus, elles meurent et peuvent être lysées. Le milieu de culture n'apporte plus les conditions nécessaires au développement des bactéries. On observe une courbe de décroissance exponentielle progressive ((**Tolker-Nielsen et al 2000**)).



**Figure I.4. :** Courbe de croissance d'une bactérie.

### **I.8. Paramètres influant la croissance microbienne**

Certaines conditions environnementales (paramètres physico-chimiques) influencent la croissance des micro-organismes. Parmi celles-ci figurent le pH (acidité et alcalinité), la température, la présence d'O<sub>2</sub>, de CO<sub>2</sub>, et la disponibilité de l'eau. La plupart des micro-organismes tolèrent une gamme de pH permettant la croissance. Le pH optimal de croissance de beaucoup de bactéries est proche de la neutralité (pH=7). Les micro-organismes acidophiles se développent à des pH acides, alors que les micro-organismes alcalinophiles se développent à des pH basiques. De même, les bactéries peuvent être distinguées selon leur aptitude à croître en fonction de la température. Les mésophiles se développent généralement à des températures comprises entre 20 et 45°C. Les psychrophiles possèdent des températures optimales de croissance inférieures à 15°C, alors que les bactéries thermophiles croissent de façon optimale à des températures comprises entre 45 et 70°C. Les micro-organismes, ayant des températures optimales de croissance supérieures à 70°C, sont qualifiés d'hyper thermophiles.

### **I.9. Les bactéries pathogènes, symbiotiques, utiles et saprophytes**

Les bactéries hétérotrophes comportent des espèces **pathogènes**, microbes responsables de maladies telles que la tuberculose, la coqueluche, la typhoïde, le choléra, le tétanos, la diphtérie, des méningites ou des pneumonies. Mais ce sont aussi des bactéries qui forment notre indispensable flore intestinale, qui fermentent le yaourt, produisent le vinaigre ou décomposent les feuilles mortes et les cadavres à la surface de la terre et dans toutes les eaux du globe.

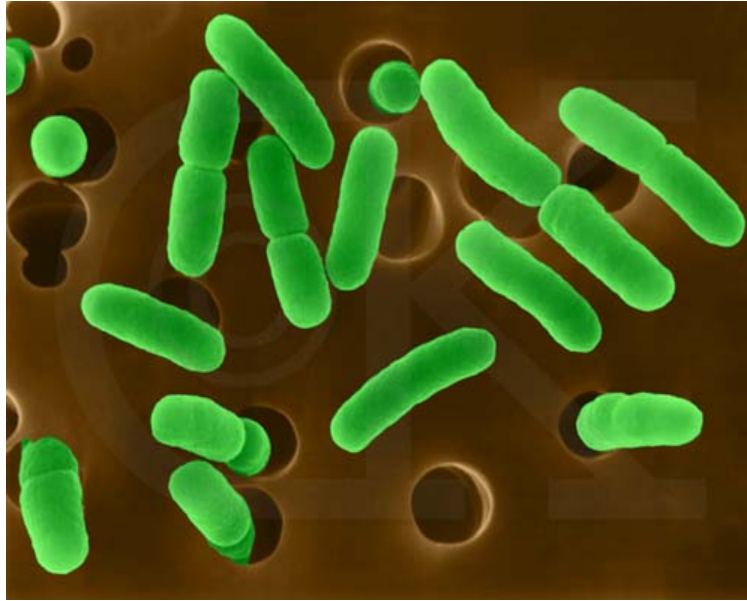


**Figure I.5.** : Culture bactérienne et fongique correspondant à des doigts lavés, lancée sur gélose enrichie en peptones et additionnée d'un bouillon Liebig. Les taches luisantes rouges, jaunes, beiges et blanches correspondent à des colonies bactériennes, les zones concentriques poudreuses sont des champignons(d'après <http://www.kent.k12.wa.us/staff/kloschky/MoneransFolder/Moneran%20Graphics/bacttypes.html>)

## I.10. Escherichia Coli

### I.10.1. Présentation

*Escherichia Coli*, découverte en 1885 par Théodore Escherich, dans des selles de nourrissons, également appelée **colibacille** ou *E. coli*, est une Bactérie Gram négatif, en forme de bâtonnet, à l'extrémité arrondie, appartenant à la famille des entérobactériacées. Elle est très répandue et présente un grand nombre de variétés ; elle vit la plupart du temps à l'état de saprophyte, dans l'intestin de l'Homme et des animaux à sang chaud, mais sous certaines influences, elle peut devenir pathogènes et induire des maladies diverses groupées sous le nom de **colibacillose**. *E. Coli* constitue alors l'espèce bactérienne dominante de la microflore anaérobie facultative de l'intestin tout au long de la vie de l'hôte. (Escherich 1988).



**Figure I.6. :** La bactérie *Escherichia coli* en cours de division, vue au microscope électronique à balayage et colorée artificiellement(d'après <http://www.kent.k12.wa.us/staff/kloschky/MoneransFolder/Moneran%20Graphics/bacttypes.html>)

### I.10.2.Caractéristiques

*E. Coli* peut apparaître sous forme coccobacillaire ou filamenteuses à des stades tardifs de culture, relativement court (2 à 3  $\mu\text{m}$  $\times$ 0.7  $\mu\text{m}$ ), isolées, groupées par 2 ou plus rarement en amas **figure I.6**. Sa culture est très facile avec une très grande tolérance de variation de pH, son pH optimum étant 7.5. Elle présente une température optimum de croissance de 37°C, mais elle peut se développer entre 15°C et 45°C.

Physiologiquement *E. coli* est versatile et s'adapte bien aux caractéristiques de son habitat. La bactérie peut se développer en présence ou en absence d'oxygène. En condition anaérobie, elle fermente en produisant acides et gaz spécifiques.

*E.Coli* peut répondre à de nombreux signaux environnementaux tels que le pH, la température ou encore l'osmolarité . Ainsi, en réponse à un changement de température et d'osmolarité , elle peut faire varier le diamètre des pores formés par les porines de la membrane externe par intermédiaire de mécanismes complexes de régulation du métabolisme. La bactérie peut sonder l'environnement chimique dans le but de synthétiser les enzymes nécessaires à la dégradation des nutriments qui l'entourent.(Meury and Kohiyama 1991; Cullum *et al.* 2001 ; Kaeriyama *et al.* 2006).

Cette bactérie résiste bien à la chaleur : Incubée à 45°C, elle fermente le glucose, le mannitol et le lactose avec production importante de gaz. Elle reste relativement sensible aux antibiotiques. Elle réduit les Nitrates, fermente irrégulièrement le saccharose et la salicine et dégrade le tryptophane en indole.

*E. Coli* représente 80% de la flore intestinale aérobie. Le germe se retrouve dans les matières fécales. De là, il se répand dans la nature : Sol et eaux. Sa présence dans le milieu environnant signe toujours une contamination fécale ; c'est pourquoi *E.Coli* est le bio-indicateur de contamination fécale, par excellence, depuis les années et encore de nos jours (Weaver et al. 2005).

### **I.10.3. Rôle pathogène et commensale de la bactérie « *Escherichia Coli* »**

Certaines souches spécialisées de *E. Coli* sont associées à des pathologies très diverses tant chez l'être humain que chez l'animal : Diarrhées, gastro-entérites, infections urinaires, méningites, septicémies, etc.

Les techniques modernes de la biochimie, de la génétique, de la biologie moléculaire, de la microbiologie cellulaire et de la chimie ont permis d'identifier et d'analyser les mécanismes impliqués dans l'interaction des *E.Coli* pathogènes avec leurs hôtes. Malgré la diversité des affections provoquées par les souches d'*E.Coli* pathogènes, toutes ces souches utilisent une stratégie classique d'infection dont les points clés sont les suivants: Colonisation des muqueuses, éventuellement invasion des cellules, multiplication, évasion des défenses de l'hôte et dommages à l'hôte.

Pour survivre et se multiplier dans le tractus intestinal, les colibacilles doivent surmonter les premières lignes de défense de l'organisme hôte, à savoir le péristaltisme (tube digestif) et l'effet de barrière de la microflore commensale.

Cette microflore accapare les nutriments, produit des inhibiteurs et occupe les surfaces des muqueuses. L'effet de barrière est surmonté par les *E.Coli* grâce à des mécanismes qui sont connus en termes généraux: la compétition pour les sources de Carbone, de Fer, d'énergie sous des conditions anaérobies, la production de bactériocines, ainsi qu'un fort taux de croissance. L'étape de colonisation implique aussi la capacité à adhérer à la surface de la muqueuse intestinale. Virtuellement toutes les souches d'entérobactéries pathogènes ou non possèdent des systèmes d'adhésion, et il est bien établi que ce pouvoir d'adhésion est la caractéristique la plus conservée chez les *E. Coli* pathogènes ou non. Les structures bactériennes responsables de l'adhésion aux cellules épithéliales sont des adhésines fimbriaires.

Exposées à la surface des bactéries, ces adhésines interagissent avec des récepteurs de la membrane des cellules cibles. C'est ainsi que des souches de *E. Coli* pathogènes ou non sont capables en partie grâce à leurs adhésines de coloniser.

#### **I.10.4. Pathogénie**

Il existe plusieurs types de souches d'*E.Coli* que l'on retrouve en pathologie humaine et qui présentent une entérovirulence marquée (Collet 2006).

##### **I.10.4.1. *E.Coli* entéro-pathogène (EPEC)**

Les *E.Coli* entéro-pathogènes sont souvent à l'origine d'épidémies de diarrhées chez l'enfant de moins de trois ans, surtout au niveau de pays en voie de développement. La pathogénie de ces souches est due à leur capacité à adhérer au niveau des entérocytes et à entraîner leur lyse. L'adhésion présente un phénotype particulier, en petits agrégats. Le gène *eae* (*E. coli* attaching and effacing) qui code la protéine « intimine » est à l'origine de ce comportement.

##### **I.10.4.2. *E.Coli* entéro-invasive (EIEC )**

Les manifestations d'une infection à *E.Coli* entéro-invasive sont analogues à celles observées lors d'infection à *Shigella* : Diarrhée sanglante et purulente ; fièvre élevée. L'infection à EIEC touche toute les tranches d'âge.

##### **I.10.4.3. *E.Coli* entéro-hémorragique (EHEC)**

Ces souches présentent le plus souvent le sérotype O157 et le sérotype O157 :H7 mais d'autres sérogroupes peuvent être impliqués : O26, O55, O103, O111, O128....

Les *E.Coli* entéro-hémorragiques sont capables d'adhérer aux entérocytes et sécrètent alors des exotoxines.

##### **I.10.4.4. *E.Coli* entéro-toxinogène (ETEC)**

Les *E.Coli* entéro-toxinogènes sont à l'origine de la turista des voyageurs, dans les pays en voie de développement. Cette infection se caractérise par une diarrhée très liquide, des nausées, des crampes abdominales associées ou non à une légère fièvre. Ces souches sécrètent deux types de toxines : Une toxine thermolabile et des toxines thermostables.

##### **I.10.4.5. *E.Coli* entéro-agrégative Eagg (EC ou EAEC)**

Les *E. coli* entéro-agrégatives sont à l'origine de manifestations voisines de celles observées lors d'infections à *E. coli* entéro-pathogène, mais plus persistantes. Une toxine a été montrée comme étant impliquée dans ce pouvoir pathogène : Il s'agit de EAST (entéroaggrégative *E. coli* heat stable enterotoxin).

#### **I.10.4.6. *E.Coli* à adhésion diffuse (DAEC)**

Ces souches, tout d'abord classées parmi les *E. coli* entéro-pathogènes, forment maintenant un groupe à part, du fait de leur phénotype d'adhésion particulier qui n'implique pas d'agrégats microbiens.

#### **I.10.4.7. *E.Coli* adhérente invasive (AIEC)**

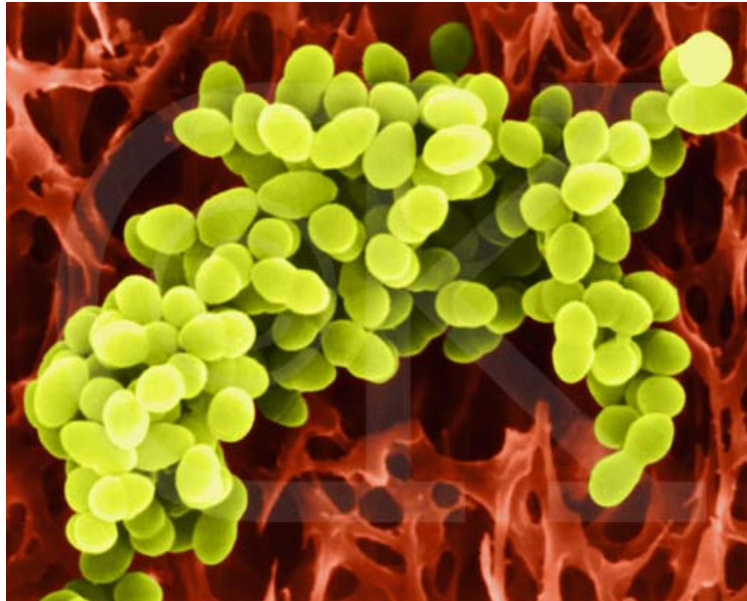
La maladie de Crohn est une infection inflammatoire chronique du tube digestif caractérisée par un état d'hyper activation du système immunitaire intestinal. Les *E.Coli* AIEC ont récemment été montrées comme associées à cette maladie.

#### **I.10.4.8. *E.Coli* K12**

*Escherichia Coli* K12 est un organisme utilisé dans le laboratoire pour différentes expériences. Il a été effectivement élaboré comme un outil dans les laboratoires de recherche pour étudier les principes fondamentaux de la biologie.

Bien qu'il existe une grande diversité des souches dans l'environnement, seuls quelques-unes sont utilisées dans le laboratoire. La majorité est un dérivé d'une souche commensale appelée K12, elle n'est pas dangereuse à manipuler; (à titre d'exemple, l'absorption, à éviter cependant, d'un liquide infecté de ce microbe n'entraîne aucun effet apparent). En plus d'être sûr d'utilisation, la souche « *K-12* » est facile à cultiver en laboratoire, sur un milieu nutritif riche ou agar-agar. S'il est souvent dit : Etre en mesure de se diviser toutes les 20 minutes, ce n'est en réalité que dans des conditions absolument optimales. Cependant, elle pousse encore très vite par rapport à d'autres microorganismes. Ceci est un grand avantage comme une culture peut être mise en place en moins de 24 heures, de belles colonies claires et distinctes sont visibles sur une plaque de gélose (Jubelin 2005).

## I.11. Les Staphylocoques



**Figure I.7. :** La bactérie *Staphylococcus sp.* vue au microscope électronique à balayage et colorée artificiellement (d'après <http://www.kent.k12.wa.us/staff/kloschky/MoneransFolder/Moneran%20Graphics/bacttypes.html>)

### I.11.1. Taxonomie

Les staphylocoques ont été mis en évidence pour la première fois en 1878 dans le pus d'abcès par Koch en Allemagne. La dénomination de *Staphylococcus* a été introduite en 1883 par Ogston et provient de l'association des termes grecs *staphylê*, grappe de raisin et *kokkos*, grain, tel que présenté dans la figure I.7. Rosenbach fut le premier, en 1884, à décrire leurs caractères culturels. La classification des staphylocoques a connu de nombreux bouleversements. Lors de la première édition en 1923 du « *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* », les staphylocoques étaient classés dans la famille des *Streptococcaceae* puis lors de la deuxième édition en 1926, dans la famille des *Micrococcaceae*. En 1948, cette famille comprenait alors les genres *Micrococcus* et *Staphylococcus*. Ce n'est qu'en 1957 que les staphylocoques et les microcoques furent séparés sur la base de leur capacité à utiliser le glucose en anaérobiose. Cependant, ce test amena beaucoup de confusion en attribuant certaines espèces du genre *Staphylococcus* au genre *Micrococcus* (Morot- Bisot 2006). En 1974, avec les débuts de la biologie moléculaire, Baird-Parker sépare définitivement le genre *Staphylococcus* du genre *Micrococcus*, grâce à la différence du contenu en guanine et en cytosine de leur ADN: (66-75)% pour *Micrococcus* et (30-39)% pour *Staphylococcus*. La



famille des *Micrococcaceae* était alors constituée des bactéries appartenant aux genres *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Planococcus* et *Stomatococcus* (Bascomb & Manafi 1998) avec l'évolution des techniques génomiques, le genre *Staphylococcus* a été reclassé avec les bactéries à Gram positif dont l'ADN présente un GC% inférieur à 55.

Le GC% et la composition de la paroi sont des marqueurs robustes pour séparer le genre *Staphylococcus* des autres coques à Gram positif et à catalase positive.

### **I.11.2. Le genre *Staphylococcus***

Les bactéries appartenant au genre *Staphylococcus* sont capables de fermenter le glucose et le glycérol, et sont sensibles à différents antibiotiques : les staphylocoques sont résistants au composé vibriostatique O/129 et à la bacitracine. Les staphylocoques possèdent une paroi composée d'acides téchoïques et d'un peptidoglycane composé de glycine. Sur des critères génotypiques, les staphylocoques ont un GC% de (30 à 39%).

### **I.11.3. La classification des espèces**

#### **La différenciation des staphylocoques à coagulase positive et des staphylocoques à coagulase négative**

Selon le Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire le genre *Staphylococcus* comprend actuellement 47 espèces et sous-espèces. Néanmoins, le nombre d'espèces n'a cessé d'augmenter au cours des 20 dernières années et le genre a été remanié. Ainsi, l'espèce *S. caseolyticus* isolée de produits laitiers a été reclassée dans un nouveau genre, le genre *Macrococcus*, qui se différencie par un GC% plus élevé (38-45) % (Kwok 2003). De même, les espèces *S. pulvereri* et *S. vitulinus* ont été récemment fusionnées dans l'unique espèce *S. vitulinus*. Enfin, une nouvelle espèce a été décrite, *S. pettenkoferi*, mais elle n'est pas actuellement officiellement validée. Le critère de base de la classification des espèces de staphylocoques reste la production de coagulase libre, enzyme responsable de la coagulation des sérums humain et canin. On distingue ainsi sept espèces et sous-espèces à coagulase positive dont *S. aureus* (SCP) et quarante à coagulase négative (SCN). Les SCN sont divisés en trois groupes suivant leur sensibilité à la novobiocine et leur activité oxydasique. En outre, parmi les SCN, on trouve quelques espèces pathogènes opportunistes pour l'homme et les mammifères, telles que *S. caprae*, *S. epidermidis*, *S. hominis* et *S. saprophyticus*. Ainsi, depuis la découverte de l'implication de certaines espèces de SCN dans des infections humaines, l'identification plus précise des membres du groupe des SCN présente un intérêt majeur. (Vilar 2000).

#### **I.11.4.L'agent pathogène**

Le genre *Staphylococcus* de la famille des *Micrococcaceae* correspond à des cocci Gram positif, non capsulés, groupés en tétrades ou en grappe de raisin, très résistants dans le milieu extérieur et peu exigeants en culture. De part l'aptitude à produire une coagulase, on distingue :

- Un staphylocoque coagulase positive, *Staphylococcus aureus* le plus rencontré en pathologie communautaire.
- Des staphylocoques coagulase négative (SCN), *Staphylococcus epidermidis*, *saprophyticus*, *hominis*, *capitis*,...rencontrés dans les infections nosocomiales.

##### **I.11.4.1. Pathogénie**

La porte d'entrée des staphylocoques est fréquemment cutanée, à la faveur d'une excoriation, d'une plaie minime ou d'un point de ponction.

Les staphylocoques possèdent de nombreux facteurs de virulence : antigènes pariétaux, exotoxines et enzymes qui interviennent dans l'expression de la maladie. Le mécanisme physiopathologique de suppuration réside dans la constitution de microthromboses vasculaires septiques sous l'action de la coagulase, puis la fibrinolyse physiologique fragmente le thrombus, source de métastases septiques à l'origine des foyers secondaires.

Au niveau des foyers infectieux, les antigènes pariétaux s'opposent à l'opsonisation et à la phagocytose, les enzymes favorisent la diffusion locale et les modifications de paroi s'opposent à l'action des antibiotiques.

Les staphylocoques ont des facultés d'adhésion aux structures inertes (corps étrangers, prothèses) et de production d'un film exo polysaccharidique (slime) qui les soustrait à l'action des systèmes de défense et aux antibiotiques ; d'où le passage à la chronicité.

##### **I.11.4.2. La coagulase**

La coagulase ou Staphylocoagulase est une enzyme capable de faire coaguler le plasma sanguin. La mise en évidence de la Coagulase dans un bouillon de culture de *Staphylococcus* est considérée comme un critère absolu d'identification de *Staphylococcus aureus* en médecine humaine. En médecine vétérinaire, d'autres germes peuvent avoir une réaction positive, notamment *Staphylococcus intermedius*.

On distingue deux types de coagulase :

\*La coagulase liée ou "*clumping factor*" adhérent au corps microbien.

\*La coagulase libre ou staphylocoagulase, une exoenzyme, propre à certaines espèces du genre *Staphylococcus*.

#### **I.11.4.3. Staphylocoques coagulase-négative**

Longtemps opposés aux "staphylocoques dorés" réputés dangereux, les "staphylocoques blancs" étaient considérés comme de simples commensaux de la peau et des muqueuses, car ils sont omniprésents. D'indéniables infections nosocomiales causées par ces staphylocoques "non pathogènes" ont suscité des travaux visant à les identifier et à les classer.

On les désigne sous le nom de "staphylocoques coagulase-négatives" (SCN) car, contrairement aux *Staphylococcus aureus*, la plupart d'entre eux sont dépourvus de cette enzyme.

#### **I.11.5. Classification et habitat**

Vingt neuf espèces de SCN sont répertoriées ; certaines sont des hôtes de l'homme, d'autres de l'animal et d'autres de l'homme et de l'animal. Chez l'homme, *Staphylococcus epidermidis* domine largement en particulier sur la peau mais sur certains sites on trouve aussi d'autres espèces : *St. capitis* sur le cuir chevelu, *St auricularis* dans le conduit auditif externe, *St hominis* ou *haemolyticus* sur les zone sèches... Sur les muqueuses intestinales ou nasales on isole surtout *St. Epidermidis* et sur la muqueuse vaginale, *St. epidermidis* et *St. saprophyticus*. Cette répartition varie légèrement selon l'âge, les habitudes, le mode de vie et une éventuelle antibiothérapie.

#### **I.11.6. Caractères bactériologiques**

Les SCN sont évidemment reconnus, d'une manière plus pragmatique que scientifique, par l'absence de coagulase ce qui les différencie de *Staphylococcus aureus* (quelques espèces de SCN, animales surtout, possèdent toutefois l'enzyme). De plus, la majorité d'entre eux sont incapables de fermenter le mannitol. Leur identification plus complète repose sur des caractères bactériologiques classiques (nitratase, phosphatase, ornithine décarboxylase, fermentations sucrées ...). Comme cela a déjà été signalé à propos de *St. aureus*, il importe de les distinguer des microcoques. Il existe des galeries miniaturisées spécialement conçues à cette fin. La démarche est cependant longue et assez coûteuse et n'a d'intérêt que dans des circonstances épidémiologiques particulières.

### **I.11.7.Pouvoir pathogène**

Les SCN sont essentiellement responsables d'infections nosocomiales et iatrogènes. Leur virulence est en rapport avec leur capacité d'adhésion aux matériels étrangers car ils élaborent une substance polysaccharidique dénommée "slime" qui facilite cette adhérence.

Cathéters, voies veineuses centrales, sondes, prothèses valvulaires cardiaques ou prothèses osseuses, valves sont les portes d'entrée ou le siège de ces infections qui occasionnent des septicémies, bactériémies, endocardites, médiastinites après chirurgie cardiaque, infections urinaires ou prostatiques après chirurgie ou endoscopie, infections sur valves de dérivation pour traiter l'hydrocéphalie.

Signalons le cas particulier des infections urinaires dues à *Staphylococcus saprophyticus* frappant surtout les femmes jeunes.

### **I.11.8.Sensibilité des SCN aux antibiotiques**

Les SCN forment un groupe hétérogène et leur comportement vis-à-vis des antibiotiques varie selon les espèces. A l'exception de *St. saprophyticus*, ils sont généralement plus résistants aux antibiotiques que *St. aureus*. Certains opposent des résistances naturelles utiles pour les identifier : *saprophyticus* résistant à la novobiocine et à la fosfomycine, *epidermidis* (et *aureus*) résistant à la polymyxine, *haemolyticus* résistant à la bacitracine etc...

Les autres antistaphylococciques (acide Fusidique, Fosfomycine, Rifampicine) sont efficaces.

### **I.11.9.Viabilité et résistance physico-chimique**

Agent commensal des mains (*S. epidermidis*), très résistant dans le milieu extérieur, sa survie à l'extérieur de l'hôte est de 7 jours (surfaces sèches) à plusieurs mois (milieu humide). Sensible à de nombreux désinfectants, tels que l'hypochlorite de sodium à 0,5% de chlore actif (eau de javel reconstituée diluée au 1/5e), les solutions d'iode et d'alcool, le glutaraldéhyde et le formaldéhyde. Les antiseptiques sont en général actifs avec une possible résistance plasmidique, notamment aux antiseptiques mercuriels. Inactivation possible par chauffage à 120°C pendant 15 min à chaleur humide ou supérieure à 160°C à chaleur sèche pendant 1 heure. Les entérotoxines restent stables au point d'ébullition.

### **I.11.10.Incubation**

Elle varie selon le tableau clinique, l'immunité de l'hôte et l'usage d'une antibiothérapie efficace. Généralement entre 4 et 10 jours. Entre 2 et 4 heures en cas de toxi-infection alimentaire collective. Ce délai dépend essentiellement de la dose de toxine ingérée.

### **I .11.11.Mode de transmission**

-Directe : A partir de lésions ouvertes ou d'un simple portage asymptomatique chez le sujet source. Auto inoculation des fosses nasales. En milieu hospitalier, l'auto infestation intervient peu, contrairement à ce qui se passe avec les entérobactéries. La transmission est essentiellement manu portée par le personnel soignant.

-Indirecte : Par voie aérienne (sécrétions de la sphère ORL), par les objets souillés ainsi que les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC).La porte d'entrée est fréquemment cutanée. Une plaie, même minime, une excoriation, le point de pénétration d'un cathéter sont des portes d'entrée potentielles. Les muqueuses sont plus rarement en cause.

## **I.12.Résultats et discussions**

**I.12.1Souches bactériennes :** les expériences ont été réalisées avec la souche d'*E.Coli* k12 fournies par le laboratoire Polymères, Biopolymères, Membranes (PBM) UMR CNRS 6522 de l'Université de Rouen France. Les milieux d'incubations utilisées sont le bouillon Mueller Hinton MHB et le milieu PCA (Annexe1,2). Avant de commencer toute manipulation les milieux sont stérilisés par autoclavage à 120C° pendant 15 min toute les cultures ont été effectuées à 37 C°, et toutes les manipulations seront faites sous une haute laminaire ou bien devant une flamme de bec benzène.

### **I.12.2. Préculture**

Les bactéries ; conservées à -24C° dans du glycérol 30% sont pré incubées 18h à 37 C° dans le MHB. elles sont ensuite centrifugées 10min. le culot est remis en suspension dans 5 ml d'eau distillée stérile et la concentration bactérienne est déterminée par mesure de la densité optique à 546nm.la densité optique est reliée au nombre d'Unité Format Colonie par ml ( UFC /ml) grâce à une courbe d'étalonnage déterminée par numération sur gélose .Avant d'entamer le travail pratique, il est nécessaire de procéder à l'activation de la bactérie selon le mode opératoire ci- dessous :

**I.12.3Préparation du milieu de culture :** Le milieu de culture de la souche bactérienne *E.Coli* K12 est dénommé PCA (plate Count Agar)( annexe 2) .

On met 23.5 g de poudre P.C.A dans un 1L d'eau distillée stérilisée. On Chauffe la solution obtenue sous agitation fréquente de manière à dissoudre complètement la poudre. Passer à l'autoclave à 121°C pendant 15 mn. Dans les boîtes de pétri on met le PCA et on laisse refroidir 30mn (solidification du milieu).

Dans un tube à urine on met 20 ml d'eau physiologique, et on ajoute quelque colonie de la souche bactérienne *E. Coli K12*.

A l'aide d'une pipette pasteur on prend quelques gouttes de la solution (colonie + eau physiologique) et on les met dans des boites de Pétri préalablement coulées de P.C.A.

#### **I.12.4.Incubation :**

L'incubation est faite dans une étuve bactériologique de marque MEMERT, à 37°C pendant 48 heures.

L'état d'activation de la bactérie est confirmé par la colonisation des boites de Pétri à l'issue des 48 heures de la phase d'incubation ci-dessus décrite et tel que le démontre la photo ci-après :



**Figure I.8 .: *E. Coli K 12* cultivée sur gélose nutritive P.C.A**

#### **I.12.5.Mesure de la densité optique**

**Préparation du milieu de culture Muller Hinton Broth(M.H.B) ( annexe 1) :** dans un litre d'eau distillée stérilisée on ajoute 21g de M.H.B la solution est ensuite autoclavée à 121 °C pendant 10 mn.

Dans un tube à urine contenant 20 ml de M.H.B, on ajoute quelques colonies de *E.Coli K12*.

Incubation : le tube à urine est placé dans une étuve à 37°C pendant 18 heures en agitation continue assurée par un agitateur basculant de marque IKA KS 130 CONTROL. Après incubation, on met le contenu du tube dans 02 tubes Falcon .

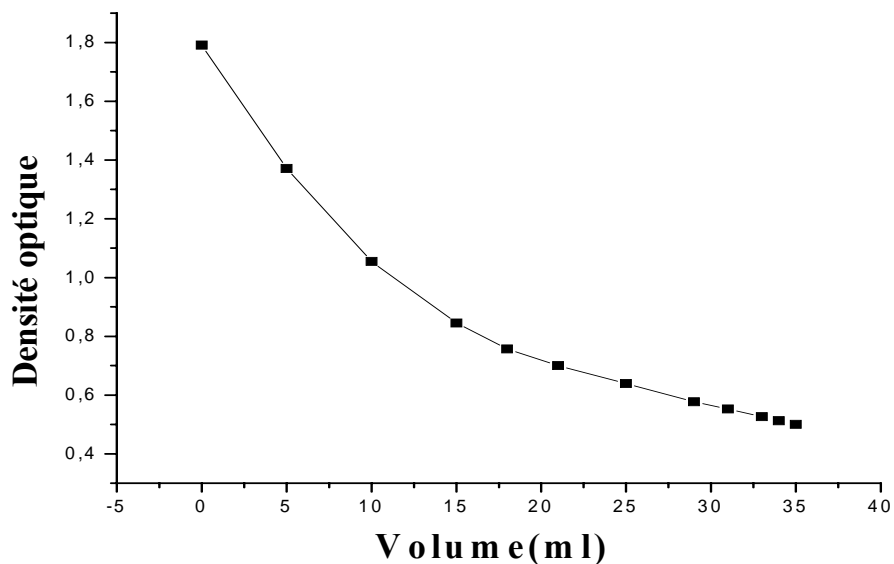
1. Centrifugation :

a. Dans le but d'obtenir un culot, On a utilisé une centrifugeuse de marque NF 200 BENCH-TOP Centrifuge, pendant 10 minutes à une vitesse de 4500 rpm.

**Préparation de la solution mère à 0,5 de D.O. :**

- ✓ Récupérer les culots et jeter les surnageant.
- ✓ Rajouter 01ml d'eau distillée stérilisée puis vortexer à l'aide d'un Vortex de Marque GRANT-BIO PV1.

L'utilisation d'un spectrophotomètre de marque Jenway 6405UV/VIS à une longueur d'onde de 546 nm, permet de mesurer la densité optique de la solution mère que l'on dilue jusqu'à l'obtention d'une solution de 0,5 de densité optique. (D.O.) qui correspond à  $10^{+8}$  CFU/ml.



**Figure I.9.: Préparation d'une solution à 0.5 D.O. ( $\lambda=546\text{nm}$ )  
Correspondant à  $10^{+8}$  UFC/ml.**

D'après cette courbe nous avons pu déterminer le nombre de bactérie correspondant à 0,5 D.O qui est égale  $10^{+8}$  UFC/ml. en partant d'une DO de 1.8 correspondant à un volume de

4 ml d'eau distillée stérilisée , par addition de petite quantité d'eau distillée stérilisée , nous avons obtenu une solution à 0.5 de DO ,ce qui correspond à un volume de 35ml.

La densité optique de 0,5 correspond à la phase exponentielle, les micro-organismes se divisent et se développent à une vitesse maximum et à intervalle de temps régulier. Il y a un doublement de la population bactérienne.

**I.12.6.Préparation des milieux d'étude contaminés** : la verrerie et les solutions utilisées ont été préalablement stérilisées dans un autoclave à 121°C.

Pour les Staphylocoques Coagulases Positives, l'ensemencement est établi dans une série de boîtes de pétri stériles, pendant 24 heures d'incubation à une température de 37°C. la culture est réalisée en passant par les étapes suivantes:

- Introduire dans une boîte de pétri 1 ml de la dilution choisie à l'aide d'une pipette Pasteur.
- Couler aseptiquement la gélose de Chapman (annexe3 ) préalablement fondu au bain marie puis la laisser refroidir à une température de 45°C à 48°C.
- Agiter la boîte par un mouvement circulaire pour assurer un mélange homogène de l'inoculum et de la gélose.
- Incuber à l'étuve à température 37°C pendant 48 heures.

Lecture : le nombre de colonies se développant dans la gélose est compté après incubation

## Référence bibliographique



**Bascomb S. Manafi M. (1998).** Use of enzyme tests in characterization and identification of aerobic and facultative anaerobic Gram-positive cocci. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 318– 340.

**Cullum A.J., Bennet A.F. and Lenski R. E. (2001).** Evolutionary adaptation to temperature. IX. Preadaptation to novel stressful environments of *Escherichia Coli* adapted to high temperature. *Evolution Int J Org Evolution* **55(11)** :2194-202.

**Escherich T. (1988).** The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant.1884. *Rev Infect Dis* **10 (6)** :1220-5.

**Jubellain Gregory 2005.** Formation de biofilms par *Escherichia coli* K12 rôle des systèmes a deux composants dans la synthèse des curli. These de Doctorat INSA Lyon.

**Kaeriyama M., Machida K., Kitakaze A., Wang H., Lao Q., Fukamachi T., Saito H. and Kobayashi H. (2006).** OmpC and OmpF are required for growth under hyperosmotic stress above PH 8 in *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol* **42(3)** :195-201.

**Kwok A.Y.C. and Chow A.W. (2003).** Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial hsp60 gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **.53** : 87–92.

**Meury J. and Kohiyama M. (1991).** Role of heat shock protein DnaK in osmotic adaptation of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **173 (14)** :4404-10.

**Morot-Bizot S. C. (2006).** Les staphylocoques à coagulase négative dans l'écosystème des salaisons. Thèse de doctorat. Auvergne-France.

**Parot S. (2007).** Biofilms électroactifs : formation, caractérisation et mécanismes Thèse – Toulouse-France. pp29-39.

**Sutherland I.W.(2001).** The biofilm matrix-an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* **9(5)** :222-7.

**Tolker-Nielsen T, Brinch UC, Ragas PC, Andersen JB, Jacobsen CS, Molin S, 2000.** Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. *J Bacteriol*; **182**: 6482-9.

**Vilain S.(2004).** Présentation des caractéristiques physiologiques des cellules immobilisées (artificiellement ou naturellement) et évocation des protéomes hypothétiquement liés à ces caractéristiques. Thèse de doctorat ,université de Rouen –France.

**Vilar I., Garcia Fontan M.C., Prieto B., Tornadijo M.E. and Carballo J. (2000).** A survey on the microbiological changes during the manufacture of dry-cured laco'n, a Spanish traditional meat product. *Journal of Applied Microbiology* **89** : 1018–1026.

# **Chapitre II**

## **Désinfection et traitements biocides**

## **II.1.Introduction**

La désinfection est une opération au résultat momentané, permettant d'éliminer ou de tuer les micro-organismes et/ou d'inactiver les virus indésirables portés par des milieux inertes, en fonction des objectifs fixés. Les traitements de désinfection visent donc à assurer l'hygiène des matériaux afin de limiter voir d'empêcher tout risque de contamination microbienne.

Cette destruction des germes indésirables portés par les matériaux inertes peut se faire soit par des procédés physique (chaleur, UV, irradiation...) ou chimiques (désinfectants) soit par une combinaison des deux. (Russelle *et al.* 1991)

## **II. 2. Modes d'action des désinfectants**

### **II.2.1.Notion de désinfection et d'antiseptique**

Sous le terme d'agent antibactérien sont regroupées différentes molécules d'origine biologique, hémi synthétique ou de synthèse. Leur utilisation pour la thérapie des infections bactériennes (antibiotiques) ou encore pour la désinfection des matériels et milieux inertes (antiseptiques et désinfectants) est directement reliée à leur toxicité plus ou moins sélective.

Les antibiotiques sont des agents antimicrobiens d'origine biologique. Ils ont une activité létale sélectivement dirigée contre les micro-organismes, ce qui en fait des médicaments des infections systémiques. A l'opposé, les antiseptiques et les désinfectants qui sont des antimicrobiens chimiques dont la toxicité est brutale et peu sélective vis-à-vis des cellules eucaryotes et procaryotes. Leur emploi est donc limité soit à un usage externe in vivo soit à une désinfection des surfaces inertes. (Allion 2004)

### **II.2.2. Choix de l'agent antimicrobien**

Pour assurer une bonne désinfection, le principe actif doit répondre aux exigences suivantes :

- Large spectre d'activité et action durable.
- Efficacité en présence de résidus de souillure.
- Utilisation possible dans des conditions très différentes de pH et de dureté de l'eau
- Action non corrosive sur les supports.
- Actif à faible concentration Facilement rinçable.
- Ne présenter aucun danger, pour le métabolisme humain.
- Etre peu couteux.

Aucun produit désinfectant ne réunisse à ce jour l'ensemble de ces propriétés, le choix du principe actif s'effectue sur des critères législatifs puis en fonction du spectre d'activités recherché et des critères spécifiques d'utilisation (compatibilité avec les matériaux.....)

### **II.2.3. Activité bactéricide**

D'une manière générale, l'activité d'un désinfectant peut être définie *in vitro* par deux valeurs :

- \* La concentration minimale inhibitrice (CMI), plus faible concentration du produit inhibant totalement en 18 ou 24 heures la multiplication des micro-organismes ;
- \* La concentration minimale létale (CML), plus faible concentration du produit capable de détruire un certain nombre de cellules microbiennes dans un temps déterminé (Joly 1995).

### **II.2.4. Détermination de l'activité antibactérienne des désinfectants**

Pour vérifier que les désinfectants atteignent leur objectif, il est nécessaire de déterminer si les bactéries sont tuées ou éliminées sous leur action. Ainsi, le pouvoir bactéricide d'un agent antimicrobien est évalué à partir d'essais réalisés *in vitro*.

La réalisation de ces tests de désinfection est complexe car plusieurs paramètres doivent être définis : choix des germes, préparation des suspensions bactériennes, élimination ou neutralisation des désinfectants ; différentes méthodes ont ainsi été développées et certaines d'entre elles sont aujourd'hui standardisées.

Nous avons choisi de ne présenter que celles susceptibles de nous intéresser pour la suite de l'étude.

#### **II.2.4.1. Sur cellules planctoniques**

Deux des normes les plus largement utilisées pour déterminer l'activité bactéricide d'un produit en l'absence ou en présence de substances interférentes (albumine bovine et extrait de levure,  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ) sont les normes NFEN1040 et NFEN1276. Les essais de désinfection, effectués sur 4 ou 5 espèces bactériennes différentes sont réalisés selon la méthode dite de dilution-neutralisation. Après 5 minutes  $\pm$  5s de contact à 20°C l'activité bactéricide du produit est stoppée par dilution de la suspension bactérienne dans un neutralisant adapté pendant 5 min. le dénombrement des cellules viables cultivables est alors réalisé par ensemencement en gélose nutritive.

#### **II.2.4.2. Sur cellules fixées**

A ce jour, aucune norme n'a été développée pour tester l'activité bactéricide d'agents antimicrobiens sur des cellules adhérentes ou en biofilms. La seule norme actuellement disponible est la norme AFNOR NF EN 72-19 dite méthode des porte germes, elle permet de

déterminer, l'activité de désinfectants utilisés, à l'état liquide et miscibles à l'eau, sur des bactéries fixées artificiellement (séchage à 45°C pendant 30min). Sur des supports non poreux de nature variée (verre de montre, acier, matière plastique...).

Après un temps de contact donné avec 0,2 ml de désinfectant, les portes germes sont transférés avec le produit désinfectant dans 100 ml de liquide de récupération, agités, grattés et si besoin, soumis aux ultra-sons. L'action du désinfectant est ensuite stoppée par une série de dilutions et de filtration successives. Les micro-organismes viables sont alors dénombrés après ensemencement en gélose nutritive.

Bien que, l'évaluation du taux de destruction, des micro-organismes adhérents, soit possible, certaines bactéries sessiles, peuvent être éliminées par supports contaminés.

Il est à noter que, la déshydratation que subissent les cellules microbiennes, peut entraîner l'apparition d'un stress « hydrique », induisant de potentielles erreurs d'interprétation des résultats. De plus, cette technique n'est pas applicable pour l'étude de l'activité bactéricide des désinfectants sur des cellules simplement adhérentes (quelques heures d'adhésion) ou en biofilms.

#### **II.2.4.3. Mécanisme d'action générale**

Quelque soit l'entité microbienne considérée et la molécule désinfectante utilisée, on sait aujourd'hui que l'action des biocides peut se caractériser par les trois phases suivantes :

1. Adsorption du désinfectant à la surface de l'enveloppe microbienne, phénomène de nature physico-chimique dépendant notamment de la concentration et du mouvement brownien des bactéries.
2. Pénétration de l'agent antimicrobien dans la cellule. La solubilité, l'ionisation et l'encombrement stérique des molécules antibactériennes sont des facteurs clé de cette phase.
3. Action proprement dite du principe actif. Elle peut avoir au niveau de différentes cibles cellulaires, telle que la membrane cytoplasmique dont l'altération de structure provoque une désorganisation du métabolisme, une fuite de substances ou de cytoplasme, et plus précisément les protéines cytoplasmiques, les acides nucléiques ou les ribosomes, qui induit à la dégénérescence de la cellule et finalement à sa mort. (Pioto and Bardoneschi, 1998 ; McDonnell and Russell, 1999).

Ainsi pour être actif, l'agent antimicrobien doit pouvoir s'absorber sur l'enveloppe microbienne et la traverser.

Ces phénomènes sont donc fortement dépendants d'une part de la composition de la paroi bactérienne, et d'autre part de la structure de la molécule désinfectante.

### **II.2.5. Classification des principes actifs antimicrobiens**

Les agents antimicrobiens peuvent être classés en deux groupes les produits potentiellement létaux et ceux non létaux mais inhibiteurs de croissance. Le premier groupe se divise lui même en deux catégories.

Les composés chimiquement très réactifs tels que l'eau oxygénée, les halogènes, les acides et les bases fortes, les aldéhydes, se caractérisent par une action brutale rapide, temporaire et souvent non spécifique.

Des composés chimiquement stables à action plus spécifique .Ce groupe comprend entre autre les ammoniums quaternaires, les dérivées phénoliques, la chlorhexidine et ses dérivés.

Les produits non létaux mais seulement inhibiteurs de croissance comprennent essentiellement les métaux (Mercuriels, dérivés du Cuivre, du Zinc, de l'Argent...). (Crémieux and Freney ,1995).

### **II.2.6.Sensibilités bactériennes aux agents antimicrobiens**

Deux types de résistance aux antimicrobiens peuvent alors être distingués : la résistance intrinsèque et la résistance acquise.

#### **II.2.6.1. Résistance intrinsèque**

La résistance intrinsèque ou naturelle est une caractéristique innée et stable des cellules appartenant à une espèce microbienne ou à un groupe d'espèces vis-à-vis d'un antibactérien. Etant stable, elle permet de définir le spectre d'activité d'un biocide .ensemble de microorganismes naturellement sensibles ou résistants à un antimicrobien ou un groupe d'antimicrobien.

La structure et la composition de la surface des microorganismes jouent un rôle important dans leur résistance naturelle.

Si l'on considère la paroi des bactéries à gram positif, on peut noter qu'elle est principalement constituée de la mureine (ou peptidoglycane) , elle-même formée de chaînes polysaccharidiques linéaires dont l'unité de base est une alternance régulière de deux sucres aminés, la N-acétylglucosamine (NAG) et l'acide N- acétylmuramique (NAM) liés à un peptide (Hancock1991). Ce peptidoglycane assure la rigidité de la cellule et représente 30 à 50% du poids sec de la paroi cellulaire.

La paroi des bactéries à gram négatif généralement plus mince, est quant à elle, constituée de pepoteines, des protéines et des lipopolysaccharides (LPS)(Hancock1991 ;Neidhardt et *al*,1994) .La partie polysaccharidiques des LPS, extrêmement hydrophile , est orientée vers l'extérieure des cellules .il est à noter que certaines

bactéries à gram négatif peuvent s'avérer être hydrophobes ,caractère relié à la présence de protéines de surface.

Par conséquent, les différences de composition de l'enveloppe bactérienne entre bactéries à gram positif et à gram négatif, mais également, au sein d'une même espèce bactérienne, entraînent une sensibilité variable des microorganismes aux agents désinfectants .Ainsi ,l'enveloppe des bactéries à gram positif ne possède pas de récepteurs spécifiques ou de perméases facilitant la pénétration des biocides dans les cellules (Russelles 1991).concernant les bactéries à gram négatif, la membrane externe de la paroi peut jouer un rôle de barrière vis-à-vis des agents chimiques (Joly, 1995). Il est à noter que chez les bactéries à gram négatif, les peptides molécules antimicrobiennes hydrophiles pourront pénétrer dans les cellules par la voie hydrophile via les porine (Hancock, 1998) alors que les composés lipophiles tels que les ammoniums quaternaires emprunteront la voie hydrophobe (diffusion à travers la membrane par les lipides et les lipopolysaccharide ) (Joly1995)

La cible de la plupart des antiseptiques et des désinfectants étant la membrane cytoplasmique, la résistance intrinsèque peut donc être corrélée avec son degré de protection. Ainsi la présence d'une enveloppe externe (bactérie à gram négatif),d'une couche de cires( mycobactériennes) ou de tunique sporals augmentera généralement la résistance cellulaires microbiennes aux désinfectants ,cette dernière peut être également due à la présence de systèmes enzymatiques tel que la catalase ou la supère oxyde dismutase chez *E.Coli* permettant de détruire l'agent oxydant avant que la dégradation bactérienne n'est eu lieu ou participant aux mécanismes de réparation cellulaire .

#### **II.2.6.2.Resistance acquise**

La résistance acquise est due à un événement imprévisible qui au sein d'une espèce a pour conséquence l'apparition d'une ou plusieurs souche ayant une résistance plus élevée a un antimicrobien.

Cette résistance est le résultat de modification génétique, soit, sur le noyau de la cellule, (résistance acquise chromosomique) soit, apporté par un plasmide (résistance plasmidique). Ces mutations génétiques peuvent alors se traduire par des évolutions biochimiques du microorganisme déterminant ainsi l'intensité et la spécificité de la résistance.(Hancock 1991).

#### **II.2.6.3.Résistance liée à l'état d'adhérant et / ou en biofilms**

Dans la plus part des environnements, les bactéries existent sous forme de biofilms. Les communautés bactériennes ainsi formées peuvent être considérer comme des refuges vis-à-vis des phénomènes de compétition, de prédation et des conditions environnementales défavorables. Ce mode fixe, confère donc au microorganisme des avantages particuliers tels

qu'un apport plus important de molécules nutritives venues s'adsorber sur la surface, une modification de l'activité métabolique, la création d'une micro zone favorisant les échanges, et comme évoqué précédemment, un effet protecteur des exo polysaccharides muqueux produits après l'adhésion (Ashter *et al.*, 1990 ;Bellon-Fontaine *et al.*, 1991).

#### **II.2.6.4. La capacité d'adaptation des microorganismes aux agents biocides**

Les microorganismes s'adaptent de façon très rapide à leur environnement, en développant notamment une résistance aux éléments extérieurs agressifs.

La résistance des bactéries aux agents désinfectants se traduit généralement par des changements du génome, induits par deux procédés génétiques : la mutation et la sélection. La sélection naturelle suit le principe suivant :

Une mutation spontanée sur l'un des chromosomes de la bactérie va conférer à cette bactérie une résistance à un antibiotique ou à un produit désinfectant précis. Lorsque l'ensemble de la population bactérienne subit l'agression d'un biocide, seules les bactéries possédant le gène résistant ne seront pas détruites. Elles pourront alors se multiplier, et former une nouvelle colonie résistante au biocide. Pour résister à l'action des biocides, les bactéries peuvent présenter plusieurs types de modifications :

- Production de nouvelles enzymes, chargées de lutter contre le biocide.
- Changement dans la structure interne de la cellule.
- Modification de la perméabilité de la membrane cytoplasmique.
- Modification de la structure de la paroi de la cellule.

De nombreuses recherches sont actuellement menées afin de déterminer les mécanismes mis en jeu permettant d'activer une résistance à certains produits. La majeure partie de ces recherches porte sur l'étude des biofilms, qui jouent un rôle important dans la protection des bactéries contre l'exposition à des agents désinfectants. La formation de biofilm se fait en plusieurs étapes pendant lesquelles les bactéries adhèrent à la surface des équipements ou des joints, se protègent grâce à une couche de polysaccharides, et se développent sous forme de colonies. La destruction de la couche de protection est très difficile avec les moyens classiques de désinfection. La plupart des biocides nécessitent un temps d'action ou/et une concentration élevée pour agir à l'intérieur du biofilm et ainsi attaquer les cellules( Allion 2004).



Dans ce contexte, maintenir un taux de désinfectant résiduel n'est pas suffisant pour lutter contre les bactéries, si celui-ci n'est pas capable de pénétrer à l'intérieur des biofilms. Afin d'assurer l'absence de formation de biofilms, le maintien d'un taux de chloramines résiduel (supérieur à 2 mg/l dans une eau non corrosive) apporte de nombreux avantages. Dans le cas plus précis du traitement de l'eau, il faut noter que les coliformes possèdent des mécanismes de réparation. Si l'action du produits désinfectant n'est pas assez efficace, les coliformes ont le temps de réparer les dommages subit, et peuvent alors former un nouveau biofilm, ou s'attacher à un déjà existant. Il est donc important pour les installations de traitement de l'eau de conserver un taux de chloramines résiduel suffisant.

### **II.2.7. Formation des composés indésirables suite à la désinfection de l'eau**

L'eau contient des gaz dissout essentiellement de l'oxygène et du gaz carbonique mais aussi de l'azote. Tous n'ont pas la même solubilité dans l'eau et celle-ci décroît quand la température augmente.

Elle contient aussi, sous forme dissoute ou en suspension, des substances minérales et organiques. Si les substances minérales sont limitées à une centaine de composés, les substances organiques sont innombrables (plusieurs centaines de mille voire plusieurs millions) et leur identification individuelle très difficile.

#### **II.2.7.1. Les matières minérales**

L'eau contient de nombreux ions dissous dont les principaux sont le calcium ( $\text{Ca}^{++}$ ), le magnésium ( $\text{Mg}^+$ ), le sodium ( $\text{Na}^+$ ), le potassium ( $\text{K}^+$ ), les carbonates ( $\text{CO}_3^{--}$ ), les bicarbonates ( $\text{HCO}_3^-$ ), les sulfates ( $\text{SO}_4^{--}$ ), les chlorures ( $\text{Cl}^-$ ) et les nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ). Ils proviennent pour l'essentiel du ruissellement.

L'eau contient aussi des nutriments, tels que l'azote (contenu dans l'ammoniac, les nitrites et les nitrates), le phosphore (contenu dans les phosphates) et la silice, ainsi que du fer et du manganèse.

D'autres éléments ne sont présents qu'à l'état de trace. C'est le cas de l'arsenic, le cuivre, le cadmium, le manganèse, le fer, le zinc, le cobalt, le plomb... Ils peuvent provenir des roches mais aussi parfois des activités industrielles et domestiques.

L'eau contient aussi des matières minérales en suspension (matériaux argileux, limons, etc).

#### **II.2.7.2. Les matières organiques**

Les matières organiques peuvent être présentes sous forme dissoute (carbohydrates, acides humiques, chlorophylles et polluants synthétiques comme les hydrocarbures, les solvants chlorés ou les pesticides), ou en suspension (déchets végétaux, plancton...). Elles proviennent pour l'essentiel de la dégradation de la matière organique présente dans le milieu

ou dans les sols lessivés par les pluies (décomposition des plantes et des animaux), mais aussi de composés issus de l'activité humaine. Leur concentration, infime dans les eaux profondes, peut atteindre quelques dizaines de milligrammes par litre dans les eaux de surface.

### **II.3. Traitements biocides chimiques**

#### **II.3.1. Halogènes et dérivés**

##### **II.3.1.1. Le Chlore**

Le chlore est le biocide industriel, le plus utilisé aujourd'hui. Il est utilisé, pour la désinfection des eaux domestiques, ou pour l'élimination, pour une longue période du goût et de l'odeur de l'eau. Lorsque l'eau est distribuée par réseau, afin de garantir sa pureté microbienne, l'usage d'un désinfectant chimique comme le chlore semble être incontournable. Les bactéries et les autres micro-organismes se développent spontanément dans l'eau (Maris 1995). Elles se fixent sur les parois des tuyaux et des réservoirs de stockage. L'écrasante majorité de ces bactéries sont inoffensives pour l'homme. Une petite partie appartient aux mêmes espèces que celles qui sont présentes en masse dans le corps des personnes atteintes de certaines maladies infectieuses. On fait donc rapidement la relation de cause à effet entre l'absorption d'une eau contenant ces bactéries réputées pathogènes et l'apparition de maladies infectieuses. Cette corrélation est loin d'être aussi simple. Le principe de précaution nous dicterait cependant qu'il vaut mieux consommer une eau qui ne contient pas ces bactéries. C'est l'origine de la conception pasteurienne de l'hygiène qui *postule* que dès le moment où les bactéries ont été éliminées de l'eau – par désinfection chimique par exemple – tout va bien. En allant jusqu'au bout de cette idée, on s'efforcera de tuer, à l'aide de biocides tout ce qui vit dans l'eau. C'est la justification de l'usage du chlore, mais aussi celui des lampes UV. Suivant cette vision, le chlore est un produit d'hygiène. En réalité, le chlore est un biocide toxique avec de nombreux effets secondaires dont on ne parle presque jamais. (Bartoli and Dusseau, 1995).

Bien que les spécialistes de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) en soient parfaitement conscients, les effets indésirables de la désinfection chimique de l'eau destinée à la consommation n'apparaissent que peu dans les publications sur le sujet. Pourtant les spécialistes savent très bien que la décision de désinfecter ou non l'eau est basée sur une balance des risques. La chloration élimine les risques immédiats liés à la présence des bactéries pathogènes, mais on sait bien que ce faisant, on expose à long terme le consommateur à d'autres types de problèmes de santé. Malheureusement, en raison de la lenteur de l'action négative des désinfectants chimiques, il est très difficile d'établir une

relation de cause à effet entre certaines maladies virales et de dégénérescence et la consommation ou l'usage (même externe) prolongé de l'eau désinfectée au chlore.

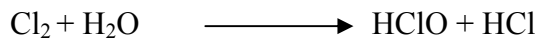
On cite souvent les composés organo-chlorés toxiques formés suite à la chloration. L'effet toxique de ces substances n'est notable qu'au cas où l'eau désinfectée contenait au départ suffisamment d'impuretés de nature organique (bactéries, matières humiques). Quand l'eau de départ contient peu de ces substances, la formation des composés organo-chlorés devient négligeable et ne présente pas un risque pour la santé. Le véritable risque se trouve ailleurs: au niveau des propriétés électrochimiques de l'eau.

La quantité de chlore que l'on doit ajouter dans l'eau est déterminée par plusieurs facteurs à savoir la demande en chlore, le temps de contact, le pH et la température de l'eau, le volume d'eau et la quantité de chlore perdu par aération. Quand le dichlore (gaz) pénètre dans l'eau il s'hydrolyse pour former de l'acide hypochloreux et de l'acide chlorhydrique.

### **Principe**

Le chlore est un désinfectant puissant par l'intermédiaire de l'ion hypochloreux  $\text{HClO}^\ominus$  qui peut pénétrer la membrane cellulaire pour inhiber les fonctions enzymatiques de la bactérie.

Le chlore gazeux réagit selon la réaction suivante:



(Formation d'acide hypochloreux  $\text{HClO}$  et d'acide chlorhydrique  $\text{HCl}$ ), qui s'accompagne de la réaction acide base :



(Formation de l'ion hypochlorite  $\text{ClO}^\ominus$  et de l'ion hydrogène  $\text{H}^\oplus$ ),

En fonction de la dose appliquée le traitement entraîne soit des lésions réversibles, soit des lésions irréversibles causant de fait la mort cellulaire (Block 2003).

Par contre, le chlore n'a que peu d'effet sur les bactéries contenues au sein du biofilm dans un réseau public d'eau potable.

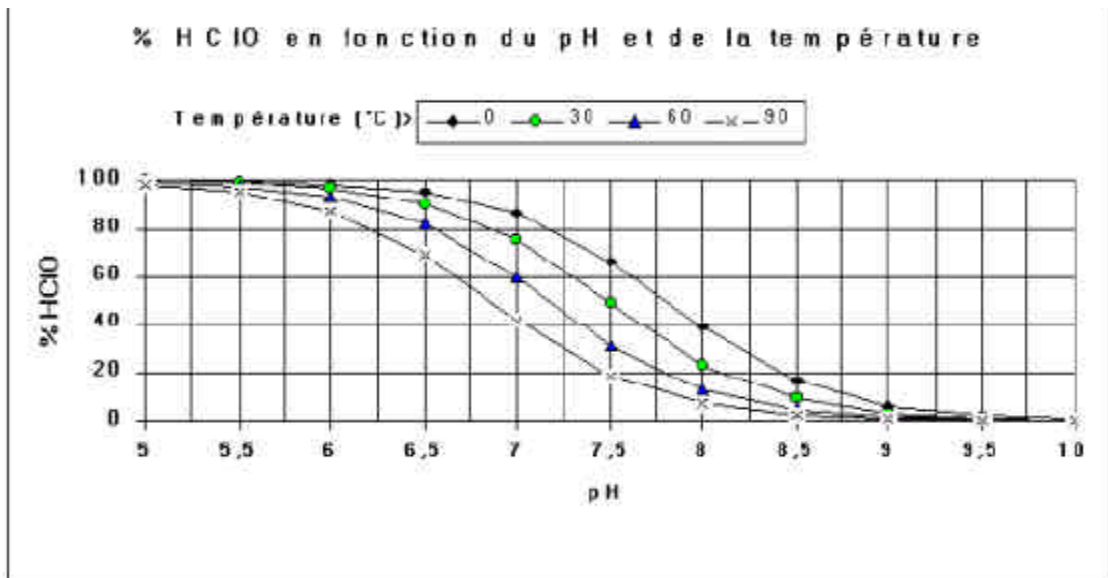
Le chlore gazeux peut produire des composés chlorés indésirables voire dangereux (THM : trihalométhanes, chlorophénols, organochlorés) et entraîne un goût prononcé de l'eau potable.

Son efficacité dépend du pH du milieu et son utilisation nécessite un local de stockage spécifique.

Son action est avérée contre les bactéries mais non contre les virus. De plus, il existe de plus en plus d'organismes résistants au chlore.

Il a été démontré qu'une dose de chlore de 0.3 mg/l dans une eau (en terme de résiduel de chlore) à 15 °C et à pH 7,5, maintenue pendant 10 à 20 minutes assure la destruction des

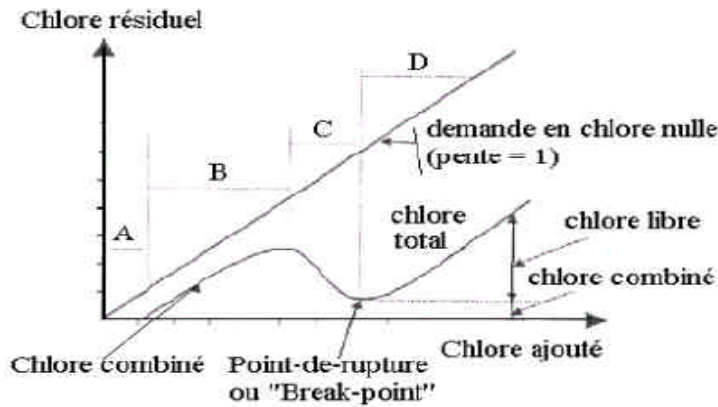
bactéries. Cependant, l'efficacité du chlore décroît avec l'augmentation de la température et du pH. La plage de pH optimale se situe entre 4 et 6, ce qui se situe hors de la gamme des pH acceptables en eau potable (**figure II.1.**) : évolution de la concentration en HClO en fonction de la température et du pH (d'après : <http://pravarini.free.fr/Desinfectants.htm>)



**Figure II.1.** : Evolution de la concentration en HClO en fonction de la température et du pH [<http://pravarini.free.fr/Desinfectants.htm>]

De plus, compte tenu de la réaction du chlore avec les matières organiques et l'ammoniaque, il est conseillé de ne traiter l'eau qu'après élimination de sa matière organique, ceci afin de pas conduire à des surconsommations de chlore et à la formation de sous-produits.

Il présente un effet rémanent dans le réseau si la dose appliquée est supérieure au break-point ou point de rupture (dose consommée par les matières azotées présentes dans l'eau et donc non disponible pour un effet désinfectant)(Figure II.2.).



chloration au break point (d'après : <http://pravarini.free.fr/Desinfectants.htm>)

**Figure II.2.**: Chloration au break point [ <http://pravarini.free.fr/Desinfectants.htm>]

- A : destruction du chlore par les composés minéraux réducteurs,
- B : formation de composés chlorés organiques et de chloramines,
- C : destruction des chloramines par ajout de chlore supplémentaire,
- D : production de chlore actif.

Tout d'abord, le chlore n'est pas un désinfectant universel : certaines bactéries, et plus encore certains virus et parasites résistent au chlore notamment les protozoaires lorsqu'ils sont enkystés (*Giardia*, *Cryptosporidium*, *Entamoeba histolytica*).

De plus, il est pourvu d'inconvénients et non des moindres :

- \*Hygiène et sécurité pour l'exploitant : la manipulation du chlore gazeux demande une certaine technicité et une sécurité des installations;
- \*Présence de sous-produits indésirables dans le milieu récepteur (THM, chloramines sauf si la chloration est supérieure au break-point) en présence de matière organique dans l'eau; \*Coût des réactifs.

Des recherches récentes ont montré que des bactéries pouvaient s'accoutumer au chlore et, de ce fait, leur permet d'être de moins en moins vulnérables à cette désinfection. Selon les experts, il vaut mieux avoir de fortes doses de chlore de temps en temps qu'un «bruit de fond de chlore» constant qui va réduire l'efficacité des actions désinfectantes ultérieures.

### **Avantages et inconvénients de la chloration au chlore gazeux**

La chloration au chlore gazeux présente de nombreux avantages dont la présence d'un résiduel de chlore qui garantit l'efficacité de la désinfection et son pouvoir oxydant.

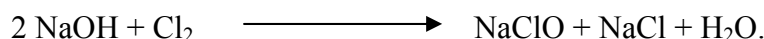
De plus, elle présente une grande facilité d'utilisation, comme les autres composés chlorés.

L'augmentation de la chloration depuis les événements du 11 septembre 2001 participe à la croyance commune d'une arme quasi absolue. Or, outre un effet très désagréable sur le goût.

### **II.3.1.2. Désinfection à l'eau de Javel**

#### **Principe**

L'eau de Javel est produite par électrolyse du chlorure de sodium. Cette réaction conduit à la formation de chlore gazeux et d'hydroxyde de sodium qui lui-même peut réagir avec le chlore pour donner de l'hypochlorite selon la formule :



L'eau de Javel se décompose plus rapidement sous l'effet de la chaleur, et par conséquent davantage en été qu'en hiver, lorsque sa concentration en chlore est importante. L'hypochlorite se décompose alors en chlorate, chlorure et oxygène perdant ainsi son effet désinfectant.

L'hypochlorite de calcium peut être obtenu de la même façon par réaction avec une eau ou un lait de chaux. Cependant, ces solutions d'hypochlorite de calcium sont moins employées dans le traitement des eaux (Masschelein 1999).

#### **Avantages et inconvénients de la chloration à l'eau de Javel**

Tout comme le chlore gazeux, l'utilisation d'eau de javel pour la désinfection de l'eau destinée à la consommation humaine peut conduire à la production de sous-produits de désinfection responsables de mauvais goûts et d'odeurs, voire dangereux pour la santé (THM, Chlorophénols, organochlorés).

De plus, l'eau de javel est basique, et peut provoquer la précipitation du calcium en cas d'eau dure, ce qui entraîne des colmatages des équipements.

Cette solution de désinfection est utilisée pour de petites installations : les installations sont réduites et la maintenance est limitée. Cependant sa stabilité est faible, 2 mois maximum pour la solution commerciale, ce qui est très limitatif. Ceci peut conduire à des erreurs de dosage (sous dosage car la solution a une faible concentration). De plus, elle impose une maintenance importante (remplacement de la solution).

### **II.3.1.3. L'acide hypochloreux**

L'acide hypochloreux est responsable des réactions d'oxydation avec le cytoplasme des micro-organismes, après diffusion à travers les membranes cellulaires. Le chlore perturbe ensuite la production d'ATP (adénosine triphosphate), une molécule importante intervenant dans les mécanismes de respirations. Les bactéries qui sont présentes dans l'eau meurent suite à des problèmes respiratoires provoqués par l'activité du chlore.

La quantité de chlore que l'on doit ajouter pour contrôler la croissance des bactéries dépend du pH. Plus le pH est élevé, plus on doit ajouter du chlore pour tuer les bactéries indésirables. Quand le pH est compris entre 8 et 9, on doit ajouter 0.4 ppm de chlore. Quand le Ph est compris entre 9 et 10 on doit ajouter 0.8 ppm de chlore.

#### **II.3.1.4.L'ion hypochlorite**

L'ion hypochlorite est un des ions de l'acide hypochloreux: ( $\text{ClO}^-$ ), on peut le trouver sous différentes formes. En général il est utilisé sous forme d'hypochlorite de sodium ( $\text{NaOCl}$ ), aussi appelé hypochlorite de soude ou eau de javel, et d'hypochlorite de calcium ( $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ ). Ces composés peuvent être utilisés comme biocides. Il fonctionne à peu près de la même façon que le chlore, bien qu'il soit un peu moins efficace.

L'un des composés les plus couramment utilisés comme désinfectant en milieu industriel, hospitalier, domestique ainsi que dans les collectivités est l'hypochlorite de sodium. Il possède une puissante activité désodorisante ainsi qu'un large spectre d'activité sur les microorganismes ; son activité bactéricide est liée à la libération de l'acide hypochloreux ( $\text{HOCl}$ ) lors de sa dissociation dans l'eau ; cet agent antimicrobien pénètre facilement à travers les parois et les membranes de cellules microbiennes. Il agit par un mécanisme rapide d'oxydation générale entraînant la dénaturation des protéines en conséquence, l'arrêt de la réaction du métabolisme conduit à la mort cellulaire. L'un des principaux inconvénients des solutions d'hypochlorite de sodium est leur rapide dégradation sous l'action de la chaleur et de la lumière.(Allion andrey.2004)

#### **II.3.1.5. Electrochloration**

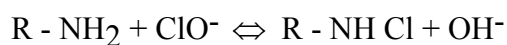
Ce procédé consiste à former un agent bactéricide par électrolyse d'halogénure et plus spécialement de chlorure. Cette technique s'applique bien sur tout et particulièrement à l'eau de mer. Il faut remarquer que dans la zone de pH utilisée, le potentiel d'oxydation de l'eau est inférieur au potentiel normal apparent du système ( $\text{Cl}^- / \text{HClO}$ ).

Dans ces conditions, il sera nécessaire de travailler à des concentrations importantes en chlorure pour obtenir des quantités notables d'hypochlorite.

La différence de potentiel au voisinage de la neutralité étant d'environ 39 mV; on en déduit un rapport maximum  $\text{ClO}^-/\text{Cl}^- = 1/20$  .

La concentration minimale de chlorure devra être au moins 20 fois supérieure à la quantité d'hypochlorite que l'on veut obtenir, mais cette valeur peut varier avec la nature de l'électrode utilisée et de la surtension de l'oxygène sur celle-ci.

La solution d'hypochlorite ainsi obtenue (eau de Javel) a un effet stérilisant et réagit sur les composés organiques en particulier avec l'ammoniaque ou d'autres composés aminés, pour former les chloramines. (Abderrahmane 2005)



Activité biocide : Il peut y avoir plusieurs types d'actions sur les micro-organismes.

Il a été montré qu'une oxydation électrochimique directe des bactéries était impossible: celles-ci étant protégées par leur membrane cytoplasmique (Chalan et *al.*,1983). Aussi, seule une action indirecte par génération électrochimique d'un oxydant susceptible de traverser la membrane bactérienne est envisageable. Par ailleurs, le champ électrique de part et d'autre de la membrane bactérienne est, estimé à quelques centaines de volts par centimètre et insuffisant pour provoquer la lyse de la membrane cytoplasmique de la bactérie. En effet les brevets des procédés de purification préconisés par des chercheurs Russes, prévoient des décharges électriques sous haute tension (10.000 à 100.000 V) et des courants de 100 A. Ces possibilités d'action directe sont donc des effets de champs dont le caractère est plus électrostatique qu'électrochimique.

#### **II.3.1.6.Dioxyde de chlore**

Le dioxyde de chlore ( $ClO_2$ ) est un gaz orangé explosif à plus de 10% (concentration dans l'air). Pour des raisons de sécurité du fait de son instabilité, il doit être fabriqué sur place au dernier moment à partir de chlorite de sodium et d'acide chlorhydrique ou de chlorite de sodium et de chlore gazeux. Contrairement au chlore ou à l'ozone, le dioxyde de chlore ne réagit qu'avec quelques composés organiques. Cette plus grande sélectivité augmente l'efficacité de ce désinfectant.

Comme il n'oxyde pas l'ammoniaque, il peut être préféré au chlore, pour éviter de donner à l'eau un goût désagréable. De plus, la gamme de pH pour laquelle le dioxyde de chlore conserve un pouvoir germicide est plus importante : entre 4 et 10.

Le dioxyde de chlore est également plus efficace que le chlore pour l'inactivation des spores, bactéries, virus et autres organismes pathogènes. Son action est également rapide : temps de contact 2 à 3 fois plus court que pour le chlore.

Ainsi une dose de 0.1 à 0.2 mg/l pendant 5 à 10 minutes assure une action bactéricide (contre 10 à 15 minutes pour le chlore) et une dose de 0.3 à 0.5 mg/l pendant 30 minutes assure une action virulicide (contre 30 à 45 minutes pour le chlore) . Un tel procédé peut être préconisé pour toutes les tailles d'installations.

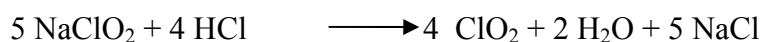


Compte tenu de son instabilité, le dioxyde de chlore est préparé sur le lieu d'utilisation à partir de :

\*Soit de chlorite en présence d'acide chlorhydrique pour maintenir un milieu acide :

La réaction mise en œuvre dans ce cas est la suivante :

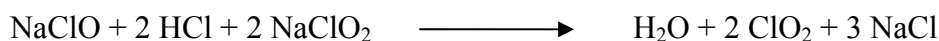
Compte tenu de son instabilité, le dioxyde de chlore est préparé sur le lieu d'utilisation à partir de



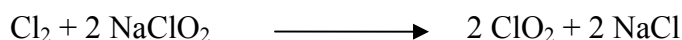
Le rendement de cette réaction est bon, taux de transformation du chlorite proche de 100%, en présence d'un excès d'acide (pH inférieur à 4).

- Soit de chlorite et de chlore,
- Soit de chlorite, d'acide chlorhydrique et d'eau de javel :

La réaction chimique intervenant alors est la suivante :



Cette dernière solution ne fait pas appel au chlore et évite les problèmes inhérents au stockage de ce composé. La réaction mise en œuvre est la suivante :



Une boucle d'enrichissement permet d'obtenir une solution de chlore concentrée de pH très acide qui est introduite dans un réacteur en présence de chlorite. La solution de dioxyde de chlore ainsi générée est stable et peut être utilisée pure ou diluée.

#### **Avantages et inconvénients de la chloration au dioxyde de chlore**

Le dioxyde de chlore présente une très grande efficacité pour éliminer de nombreuses espèces pathogènes. L'ion chlorite produit a également une action bactériostatique ce qui lui confère un pouvoir rémanent. Il est plus efficace que le chlore sur les protozoaires, bactéries et virus.

Le dioxyde de chlore présente la meilleure efficacité combinée si l'on considère les 2 paramètres que sont l'efficacité biocide et la rémanence dans le réseau.

De plus, il est très sélectif et ne réagit avec :

- les composés azotés : il n'y a pas formation de nitrites ou nitrosamines,
- les bromures : aucune formation de bromates,
- les composés organiques ce qui évite la formation de THM.

De plus, le dioxyde de chlore est peu sensible au pH.

D'autre part, son caractère rémanent, par le biais de l'ion chlorite, lui confère une efficacité inégalée sur le biofilm. Ainsi, 0,5 g/l de chlorite équivaut à 6 à 7 mg/l de chlore (Zydowicz P. et al. 2002).

Cependant, il faut noter que le décret 2001/1220 du 20 décembre 2001, à la différence de la directive européenne 98/83/EC, préconise une valeur limite pour les chlorites : 0,2 mg/l. La formation de chlorite à partir de dioxyde de chlore est rapide : 30 à 60 minutes. La proportion de chlorite formée est de 50 à 70% du dioxyde ayant réagi (Allion Andrey.2004) .

#### **II.3.1.7.Chloro-isocyanurates**

Il s'agit de composés organochlorés qui s'hydrolyse en acide hypochloreux et en acide cyanhydrique dans l'eau. L'acide cyanhydrique réduit la perte de chlore due aux réactions photochimiques avec les rayons UV, ainsi il y a plus d'acide hypochloreux utile à l'action biocide.

#### **II.3.1.8.Chlorhexidine**

La chlorhexidine est probablement le biocide le plus largement utilisé dans les produits antiseptiques, en particulier dans le nettoyage des mains et des produits par voie orale, mais aussi comme un désinfectant et un conservateur. Cela est dû en particulier à son efficacité à large spectre, substantivité pour la peau, et une irritation légère (Gardner, J. F., and K. G. Gray. 1991), Rosenberg, A., *et al* . 1976). Malgré les avantages de la chlorhexidine, son activité est dépendante du pH est fortement réduite en présence de matière organique (Russell, A.D., and M.J. Day.1993).

La chlorhexidine est un agent bactéricide (Denyer, S. P. 1995, Hugo, W. B.). Son interaction et l'assimilation par les bactéries ont été étudiées initialement par Hugo et al. ( Hugo, W. B., *et al*. 1964; Hugo, W. B.,*et al*. 1966), qui a constaté que l'absorption de chlorhexidine par *E.Coli* et *S. aureus* a été très rapide et dépend de la concentration de chlorhexidine et le pH.

#### **II.3.1.9.L'iode et les iodophores**

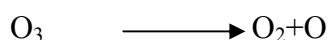
Bien que moins réactif que le chlore, l'iode est rapidement bactéricide, fongicide, tuberculocide, virucide, et sporicide ( Gottardi, 1991). Les solutions d'iode ont été utilisées depuis 150 ans comme antiseptiques.

Similaires au chlore, l'action antimicrobienne de l'iode est rapide, même à faible concentration, mais le mode d'action exact est inconnu. L'iode pénètre rapidement dans les micro-organismes (Chang, S. L. 1971.) et les attaques .Des groupes clés de protéines (en particulier les acides aminés soufrés de libre-cystéine et la méthionine ( Gottardi, W. 1991,

Kruse, W. C. 1970) des acides, des nucléotides, et des acides gras ( Apostolov *et al.* 1980 ), qui culminent dans la mort cellulaire.

#### II.3.1.10.L'ozone

L'ozone est naturellement instable. On peut l'utiliser comme un agent oxydant puissant, lorsqu'on le génère par un réacteur. En tant que biocide il agit en gros de la même façon que le chlore: il perturbe la production d'ATP, de ce fait la respiration cellulaire des micro-organismes est rendue difficile. Lors d'une oxydation avec de l'ozone, les bactéries meurent en général, de la perte du contenu essentiel à la vie du cytoplasme. Lors du procédé d'oxydation l'ozone se décompose en oxygène moléculaire et un atome d'oxygène, qui est perdu lors de la réaction avec les fluides cellulaires de la bactérie:



Un certain nombre de facteurs déterminent la quantité d'ozone nécessaire pour l'oxydation, il s'agit du pH, de la température, des produits organiques et solvants présents, et des produits de réaction accumulés.

L'ozone est moins nocif pour l'environnement que le chlore, car on n'ajoute pas de l'ozone dans l'eau et du fait de sa décomposition en oxygène, il ne met pas en danger la vie aquatique.

En général 0.5 ppm d'ozone sont ajoutés dans le système, de façon continue ou intermittente. Les agents oxydants les plus utilisés en plus de l'ozone  $\text{O}_3$  sont, le peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$  et l'acide péricétique ( $\text{CH}_3\text{-CO-O-OH}$ ), leur mode d'action est basé sur la libération d'oxygène entraînant l'oxydation des systèmes enzymatiques. Ainsi, les agents oxydants tel que l'acide péricétique, agissent sur les lipides, les liaisons sulfurées enzymatiques ils entraînent une désorganisation de la membrane cellulaire.

Ces composés oxydants ont l'avantage de présenter un large spectre d'activité, une absence de résidus finaux, un faible pouvoir corrosif aux concentrations d'usage et s'ils sont facilement éliminable par rinçage, ils sont cependant toxiques aux fortes concentrations et instables pendant leur stockage.(Allion .2004)

#### II.3.1.11.Acides et bases

L'efficacité de ces composés est liée aux concentrations en ions  $\text{H}^+$  et  $\text{OH}^-$ . Les ions  $\text{H}^+$  agissent sur les liaisons aminoacides des acides nucléiques modifiant le pH cytoplasmique et précipitant les protéines .Les ions  $\text{OH}^-$ , en saponifiant les liquides membranaires, entraînent la destruction de ces structures.

### **II.3.1.12. Acide péracétique**

L'acide péracétique (PAA) ( $\text{CH}_3\text{COOOH}$ ) est considéré comme un biocide plus puissant que le peroxyde d'hydrogène, étant sporicide, bactéricide, virucide, fongicide et à de faibles concentrations (<0,3%) (Block, S. S. 1991). Il se décompose également en des sous-produits (acide acétique et de l'oxygène), (Lensing, H. H., and H. L. Oei. 1984, Malchesky, P. S. 1993). Son application principale est la stérilisation à basse température des liquides pour les dispositifs médicaux, endoscopes souples, et hémodialyseurs, mais il est aussi utilisé comme agent stérilisant des surfaces de l'environnement hospitalier (Crow, S. 1992, Malchesky, P.S. 1993).

Similaires à  $\text{H}_2\text{O}_2$ , l'AAP dénature probablement les protéines et les enzymes et augmente la perméabilité de la paroi (Baldry, M. G. C., and J. A. L. Fraser. 1988, Block, S. S. 1991.).

### **II.3.1.13. Peroxydes**

Le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) est un biocide largement utilisé pour la désinfection, la stérilisation et antisepsie. Il s'agit d'un liquide clair, incolore, qui est disponible commercialement dans une variété de concentrations allant de 3 à 90%.  $\text{H}_2\text{O}_2$  est considéré comme respectueux de l'environnement, car il peut se dégrader rapidement dans l'eau sans danger. Bien que les solutions pures sont généralement plus stables, contenir des stabilisants pour éviter la décomposition.  $\text{H}_2\text{O}_2$  démontre l'efficacité à large spectre contre les virus, bactéries, levures, et les spores bactériennes (Block, S.S.1991). En général, une plus grande activité est considérée contre les bactéries gram-positives que les bactéries gram-négatives, mais la présence de la catalase ou autres peroxydases dans ces organismes peuvent augmenter la tolérance à la présence de concentrations plus faibles. Des concentrations plus élevées de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 à 30%) et des temps de contact plus longs sont nécessaires pour l'activité sporicide (Russell, A. D. 1991), même si cette activité est significativement augmentée dans la phase gazeuse. Il est considéré comme oxydant en produisant des radicaux libres hydroxyles (OH) qui attaquent les composants cellulaires essentiels, y compris les lipides, les protéines et l'ADN. Il a été proposé que les groupes exposés et les doubles liaisons sulfhydryle soient particulièrement visés.

### **II.3.1.14. Aldéhydes**

Le glutaraldéhyde est l'aldéhyde le plus utilisé, en milieu hospitalier pour des opérations de désinfections à basse température pour la stérilisation des endoscopes et du matériel chirurgicale (Mc Donnelle et Russell, 1999). C'est un puissant agent réducteur qui réagit avec les groupements aminés  $\text{R-NH}_2$  des protéines cellulaires, ainsi, en se liant ,entre autre ,à ces groupements présents à la surface de l'enveloppe bactérienne, cet agent

antimicrobien inhibe les systèmes enzymatiques et de transport transmembranaire entraînant ainsi la mort cellulaire, il dénature également les acides nucléiques par alkylation. Son activité est optimale à pH alcalin ((Mc Donnelle et Russell, 1999). La présence de matière organique diminue son efficacité bactéricide.

La spore bactérienne présente, sur plusieurs sites, dont l'interaction avec le glutaraldéhyde est possible, bien que l'interaction avec un site particulier ne signifie pas nécessairement que cela est associé à l'inactivation des spores (Power, *et al.* 1990; Power and 1989).

Le formaldéhyde (méthanal, CH<sub>2</sub>O) est un monoaldéhyde qui existe sous forme de gaz librement soluble dans l'eau. La solution de formaldéhyde (formol) est une solution aqueuse contenant environ 34 à 38% (poids/poids) avec du méthanol CH<sub>2</sub>O de retarder la polymérisation. Son utilisation clinique est généralement comme désinfectant et stérilisant dans un liquide ou en combinaison avec de la vapeur à basse température. Le formaldéhyde est un bactéricide, sporicide, et virucide, mais il fonctionne plus lentement que le glutaraldéhyde ( Power 1995 ; Scott and Gorman 1991). La plupart des autres aldéhydes (glutaraldéhyde, glyoxyl, succinaldéhyde, et o-phthalique [OPA]) qui ont une activité sporicide sont dialdéhydes et parmi eux, le glyoxyl succinaldéhyde sont faiblement actifs ( Russell, A. D., and I. Chopra. 1996)

Les aldéhydes ont l'avantage de présenter un large spectre d'activité et d'être peu corrosif, leur point faible reste leur forte toxicité, leur action lente et leur difficulté d'élimination par rinçage.

### **II.3.1.15. Alcools**

L'éthanol, l'isopropanol et le n-propanol sont les alcools les plus couramment utilisés, particulièrement en Europe. Leur activité antibactérienne est rapide à large spectre incluant notamment les formes végétatives des bactéries, les virus et les moisissures. Bien qu'ils puissent inhiber leur sporulation et leur germination, ils ne sont pas létaux pour les spores bactériennes. Ils sont généralement plus actifs sur les bactéries à gram négatif que celles à gram positif (Allion .2004)

Leur mécanisme d'action est encore mal connu mais leur efficacité bactéricide est favorisée en présence d'eau. Les agents antimicrobiens perturbent le métabolisme bactérien en induisant des lésions au niveau de la membrane et par dénaturation des protéines. Leur activité est optimale pour une concentration en alcool comprise entre 60% et 9% .Ils sont souvent utilisés en synergie avec d'autres désinfectants, et en particulier avec la chlohexidine

### II.3.1.16. Dérivés phénoliques

Ces antimicrobiens sont actifs sur les bactéries à gram positif et à gram négatif mais n'ont pas d'activité létale sur les spores. Ils agissent sur la membrane cellulaire et inactivent les enzymes cytoplasmiques par, formation de complexes instables. Aux faibles concentrations, les constituants cellulaires sont libérés dans le milieu extérieur ; aux fortes concentrations, il y'a dénaturation des protéines et lyse de la membrane cellulaire ,leur efficacité est dépendante du pH et de la présence de matière organique(Allion Andrey.2004) .

### II.3.1.17. Bis-phénols

Les bis-phénols sont des hydroxy dérivés halogénés de deux groupes phénoliques reliés par des ponts différents ( Gump, W. S. 1977., Russell, A. D., W. B. Hugo, and G. A. J. Ayliffe (Ed.). 1992). En général, ils présentent une efficacité à large spectre, mais ont peu d'activité contre *P. aeruginosa* et les moisissures . Triclosan et hexachlorophane sont les biocides les plus largement utilisés dans ce groupe, en particulier dans les savons antiseptiques et rince-mains. Les deux composés se sont révélés avoir des effets cumulatifs et persistants sur la peau ( Marzulli, F. N., and M. Bruch. 1981.).

### II.3.1.18. Halophénols

Chloroxylenol (4-chloro-3 ,5-diméthylphénol; p-chloro-m-xylénol) est le halophénol très utilisés dans les formulations antiseptiques et désinfectantes. Chloroxylenol est un bactéricide, mais *P. aeruginosa* et de nombreux moules lui sont très résistants ( Bruch, M. K. 1996, Russell, A. D., and J. R. Furr. 1977). Étonnamment, son mécanisme d'action a été peu étudié, malgré son utilisation très répandue depuis de nombreuses années. En raison de sa nature phénolique, on pourrait s'attendre à avoir un effet sur les membranes microbiennes.

### II.3.1.19. Ammoniums quaternaires

Ce sont des agents tensio-actifs (surfactants) ,ils ont deux régions dans leurs structures moléculaires, l'une d'hydrocarbures, hydrofuge (hydrophobe) et l'autre groupe une molécule d'eau pour attirer (hydrophile ou polaire).

L'anion  $X^-$  est généralement un atome de chlore ou de brome ; $R_1$  ;  $R_2$  ;  $R_3$  ;  $R_4$  sont des groupes alkyles.

Les ammoniums quaternaires sont des composés bipolaires comportant un pôle hydrophobe et un pôle hydrophile chargé positivement permettant à la molécule de s'adsorber aux surfaces inertes. Ce caractère amphiphile donne à ce type de molécule des propriétés détersives en plus de son activité bactéricide .Ils sont généralement plus efficaces sur les bactéries à gram positif que sur les bactéries à gram négatif, ils n'ont pas d'action sur les

mycobactéries, ni sur les formes sporulés des bactéries, et sont fongicides à hauteur de 0,1% (v/v) (Allion 2004).

De part leurs propriétés physico-chimiques, ces molécules peuvent s'adsorber de manière irréversible aux phospholipides et aux protéines de l'enveloppe bactérienne. Cette adsorption entraîne alors des changements de perméabilité puis des lésions de la membrane cytoplasmique conduisant à une fuite des constituants cytoplasmiques (notamment des ions potassium). L'efficacité bactéricide des ammoniums quaternaires est également dépendante du pH, de la longueur de la chaîne alkylée ; maximum d'activité est à C= 14 est pH=7, ils sont inactif à un pH  $\leq 3,5$ . Leur faible toxicité, leur stabilité et leur caractère non corrosif en font des désinfectants de choix. Cependant, leur efficacité bactéricide est atténuée par la présence de matières organiques et par l'eau dure.

#### **II.3.1.20. Diamidines**

Les diamidines sont caractérisées chimiquement comme les sels iséthionates de deux composés, propamidine (4,4-diaminodiphenoxypropane) et dibromopropamidine (2,2-dibromo-4,4-diamidinodiphenoxypropane), ont été utilisés comme des agents antibactériens. Leurs propriétés antibactériennes ont été examinées par Hugo ( Hugo, W. B. 1971). Cliniquement, diamidines sont utilisées pour le traitement topique des plaies.

Le mécanisme d'action exact des diamidines est inconnu, mais ils ont été capables d'inhiber l'absorption d'oxygène et provoquer une fuite d'acides aminés, comme on pouvait s'y attendre, si, elles sont considérées comme des agents de surfaces cationiques actives. Les surfaces des cellules de *P.aeruginosa* et *Enterobacter cloacae* ont été endommagées (Richards, R. M. E., *et al.* 1993).

#### **II.3.1.21. Composés d'Argent**

Sous une forme ou une autre l'Argent, et ses composés ont longtemps été utilisés comme agents antimicrobiens ( Brown, M. R. W., and R. A. Anderson. 1968, Russell, A. D., and W. B. Hugo. 1994). Les composés d'Argent les plus importants, actuellement en cours d'utilisation, sont les sulfadiazine d'Argent (AGSD), bien en métal argenté, l'acétate d'argent, nitrate d'argent, et des protéines d'argent, qui ont tous des propriétés antimicrobiennes, sont répertoriés dans Martindale, La Pharmacopée Extra ( Martindale Extra Pharmacopoeia. 1993). Ces dernières années, des composés d'argent ont été utilisés pour prévenir l'infection des brûlures, désinfections des yeux et la destruction des verrues.

Le mécanisme d'action antimicrobienne des ions d'argent est étroitement lié à leur interaction avec les thiol (sulfhydryle, -SH) ( Furr, J. R., A. D. Russell, T. D. Turner, and A. Andrews. 1994), bien que d'autres sites cibles demeurent possible ( Richards, R. M. E. et al 1981,

Gerba. C. P. 1988). Liao et al ( Liao, S. Y.,*et al.* 1997) a démontré que les acides aminés tels que les composés cystéine et d'autres, comme le thioglycolate de sodium contenant des groupes thiol neutralise l'activité du nitrate d'argent contre *P. aeruginosa*. Ces résultats impliquent que l'interaction de  $Ag^+$  avec des groupes thiols des enzymes, et des protéines joue un rôle essentiel dans l'inactivation bactérienne, bien que d'autres composants cellulaires peuvent être impliqués. La liaison hydrogène, les effets des agents de liaison hydrogène, et la sélectivité de  $Ag^+$  pour les groupes thiol ont été discutés plus en détail par Russell et Hugo (Russell, A. D., *et al* 1994).

## **II.4.Traitements physiques**

### **II.4.1.Effets du champ électrique**

Le champ électrique imposé ainsi que le champ électrique pulsé, ont montré une influence sur l'activité des protéines membranaires (Teissie, J. 1986) (Zrimec, A., *et al.* 1999).

Les champs électriques pulsés (CEP) et imposés (CEI) se présentent comme des traitements de courte durée, qui diffèrent des autres traitements par un endommagement ciblé des membranes cellulaires et peu destructeur de la matrice tissulaire. D'un point de vue tout à fait général, l'injection très brutale d'énergie électrique dans des milieux, crée des phases de déséquilibre des propriétés physiques, biologiques ou chimiques qui peuvent présenter des caractéristiques très intéressantes. En effet, les décharges électriques peuvent produire, très soudainement, des effets thermiques, des effets photoniques, des effets de chocs ou faire apparaître des radicaux libres qui rendent les milieux très réactifs. Les applications qui en découlent sont multiples, par exemple en ce qui concerne la dépollution :

\*Traitements des gaz :  $NO_x$ ,  $SO_x$ , gaz d'échappement de moteurs classiques ou diesel, dépoussiérage de fumées, ...,

\*Traitements des liquides : débactérisation, pasteurisation à froid, extraction de composés cellulaires, floculation de boues, ...,

\*Traitements des solides : séparation puis concassage de déchets, réduction en poudre de produits, écroutage de béton, frittage de céramiques...

Les nouvelles technologies de traitement de l'eau (eau potable et eaux usées) présentent toutes de puissantes propriétés antimicrobiennes (les champs électriques pulsés, le traitement par couronnes pulsées et par faisceaux d'électrons, le traitement par U.V. et Ozone). Cependant, tous les micro-organismes ne répondent pas de la même manière à ces traitements. C'est pourquoi, en considérant les applications variées d'un tel système, (Espel P., *et al.* 1999) ont imaginé un nouveau procédé exploitant toutes ces propriétés dans le but



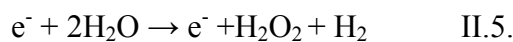
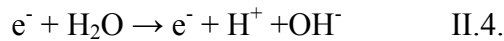
d'optimiser l'efficacité du traitement sur une large variété de micro-organismes dans les liquides. Elles peuvent aussi mener à la rupture diélectrique du liquide. Ce système de traitement a été testé sur des liquides contenant les micro-organismes *Saccharomyces cerevisiae* (industrie de la levure et de la fermentation), des *Bacillus cereus* (bactérie Gram positif omniprésente dans la nature qui peut provoquer des empoisonnements des aliments tels que le riz, le lait ou les céréales) et *Escherichia coli* (bactérie Gram négatif).

Quand des impulsions haute tension sont appliquées entre des électrodes immergées dans un liquide, des espèces chimiques actives, des électrons hautement énergétiques, de l'ozone, des radiations ultraviolet voire des ondes de chocs, sont produits et peuvent jouer un rôle important dans la débactérisation et la dégradation de micro-organismes ( Sato, M.,*et al* 1997 ;Sun,B *et al* 1997 ;Sun,B ;*et al* 1999 ;Heesch.V *et al* 1997 ; Akiyama.H 2000)

Ainsi, les décharges électriques dans les liquides permettent d'envisager de mettre en œuvre un grand nombre d'applications commerciales telles que :

- \*Le traitement de boues,
- \*La dissociation de produits chimiques toxiques comme la dioxine,
- \*Le nettoyage de l'eau contaminée,
- \*La stérilisation de lait et de jus de fruits,
- \*La gestion de l'eau potable, etc...

En ce qui concerne l'eau et les milieux aqueux, les espèces chimiques actives créées par les décharges électriques sont les radicaux H, OH, O, O<sub>2</sub>, HO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub> et du peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Parmi ces espèces, OH, O, O<sub>3</sub> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont les plus importantes pour les réactions chimiques. Ces radicaux traitent les composés organiques par oxydation. Les radicaux hydroxyles OH et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont directement produits par des décharges dans l'eau, suivant les réactions chimiques des équations II.4 et II.5 (Yamabe C.,*et al* 2000).



Pour ce qui est de l'ozone (O<sub>3</sub>), sa présence est notamment due à l'injection de bulles de gaz (principalement de l'oxygène) dans le liquide, autour de la zone de décharge.

Les radicaux OH<sup>-</sup> sont spécialement connus pour jouer un rôle important dans la dégradation des composés organiques ; c'est l'espèce qui possède le plus fort pouvoir oxydant (après la fluorine), suivi de l'oxygène singulé O et de l'ozone (Zhou H., *et al* 2002) .

Selon Sato *et al*, l'émission de ces différents radicaux par la décharge est étroitement liée à la conductivité de la solution, à la tension appliquée, à la polarité (polarité positive plus efficace) et à la géométrie de la pointe portée à la haute tension (Sukka P., *et al*. 1999).

#### **II.4.2.Traitement par UV**

Le recours à des procédés de stérilisation utilisant le rayonnement électromagnétique répond à l'existence d'objets médicaux sensibles à la chaleur ou à l'humidité, rendant l'utilisation des méthodes précédentes problématique.

Chaque type de rayonnement électromagnétique (Ultra-Violets, rayons Gamma, rayons X...) affecte de manière différente les cellules vivantes. Utilisé depuis plus d'un siècle et reconnu comme un excellent agent biocide, le rayonnement UV est extrêmement efficace dans la gamme [230-260] nm . (Mahfoudh.A.2010)

Les lampes U.V. d'un traitement d'eau par UV produisent des UV-C. Le nom signifie « au-delà du violet » (du latin ultra : « au-delà de »). Les UVC du soleil ne nous atteignent pas car elles sont complètement filtrées par l'atmosphère. Les lampes UV-C sont utilisées en laboratoire de biologie pour les effets germicides, Ces UV-C ont un rayonnement d'une intensité beaucoup plus grande que la lumière du soleil et sont utilisés dans le traitement de l'eau afin de la stériliser.

La filtration par UV peut tuer la majorité des bactéries et des virus présents dans l'eau. Cependant, ce type de traitement de l'eau ne permet pas de purifier totalement l'eau. En effet, elle ne permet pas de traiter l'eau contre les polluants chimiques par exemple. L'installation des systèmes ultra-violets de purification d'eau sont par conséquent combinés avec d'autres système de purification de l'eau, la lumière UV n'a généralement aucun impact sur le chlore, les métaux lourds, et d'autres contaminants chimiques.

Le traitement de l'eau UV offre beaucoup d'avantages par rapport à d'autres formes de traitement de l'eau pour les contaminants microbiologiques. D'une manière plus importante, il ne laisse aucun produit chimique dans l'eau, il ne produit aucun sous-produit, et il ne change pas le goût, le pH, ou d'autres propriétés de l'eau.

En conséquence, en plus de produire une eau potable sûre, il n'est pas nocif pour votre tuyauterie et fosse septique.

La purification d'eau par ultra-violet emploie une source de lumière UV (lampe) qui est enfermée dans une douille transparente protectrice (habituellement quartz). La lampe est montée de telle manière à ce que l'eau traverse le filtre par une chambre d'écoulement. L'eau est donc exposée aux rayons légers UV-C. Quand des microbes nocifs sont exposés aux rayons UV, leur acide nucléique absorbe l'énergie UV, qui brouille alors la structure d'ADN. La cellule est rendue stérile et ne peut plus se reproduire. La cellule est maintenant considérée comme morte et ne présente plus une menace.

Le traitement UV est un excellent choix pour éliminer la contamination biologique de la plupart des eaux. Nous rappelons donc la nécessité d'être combiné avec d'autres formes de filtration (adoucisseur, système de filtration anti-sédiments, osmose inverse...) pour la réduction de métaux lourds, le chlore et d'autres contaminants chimiques.

Il n'y a aucun micro-organisme connu résistant à l'Ultra violet, à la différence du traitement de l'eau au chlore. L'UV est connu pour être fortement efficace contre des bactéries, des virus, des algues. Dans la pratique, les bactéries et les virus sont la cause de nombreuses maladies pathogènes transportées par les eaux. De ces virus, le virus d'hépatite et la légionellose ont démontrés des facultés à survivre pendant des périodes considérables au traitement au chlore, mais sont aisément éliminés par un traitement UV. Pour la plupart des micro-organismes, l'efficacité des UV contre les contaminants microbiologiques tels que des bactéries et les virus dépasse généralement 99.99%.

Le traitement de l'eau par UV est très efficace (+ de 99,99%) contre les salmonelles (fièvre typhoïde), les salmonella enteritidis (gastroentérite), les vibrions cholériques (choléra), les tuberculoses de Mycobacterium (tuberculose), les pneumophila de Legionella (Légionellose), virus de la grippe, de poliomyélite, et Hepatitis.

## **II.5.RESULTATS ET DISCUSSION**

### **II.5.1. L'électrochloration :**

#### **Production du chlore actif *in situ* CA et les ions en solution IS :**

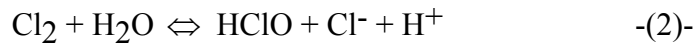
L'électrolyse des solutions aqueuses de chlorure de sodium conduit à des produits tels que le chlore, l'hydrogène, les hypochlorites ou les chlorates Cl<sub>2</sub>, HClO et ClO<sup>-</sup>. On utilise une solution de chlorure de sodium à 0,5 N

#### **A l'anode:**

Les ions chlorures sont oxydés en chlore



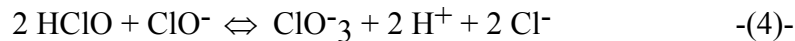
Une partie du chlore se dismute en donnant de l'acide hypochloreux et en libérant les protons  $H^+$ .



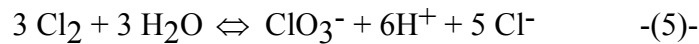
L'acide hypochloreux formé est un acide faible qui se dissocie en libérant les protons et des ions hypochlorites :



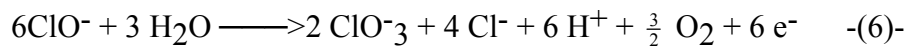
La présence d'acide hypochloreux et des ions hypochlorites donnent naissance à une troisième réaction purement chimique conduisant à la formation du chlorate:



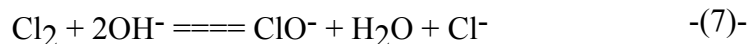
En combinant (2), (3), (4), on obtient:



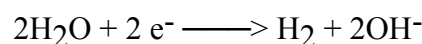
La formation des chlorates n'est pas souhaitable car elle entraînerait une diminution du rendement pratique du courant en ce qui concerne  $Cl_2$  et aussi, par ce que le chlorate formé pourrait être réduit à la cathode avec diminution également du rendement du courant mis en jeu dans le processus cathodique. Le chlorate peut aussi, se former par voie électrochimique à l'anode:



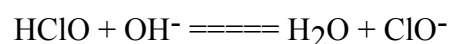
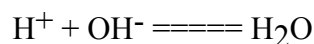
Une autre cause responsable de la chute du rendement du courant se manifeste quand les ions  $OH^-$  formés à la cathode migrent dans la région anodique. En premier lieu, ils peuvent prendre part à une réaction de décharge primaire provoquant une perte de courant correspondant au dégagement d' $O_2$  et éventuellement, aussi de gaz carbonique ce qui diminue la pureté du chlore. En plus la présence des radicaux  $OH^\cdot$  dans le milieu est responsable de réactions secondaires avec le chlore dissout:



**A la cathode:** il se produit la réduction de l'eau



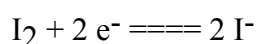
$HClO$  et  $H^+$  formés à l'anode d'une part,  $OH^-$  formé à la cathode d'autre part, diffusent vers la solution et réagissent pour former du  $H_2O$  et  $ClO^-$ :



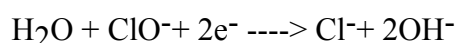
Il s'établit un gradient de pH de l'anode milieu acide, à la cathode milieu basique. Les réactions électrochimiques qui ont lieu aux électrodes sont représentés dans le diagramme pH - tension de Pourbaix. Les réactions électrochimiques susceptibles de se produire aux électrodes pour le système (Cl<sup>-</sup> - H<sub>2</sub>O), représentées par le diagramme de Pourbaix, dépendent du potentiel imposé et du pH de la solution. Il ressort de ce diagramme que l'oxydation des chlorures en solution suffisamment acide conduit à la formation du chlore gazeux. En solution neutre ou alcaline, elle conduit à la formation des dérivés oxygénés du chlore. Il apparaît alors clairement qu'à potentiel constant, les réactions électrochimiques qui ont lieu aux interfaces des électrodes et les transformations chimiques consécutives dépendent en grande partie du pH.

#### **Analyse quantitative du chlore actif obtenu:**

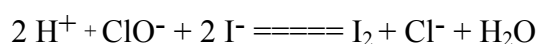
L'analyse du chlore d'électrolyse a été effectuée par iodométrie. Le fait que le but de notre travail concerne l'effet biocide du chlore actif de manière globale. Le recours aux autres techniques plus complexes serait justifié si l'on se propose de différencier l'effet biocide des divers composés chlorés. Elle est basée sur le pouvoir oxydant du couple I<sub>2</sub>/2I<sup>-</sup>



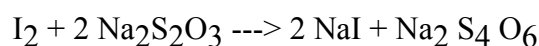
Etant donné que le potentiel du couple redox ClO<sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup> mis en cause dans la réaction



est égal à 0,90/ qui est supérieur au potentiel du couple I<sub>2</sub>/2I<sup>-</sup> (+0,54/), les ions hypochloreux oxydent les iodures en présence d'un milieu acide et donnent naissance à l'iode libre I<sub>2</sub> d'après la réaction suivante :



L'iode formé est titré par une solution de thiosulfate de sodium Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.5 H<sub>2</sub>O d'après la réaction :



Pour cette réaction l'indicateur coloré utilisé est l'amidon.

#### **Les réactifs utilisés sont:**

Solution contenant du chlore actif à analyser

Solution d'iodure de potassium KI à 10%

Acide chlorhydrique à 2 N

Solution d'amidon 0,5%

Solution de thiosulfate de sodium à  $2 \cdot 10^{-3}N$

**Mode opératoire:**

Dans une fiole conique de 250 ml, on verse 25 ml de la solution à doser puis on ajoute 5 ml de la solution de KI, puis 10 ml d'acide chlorhydrique, on laisse reposer le mélange 5 minutes tout en le fermant hermétiquement et en l'agitant. Le mélange est titré par une solution de thiosulfate de sodium. Quand la couleur devient jaune paille, on ajoute quelques gouttes d'amidon, qui donnent une coloration bleue, on continue alors le titrage jusqu'à décoloration complète. A la fin du titrage, on fixe le volume du titrant et on calcule la normalité du chlore actif selon la formule classique :  $N_1 V_1 = N_2 V_2$

$$N_{(\text{thiosulfate})} \cdot V_{(\text{thiosulfate})} = N_x \cdot V_{\text{échantillon}}$$

$$N_{(\text{thiosulfate})} = \text{Normalité du thiosulfate de sodium } 2 \cdot 10^{-3}N.$$

$$V_{(\text{thiosulfate})} = \text{Volume du titrant inscrit sur la burette}$$

$$V_{(\text{échantillon})} = \text{Volume de la solution à doser}$$

$$N_x = \text{Normalité du chlore actif}$$

La concentration du chlore actif est donnée par la formule :

$$T_{\text{chlore actif/Cl}} = \frac{N_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \cdot V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \cdot 35,45}{1000 \cdot V_{\text{échantillon}}}$$

**II.5.2. Matériels et méthodes :**

Pour l'électrochloration on a besoin d'un Voltalab 40 (Radiometer Analytical, France), équipée d'une cellule d'électrolyse traditionnelle qui est constituée de trois électrodes:

- Une électrode de travail, soit en Platine ou en acier inox AISI 430, dont la composition chimique (% en poids) est représentée au tableau II.1.
- Une électrode de référence en Ag / AgCl .
- Une électrode auxiliaire en graphite.

**Tableau II.1 :** Composition chimique de l'acier AISI430.

Nuance %	C	Mn	Si	P	S	Cr	Ni	Mo
AISI430	0,062	0,941	0,331	0,024	0,0015	16,618	4,206	0,737

L'électrode en acier inoxydable AISI430 a une section circulaire de 1,77 cm<sup>2</sup>, et une épaisseur de 1 cm. L'alliage à 17% de Chrome, nous a été délivré sous forme de barreaux, que nous avons usinés pour ramener le diamètre à 1,5 cm. Pour minimiser les risques de corrosion caverneuse, les échantillons sont d'abord vernis sur les faces non utiles, avant d'être enrobés dans une résine. Le polissage de finition est effectué avec du papier abrasif SiC (de classe 180 à 1200). La surface de travail est dégraissée à l'acétone, lavée, puis rincée à l'eau distillée. Un fil de cuivre avec un diamètre de 1 mm est soudé sur la face opposée à la surface de travail pour permettre le raccordement électrique. L'ensemble est incorporé dans une résine époxy, laissant libre que la surface de travail.

**Milieu d'étude :**

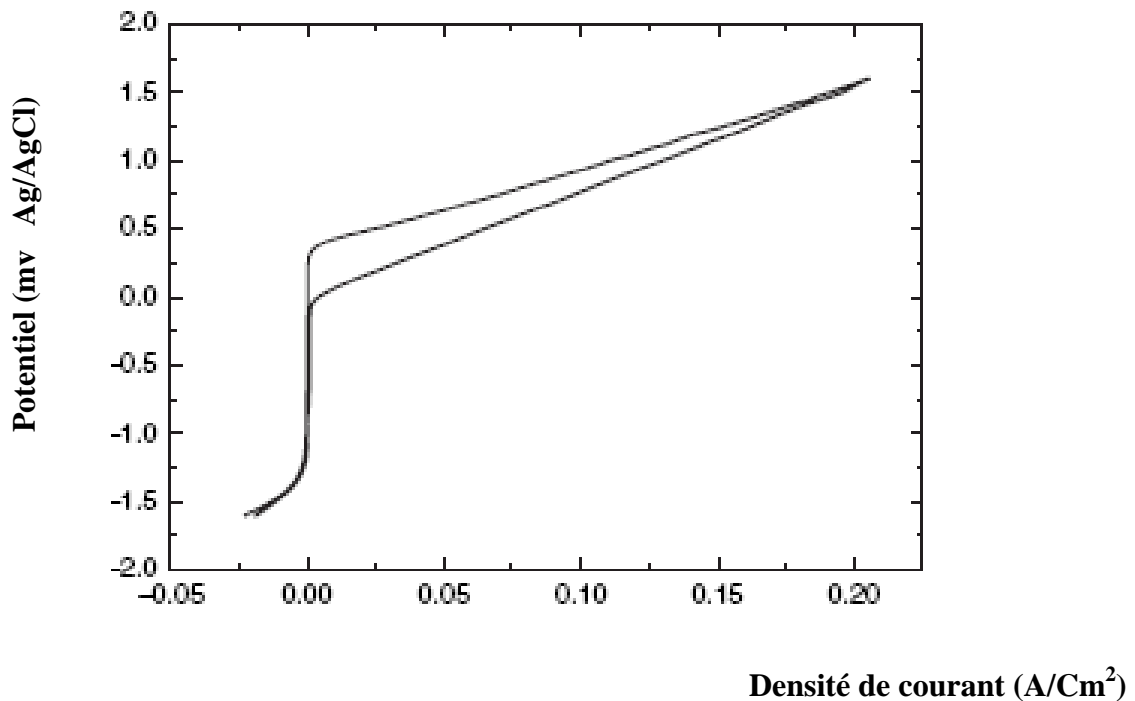
Les essais ont été effectués dans des conditions d'aération sans agitation. La solution chlorurée à 0.5N est préparée à partir de réactif de qualité chimique pure.

**Dispositif expérimental:**

Les mesures électrochimiques sont réalisées à l'aide d'un montage classique à trois électrodes. L'électrode auxiliaire est en graphite, l'électrode de référence est une électrode Ag /AgCl ; dont le potentiel par rapport à l'électrode normale à hydrogène est 0,80V à 20°C. L'acier d'étude constitue l'électrode de travail. Nous avons utilisé le même montage pour le tracé des courbes de polarisation potentiocinétique.

**Etude du comportement de l'acier AISI 430 vis-vis de la corrosion en milieu chloruré :**

Le comportement de l'acier inoxydable AISI430 vis-à-vis de la corrosion a été étudié en traçant la courbe de polarisation potentiocinétique cyclique dans une solution de NaCl à 0,5 N , à une vitesse de balayage de 12 mV/min dans l'intervalle (-1000 mV à 1600 mV) pendant 15 min .



**Figure II.3.** Courbe potentiocinétique cyclique de l'acier inoxydable AISI 430 dans une solution à 0.5N de NaCl

En milieu chloruré, dans des conditions de polarisation anodique supérieures à des valeurs de potentiel de rupture, les aciers inoxydables sont susceptibles à la corrosion par piqûres. Cependant, il existe un domaine de potentiel connu sous le nom de domaine de passivité parfaite où les piqûres préalablement formées se repassivent. Ce caractère de comportement nous permet d'espérer une application pratique de ces aciers en travaillant en régime de potentiel pulsée bipolaire. La courbe obtenue lors du balayage retour effectué lorsque le courant anodique atteint une valeur de  $150 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ , rencontre la courbe allée sur le palier de passivité.

Les deux valeurs de potentiels caractéristiques sont:

- Potentiel de rupture ou de piqûration, ( $E_R$ ).
- Potentiel de protection ( $E_{\text{prot}}$ ).

La connaissance de ces deux potentiels permet de prédire le comportement du métal sous différentes conditions de polarisation.



Nous pouvons définir 3 domaines de comportement : domaine de passivité parfaite ; domaine de passivité imparfaite et le domaine d'attaque.

L'envergure de l'hystérésis obtenue lors du balayage aller -retour caractérise la susceptibilité du matériau aux phénomènes de corrosion caverneuse.

L'existence d'un domaine de passivité parfaite de large étendue permet d'envisager la possibilité de pouvoir repasser des piqûres préalablement formées à des potentiels imposés supérieurs au potentiel de rupture.

Il s'agira plus précisément, de travailler en régime de polarisation pulsé, où l'on formera du chlore lors d'un pulse à une valeur de potentiel supérieure au potentiel d'équilibre du chlore (+ 1600 mV/Ag/AgCl). Parallèlement à ce processus d'électrolyse souhaité, on assistera à la formation de piqûres, qui pourront être alors repassivées à l'issue du "pulse cathodique" à un potentiel relevé dans le domaine de passivité parfaite.

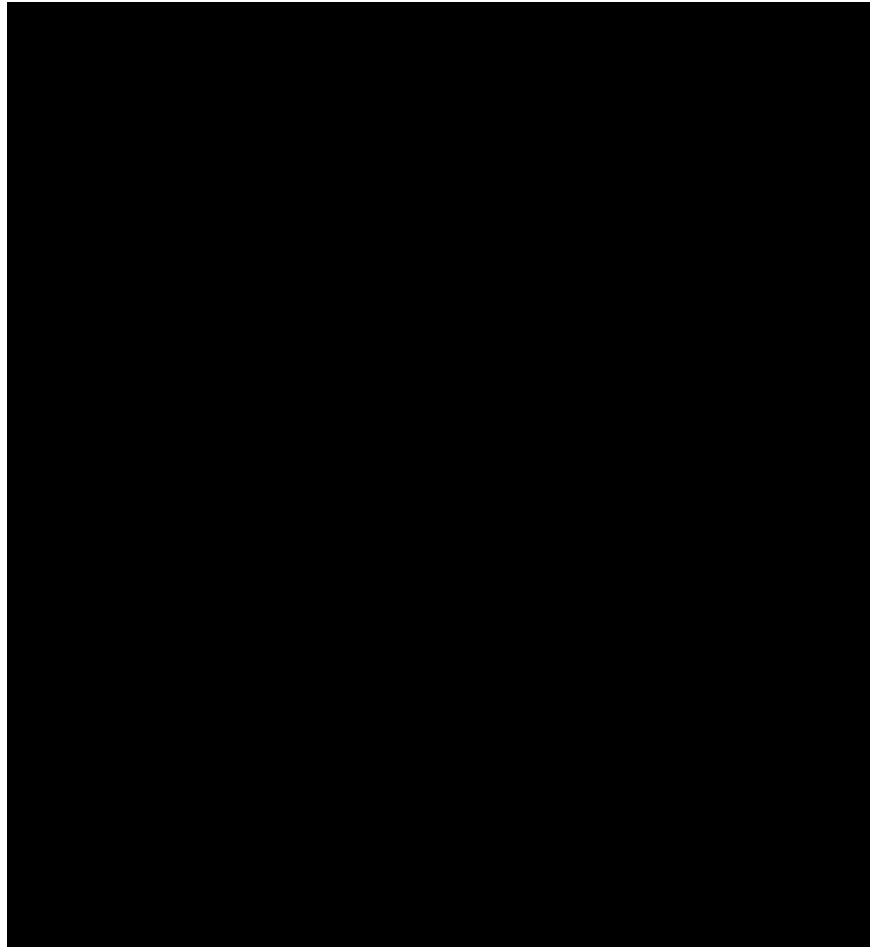
La valeur du potentiel de rupture  $E_R$  obtenue, est de + 0.38 V, correspondant à une densité de 0,18 A/cm<sup>2</sup>. De la même façon le cycle d'hystérésis est formé avec le potentiel de protection  $E_P = - 0,42$  V ; Un domaine important de passivité parfaite est enregistré. Par conséquent, le potentiel de corrosion  $E_C = -0,62$  V se trouve entre les deux potentiels de protection et de rupture.

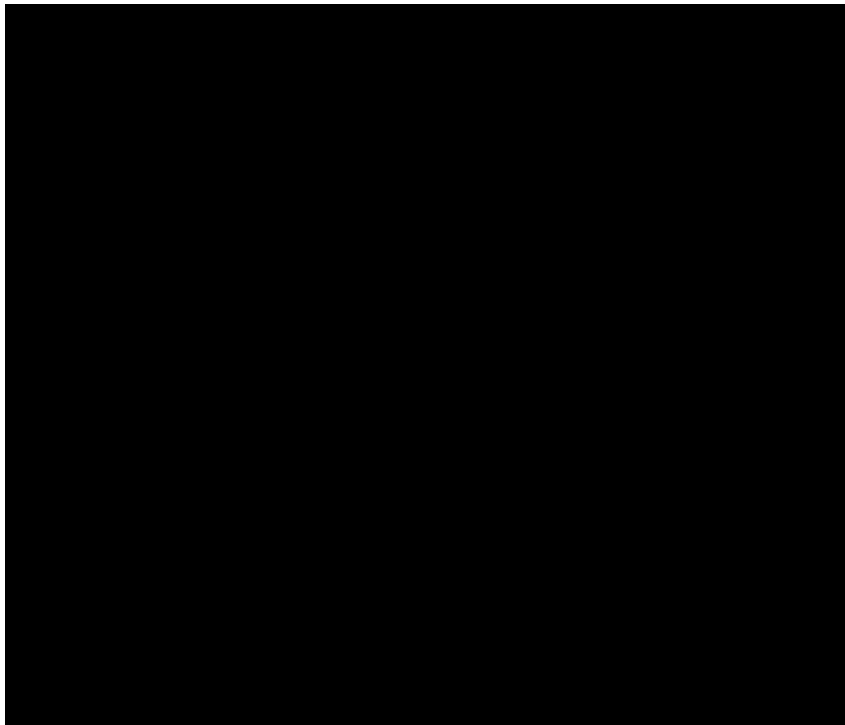
Cette caractéristique en acier inoxydable confère à l'électrode, l'aptitude à la corrosion par piqûres repassivées qui devraient être formées au cours des impulsions anodiques lors de la formation du chlore actif. Quand la composante faradique diminue, la vitesse de corrosion diminue en parallèle avec l'augmentation de la fréquence, à la suite des conditions de formation du chlore actif.

La comparaison des vitesses de corrosion dans tout l'intervalle de fréquences d'étude montre que la réduction de la vitesse de corrosion est d'autant plus grande que les fréquences sont élevées. Ce résultat est prévisible étant donné que pour les hautes fréquences, les ions passés en solution n'ont pas le temps de diffuser au sein de l'électrolyte. Leur présence à l'interface métal/électrolyte facilite d'avantage le processus de redéposition.

Pendant l'électrolyse nous constatons que la quantité du chlore actif produite augmente à chaque fois que la fréquence augmente (Figure II.4). Puisque le potentiel cathodique est très

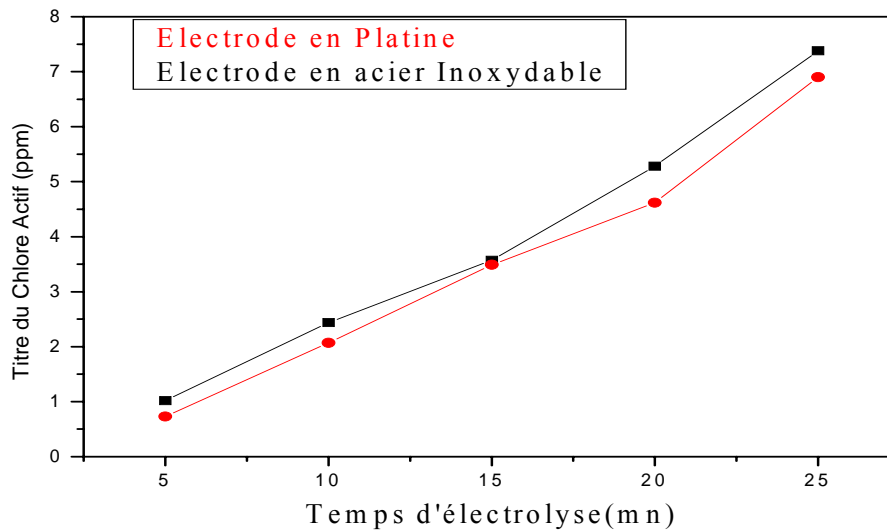
électro-négatif, le phénomène électrochimique de réduction du chlore est prépondérant, et contrôle alors la formation du chlore actif. La réaction de réduction du chlore régie par un mécanisme diffusionnel est d'autant plus incomplète que les fréquences sont élevées, ce qui conduit globalement à une augmentation en chlore aux hautes fréquences. Il faut également tenir compte des ions passés en solution qui sont susceptibles de participer à la réaction cathodique et de ce fait, ralentir la réaction de réduction du chlore et participer indirectement à l'augmentation de la formation de ce dernier.





D'après les résultats illustrés dans les figure II .4 et II.5, nous constatons que l'utilisation de l'acier inoxydable AISI430 comme électrode de travail pour l'Electrochloration, en travaillant en régime de potentiel bipolaire pulsé, est efficace et peut remplacer d'autre matériaux nobles utilisés comme électrode de travail tel que le Platine.

D'après la figure II .4, nous remarquons clairement que la quantité de chlore produite en utilisant l'acier AISI430 est satisfaisante, en parallèle la figure II .5 montre, que la vitesse de corrosion diminue à chaque fois que la fréquence augmente et à chaque fois que la quantité de chlore produite augmente, donc nous pourrions dire que l'acier AISI430 se repassive aussi. La figure II.6 montre que l'utilisation d'une électrode de platine et l'utilisation d'une électrode AISI430 donne les mêmes quantités de chlore actif dans une même durée de temps .D'après les résultats obtenues et illustrée dans les figures II.4, II.5, et II.6, nous remarquons que l'acier AISI430 se comporte lors de l'Electrochloration en régime bipolaire pulsée comme un matériau noble. Les considérations économiques et chimiques donnent à l'acier inoxydable AISI430 la priorité d'être utilisé comme électrode de travail.



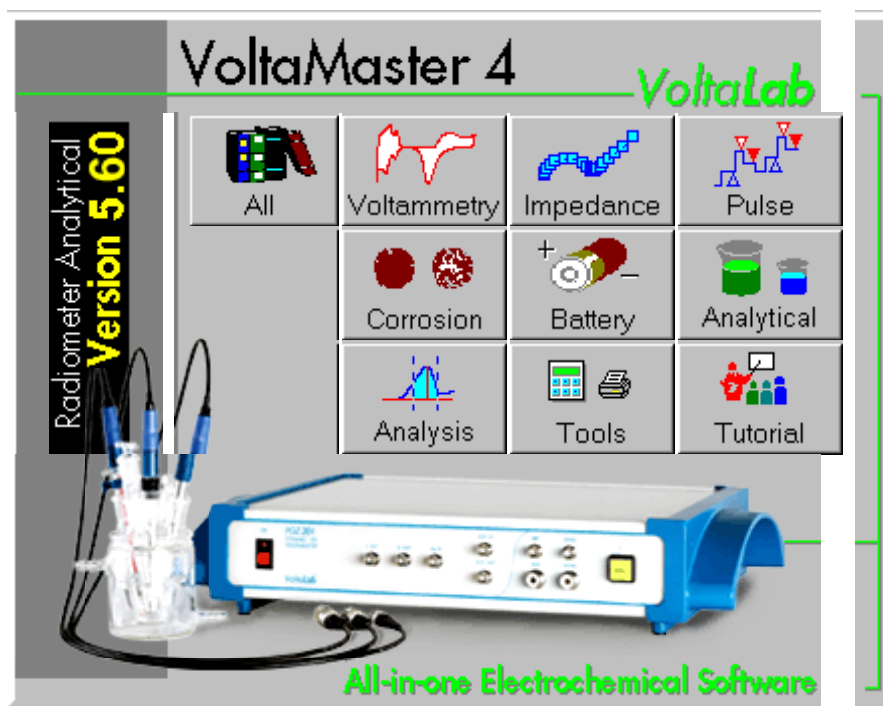
**Figure II.6 :** Variation du titre du Chlore actif en fonction du temps d'électrolyse sous un régime de PBP

Les staphylocoques coagulase positive et les staphylocoques coagulase négative sont des bactéries très résistantes à la dessiccation, aux variations de température et au choc osmotique. Dans le chapitre I, nous avons consacré une bonne partie pour mieux connaître ce genre de bactéries : leurs pathologies, leurs résistances aux agents antimicrobiens ...etc.

Dans cette étude nous avons mis au point l'inactivation des bactéries staphylocoques coagulase négative et positive en utilisant différents traitements biocide : champ électrique (CE), Chlore actif (CA) et des ions métalliques (principalement: Fe, Cr et Ni) en solution (I.S) au cours de l'Electrochloration. Les traitements biocides ont été effectués dans les mêmes conditions que l'Electrochloration. La combinaison des traitements biocides précédents, a été effectuée sur une solution de NaCl à 0.5 N contaminée par des staphylocoques. Chaque expérience a été vérifiée au moins trois fois. La moyenne est alors calculée.

### Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental utilisé pour la désinfection par Electrochloration, est un Voltalab 40 assisté par ordinateur et relié à une cellule électrochimique à trois électrodes.



**Figure II.7.** : Dispositif expérimental

- Electrode de travail en Platine à fil de marque Radiometer Analytical SA, Lyon, France./Acier inoxydable AISI430.
- Electrode de référence du type Ag/AgCl de marque Radiometer Analytical SA, Lyon, France.
- Electrode auxiliaire en graphite de marque Radiometer Analytical SA, Lyon, France.

Le temps d'électrolyse étant maintenu constant à 30 mn pour l'ensemble des essais.

### II.5.3.Méthodes de traitements biocides

Nous avons procédé à la désinfection de l'eau contaminée par les Staphylocoques Coagulase Positive par la contribution synergique des effets biocides par différentes combinaisons à savoir :

- Champ électrique (CE)
- Champ électrique / Chlore actif (CE) et (AC)
- Champ électrique / Chlore actif / Ions passés en solution. (CE),(AC) et (IS)

Ces traitements ont été effectués en régime de potentiel bipolaire pulsé de (-1000 à +1600) m V, pour des fréquences de  $(10^{+4}-10^{+4}) s^{-1}$ .

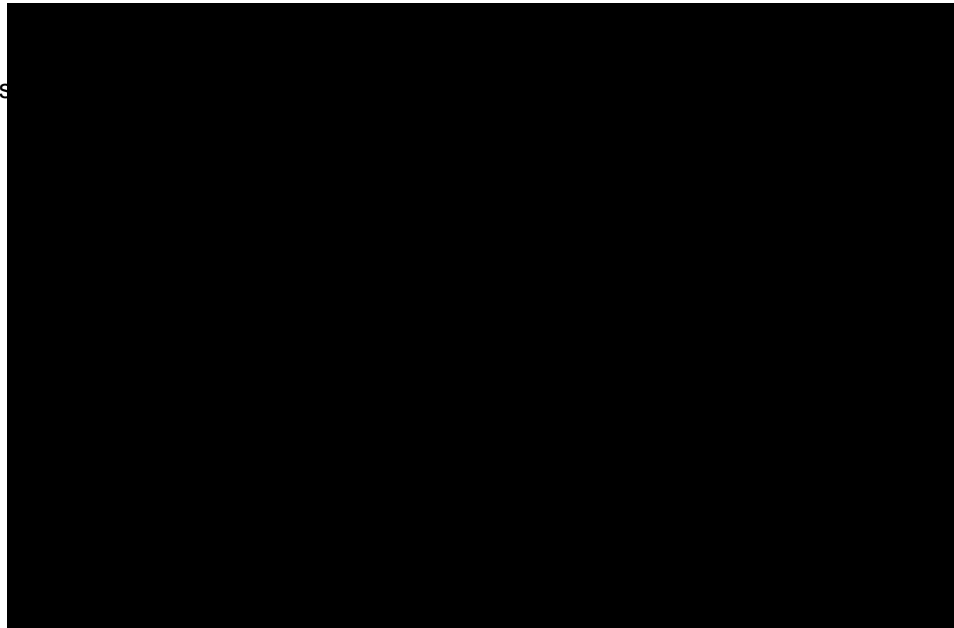
L'effet de l'inactivation des cellules bactériennes en fonction du temps de contact (durée du traitement biocide appliqué à la solution) est évalué par une numération bactérienne au cours du temps par rapport au nombre initial de cellules.

Les résultats de l'inactivation des staphylocoques coagulase positive obtenus sont rassemblés dans les tableaux II.2 ; II.3 et II.4.

**Tableau II.2:** Effets synergiques des traitements biocides sur les Staphylocoques Coagulase Positive

Flacon	Phénomènes	Potentiels	T (mn)	Nombre de Staphylocoques Coagulase Positive /1ml	Electrodes de travail	[Cl <sup>-</sup> ] (ppm)
R				1600.10 <sup>+4</sup>		
01	Champ électrique	Pulsé (- 1000 ÷ + 1600 ) mV 10 <sup>+4</sup> 10 <sup>+4</sup> (s <sup>-1</sup> )	5	400 .10 <sup>+4</sup>	Platine	/
			10	210.10 <sup>+4</sup>		
			15	120.10 <sup>+4</sup>		
			20	0		
02	-Chlore actif -Champ électrique	Pulsé (- 1000 ÷ + 1600 ) mV 10 <sup>+4</sup> 10 <sup>+4</sup> (s <sup>-1</sup> )	5	280.10 <sup>+4</sup>	Platine	0,56
			10	105.10 <sup>+4</sup>		1,42
			15	40.10 <sup>+4</sup>		2,98
			20	0		4,40
			25	0		
			30	0		
03	Chlore actif Champ électrique Ions passés en solution	Pulsé (- 1000 ÷ + 1600 ) mV 10 <sup>+4</sup> 10 <sup>+4</sup> (s <sup>-1</sup> )	5	284.10 <sup>+4</sup>	Inox	8,52
			10	180.10 <sup>+4</sup>		
			15	90.10 <sup>+4</sup>		
			20	25.10 <sup>+4</sup>		
			25	0		
			30	0		
04	- Champ électrique - Ions passés en solution	Pulsé (- 1000 ÷ + 1600 ) mV 10 <sup>+4</sup> 10 <sup>+4</sup> (s <sup>-1</sup> )	5	290.10 <sup>+4</sup>	Inox	/
			10	230.10 <sup>+4</sup>		
			15	180.10 <sup>+4</sup>		
			20	150 .10 <sup>+4</sup>		
			25	120.10 <sup>+4</sup>		
			30	0		

Nbre.de  
Staphylocoques  
Coagulases  
Positives/1ml  
 $10^{+4}$



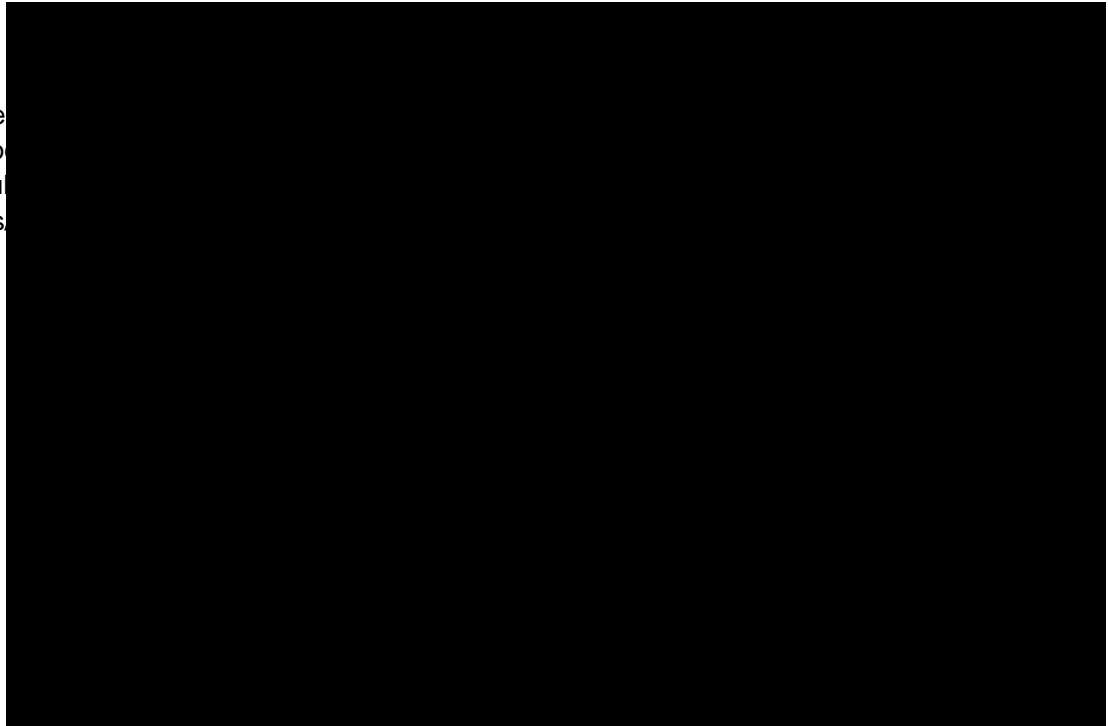
de contact  
(mn)

**Figure II.8.:** Influence de la polarisation Pulsée (-1000 ÷ +1600)mV aux fréquences ( $10^{+4}$ - $10^{+4}$ )  $s^{-1}$  sur le nombre de Staphylocoques Coagulase Positive en fonction du temps de contact.

**Tableau II.3.:** Effets synergiques des traitements biocides sur les Staphylocoques Coagulase Positive.

Flacons	Phénomènes	Potentiels	Temps de contact (mn)	Nombre de Staphylocoques Coagulase Positive /1ml	Electrodes de travail	[Cl <sup>-</sup> ] (ppm)
R				$960.10^{+4}$		
01	Champ électrique	Pulsé (- 1000 ÷ + 1600 ) mV $10^{+4}$ $10^{+4}$ (s <sup>-</sup> ) 1)	5	$250.10^{+4}$	Platine	/
			10	$190.10^{+4}$		
			15	$80.10^{+4}$		
			20	0		
02	Chlore actif Champ électrique	Pulsé (- 1000 ÷ + 1600 ) mV $10^{+4}$ $10^{+4}$ (s <sup>-</sup> ) 1)	5	$210.10^{+4}$	Platine	0,56
			10	$140.10^{+4}$		1,42
			15	$40.10^{+4}$		2,98
			20	0		4,40
03	Chlore actif Champ électrique Ions passés en solution	Pulsé (- 1000 ÷ + 1600 ) mV $10^{+4}$ $10^{+4}$ (s <sup>-</sup> ) 1)	5	$536.10^{+4}$	Inox	8,52
			10	$250.10^{+4}$		
			15	$120.10^{+4}$		
			20	$60.10^{+4}$		
			25	0		
04	- Champ électrique - Ions passés en	Pulsé (- 1000 ÷ + 1600 ) mV $10^{+4}$ $10^{+4}$ (s <sup>-</sup> ) 1)	5	$580.10^{+4}$	Inox	/
			10	$384.10^{+4}$		
			15	$220.10^{+4}$		
			20	$90.10^{+4}$		

Nbre  
Staphylo  
Coagu  
Positives  
4



	solution	1)	25	0		
--	----------	----	----	---	--	--

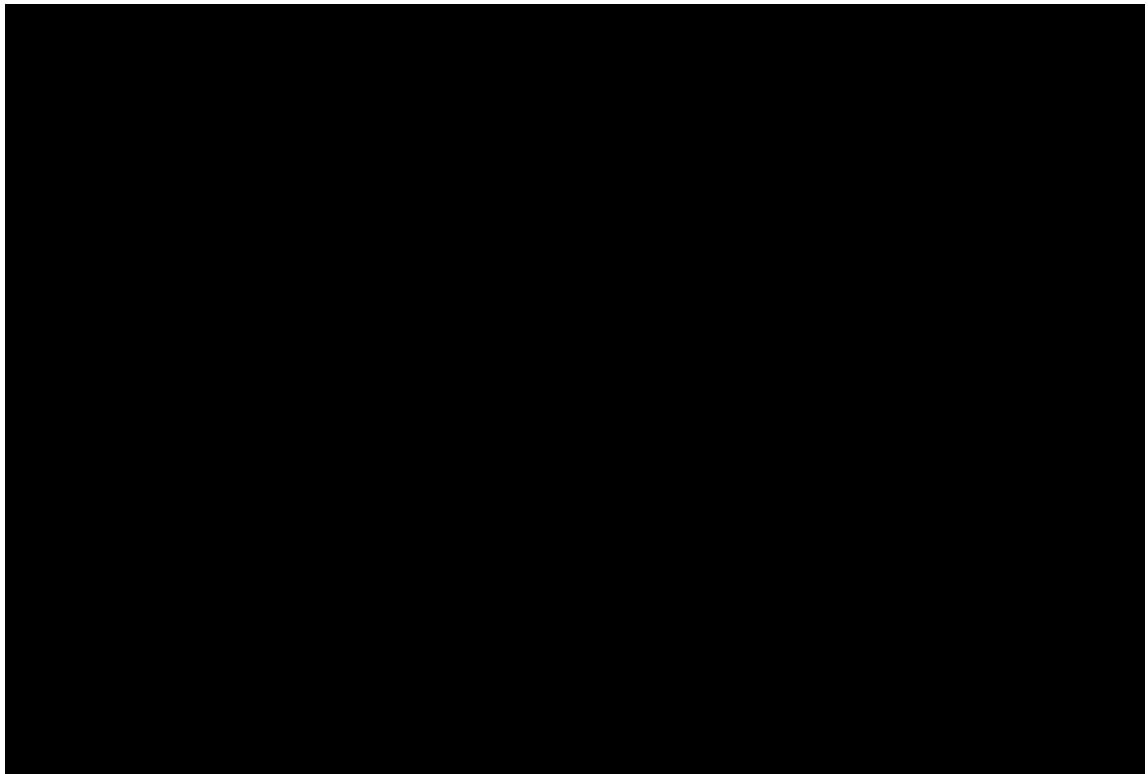
**Figure II.9. :** Influence de la polarisation Pulsée (-1000 ÷ +1600) mV aux fréquences ( $10^{+4}$ - $10^{+4}$ ) s<sup>-1</sup> sur le nombre de Staphylocoques Coagulase Positive en fonction du temps de contact

**Tableau II.4:** Effets synergiques des traitements biocides sur les Staphylocoques Coagulase Positive

Flacons	Phénomènes	Potentiels	Temps de contact (mn)	Nombre de Staphylocoques Coagulase Positive /1ml	Electrodes de travail	[Cl <sup>-</sup> ] (ppm)
R				960.10 <sup>+4</sup>		
01	Champ électrique	Pulsé (- 1000 ÷ + 1600 ) mV 10 <sup>+4</sup> 10 <sup>+4</sup> (s <sup>-1</sup> ) 1)	5	400 .10 <sup>+4</sup>	Platine	/
			10	210.10 <sup>+4</sup>		
			15	60.10 <sup>+4</sup>		
			20	0		
02	Chlore actif Champ électrique	Pulsé (- 1000 ÷ + 1600 ) mV 10 <sup>+4</sup> 10 <sup>+4</sup> (s <sup>-1</sup> ) 1)	5	350.10 <sup>+4</sup>	Platine	0,56
			10	200.10 <sup>+4</sup>		1,42
			15	40.10 <sup>+4</sup>		2,98
			20	0		4,40
03	Chlore actif Champ électrique Ions passés en solution	Pulsé (- 1000 ÷ + 1600 ) mV 10 <sup>+4</sup> 10 <sup>+4</sup> (s <sup>-1</sup> ) 1)	5	500.10 <sup>+4</sup>	Inox	8,52
			10	260.10 <sup>+4</sup>		
			15	90.10 <sup>+4</sup>		
			20	20.10 <sup>+4</sup>		
			25	0		
04	- Champ	Pulsé	5	520.10 <sup>+4</sup>	Inox	/



			10	$390.10^{+4}$		
			15	$180.10^{+4}$		
			20	$60.10^{+4}$		



	électrique - lons passés en solution	(- 1000 ÷ + 1600 ) mV $10^{+4}$ 1)	$10^{+4}$ (s <sup>-</sup>	25	$0.10^{+4}$		
--	---	---	---------------------------	----	-------------	--	--

**Figure II.10.** : Influence de la polarisation Pulsée (-1000 ÷ +1600) mV aux fréquences ( $10^{+4}$ - $10^{+4}$ ) s<sup>-1</sup> sur le nombre de Staphylocoques Coagulase Positive en fonction du temps de contact.

D'après les résultats réunies dans les tableaux II.2, II.3, et II.4. , nous remarquons que la meilleur combinaison de traitement biocide est celle du champ électrique –chlore actif. L'inactivation totale des germes est obtenue au bout de 20 minutes seulement .L'efficacité de l'inactivation  $\alpha$  peut être déterminée par :  $\alpha = \frac{N_0 - N}{N_0}$  .

Où  $N_0$  est le nombre initial de bactéries ;

et  $N$  est le nombre de bactéries après la désinfection.

Temps de contact (mn)

L'inactivation total est obtenue après un temps de contact de 20 min, comme le montre les figures II.8. , II.9., et II.10.

Nous avons procédé à la désinfection de l'eau, contaminée par les Staphylocoques Coagulase Positive par la contribution synergique des effets biocides par différentes combinaisons en régime de polarisation pulsée (-1000 -+1600) m V aux fréquences ( $10^{+4}$ - $10^{+4}$ ) s<sup>-1</sup>.

1-Traitement biocide par le champ électrique, en utilisant comme électrode de travail une électrode en platine et comme électrolyte, de l'eau distillée stérilisée.

2-Traitement biocide combiné:

- Champ électrique.
- Chlore actif.

En utilisant comme électrode de travail une électrode en platine et comme électrolyte une solution de NaCl à 32 g/l stérilisée.

3-Traitement synergique:

- Champ électrique.
- Chlore actif.
- Ions en solution.

Dans ce cas, on utilise comme électrode de travail, une électrode en acier inoxydable AISI430 et comme électrolyte une solution de NaCl à 32 g/l.

En utilisant les résultats réunis dans les tableaux II2, II3, II4, nous pouvons comparer l'efficacité des traitements biocides effectués en calculant l'efficacité  $\alpha$ . Le tableau II.5 montre l'efficacité des traitements biocides en régime PBP après un temps de 15 minutes.

**Tableau II.5. :** Calcul des efficacités des traitements biocides en régime PBP après un temps de 15 minutes.

Nombre initial de Staphylocoques Coagulase Positive	Efficacité du champ électrique à E pulsé	Efficacité du champ électrique et du chlore actif	Efficacité du champ électrique et du chlore actif et des ions en solution
$1600.10^{+4}$	92.50%	94.37%	94.37%
$960.10^{+4}$	91.66%	95.83%	87.5%
$960.10^{+4}$	93.75%	95.83%	90.62%

<b>MOYENNE</b>	92.63%	95.34%	90.83%
----------------	--------	--------	--------

D'après les résultats obtenus représentés sur les figures (II.8,II.9,et II.10) correspondants aux tableaux (II.2,II.3,et II.4) , nous avons constaté que parmi les trois traitements suscités, les deux meilleurs sont ceux du champ électrique seul, et de la combinaison du champ électrique et le chlore actif avec une inactivation totale de 100% pour un temps de contact de 20mn ; par contre, le troisième traitement biocide qui consiste en la combinaison du champ électrique -chlore actif et ions en solution, l'efficacité moyenne n'est que de 90,83% pour le même temps de contact.

En conséquence des éléments sus indiqués, nous pouvons classer les effets biocides en régime pulsé (-1000 - +1600) mV aux fréquences ( $10^{-4}$  -  $10^{+4}$ )s<sup>-1</sup> pour un temps de contact de 15 mn et selon leurs efficacités comme suit :

Champ électrique - Chlore actif :	96,38%
Champ électrique :	92,63%
Champ électrique -Chlore actif - Ions en solution :	90,83%
Champ électrique - Ions en solutions :	82,36%

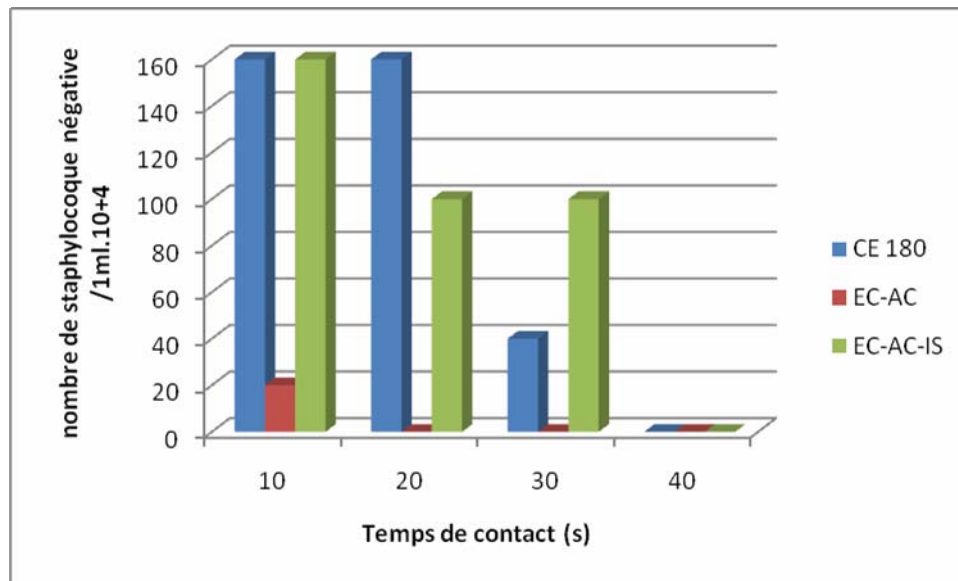
**Contribution synergique des effets biocides à la décontamination des eaux infectées par les Staphylocoques Coagulases Négatives :**

Les mêmes expériences seront reproduite pour les bactéries staphylocoques coagulase négatives .

**Tableau II .6. :** Effets synergiques des traitements biocides sur les Staphylocoques Coagulase Négative (SCN).

Flacon	Phénomènes	Potentiels	Temps de contact/ (s)	Nombre de SCN /1ml	Electrodes de travail
01	Champ électrique	Pulsé (- 1000 ÷ + 1600 ) mV $10^{+5}$ $10^{+5}$ (s <sup>-1</sup> )	NT	18.10 <sup>5</sup>	Platine
			10	16.10 <sup>5</sup>	
			20	16.10 <sup>5</sup>	
			30	4.10 <sup>5</sup>	
			40	0	
02	- Chlore actif - Champ électrique	Pulsé (- 1000 ÷ + 1600 ) mV $10^{+5}$ $10^{+5}$ (s <sup>-1</sup> )	10	2.10 <sup>5</sup>	Platine
	20		0		
	30		0		
	40		0		
03	- Chlore actif - Champ électrique - Ions passés en solution	Pulsé (- 1000 ÷ + 1600 ) mV $10^{+5}$ $10^{+5}$ (s <sup>-1</sup> )	10	16.10 <sup>5</sup>	Inox
	20		10.10 <sup>5</sup>		
	30		10.10 <sup>5</sup>		
	40		0		
04	- Champ électrique - Ions passés en	Pulsé (- 1000 ÷ + 1600 ) mV $10^{+5}$ $10^{+5}$ (s <sup>-1</sup> )	10	8.10 <sup>5</sup>	Inox
	20		2.10 <sup>5</sup>		
	30		2.10 <sup>5</sup>		

	solution		40	$2.10^5$	
--	----------	--	----	----------	--



**Figure II.11.** : Influence de la PBP ( $-1000 \div +1600$ )m V ,aux fréquences ( $10^{+5}$ - $10^{+5}$ )  $s^{-1}$  sur le nombre de Staphylocoques Coagulase Négative en fonction du temps de contact .

### II.5.5. Interprétations des résultats

Les résultats obtenus sur la figure II.11. correspondant au tableau II.6, mettent en évidence les effets synergiques des traitements biocides sur les Staphylocoques Coagulase Négative, en polarisation pulsée de ( $- 1000 \div + 1600$ ) mV, aux fréquences ( $10^{+5}$ - $10^{+5}$ )  $s^{-1}$ , et nous amène à les classer selon leurs efficacités croissantes à savoir:

1-Traitement biocide par le champ électrique et dans ce cas nous avons utilisé de l'eau distillée stérilisée comme électrolyte et comme électrode de travail une électrode en Platine.

2-Traitement biocide combiné le champ électrique, le chlore actif et les ions passés en solution dans ce cas l'électrolyte utilisé est une solution de NaCl à 32g/l stérilisée et comme électrode de travail une électrode en acier inoxydable à 17% Cr.

3- Traitement biocide combiné ,le champ électrique et les ions passés en solution et dans ce cas l'électrolyte utilisé ,est une eau distillée et stérilisée et comme électrode de travail une électrode en acier inoxydable à 17%Cr .

4-Traitement biocide combiné le champ électrique et le chlore actif et dans ce cas l'électrolyte utilisé est une solution de NaCl à 32g/l stérilisée et comme électrode de travail une électrode en Platine.

Il est à noter que les temps de contact sont infiniment petits de l'ordre des secondes.

Pour un temps de contact de 40s l'inactivation est totale sauf pour le troisième traitement suscité.

## **Conclusion**

Dans ce travail, les expériences sont réalisées sur l'effet de la désinfection de l'eau contaminée par des Staphylococcus Coagulase Positive (SCP) et les Staphylocoques Coagulase Négative (SCN). Plusieurs traitements sont utilisés sous polarisation bipolaire pulsé (PBP): champs électrique (CE), chlore actif (CA) formé dans une solution de NaCl 0,5 N, et des ions en solution (IS) en utilisant l'acier inoxydable AISI430 comme électrode de travail. Cependant, après l'observation des résultats des deux bactéries SCP et SCN, nous remarquons qu'ils ont des sensibilités spécifiques selon le type de traitement et le types de bactérie. Une plus grande efficacité d'inactivation de SCP et SCN est obtenue avec effets synergiques des traitements biocides CE-CA .Le traitement biocide par la combinaison de CE-AC-IS est moins efficace que les autres effets. Le temps d'inactivation des deux bactéries varie de l'une à l'autre; l'inactivation des bactéries SCN est complète en 30 secondes seulement, alors que pour les SCP exige un temps de contact de 20 minutes avant d'atteindre une inactivation complète. Le comportement électrochimique de l'acier inoxydable AISI430 au cours de l'électrochloration à différentes fréquences a été étudié .La valeur du potentiel très électropositif de formation du chlore conduit à un phénomène de piqûration. Nous avons formé du chlore en régime PBP à des fréquences de  $(10^{-4}-10^{+4}) s^{-1}$ .

Dans ces conditions, les piqûres développées, lors de la formation du chlore à un potentiel anodique, seraient repassivées à l'issue du pulse cathodique à un potentiel relevé dans le domaine de passivité parfaite.

Les résultats obtenus ont permis de constater que la vitesse de corrosion diminue de manière notable pour les hautes fréquences, pour lesquelles la formation du chlore actif augmente considérablement.

Ce présent travail a fait l'objet d'une publication dans la revue Américaine « Sensors Letters » dont le facteur impact est de 1,587 en 2007.

## Références bibliographiques

**Abderrahmane S. (2005).** Thèse « Traitements biocides par Electrochloration et réalisation d'un capteur de corrosion à fibre optique » Université Badji-Mokhtar Annaba Algérie.

**Abderrahmane S., Himour A. and Ponsonnet L. (2008).** Inactivation of *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa* by electrochloration under bipolar pulsed polarization . *Materials Science and Engineering:C28(5-6) :901-905.*

**Allion A. (2004).** *Environnement des Bactéries et Sensibilité aux Biocides* ;pp 20-24-38-40-45.

**Akiyama H. (2000).** *Streamer discharges in liquids and their applications* IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation. **7(5):** 646-653.

**Apostolov K. (1980).** The effects of iodine on the biological activities of myxoviruses. *J. Hyg.* **84:**381-388.

**Ayliffe G. A. J., Coates D., and Hoffman P. N. (1993).** *Chemical disinfection in hospitals*, 2nd ed. Public Health Laboratory, London, England.

**Badruzzaman M., Oppenheimer J., Adham S., and Kumar M.(2009).** Innovative beneficial reuse of reverse osmosis concentrate using bipolar membrane electro dialysis and electrochloration processes *Journal of Membrane Science* .**326 (2) :** 392-399.

**Baldry M., and Fraser J. A. L. (1988).** Disinfection with peroxygens. *Crit. Rep. Appl. Chem.* **22:**91-116.

**Bartoli M.et Dusseau J.Y.(1995).** Oxydants. Dans :Antisepsie et Désinfection.FleuretteJ, Fresney J et Reverdy M.E.(EDS), Edition Eska,pp305-314.

**Beaver D. J. Roman D.P., and Stoffel P. J.(1957).** The preparation and bacteriostatic activity of substituted ureas. *J. Am. Chem. Soc.* **79:**1236-1245.

**Block S. S. (1991).** Definitions of terms, p. 18-125. *In* S. S. Block (ed.), *Disinfection, sterilization, and preservation*, 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, Pa.

**Block S. S. (1991).** Peroxygen compounds, *Disinfection, sterilization, and preservation*, 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, Pa. p. 167-181. *In* S. S. Block (ed.).

**Block S. S. (1991).** Historical review, p. 3-17. *In* S. S. Block (ed.), *Disinfection, sterilization, and preservation*, 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, Pa.

**Brown M. R. W., and R. A. Anderson. (1968).** The bactericidal effect of silver ions on *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Pharm. Pharmacol.* **20(Suppl.):**1S-3S.



**Bruch M. K. (1996).** Chloroxylenol: an old-new antimicrobial, p. 265-294. *In* J. M. Ascenzi (ed.), Handbook of disinfectants and antiseptics. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.

**Chang S. L. (1971).** Modern concept of disinfection. *J. Sanit. Eng. Div. Proc. ASCE* **97**:689.

**Crémieux A. et Freney J. (1995).** Base fondamentales de l'action antimicrobienne des antiseptiques et des désinfectants. Dans : Antisepsie et Désinfection. Fleurette J, Fresney J et Reverdy M.E.(EDS), Edition Eska, pp305-314.

**Crow S. (1992).** Peracetic acid sterilization: a timely development for a busy healthcare industry. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **13**:111-113.

**Denyer S. P. (1995).** Mechanisms of action of antibacterial biocides. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **36**:227-245.

**Espel P., Riquel G., Gibert A., Domens P., Paillol J. (1999).** *Experimental investigation of the streamers guiding field in SF6 under positive and negative polarity* 10th Int. Symp. On High Voltage Engineering (ISH), London.

**Furr J. R., Russell A. D., Turner T. D. and Andrews A. (1994).** Antibacterial activity of Actisorb Plus, Actisorb and silver nitrate. *J. Hosp. Infect.* **27**:201-208 .

**Gardner J. F., and Gray K. G. (1991).** Chlorhexidine, p. 251-270. *In* S. S. Block (ed.), Disinfection, sterilization, and preservation, 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, Pa.

**Goulhen-Chollet F., Josset S., Keller N., Keller V., and Lett M.C. (2009).** Monitoring the bactericidal effect of UV-A photocatalysis: A first approach through 1D and 2D protein electrophoresis. *Selected Contributions of the 4th European Meeting on Solar Chemistry and Photocatalysis: Environmental Applications (SPEA Catalysis Today)*. **147(3-4)**15 :169-172.

**Gottardi W. (1991).** Iodine and iodine compounds, p. 152-166. *In* S. S. Block (ed.), Disinfection, sterilization, and preservation., 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, Pa.

**Guay C., Rodriguez M., and Sérodes J. (2005).** Using ozonation and chloramination to reduce the formation of trihalomethanes and haloacetic acids in drinking water. *Desalination*, **176(1-3)** : 229-240.

**Gump W. S. (1977).** The bis-phenols, p. 252-281. *In* S. S. Block (ed.), Disinfection, sterilization, and preservation, 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, Pa.

**Hancock I. C. (1991)** .Microbial Cellul Surface Architecture. *In* Microbial Cell Surface Analysis : *Structural and Physicochemical Methods*, eds.21-59.

**Heesch V. e. J. M., Smulders H. W. M., Van paasen S. V. B.,Blom p. P. M., VAN Gompel F. M., Staring A. J. P. M., Ptasinski K. J. (1997).** *Pulsed corona for gaz and water treatment* 11th IEEE International Pulsed Power Conference, pp. **103-108**.

**Hugo W. B., and Longworth A. R. (1964).** Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. *J. Pharm. Pharmacol.* **16**:655-662.

**Hugo W. B., and Longworth A. R. (1966)** . The effect of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmic content, dehydrogenase activity and cell walls of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Pharm. Pharmacol.* **18**:569-578.

**Hugo W. B. (1971)**. Diamidines, p. 121-136. *In* W. B. Hugo (ed.), Inhibition and destruction of the microbial cell. Academic Press, Ltd., London, England.

**Joly B. (1995)**. La resistance microbienne a l'action des antiseptiques et désinfectants. Dans : Antisepsie et desinfection .Fleurette J. , et Reverdy. M.E.(Eds), Editions ESKA.52-65.

**Josset S., Taranto J., Keller N., Keller V., Lett M.C., Ledoux M., Bonnet V., Rougeau S. (2007)**. UV-A photocatalytic treatment of high flow rate air contaminated with *Legionella pneumophila*. *Catalysis Today*.**129(1-2)15** :215-222.

**Josset S., Hajiesmaili S. ,Begin D., Edouard D., Pham-Huu C., Lett M.C., Keller N., and Keller V. (2010)**. UV-A photocatalytic treatment of *Legionella pneumophila* bacteria contaminated airflows through three-dimensional solid foam structured photocatalytic reactors .*Journal of Hazardous Materials*, **175(1-3)** :372-381.

**Kampf G., Rudolf M., Labadie J. -C., and Barrett S. P. (2002)**. Spectrum of antimicrobial activity and user acceptability of the hand disinfectant agent Sterillium. *Gel Journal of Hospital Infection*.**52(2)** :141-147.

**Khelifa A., Moulay S., Hannane F., Benslimene S., and Hecini M.( 2003)**. Application of the experiment design method to the study of the performance of the electrochlorination cells *Desalination***158(1-3)** :231.

**Kruse W. C. (1970)**. Halogen action on bacteria, viruses and protozoa, p. 113-137. *In* Proceedings of the National Special Conference on Disinfection. ASCE, Amherst, Mass.

**Lensing H. H., and Oei H. L. (1984)**. Study of the efficiency of disinfectants against antrax spores. *Tijdschr. Diergeneeskd.* **109**:557-563.

**Liau S. Y., Read D. C., Pugh W. J. Furr J. R. and Russell A. D. (1997)**. Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. *Lett. Appl. Microbiol.* **25**:279-283.

**Mahfoudh, A. (2010)**. Étude des mécanismes d'inactivation des microorganismes suite à un traitement à l'ozone .Thèse de doctorat .Université de Montréal Faculté des études supérieures et postdoctorales. Canada.

**Malchesky P. S. (1993)**. Peracetic acid and its application to medical instrument sterilization. *Artif. Organs* **17**:147-152 .

**Maris P. (1995)**. Modes of action disinfectans in : disinfectants :Mc daniel. H.A. ed .Revue scientifique et technique.**14** :47-55.

**Martindale Extra Pharmacopoeia. (1993)** . Silver nitrate, p. 1412. ; silver sulfadiazine, p. 201. Pharmaceutical Press, London, England.

- McDonnell G., Kornberger K., Marzulli D., and Bruch M. (1981).** Antimicrobial soaps: benefits versus risks, p. 125-134. *In* H. Maibach, and R. Aly (ed.), *Skin microbiology: relevance to clinical infection*. Springer-Verlag, New York, N.Y.
- Moratö J., Mir J., Codony F., Mas J.,and Ribas F. (2003)** .Microbial response to disinfectants. *Handbook of Water and Wastewater Microbiology. Pages 657-693.*
- Mounier M., Pestourie N. Ploy M.C., Denis F. (2009)** . Les détergents et les désinfectants : les risques liés à l'usage médical des biocides (2<sup>e</sup> partie). *Antibiotiques*. 11(4) :234-242.
- Neidhardt F.C., Ingraham J.L. et Schaechter M.(1994).** *Physiologie de la cellule bacterienne : une approche moleculaire. ED.,Masson, 487.*
- Power E. G. M. (1995).** Aldehydes as biocides. *Prog. Med. Chem.* **34**:149-201.
- Power E. G. M., and Russell A. D. (1989).** Glutaraldehyde: its uptake by sporing and non-sporing bacteria, rubber, plastic and an endoscope. *J. Appl. Bacteriol.* **67**:329-342.
- Power E. G. M., and Russell A. D. (1990)** . Sporicidal action of alkaline glutaraldehyde: factors influencing activity and a comparison with other aldehydes. *J. Appl. Bacteriol.* P.Setlow, Spores of bacillus subtilis: their resistance to and killing by radiation,heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, **101**: 514-525, 2006.
- Pretzer A. (1997).** Antiseptic resistance: a survey of *Staphylococcus* and *Enterococcus*. *In* The healthcare continuum model: topical antimicrobial wash products in healthcare settings, the food industry and the home, June.
- Richards R. M. E. (1981).** Antimicrobial action of silver nitrate. *Microbios* **31**:83-91.
- Richards R. M. E., Xing J. Z., Gregory D. W., and Marshall D. (1993).** Investigation of cell envelope damage to *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter cloacae* by dibromopropamide isethionate. *J. Pharm. Sci.* **82**:975-977.
- Rosenberg A., Alatary S. D., and Peterson A. F. (1976).** Safety and efficacy of the antiseptic chlorhexidine gluconate. *Surg. Gynecol. Obstet.* **143**:789-792.
- Rotaru A.,Ungureanu M., Danac R.,Poata A., and Druta I. (2004).** Activité antimicrobienne *in vitro* de nouveaux sels diquatéraux dérivés de la 4,4'-bipyridine *Annales Pharmaceutiques Françaises.* **62(6)** : 428-430.
- Russell A. D. (1971).** Ethylenediamine tetraacetic acid,. *In* W. B. Hugo (ed.), *Inhibition and destruction of the microbial cell*. Academic Press, Ltd., p. 209-224 London, England.
- Russell A. D. (1991).** Chemical sporicidal and sporostatic agents, p. 365-376. *In* S. S. Block (ed.), *Disinfection, sterilization, and preservation*, 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, Pa.
- Russelle A.D.(1991).**Principales of Antimicrobial Activity *In Disinfection,sterilization and preservation*.BlockS.S,ed.,Lea and Febiger, pp29-58.
- Russell A. D. (1992).** Effect of liquid phase antibacterial agents, p. 169-231. *In* A. D. Russell (ed.), *The destruction of bacterial spores*. Academic Press, Ltd., London, England.

**Russell A. D., and Day M. J. (1993).** Antibacterial activity of chlorhexidine. *J. Hosp. Infect.* **25**:229-238.

**Russell A. D. (1994).** Glutaraldehyde: current status and uses. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **15**:724-733.

**Russell A. D., and Furr J. R. (1996).** Biocides: mechanisms of antifungal action and fungal resistance. *Sci. Prog.* **79**:27-48.

**Sato M., Ohgiyama T., Clements J. S. (1996)** . *Formation of chemical species and their effects on microorganisms using a pulsed high-voltage discharge in water* IEEE Transactions on Industry applications. **32**(1): 106-112.

**Scott E. M., and Gorman S. P. (1991).** Glutaraldehyde, p. 596-614. *In* S. S. Block (ed.), *Disinfection, sterilization and preservation*, 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, Pa.

**Setlow P. (2006).** Spores of bacillus subtilis: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, **101**: 514-525.

**Sun B., Sato M., Clements J. (1997)** .Optical study of active species produced by a pulsed streamer corona discharge in water *Journal of Electrostatics.* **39**(3):189-202.

**Sun B., Sato M., Clements J. S. (1999)** *Use of a pulsed high-voltage discharge for removal of organic compounds in aqueous solution* *Journal of Physics D : Applied Physics*, Vol. 32, , pp. 1908-1915.

**Thakur D., Bora T.C., Bordoloi G.N., Mazumdar S. (2009)** .Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology.***19**(3) : 161-167.

**Tiehm A., Svenja T. L.,and Augenstein T. (2009)** .Effects of direct electric current and electrode reactions on vinyl chloride degrading microorganisms. *Electrochimica Acta.* **54**(12, 30) 3453-3459.

**Teissie J. Adenosine. (1986)** .Triphosphate synthesis in *Escherichia coli* submitted to a microsecond electric pulse. *Biochemistry* **25**( 368): 73.

**Thurmann R. B., and Gerba C. P.(1988).** Molecules mechanisms of viral inactivation by water disinfectants. *Adv. Appl. Microbiol.* **33**:75-105.

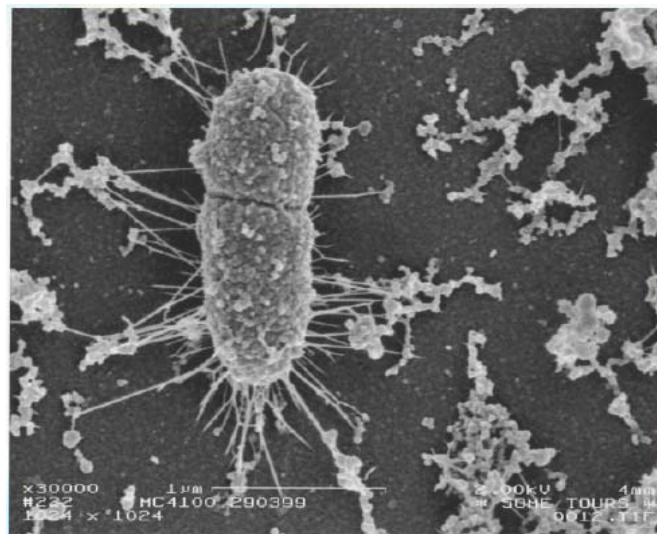
**Zrimec A., Jerman I. and Lahajnar G. (1999).** Low frequency alternating electric fields inhibit lactose uptake in *Kluyveromyces marxianus*. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **48**( 481) : 84.

# **Chapitre III**

## **Bioadhésion**

### III.1. Introduction :

L'adhésion des microorganismes aux surfaces constitue la première étape dans la formation de biofilm (Figure III.1.). Ce dernier est la source de problèmes de biocontamination dans divers domaines tels que la santé, l'environnement et l'industrie alimentaire. (Katsutoshi Hori *et al* 2008). Une grande quantité de travaux de recherche ont été réalisés pour la compréhension des mécanismes de l'adhésion bactérienne. L'adhésion bactérienne est un processus très compliqué qui dépend de nombreux facteurs, tels que le genre de bactéries, les propriétés du matériau, l'environnement et, en outre, le dispositif expérimental. L'évaluation de la contribution relative de ces facteurs est extrêmement difficile ; d'autres recherches sont encore nécessaires pour faire progresser notre compréhension des mécanismes d'adhésion bactérienne. La plupart des études ont jusqu'ici utilisé différents matériaux (verre, métaux, polymères) et des souches bactériennes de différentes espèces avec des concentrations et des procédures expérimentales différentes.



**Figure III.1.** : Adhésion d'une bactérie sur une surface.

Plusieurs auteurs ont étudié le phénomène d'adhésion dans le but de comprendre ses mécanismes, afin de pouvoir intervenir pour le moduler. Les auteurs (Van Loosdercht *et al.*, 1987 ; Dickson et Koohmaraie, 1989 ; Vanhaecke *et al.*, 1990 ; Van der Mei *et al.*, Hamadi *et al.*, 2009 ; Braindet *et al.*, 1999; Faille *et al.*, 2002 ) ont étudié les propriétés physico-chimiques de la surface cellulaire pour expliquer ce phénomène, d'autres se sont intéressés à

celles de la surface du substrat (Boulangé- Petermann *et al.*, 1993; Boulangé- Petermann *et al.*, 1997; Scheuerman *et al.*, 1998; Ong *et al.*, 1999) L'étude des caractéristiques du milieu environnant a été aussi sujet de grande attention (Stanley, 1983 ; Jana *et al.*, 2000 ; Gallardo-Moreno *et al.*, 2002 ; Hamadi *et al.*, 2004).

La présence de ces biofilms sur les matériaux couramment utilisés en industrie agroalimentaire serait à l'origine de contamination des aliments transformés, rendant leur salubrité non- conforme. Le but de ce travail est d'étudier l'adhésion d'*E.Coli K12* sur un support hydrophile qui est le verre et un support hydrophobe qui est le platine. Ces deux substrats ont été choisis pour cette étude, vu leur utilisation dans plusieurs domaines : alimentaire, santé, industrie...etc.

L'entérobactérie *E. Coli* est une bactérie capable d'adhérer aux surfaces inertes et former des biofilms (Katsikogianni *et al.*; 2004).

Les travaux de Claude E. Zobell ont ouvert une nouvelle ère dans le domaine de la microbiologie. Dès 1936, ce chercheur démontra que les surfaces solides sont bénéfiques au développement des bactéries lors de leur conservation dans un milieu nutritif dilué. En 1943, il montra que de très faibles quantités de nutriments organiques s'adsorbent sur le verre et, que cette concentration de matière organique favorise la formation de « biofilms » sur les surfaces.

Longtemps, les biofilms ont conservé leurs secrets et ce en partie parce que les méthodes d'observation n'étaient pas adaptées. La microscopie électronique n'a pas été d'un grand secours, car elle ne permet pas d'obtenir des images précises des couches profondes des amas bactériens. Les chercheurs supposèrent alors que les cellules situées à l'intérieur des biofilms étaient mortes et disposées de façon aléatoire.

Cette vision a changé dans les années 1990, lorsque les bactériologistes ont utilisé la microscopie confocale à balayage laser. L'étude des biofilms, sous l'impulsion de Characklis et Costerton, a montré que les bactéries se développent dans de minuscules enclaves, appelées micro-colonies, et qu'elles représentent moins d'un tiers de la masse totale du biofilm. Le reste est constitué par une substance visqueuse sécrétée par les cellules.

Durant ces 20 dernières années, les microbiologistes ont pris conscience que le mode de croissance bactérien utilisé au laboratoire avait ses limites. Dans leur environnement naturel, les micro-organismes sont attachés à une surface, organisés en communautés structurées, et englobés dans une matrice d'exopolysaccharides, ce mode de développement est appelé biofilm. La plupart des micro-organismes favorisent un mode de vie où la population bactérienne se trouve fixer sur un support, plutôt que libre et isolée dans le milieu environnemental.

Le terme de biofilm est utilisé pour désigner les couches de micro-organismes contenus dans une matrice solide polymérique d'origine bactérienne. (Filloux. A., Vallet 2003). Les biofilms interviennent de façon ubiquitaire, ils colonisent les sols, les rivières, les organismes vivants supérieurs. Ils engendrent de lourds problèmes industriels : dégradation des installations portuaires, formation de bio salissure sur les coqs des bateaux, accélération des phénomènes de corrosion, contamination des équipements des industries agroalimentaires et réseau de distribution d'eau potable. Depuis quelques années, il est apparu que leur importance dans le milieu médicale est capitale, puisque 65% des infections bactériennes chez l'homme impliquent des biofilms (Chicurel 2000). Les biofilms peuvent se former au niveau des cathéters ou d'implant (valves cardiaques, hanches artificielles...). La première étude scientifique consacrée au biofilms date de 1943(Zobell 1943). La prédominance du mode de vie sous forme de biofilms ne fut cependant affirmée qu'en 1978 (Casterton et al., 1978). Il a été montré que plus de 99% des bactéries se développent en biofilms sur une grande variété de surfaces telles que les métaux, les plastiques, les tissus vivants ; les surfaces minérales (pierres, bétons) ; un biofilm peut être constitué d'une espèce ou de plusieurs espèces bactériennes ( Coghlan 1996 ;Donlan et Casterton 2002). Les bactéries contenus dans un biofilm présentent des caractéristiques très différentes des homologues planctoniques : Bactérie libre en suspension. Parmi lesquelles des modifications structurales (par exemple disparition des flagelles, la production d'exopolymères, la mise en place d'un système de communication chimique( quorum sensing ),une augmentation significative de leur résistance aux agents antimicrobiens : désinfectants ou antibiotiques et au stress environnementaux(déshydratation,privation nutritionnelle,rayonnements ultraviolets...)  
(Bardoniotis et.al.,2003 ).



### III.2. Où trouve-t-on les biofilms ?

Zobell montra qu'il y avait plus de bactéries vivantes sur les surfaces d'un récipient que dans le liquide qu'il contient (Zobell 1943). Les microbiologistes admettent désormais que plus de 99% des bactéries présentes dans l'environnement, le milieu industriel ou médical vivent sous la forme de biofilms. Cependant, ce nouvel aspect de la microbiologie, redécouvert en 1977 (Geesey *et al.*, 1977), n'est encore que très peu abordé dans l'enseignement supérieur.

#### III.2.1. Dans la nature

Les biofilms sont principalement pluri-espèces et se trouvent dans les ruisseaux, les lacs et autres milieux aquatiques. De ces environnements sont extraites des boues, utilisées dans certaines méthodes de dépollution (Yatao 2008). A titre d'exemple, citons l'étude du lac Fertö, entre l'Autriche et la Hongrie. Les boues qui sont extraites sont composées de 493 souches bactériennes, et que sur les 296 étudiées, la majorité est aérobie avec une grande proportion de *Micrococcus* et de *Pseudomonas*.

Les biofilms pluri-espèces sont de véritables consortiums où chaque espèce y trouve son avantage. Ainsi, plusieurs espèces bactériennes, chacune équipée de différents systèmes enzymatiques, peuvent métaboliser ensemble certains nutriments que chacune d'elles, prise individuellement, ne peut utiliser. Cette coopération est d'ailleurs à la base de l'utilisation de certains biofilms dans des procédés industriels.

La formidable capacité de survie des bactéries adhérentes est illustrée par la diversité des niches écologiques colonisées par les biofilms. Ainsi, on les retrouve dans des failles océaniques à 3500 mètres de profondeur et à  $-0,7^{\circ}\text{C}$  mais aussi, selon certains chercheurs de la NASA, sur Mars. L'examen des météorites provenant de Mars ALH84001 et Nakhla révèle en effet la présence de biofilms à *cocci* identiques à ceux trouvés dans des fossiles terrestres. La particularité de ces biofilms est une forte concentration en fer et en manganèse dans leur matrice. (Yatao 2008).

#### III.2.2. Des biofilms dangereux et pourtant...

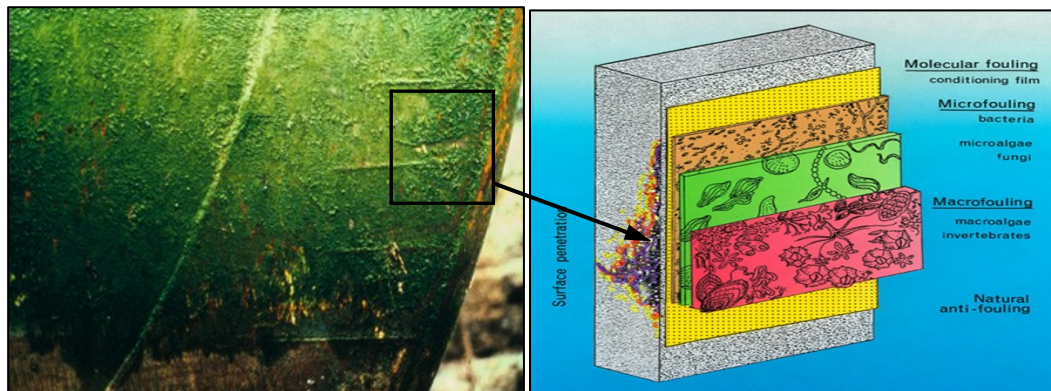
Comme cette introduction a pu le souligner, les biofilms peuvent être qualifiés d'utiles (traitement des eaux usées), d'essentiels (digestion des aliments), de gênants (marches glissantes), de disgracieux (plaque dentaire), de destructeurs (canalisation), de fatals (mucoviscidose) . Tous ces adjectifs (dont la liste n'est pas exhaustive) illustrent les différences physico-chimiques et/ou biologiques entre les biofilms et les micro-organismes en

suspension. Les propriétés particulières des bactéries immobilisées sont utilisées depuis plus d'un siècle. Ainsi, dès 1823, Schuetzenbach envisagea d'utiliser des copeaux de hêtre pour adsorber des micro-organismes et produire du vinaigre et Pasteur développa le premier système à cellules immobilisées, dans le procédé « Pasteur » ou « Orléans » pour la production de vinaigre. L'immobilisation cellulaire consiste à confiner des cellules microbiennes dans un espace restreint afin d'obtenir une biomasse active à haute densité (Vilain 2006).

### III.2.2.1. Dans l'industrie

Dans le monde industriel, deux aspects du biofilm sont rencontrés : un aspect négatif, nocif voire dangereux, et un aspect positif. Ce dernier est illustré par les systèmes de dépollution des eaux usées.

A l'inverse, les biofilms peuvent poser des problèmes majeurs aux industriels. Ainsi, dans l'industrie pétrolière, la colonisation des systèmes d'injection d'eau par des bactéries productrices de soufre peut entraîner une acidification du pétrole et le rendre inutilisable, conduisant à une possible fermeture du champ pétrolifère. La colonisation des canalisations des réseaux de distribution d'eau potable est également un problème majeur, malgré l'addition de biocide. L'ajout de chlore permet d'obtenir des comptages bactériens en dessous des limites sanitaires, mais les bactéries protégées au sein du biofilm sont toujours viables (Terri 2007). Les biofilms se forment également sur la coque des navires (phénomène de « biofouling », figure III.2.), ce qui entraîne une augmentation du tirant d'eau, donc une réduction de la vitesse des navires et une augmentation de la consommation en fuel. Certains biofilms composés de plusieurs espèces (notamment les bactéries sulfo-réductrices) peuvent également corroder le métal et engendrer des trous profonds de 2,5 cm en 6 mois.



**Figure III. 2.** : Phénomène de biofouling sur la coque d'un navire.  
[<http://www.biosciences.bham.ac.uk>]

La formation de biofilms sur des plaques internes des échangeurs de chaleur industriels peut diminuer de 20 à 30 % leur capacité de transfert thermique. L'industrie navale doit continuellement lutter contre la corrosion qui leur est associée, par des revêtements anti-fouling toxiques, souvent responsables de graves pollutions (Baikun 2004).

Dans l'industrie alimentaire, on les retrouve dans les secteurs : laiteries, brasseries, meuneries, sucreries, malteries et salaisonneries. Toutes les installations industrielles, fabriquant des produits à humidité intermédiaire ou élevée, sont exposées à la formation de biofilms. Tout équipement non stérilisé abrite des micro-organismes qui peuvent démarrer un processus de colonisation entre deux procédures de nettoyage-désinfection. Un biofilm peut se mettre en place en quelques heures, et permettre ainsi aux bactéries qui s'y trouvent de devenir résistantes aux agents extérieurs. Les industries de production et distribution d'eau potable sont par exemple très sensibles à ce problème.

Les biofilms peuvent induire de sévères phénomènes de dégradation /corrosion sur les matériaux qui leur servent de support (polymères, bétons, matériaux métalliques....).

Le caractère hautement hétérogène du biofilm, présence de substances organiques comme les exo polymères extracellulaires aux propriétés complexantes ou inoxydables en eaux naturelles ; trois caractéristiques du biofilm interviennent pour expliquer le comportement de ces matériaux selon les conditions d'aération:

-En eau aérée, ce sont les propriétés de catalyse enzymes présentes dans le biofilm qui conduisent à une augmentation des vitesses des réactions cathodiques, donc du potentiel corrosif ;

-En milieux anaérobies, les sulfures produits par les bactéries sulfato-réductrices diminuent la couche passive et sa reconstitution ;

-En milieu faiblement oxygéné et dans les biofilms matures où coexistent des zones aérobies et anaérobies, c'est le caractère hétérogène du biofilm qui conduit à des corrosions spectaculaires, la zone aérobie provoquant une augmentation du potentiel de corrosion alors que le potentiel de rupture de la couche passive diminue dans les zones anaérobies où survivent les bactéries sulfato-réductrices (Karen 2008).

La maîtrise du développement et des propriétés des biofilms est donc une des clefs de la maîtrise des phénomènes de biocorrosion (Allison 2003).

### III.2.2.2. Dans le monde médical

La plaque dentaire est un exemple classique de biofilm dans le milieu médical. Elle est définie comme une gangue hétérogène adhérant à la surface des dents ou logée dans l'espace gingivo-dentaire. Elle est composée d'une communauté microbienne riche en bactéries aérobies et anaérobies, enrobée d'une matrice intercellulaire d'origine microbienne et salivaire (Mouton *et al.*, 1999). Sa masse varie, selon l'hygiène dentaire, de 5 à 200 mg. Elle contient de  $10^8$  à  $10^9$  Unités Formant Colonie (UFC)/mg et est composée de plus de 500 espèces dont 300 ont été identifiées à ce jour. La plaque dentaire (figure III.3.) est un exemple de collaboration métabolique entre espèces. Ainsi, des bactéries anaérobies prospèrent lorsqu'elles sont physiquement très proches d'organismes aérobies qui appauvrissent l'environnement en oxygène.



**Figure III. 3 :** Biofilm sur une plaque dentaire.[<http://www.granby.net>]

La colonisation des poumons des patients atteints de mucoviscidose par *Pseudomonas aeruginosa* est un autre exemple de biofilm rencontré dans le milieu médical. Les biofilms seraient responsables de plus de 60% des infections nosocomiales, Tableau III.1, et leurs traitements coûteraient plus d'un milliard de dollars US par année (O'Toole *et al.* 2000) Deux propriétés des biofilms peuvent expliquer leur prédominance dans les maladies nosocomiales ; d'une part, les bactéries en biofilm perdurent dans les milieux les plus hostiles ; et d'autre part, la virulence des bactéries semble décuplée par l'immobilisation. Une revue réalisée par Costerton et Lappin-Scott illustre bien la pathogénicité des bactéries immobilisées : alors que l'injection de  $10^6$  bactéries en suspension dans le cœur, les poumons ou le péritoine est suivie de leur élimination par le système immunitaire, l'injection de  $10^3$

bactéries immobilisées suffit pour causer des infections persistantes (Costerton et Lappin-Scott 1989).

**Tableau III.1** : Liste partielle des infections humaines dues aux biofilms (Costerton, 2001).

<b>Infection ou maladie</b>	<b>Espèce(s) impliquée(s)</b>
Infection des sutures	<i>Staphylococcus epidermidis</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>
Infection des lentilles de contact	<i>P. aeruginosa</i> et cocci Gram +
Infection des cathéters urinaires	<i>Escherichia coli</i>
Infection des cathéters veineux	<i>S. epidermidis</i>
Infection des valves cardiaques	<i>S. aureus</i> et <i>S. epidermidis</i>
Caries dentaires	Cocci Gram + acidogènes ( <i>Streptococcus</i> )
Otite	<i>Haemophilus influenzae</i> (non typable)
Infection des muscles squelettiques	Cocci Gram + ( <i>Staphylococci</i> )
Mucoviscidose	<i>P. aeruginosa</i> et <i>Burkholderia cepacia</i>

En France, une enquête nationale, commandée par le Ministère de la Santé en 1996, montre qu'environ 7% des personnes hospitalisées contractent une infection nosocomiale. Parmi les infections, 36% sont urinaires, 13% pulmonaires et 11% sont localisées sur la zone opérée. Les maladies nosocomiales deviennent de plus en plus une priorité de santé publique, du fait de leur fort taux de mortalité (50% des pneumopathies nosocomiales sont létales) et leur coût (45000 lits sur 550000, problème juridique...), sans parler de l'utilisation des antibiotiques qu'elles entraînent.

Compte tenu de son ubiquité et de ses propriétés extraordinaires, la compréhension du biofilm, de sa mise en place, de son maintien et de son évolution, représente donc un enjeu considérable dans tous les domaines où il est présent, qu'il soit nuisible ou utile.

### **III.3.Organisation du biofilm**

Les mécanismes permettant d'aboutir au biofilm mature dépendent des espèces et des surfaces (Costerton et Lappin-Scott 1989). Cependant, de nombreux auteurs évoquent des étapes clés dans cette formation mais leur nombre reste encore variable et il est en perpétuelle discussion. En 1997, Palmer et White définissent deux grandes étapes dans la formation du

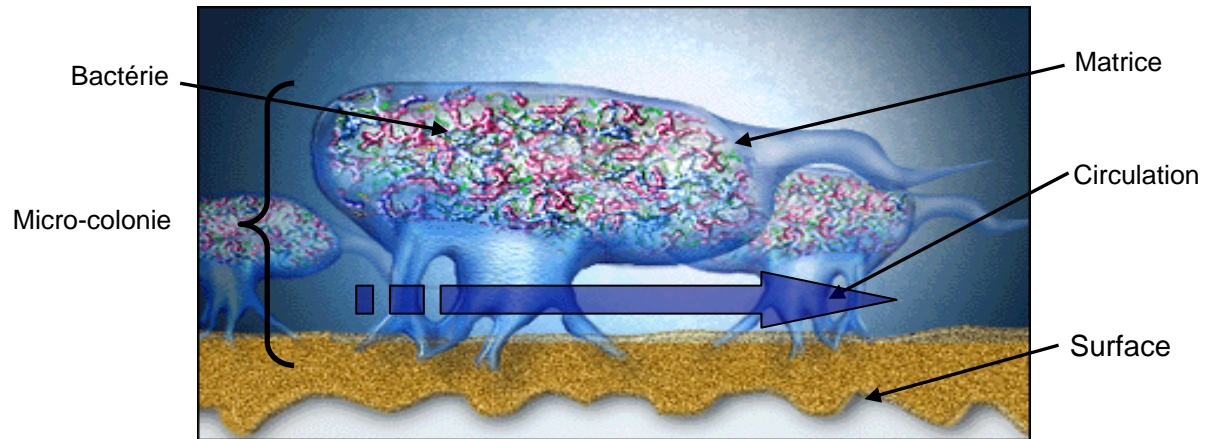
biofilm : les étapes précoces, faisant intervenir des interactions cellules – cellules et cellules – surfaces, dont les mécanismes moléculaires restent très flous, et les phases tardives dont la fixation définitive de la micro-colonie à la surface. D'autres auteurs décrivent la formation du biofilm comme une phase dans un cycle de développement cellulaire comprenant une étape d'approche, d'adhésion, de colonisation, d'accumulation, de maturation et de dispersion (Jenkinson et Lappin-Scott 1999). O'Toole, quant à lui, propose 4 grandes étapes : l'initiation, la maturation, la maintenance et la dissolution (O'Toole *et al.*; 2000) .

Ces différences, minimales certes mais existantes, dans la vision de la formation du biofilm montrent bien la complexité du phénomène et la jeunesse de cette discipline. Les futurs progrès dépendent de l'évolution des techniques, en particulier de la microscopie et de la biologie génomique et post-génomique (Costerton et Lewandowski 1995).

Le développement du biofilm est un processus très structuré qui aboutit à la formation d'une communauté complexe d'organismes. Pour former ces communautés, les organismes doivent intégrer des messages extérieurs et intérieurs, communiquer entre eux (détection de la densité de population et des espèces) et se coordonner dans le temps. On distingue 3 phases majeures dans la formation du biofilm : le conditionnement et l'approche de la surface, la fixation à la surface et la maturation du biofilm, chacune de ces phases étant sub-divisée en différentes étapes.

### **III.3.1.Phase 1 : Film initiateur et approche de la surface**

De façon logique, la colonisation d'une surface implique deux partenaires : la surface et la bactérie (figure III.4). Chacun de ces partenaires doit présenter un certain nombre de caractéristiques pour que la colonisation ait lieu. Théoriquement, toute surface est colonisable. Cependant, la formation d'un « film initiateur » sur cette surface semble indispensable pour la colonisation . Cette notion de film initiateur était déjà évoquée par Zobell en 1943. Ce film est composé de matières organique et minérale s'adsorbant sur la surface (Trulear et Characklis 1982). Son épaisseur varie de 0,1 à 1  $\mu\text{m}$  (Mouton *et al.*, 1999). Il est requis pour le futur attachement bactérien (Fletcher 1980) mais son importance n'est pas quantitative (Apilanez *et al.*, 1998).



**Figure III. 4.** : Eléments caractéristiques d'un biofilm bactérien <http://www.dentalcare.com>

Le dépôt de glycoprotéines salivaires sur la dentine est un exemple de film initiateur. Ce dernier apparaît quelques minutes après le polissage et permet la formation de la plaque dentaire. Le rôle de ses glycoprotéines consisterait à neutraliser les excès de charges et d'énergie libre de surface qui limiteraient l'adhésion (Roques 2000). La nature et l'importance du film initiateur sont liées aux propriétés du milieu. Les bactéries à Gram négatif, à l'exception de *Myxococcus xanthus* et d'*E.Coli* O517:H7, forment des biofilms dans les milieux les moins carencés. Certaines souches d'*E. Coli* K12 et de *Vibrio cholerae* ne forment pas de biofilm dans un milieu minimal sauf s'il est enrichi en acides aminés. Au contraire, *E. Coli* O517:H7 ne forme un biofilm que dans un milieu pauvre en nutriment ; plus le milieu est pauvre, plus le film sera attractif pour la bactérie. (O'Toole *et al.*, 2000).

Trois forces sont impliquées dans l'approche de la bactérie vers la surface conditionnée : les forces hydrodynamiques, le chimiotactisme et les interactions hydrophobes (Roques 2000). Les forces hydrodynamiques regroupent l'attraction, la friction, l'écoulement, la convection, la sédimentation et les mouvements browniens. Ces forces vont permettre à la bactérie de s'approcher du support de façon aléatoire. La convection et la sédimentation, quant à elles, permettent le déplacement des bactéries sur de « longues distances ».

Un gradient de nutriments peut aussi s'instaurer entre le support et le milieu environnant, induisant un chimiotactisme. Les molécules attractives sont classiquement les oses et les osamines. La bactérie est pourvue de récepteurs membranaires sensibles à la concentration en nutriment. Dans cette phase, un élément majeur intervient : le flagelle. Il permet à la bactérie de lutter contre les forces de répulsion (Stickler 1999). Des forces physiques sont impliquées

dans l'attraction ou la répulsion électrostatique de la bactérie vers/envers la surface. La nature chargée des surfaces attire les polymères solubles formant le « film de conditionnement » (Costerton et Lappin-Scott 1989)(figure III.5.) .



**Figure III. 5.** : Formation du film de conditionnement sur la surface.

Comment la bactérie sait-elle qu'un support est à proximité ? Il est connu que les bactéries libèrent des protons et des molécules signal dans leur environnement. Ces messagers sont supposés diffuser de façon radiale. On suppose que lorsqu'une bactérie est proche d'une surface, elle détecte une augmentation locale de la concentration en messagers (Costerton *et al.*; 1999).

### III.3.2.Phase 2 : Adhérence, adhésion et site d'initiation

En 1964, Mitchell et Marshall examinent les premières étapes de la formation du biofilm à partir d'une culture pure et distinguent l'adsorption réversible de l'adhésion définitive qui constitue la première étape de la maturation du biofilm (Costerton 1999).

L'adsorption implique des forces faibles . Ces forces agissent sur les bactéries qui sont considérées comme des particules colloïdales afin de pouvoir appliquer la théorie **DLVO** (**D**erjaguin **L**andau **V**erwey **O**verbeek). Ainsi, la somme des forces attractives de Van Der Waals et London (agissant de 10 à 50 nm) et des forces répulsives électrostatiques (agissant de 10 à 20 nm) définit l'interaction totale entre la bactérie et la surface séparées par une distance D. Entre 10 et 20 nm, la bactérie et le support, généralement chargée négativement, se repoussent (Roques, 2000). La concentration en électrolyte est alors importante car la formation d'une couche cationique peut permettre le rapprochement des deux partenaires (figure III.6).



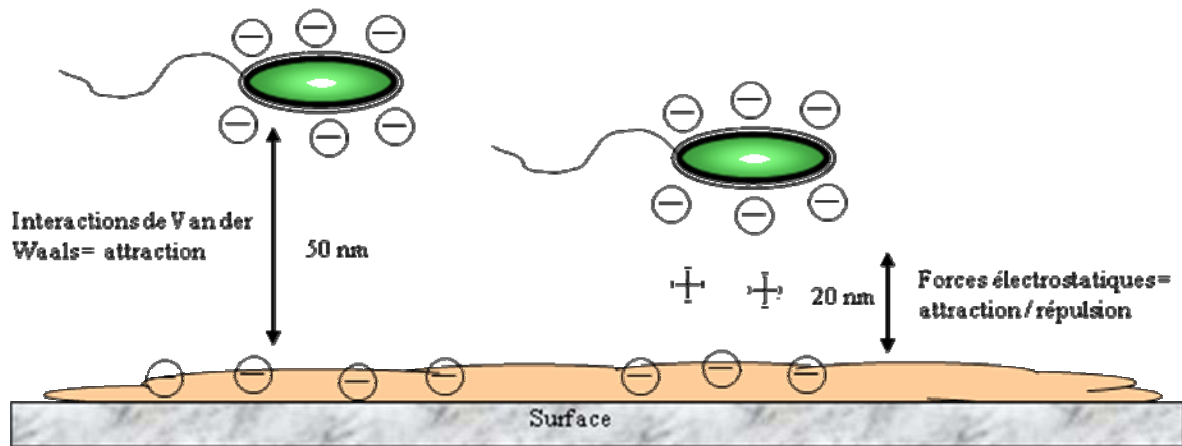


Figure III. 6. : L'adsorption.

La micro-colonie naissante se déplace ensuite sur la surface grâce à un mouvement appelé « twitching » (figure III.7). Ce déplacement saccadé mobilise des structures membranaires nommées fimbriae ou pili de type IV (Semmler *et al.*, 1999). Le twitching est 100 fois plus lent que la nage impliquant le flagelle. Le but de ce mouvement de masse est de trouver un site idéal de colonisation. Les caractéristiques d'un tel site sont actuellement totalement inconnues. Une fois ce site atteint, la colonisation peut commencer. Des forces physiques et chimiques vont ensuite se combiner pour sceller définitivement la cellule à la surface (Costerton et Lappin-Scott 1989).

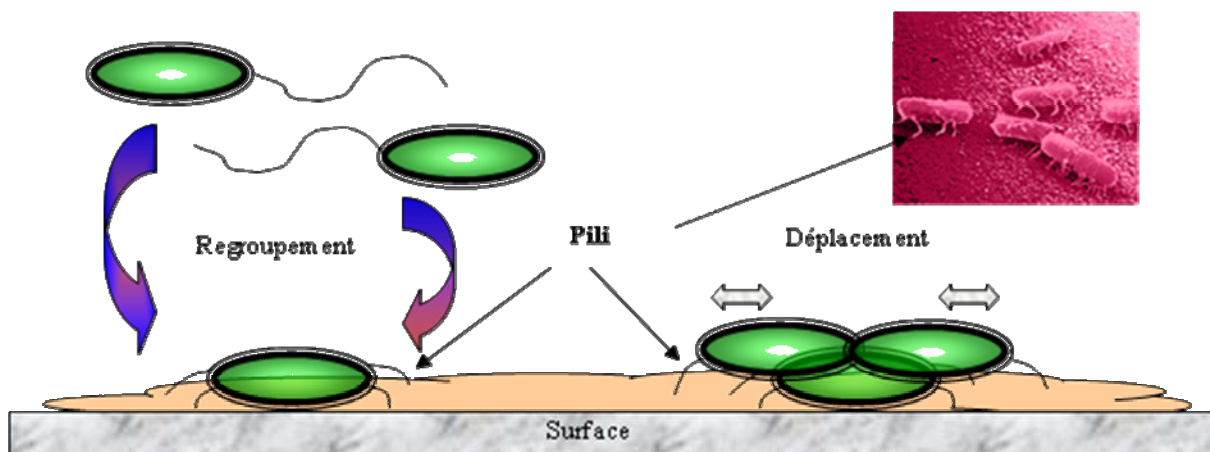
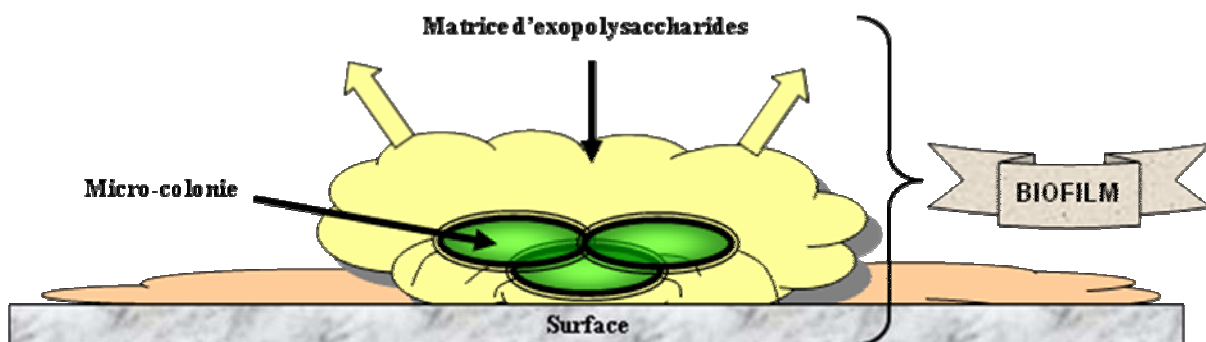


Figure III. 7. : Recherche du site d'initiation.

Lors de l'adhésion, la bactérie acquiert de nouvelles structures (flagelles latéraux, fimbriae, adhésines, exopolymères) et modifie son phénotype en réponse au contact avec la surface (figure III.8). Les bactéries vont s'ancrer au support par l'intermédiaire d'appendices

cellulaires, les pilis. Chez *Klebsiella pneumoniae*, les pilis de type III ont un rôle important dans la colonisation des surfaces (Di Martino *et al.*; 2002). Les adhésines (pili de type I) chez *E. coli* sont sensibles au mannose (Stickler 1999). Chez *P. aeruginosa*, les fimbriae sont très importants (O'Toole *et al.*, 2000) ; des mutants déficients en pili de type IV sont incapables de se fixer sur un support et d'initier la formation de micro-colonies. De tels mutants de *P. fluorescens*, ayant perdu toute aptitude à coloniser les surfaces, retrouvent leur aptitude à former un biofilm s'ils sont plongés dans un milieu riche en citrate, en glutamate ou en fer (O'Toole *et al.*, 2000). Ces pili de type IV joueraient un rôle dans l'accumulation cellulaire au sein de la micro-colonie naissante (Stickler 1999). Les fimbriae sont impliqués dans une liaison spécifique avec un support (comme les supports biotiques) contrairement aux **ExoPolySaccharides (EPS)** qui engendrent une liaison non spécifique (Costerton 1999). Ces nouvelles structures macromoléculaires sont à l'origine de nouvelles interactions entre la bactérie et le support comme des liaisons chimiques (électrostatiques, covalentes, hydrogène), des interactions dipôles (dipôle – dipôle, dipôle – dipôle induit, ion – dipôle) et des interactions hydrophobes.

C'est durant cette étape d'adhésion que la physiologie bactérienne s'oriente vers un phénotype « biofilm ». Ainsi, c'est lors de l'adhésion que *P. aeruginosa* surexprime *algC* et *algD*, deux gènes impliqués dans la production d'alginate .



**Figure III. 8. :** L'adhésion irréversible.

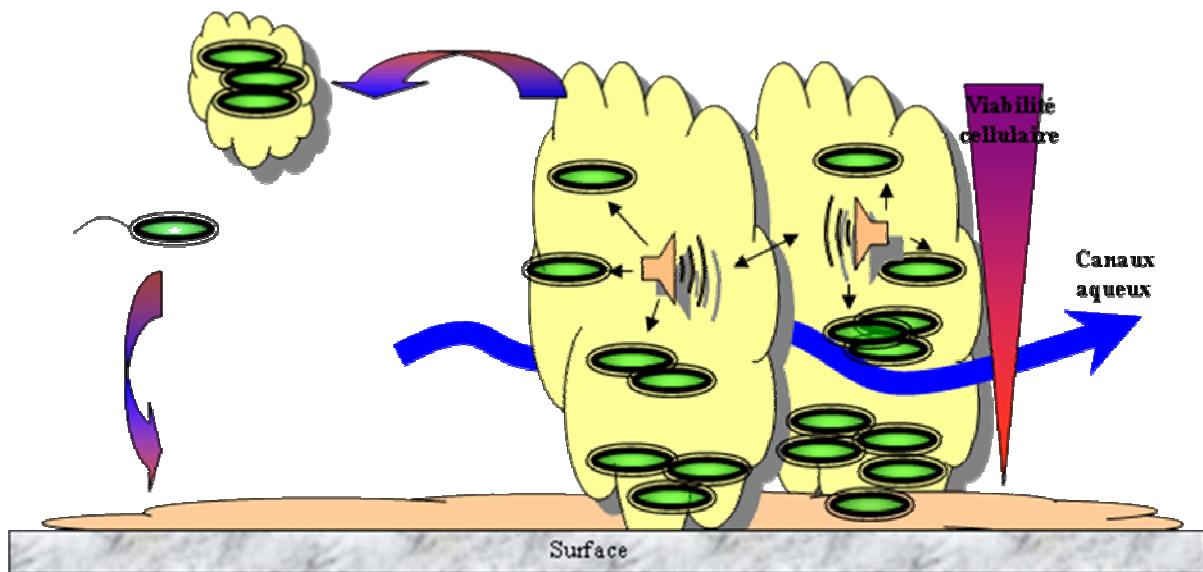
**III.3.3.Phase 3 : Maturation du biofilm** Différents facteurs physiques, chimiques et biologiques vont conditionner la formation du biofilm. Certains de ces différents paramètres sont regroupés dans le tableau II

**Tableau III.2.** : Facteurs impliqués dans la formation des biofilms (Wimpenny *et al.*, 2000).

Facteurs	Implication(s)
Facteurs génétiques	Génotype spécifique de l'organisme  Expression de gènes liés aux propriétés des surfaces  Expression de système signal  Production d'EPS  Taux de croissance, affinité pour les substrats  Expression de facteurs génétiques non directement liés à la formation de biofilm (mobilité, chimiotactisme)
Facteurs physico-chimiques	Composition de la surface et rugosité  Nature du substrat  Concentration et gradient du substrat  Température, pH, potentiel hydrique, pression, oxygène disponible, radiation
Processus stochastiques	Colonisation initiale : attachement et détachement  Modifications aléatoires des facteurs biotiques et abiotiques
Phénomènes déterministes	Interactions spécifiques entre les organismes : compétition, neutralité, coopération et prédation
Processus mécaniques	Forces de cisaillement
Import / export	Ajout ou perte de composants biotiques ou abiotiques au biofilm
Changements temporeux	Alternance jour/nuît qui modifie l'environnement (lumière, température, pH, P <sub>O2</sub> )

La première étape de la maturation correspond à la dernière étape de la colonisation, c'est-à-dire à la production d'exopolysaccharides dont la nature varie avec l'espèce bactérienne. Ces EPS sont capables de concentrer les métaux et les acides organiques (Costerton et Lappin-Scott 1989). L'alginate, un polymère d'acides mannuronique et guluronique, est l'EPS majoritairement retrouvé dans les biofilms de *P. aeruginosa*. La matrice est en fait un mélange complexe de macromolécules constitué outre les EPS, de protéines et d'ADN (Sutherland 2001). Cet ADN extracellulaire a longtemps été supposé être

le résultat de la lyse cellulaire et donc ne jouer aucun rôle dans la vie du biofilm. Aujourd'hui, il a été montré que certaines bactéries, dont *P. aeruginosa*, sécrètent de petites quantités d'ADN extracellulaire via de petites vésicules (Kadurugamuwa 1995). Whitchurch a démontré que l'addition de DNase I dans le milieu de culture inhibe fortement la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* et dissout les biofilms âgés de moins de 60 heures (Whitchurch *et al.*, 2002). Par la formation de la matrice, le biofilm va acquérir son architecture dite en champignon (Costerton *et al.*, 1995) (figure III. 9).



**Figure III. 9.** : La maturation du biofilm.

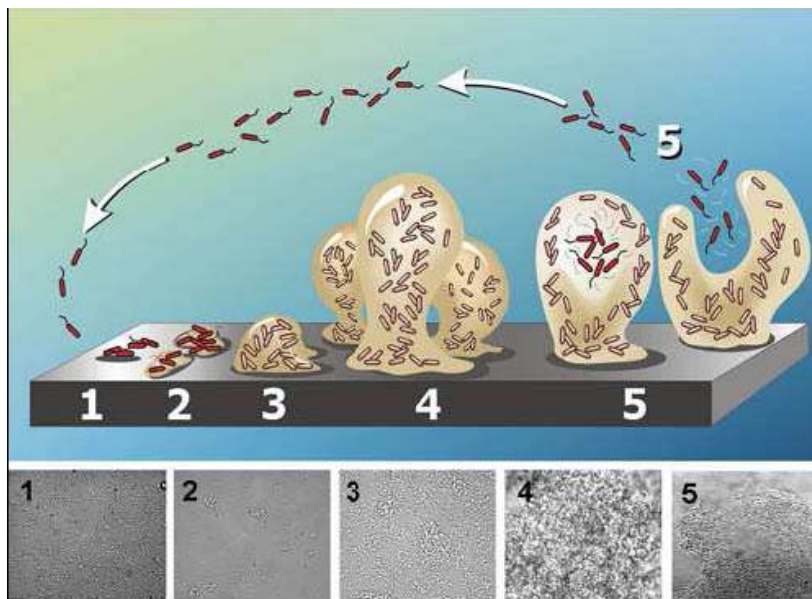
Un cycle de croissance et de relargage cellulaire s'établit par la suite. C'est ce cycle qui fait des biofilms de véritables réservoirs de pathogènes. Le relargage des bactéries étant induit par la carence ; il a été avancé qu'il devait permettre aux bactéries de retrouver un milieu plus favorable (O'Toole *et al.*, 2000). Les protagonistes principaux impliqués dans cette libération cellulaire sont les forces de cisaillement, les modifications de l'énergie de surface, la croissance bactérienne et la dégradation enzymatique des structures adhésives.

Le biofilm doit ainsi être vu comme un véritable système multicellulaire qui va au-delà de la compartimentation actuelle que l'on en a fait (Stewart 2001). Cette transition de l'état de cellules individuelles en suspension à l'état de membres d'une communauté complexe, entraîne inévitablement de profonds changements chez les micro-organismes.

### III.4. Formation de biofilms

L'état planctonique ou la bactérie est isolée dans le milieu environnemental, pourrait se réduire au passage de la bactérie d'une surface à l'autre. L'attachement sur une surface est une stratégie de survie qui permet à la bactérie de s'installer et de coloniser un environnement : c'est l'état sessile. La formation d'un biofilm bactérien sur une surface solide est un phénomène complexe dans lequel des processus physique, chimique, et biologiques sont impliqués (Katsutoshi 2009). La constitution d'un biofilm mature nécessite plusieurs étapes (figure III.10):

- Attachement réversible des bactéries ;
- Adhésion irréversible et production d'EPS ;
- Formation des micro-colonies ;
- Maturation du biofilm et mise en place de la structure tridimensionnelle du biofilm ;
- Détachement du biofilm.



**Figure III.10.** Représentation schématique des différentes étapes conduisant à la formation d'un biofilm (d'après *Stoodley et al., 2002*).

#### III.4.1. Conditionnement de la surface par le milieu

La nature du milieu, du matériau, ainsi que les caractéristiques de surface de ce dernier, sont des paramètres essentiels intervenant lors de cette première étape. En effet, la surface est le siège d'une absorption irréversible de macromolécules telles que des acides

humiques, des polysaccharides ou des protéines, conduisant à la formation d'un film conditionnant ("conditionning film") (Gallardo- Moreno 2002; Ghigo 2003). Ce film est qualifié de conditionnant car il peut modifier les propriétés de surface initiales du matériau ce qui a pour conséquence, soit de prévenir l'approche des bactéries, soit au contraire de créer un microenvironnement favorable à l'adhésion stable des bactéries.

### **III.4.2. Adhésion des bactéries**

L'approche des bactéries de la surface dépend des propriétés dynamiques du milieu (vitesse d'écoulement du fluide) et des propriétés physico chimiques de la surface (Katsikogianni et al., 2004). L'adhésion bactérienne implique le déplacement de la cellule vers le lieu de son adhésion. Cette approche nécessite différents appendices bactériens, tels que les flagelles et les cils qui permettent également à la bactérie de se déplacer sur la surface (O'Toole et Kolter, 1998 ; Gavin et al., 2003) . D'autres appendices, les pilis sont pour leur part impliqués dans l'attachement initial à la surface (Fletcher et al., 1993 ; McBride 2001). Dans un premier temps, l'adhésion est due à des interactions faibles entre la surface et les bactéries (interactions de type van der Waals et électrostatiques). A ce stade, la bactérie peut résorber de la surface et retrouver son état planctonique, l'adhésion est donc réversible.

Dans un deuxième temps, l'adhésion devient irréversible grâce à la sécrétion d'exopolymères par les bactéries permettant de consolider leur fixation au support. Dans ce cas, des interactions fortes s'établissent entre la bactérie et la surface avec des liaisons de type hydrophobe. La synthèse des EPS, qui débute dès les premières étapes d'adhésion, se poursuit pendant la maturation du biofilm et la matrice peut alors occuper jusqu'à (75-95) % du volume d'un biofilm mature (Parot s et al., 2007) .

### **III.4.3. Croissance du biofilm**

Une fois que la bactérie est irréversiblement adhérente à la surface, sa multiplication conduit à la formation de colonies qui vont recouvrir toute ou une partie de la surface selon les propriétés de surface des bactéries et des matériaux. La structure du biofilm dépend des conditions environnementales telles que, la source de carbone ou le régime hydrodynamique (Stanley et al., 2003 ; Klausen et al., 2006). Par la suite, le biofilm a une croissance exponentielle se traduisant par une augmentation importante de son épaisseur jusqu'à former un film hétérogène tridimensionnel (Costerton et al., 1995 ; Davey et O'Toole, 2000 ; Sauer

et *al.*, 2002). Dans cette structure tridimensionnelle se forment des canaux permettant la circulation de nutriments, d'oxygène et l'évacuation des produits issus du métabolisme bactérien (Costerton et *al.*, 1999). Finalement, l'épaisseur du biofilm se stabilise lorsque les phénomènes d'arrachement du biofilm compensent sa croissance.

#### **III.4.4. Dispersion du biofilm**

Le détachement de cellules du biofilm intervient lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables : limitation de la disponibilité en oxygène dans des biofilms épais, apparition de forces de cisaillement dues aux conditions hydrodynamiques, diminution de la concentration ou modification de la nature des nutriments disponibles (Sauer et *al.*, 2002 ; Sauer et *al.*, 2004). Les bactéries peuvent alors migrer afin de trouver un environnement plus favorable à leur développement. Ce phénomène n'est pas restreint au dernier stade du développement du biofilm, mais peut avoir lieu, soit par lyse cellulaire, soit par le départ de cellules viables, tout au long de la formation du biofilm et en réponse à un changement d'environnement

#### **III.4.5. Propriétés des biofilms**

Dans la nature, il est plutôt exceptionnel de trouver des biofilms clonaux, c'est-à-dire ne comportant que des individus d'une seule et même espèce provenant d'un ancêtre unique s'étant multiplié par scissiparité, sauf peut-être au tout début de son installation. Pour qu'un biofilm se développe, il faut d'abord qu'un microorganisme se fixe sur le substrat. Tous les microorganismes possèdent des moyens de s'accrocher à un substrat, même s'ils sont essentiellement planctoniques. Certains d'entre eux, essentiellement parce qu'ils sont benthiques, auront développé des moyens remarquables de fixation. Mais c'est surtout chez les bactéries que ces moyens sont particulièrement efficaces. Les bactéries possèdent, en effet, des dispositifs d'adhésion efficaces sous la forme d'abord des pilis et des fimbriaes, mais aussi grâce à des protéines membranaires que l'on appelle adhésines. Ces protéines sont assez efficaces pour autoriser la fixation des bactéries sur des revêtements dits antiadhésifs. Dans un premier temps, les bactéries établissent des liaisons chimiques faibles (forces de van der Waals) avec le substrat : effet d'orientation ou forces de Keesom ; effet d'induction ou forces de Debye ; effet de dispersion ou forces de London ou des ponts hydrogènes. La mise en place des biofilms ne résulte pas seulement de l'adhésion des microorganismes sur le substrat, mais également de celle des molécules et macromolécules (protéines, sucres, acides gras, etc.) qui, en encrassant les surfaces vont aider à la constitution des biofilms, par exemple, en les initiant. Diverses explications aident à comprendre les mécanismes d'adhésion

de ces salissures sur les substrats, en particulier la théorie de Derjaguin, Landau, Verveij et Over Beek (DLVO) qui met en avant le rôle des charges électriques dans les interactions entre les particules chargées et les macromolécules (Katsutoshi et *al.*; 2009). Enfin, l'adhésion des microorganismes sur les substrats s'explique aussi selon une approche thermodynamique dite théorie du mouillage. Cette théorie met aussi en jeu les forces de van der Waals. Dans un deuxième temps, les bactéries produisent des protéines ligands (pili) grâce auxquelles elles vont installer une adhésion durable avec le substrat. Certains microorganismes, incapables de produire ces ligands, vont simplement s'accrocher aux individus des espèces bactériennes qui sont capables de le fabriquer. Lorsqu'un nombre significatif d'organismes sont solidement fixés, il va se produire deux phénomènes concomitants : la sécrétion proprement dite du biofilm, c'est-à-dire de la matrice protéique et polymérisée dans laquelle les organismes fixés vont se reproduire et former des colonies imbriquées. A partir de ce moment, le biofilm s'épaissit et s'enrichit de diverses autres espèces de bactéries, d'algues, de champignons et de protozoaires, y compris de prédateurs ou des parasites lesquels assurent une relative régulation du microécosystème en devenir. A mesure que le biofilm s'épaissit et vieillit, diverses contraintes mécaniques en arrachent des parties qui sont dispersées dans le milieu liquide. Les bactéries et autres microorganismes deviennent planctoniques avant de s'installer ailleurs ou de disparaître.

### **III.5. Aspects positifs et négatifs des biofilms**

Les biofilms bactériens peuvent jouer des rôles bénéfiques ou préjudiciables aussi bien dans les domaines médicaux, environnementaux qu'industriels.

#### **III.5.1. Aspects positifs des biofilms**

Dans de nombreux cas des biofilms ont des effets positifs, ou même vitaux en ce qui concerne les biofilms physiologiques (colonisation de tractus intestinal ou de la surface des racines). Ils sont également des agents géochimiques importants en agissant sur les transformations et les flux de matière aux interfaces liquide-solide et dans la formation ou l'altération des minéraux. La capacité de certains biofilms à dégrader leur support est mise à profit dans les procédés de biolixiviation (attaque microbienne des minéraux pour mettre en solution les ions souhaités). La capacité des biofilms à dégrader les molécules organiques est aussi utilisée pour la dépollution des eaux comme la dénitrification, la dégradation du toluène, la rétention du cadmium, etc. (Whiteley et *al.*; 2001)

#### **III.5.2. Aspect négatifs des biofilms**



D'une manière générale toute prolifération non contrôlée des biofilms peut être nuisible. Les biofilms posent des problèmes importants dans des domaines très divers allant de la médecine au milieu industriel (agroalimentaire, maritime, distribution des eaux...), en passant par l'environnement (dégradation des monuments) (Reisner *et al.*; 2005).

### **III.6. Infection bactérienne**

Les biofilms ont pris une importance toute particulière en médecine lorsqu'il a été établi qu'ils étaient impliqués dans 65% des infections bactériennes chez l'homme (Costerton *et al.* 1999 ; Reid 1999 ; Hall-Stoodley *et al.*, 2004 ; Hope and Wilson 2006 ; Tenke *et al.*, 2006) Ces biofilms sont également impliqués dans la majorité des infections nosocomiales et dans toutes les infections prothétiques (Costerton *et al.*, 1999 ; Costerton *et al.*, 2005 ; Dunlop *et al.*, 2005 ; Arciola *et al.*, 2006). L'éradication des infections à biofilm est en effet extrêmement difficile. Si les traitements antibiotiques classiques sont efficaces sur les bactéries en suspension, ils s'avèrent bien moins efficaces sur des bactéries adhérentes (Booun *et al.*; 2000 ). Cette diminution de la sensibilité des bactéries adhérentes aux agents antibactériens participe à ce qu'on appelle aujourd'hui le phénotype « biofilm » qui refléterait des altérations de l'expression génétique des bactéries adhérentes. Identifier les gènes biofilms donc des cibles potentielles est donc apparu rapidement comme une stratégie intéressante pour limiter leur formation voire permettre leur éradication (Lewis 2001 ; Stewart and Costerton 2001a ; Ghigo 2003), .

### **III.7. Résistance et biofilms**

Les biofilms possèdent des propriétés physiques, chimiques, biologiques et phénotypiques extraordinaires, en particulier une résistance accrue aux stress naturels et aux agents antimicrobiens (Davey and O'Toole 2000) . La résistance des biofilms est différente de la résistance conférée artificiellement par une mutation, un transposon ou un plasmide. Un biofilm montre une résistance aux traitements antibiotiques nettement supérieure à une culture en suspension avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) dix à mille fois supérieures (Stewart and Costerton 2001a). L'âge du biofilm a également son importance puisqu'il a été montré qu'un biofilm mature est moins sensible aux antibiotiques qu'un biofilm jeune ( Jouenne *et al.* 1994)

Pour expliquer cette résistance plusieurs théories ont été mises au point parmi les plus récentes sont : L'effet de la matrice, la création de microenvironnements au sein des biofilms

et enfin l'émergence d'un phénotype persistant chez les bactéries immobilisées (Stewart and Costerton 2001b).

### **III.7.1. Existence de microenvironnements**

La matrice est composée de cellules, d'eau et de macromolécules auxquelles s'ajoutent des zones d'activité enzymatique et/ou régulatrices. Ces ensembles contribuent à créer des microenvironnements particuliers au sein du biofilm (Allison 2003). Il a par exemple été montré qu'il existe des zones anaérobies dans un biofilm ; or certains antibiotiques (les aminosides) sont inefficaces ( Beer *et al.*, 1994b).

La deuxième hypothèse entre dans la classe des hypothèses physiologiques et explique la résistance par une faible croissance des bactéries sessiles par rapport aux bactéries planctoniques .vraie pour certaines classe d'antibiotiques (les  $\beta$ -lactamines), elle n'explique néanmoins pas la résistance à l'hypochlorite.

Il a également été rapporté la présence de zones acides au sein des biofilms (en particulier à la périphérie des colonies), avec des écarts de valeur allant jusqu'à une unité pH, ce qui peut perturber l'activité de certains antibiotiques. L'environnement osmotique peut être également modifié et induire une réponse au stress qui va contribuer à la résistance des bactéries (Priegent-Combaret *et al.*, 1999 ;Stewart and Coeterton 2001a).

### **III.7.2. Bactéries résistantes**

Certaines cellules libres peuvent devenir résistantes pour une contrainte donnée, mais quand cette pression est levée, les cellules reviennent rapidement à un état sensible. A l'inverse, les cellules résistantes s'accumulent dans les biofilms, car elles sont retenues par la matrice du biofilm.

### **III.8 Dénombrement des cellules viables cultivables**

Pour dénombrer les cellules viables adhérentes, il faut les décrocher du support solide soit par traitement aux ultra sons soit en grattant les surfaces. Les microorganismes ainsi récupérés sont alors ensemencés en gélose nutritive et incubés, généralement à leur température optimale de croissance .cette technique ne permet cependant de déterminer que les formes viables et cultivables. De plus, il est à noter que la mise en suspension des cellules décrochées implique une dilution et augmente ainsi le seuil de sensibilité de cette méthodologie. D'autres techniques doivent donc être mise en œuvre afin de compléter l'étude du comportement bioadhésif des microorganismes aux surfaces. Facteur susceptibles de

modifier l'adhésion est dépendante de l'énergie d'interaction entre les corps en présence i.e. Microorganismes substrats récepteur et fluide environnant.

Ainsi, tous les paramètres susceptibles de modifier ces interactions peuvent potentiellement influencer l'adhésion microbienne sur support solide en milieu aqueux.

### **III.8.1. Caractéristiques des cellules bactériennes**

L'architecture et la nature des groupements chimiques présents à la surface des cellules microbiennes sont à l'origine de leurs propriétés physico-chimiques de surface (charge de surface, caractère Lewis acide base et Vander waals ) (Van der Mei *et al.*, 1988 ;Hancock 1991 ; Reid *et al.* ;1999) .

La charge de surface de bactéries, généralement liées aux groupements ionisés (phosphates, carboxyliques, sulfates, amines) des macromolécules présentes à la surface des bactéries dépend de leurs environnement aqueux. Quelques exceptions près les bactéries sont généralement chargées négativement au pH physiologique.

Il est à noter que la synthèse de la pluparts des constituants de la paroi cellulaire est spécifique à chaque souche et qu'elle peut évoluer en fonction de l'état physiologique des cellules (température de croissance ,stade de croissance ....), en modifiant ainsi leurs propriétés physico-chimiques de surface et donc leur comportement bio adhésif .de plus ,il semblerait que la capacité d'adhésion des microorganismes aux surfaces soit dépendante de leurs capacité a synthétisé des polymères extracellulaires . Cette caractéristique est d'autant plus importante que les cellules sont soumises à un flux hydrodynamique. Enfin la synthèse d'appendices exo cellulaires peut facilités le déplacement des micro-organismes favorisant ainsi le contact avec les surfaces réceptrices.

### **III.8.2. Caractéristiques des supports solides**

Les supports inertes sont classés en trois groupes en fonction de leurs hydrophobicité de surface.

1. Les polymères non - polaires
2. Les polymères ayant des groupements polaires.
3. Les matériaux hydrophiles inorganiques.

Il est à noter que pour les supports hydrophiles chargés négativement, l'adhésion était négligeable et inversement pour ceux chargés positivement. Il est évident que la charge électrique des supports hydrophobes des polymères sur l'adhésion bactérienne est très importante.

Il est à noter qu'un traitement plasma ou encore une simple procédure de nettoyage, en modifiant les propriétés physico-chimiques de surface des matériaux inertes (hydrophobie, caractéristiques LEWIS acide base ou encore charge de surface peuvent modifier l'adhésion bactériennes. (Allion 2004).

### III.9. Biofilm à E. Coli

Les déterminants de surface impliqués dans les différentes phases de la formation d'un biofilm à E. Coli sont repris dans le tableau III.3.

1-contact de surface et attachement réversible	Flagelle et mobilité
2-attachement irréversible	Fimbriae de type 1 Curli EPS (PGApolysaccharide)
3-formation de microcolonies/	Mobilité Curli antigène 43 (autotransporteur) EPS(acide colanique ) EPS(PGApolysaccharidique)
4-maturation	Curli EPS(acide colanique) Pili de conjugaison
5-relargage	Flagelle et mobilité

**Tableau III.3. Déterminant de surface requis pour les biofilms d'E.Coli** (d'après Van Houdt, 2005)

Trois facteurs sont essentielles à la formation de biofilm chez E.Coli : la synthèse de flagelle, la mobilité et les pilis de type I. La production d'exopolysaccharides joue également un rôle dans la formation du biofilm .

### III.9.1. Les surfaces anti-biofilm

Ainsi, grâce à la connaissance de ce mécanisme d'adhésion, nous pouvons définir des stratégies contre la formation des biofilms.

Dans chaque domaine, une précaution semble primordiale, celle d'éviter l'utilisation de surfaces poreuses, appréciées par les bactéries car présentant des microcavités hospitalières (replis ou cavités). On préférera donc des surfaces lisses et inertes pour restreindre au maximum toute fixation de bactérie.

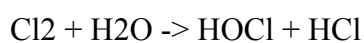
D'autre part il a été démontré que les matériaux hydrophobes fixent plus facilement les bactéries que ceux de nature hydrophile. C'est pourquoi on préférera des surfaces telles que le verre. C'est également pour cette raison que l'on cherche à synthétiser des produits de synthèse à pouvoir mouillant élevé.

#### III.9.1.1. Les produits anti-adhérentiels

Dans l'industrie alimentaire, l'accent est mis sur la conception de nouveaux types d'emballages : les emballages fonctionnels. Ce type d'emballage est obtenu par incorporation d'une substance active au sein de l'emballage. Cette substance active permet de prévenir le développement de bactéries pathogènes à sa surface.

La désinfection des biofilms dans les circuits d'eau chaude sanitaires peut être obtenue par la libération d'ions chlore et argent. Ce sont des agents biocides.

Par exemple, quand le dichloré (gaz) pénètre dans l'eau il s'hydrolyse pour former de l'acide hypochloreux et de l'acide chlorhydrique. La réaction qui se produit est la suivante:



L'acide hypochloreux est responsable des réactions d'oxydation avec le cytoplasme des micro-organismes, après diffusion à travers les membranes cellulaires. Le chlore perturbe ensuite la production d'ATP (adénosine triphosphate), une molécule importante intervenant dans les mécanismes de respirations. Les bactéries qui sont présentes dans l'eau meurent suite à des problèmes respiratoires, provoqués par l'activité du chlore.

### III.10 Résultats et discussions

#### III.10.1. Adhésion sur un support en verre dans trois milieux d'études :

1 / Eau distillée stérilisée

2/ Eau physiologique

3/ Milieu de culture PBS ( Phosphate Buffer Saline) (Composition voir ANNEXE3)

**1<sup>ère</sup> phase :** Obtention des biofilms sur des lames en verre de marque objeckttager made in Germany de dimensions (76 × 26) mm.

**Préparation des lames en verre:**

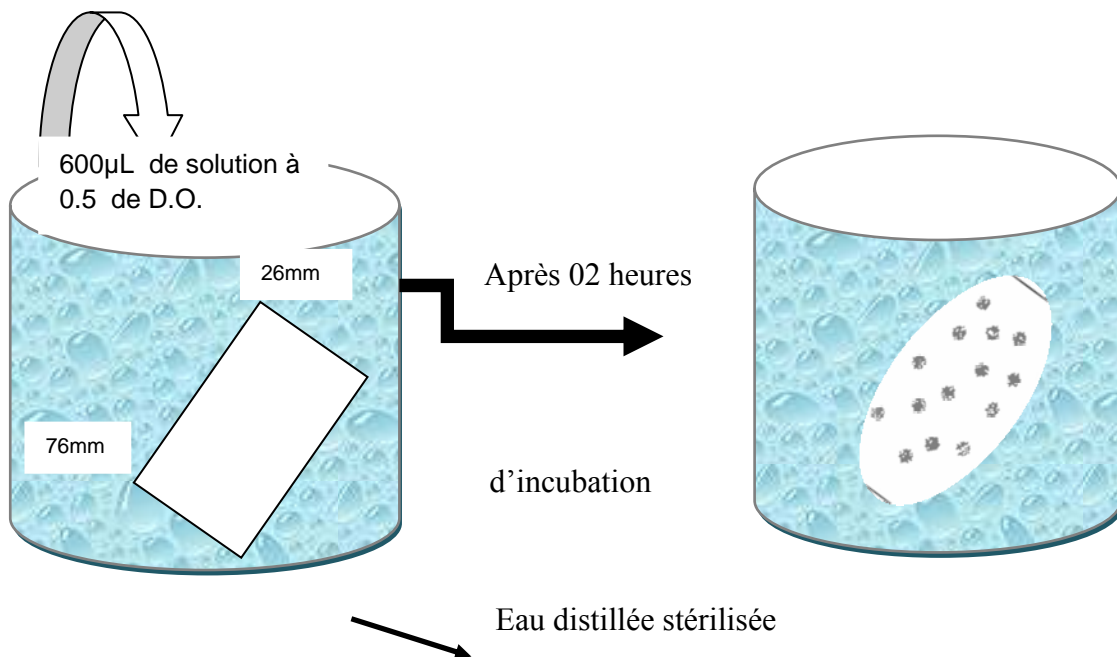
1. Rinçage à l'eau distillée stérilisée.
2. Nettoyage par immersion pendant 01 mn dans une solution « piranha » préparée comme suit :

Prendre 3.75ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 70%, ajouter 8.75ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30%

1. Autoclavage pendant 15 mn à 121°C, dans une eau distillée stérilisée.

**1- formation du biofilm dans l'eau distillée stérilisée :**

1. Dans 03 béchers contenant chacun 150 ml d'eau distillée stérilisée, nous avons placé dans chacune d'elles une lame en verre préalablement stérilisée et 600 µl de la solution mère à 0.5 de D.O. (Schéma 1).
2. Dans l'étuve, nous avons placé les 03 béchers avec une agitation continue, pour incubation pendant 02 heures à une température de 37°C.



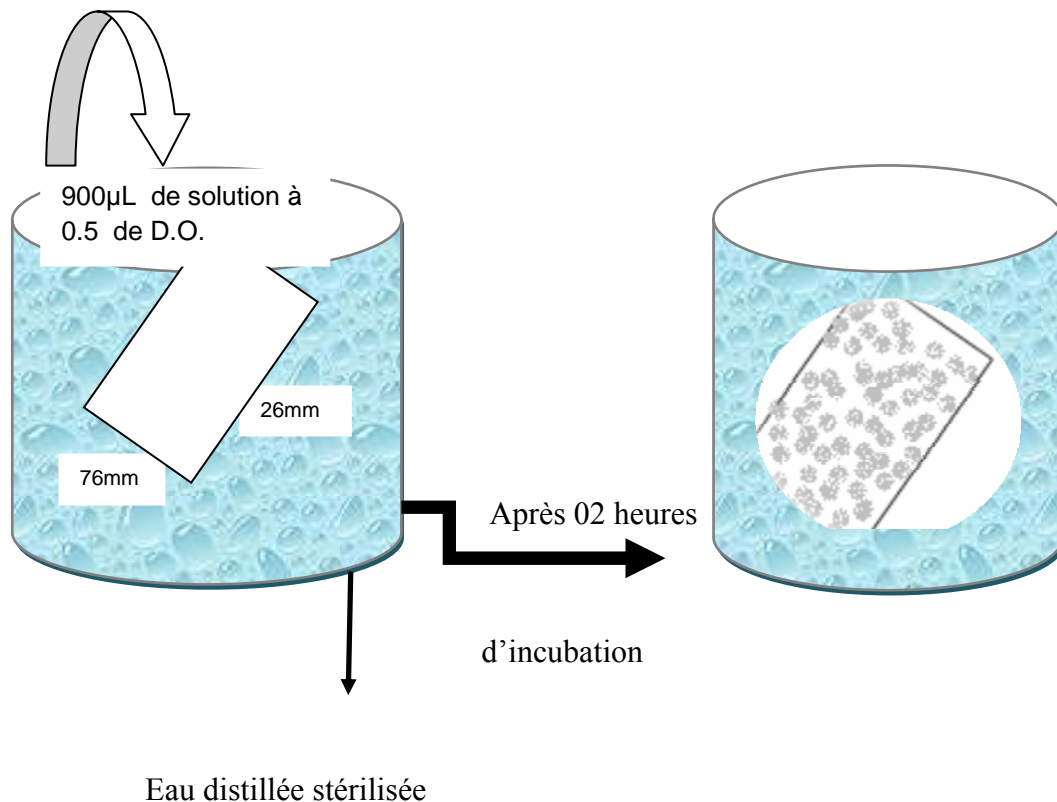
**Schéma 1**

A l'issue des 02 heures d'incubation, dans un bac à ultrason de Marque Bandelin electronic Gm bh, lavé à l'eau de Javel puis à l'éthanol et séché, nous avons rincé chaque lame en verre dans de l'eau distillée stérilisée.

Nous avons prélevé à l'aide d'une micropipette 20  $\mu$ l de cet eau de rinçage que nous avons versé dans les boites de Pétri préalablement coulées avec du P.C.A.

Ensuite, nous avons placé les dites boites de Pétri dans l'étuve pour incubation, pendant 48 heures à 37°C.

Les différentes étapes et les moyens ci-dessus utilisés en matière de formation des biofilms sont répétés, une seconde fois avec 900  $\mu$ l de solution mère à 0.5 de D.O.(Schéma 2).



**Schéma 2**

**2- Formation du biofilm dans l'eau physiologique :**

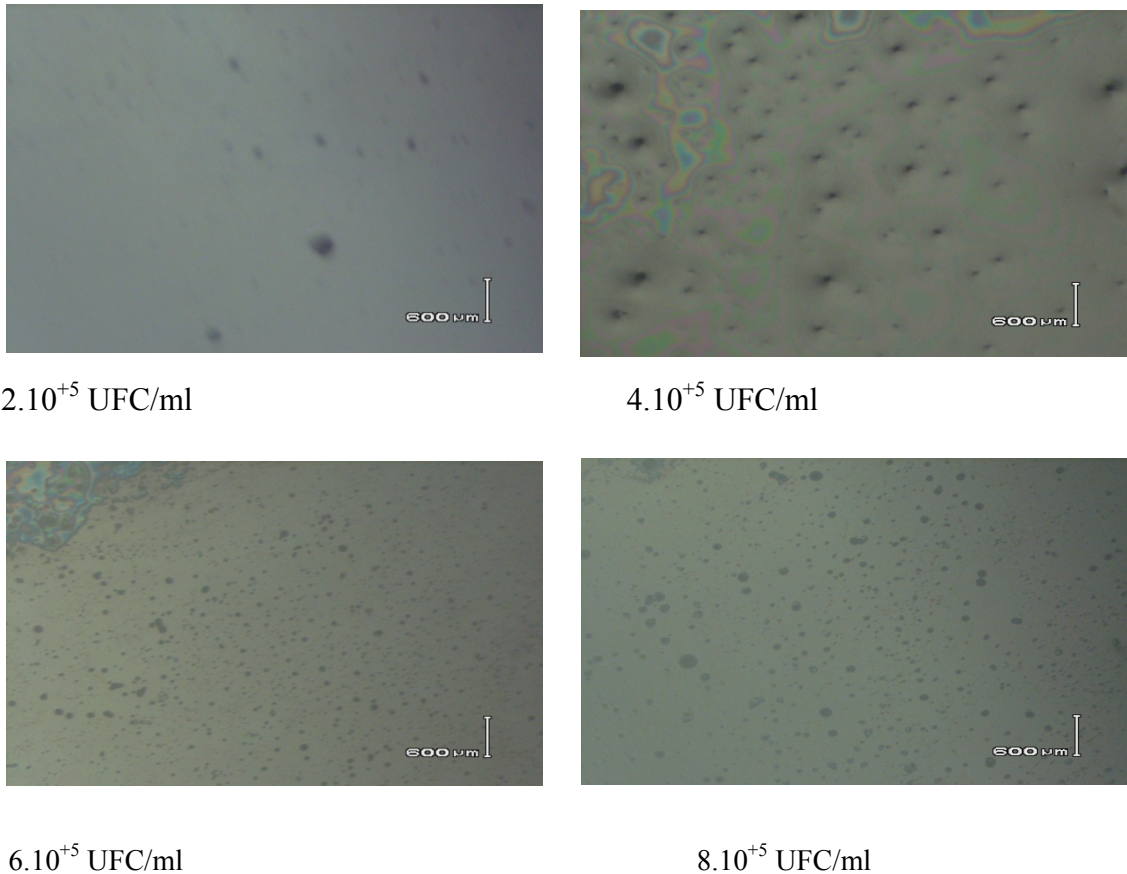
La même démarche a été renouvelée pour la formation du biofilm dans l'eau physiologique avec des volumes 300 $\mu$ l ; 900 $\mu$ l de solution mère à 0,5 de D.O.

### 3- Formation du biofilm dans le P.B.S. (Phosphate Buffer Saline) :

La même démarche a été renouvelée pour la formation du biofilm dans le P.B.S avec des volumes 300µl ; 600 µl , 900 µl et 1200 µl de solution mère à 0,5 de D.O.

D'après les résultats bactériologiques obtenus, nous avons constaté que l'augmentation de la concentration des *E.Coli* K12 dans le milieu d'étude favorise l'augmentation de l'épaisseur du biofilm.

Pour confirmer ces constatations des observations au microscope optique ont été réalisées. Le microscope optique utilisé est de marque : Olympus BX51M Upright



**Figure III.11. :** Observations aux microscopes optiques des biofilms obtenus sur support en verre dans le PBS à différentes concentrations de solution mère à 0,5 de D.O.

#### III.10.2. Biofilms sur support en platine :

##### a/ Stérilisation de l'électrode de platine à plaque :



L'électrode de platine à plaque de marque RADIOMETER Analytical , est rincée à l'eau distillée stérilisée puis nettoyée avec de l'acétone et enfin immergée pendant 01 mn dans la solution « piranha »

A noter que la solution « piranha » est obtenue dans les mêmes conditions et selon le même mode opératoire auparavant décrits.

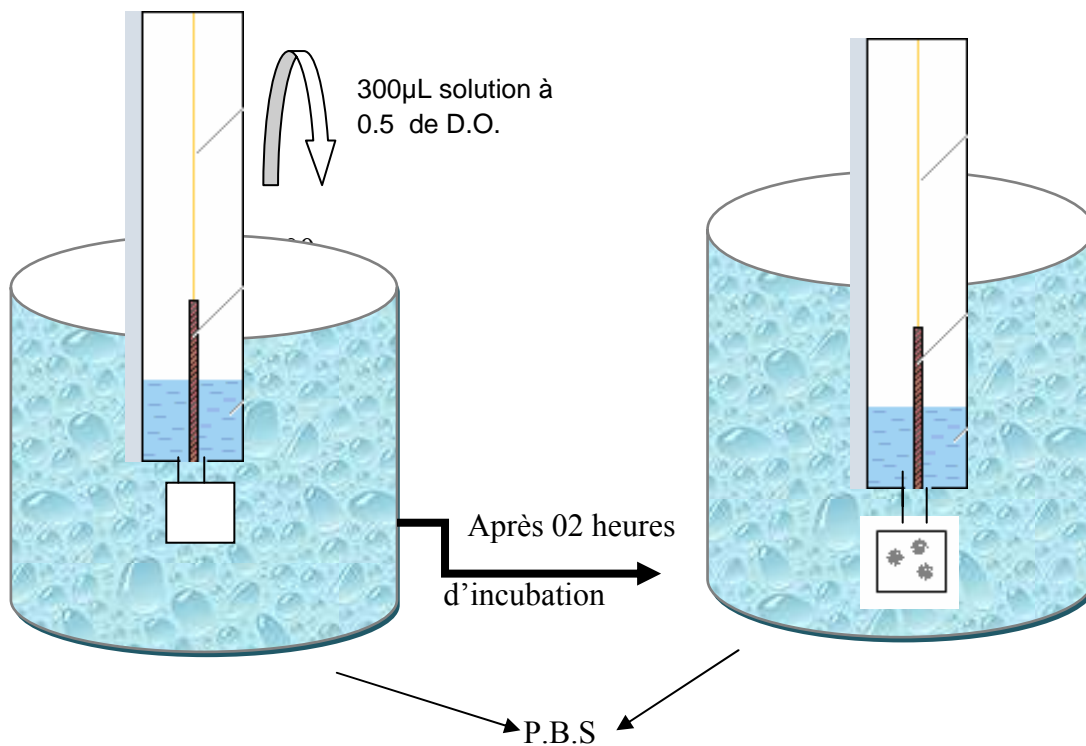
**b/ formation du biofilm :**

Dans un bécher contenant 150 ml de solution P.B.S, nous y avons mis l'électrode de platine, préalablement lavée et stérilisée et 300 µl de la solution mère à 0.5 DO.(Schéma 3).

Dans l'étuve, nous avons placé le bécher pour incubation pendant 02 heures à une température de 37°C.

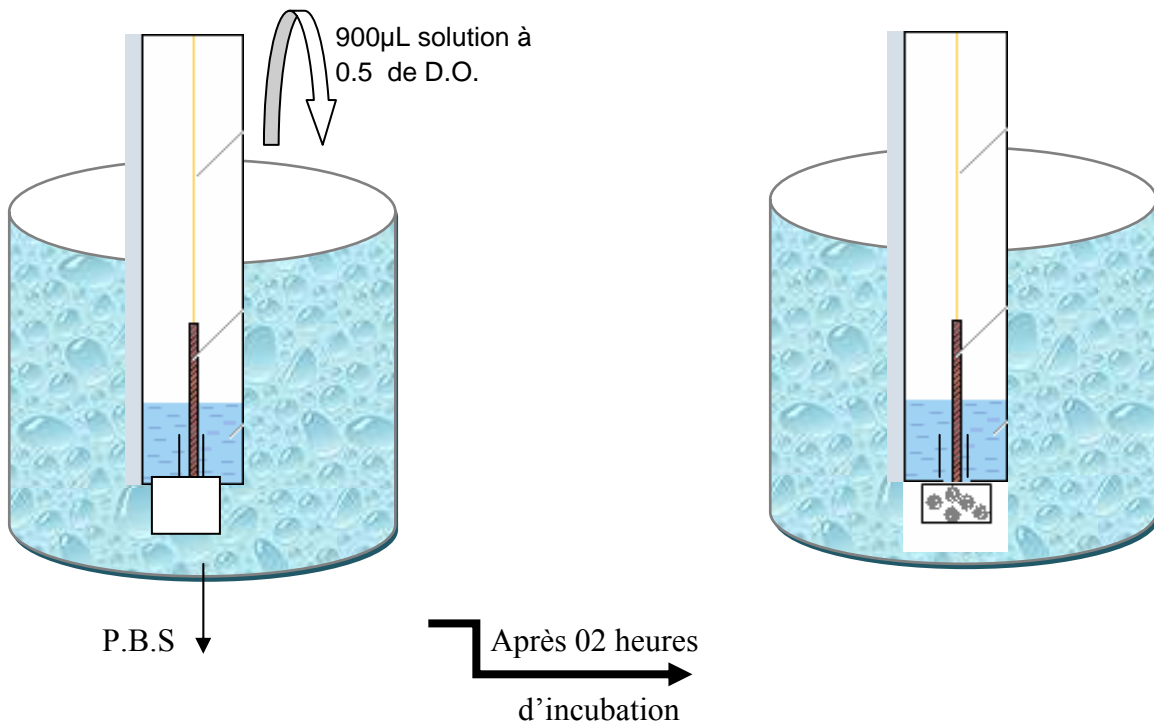
Dans le bac à ultrason lavé à l'eau de javel puis à l'éthanol et séché, nous avons rincé l'électrode dans l'eau distillée stérilisée pendant 90mn et de cet eau de rinçage ,nous avons prélevé, à l'aide d'une micropipette, 20 µl que nous versons dans une boîte de Pétri préalablement coulée avec du PCA.

Les boîtes de Pétri sont placées dans l'étuve pour incubation pendant 48 heures à 37°C.

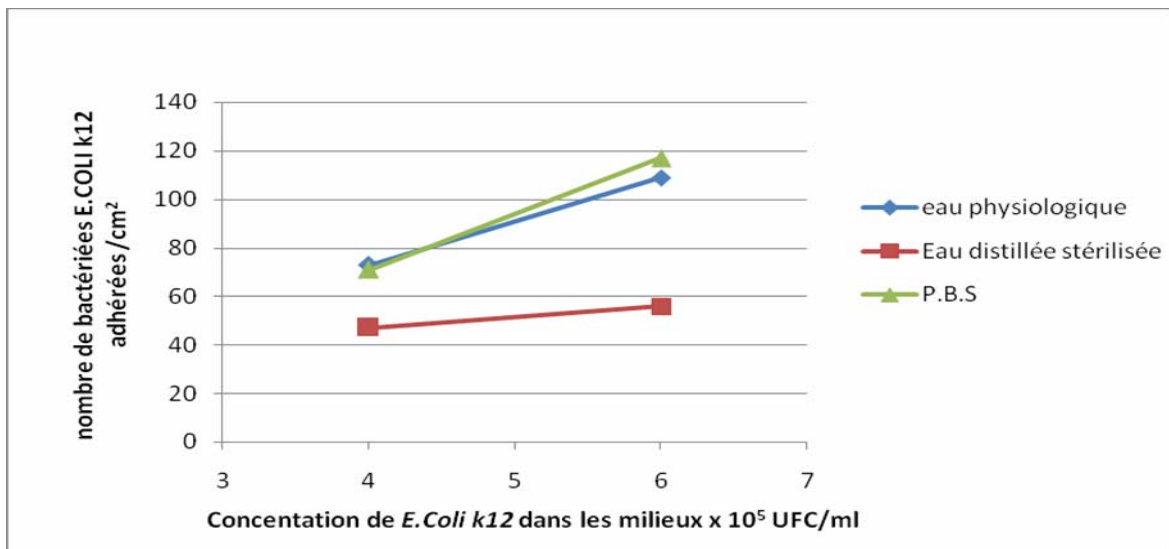


**Schéma 3**

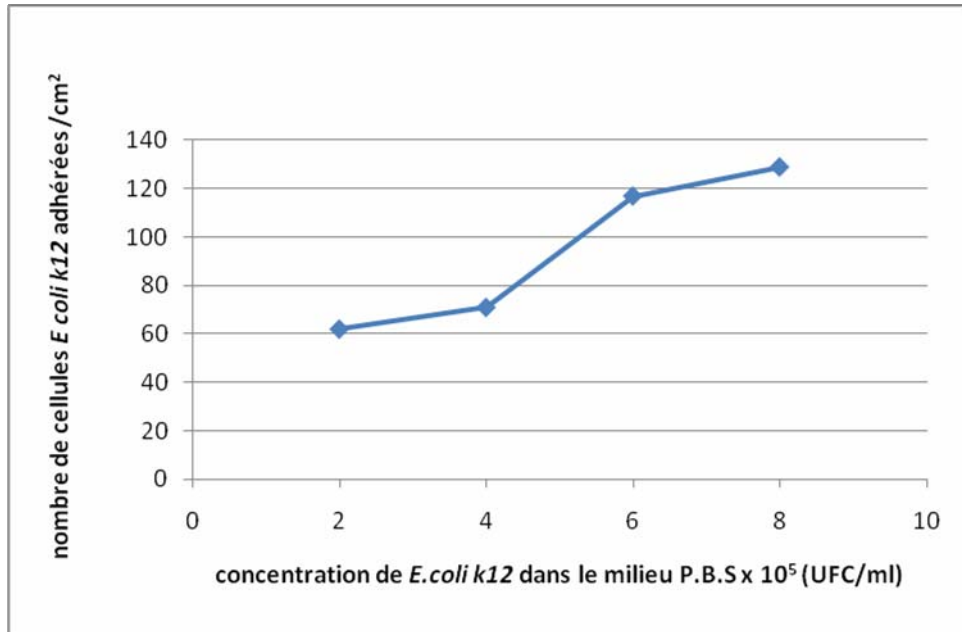
La même démarche et les mêmes étapes sont répétées avec une concentration de 900  $\mu\text{l}$ , à 0,5 de D.O. (Schéma 4).



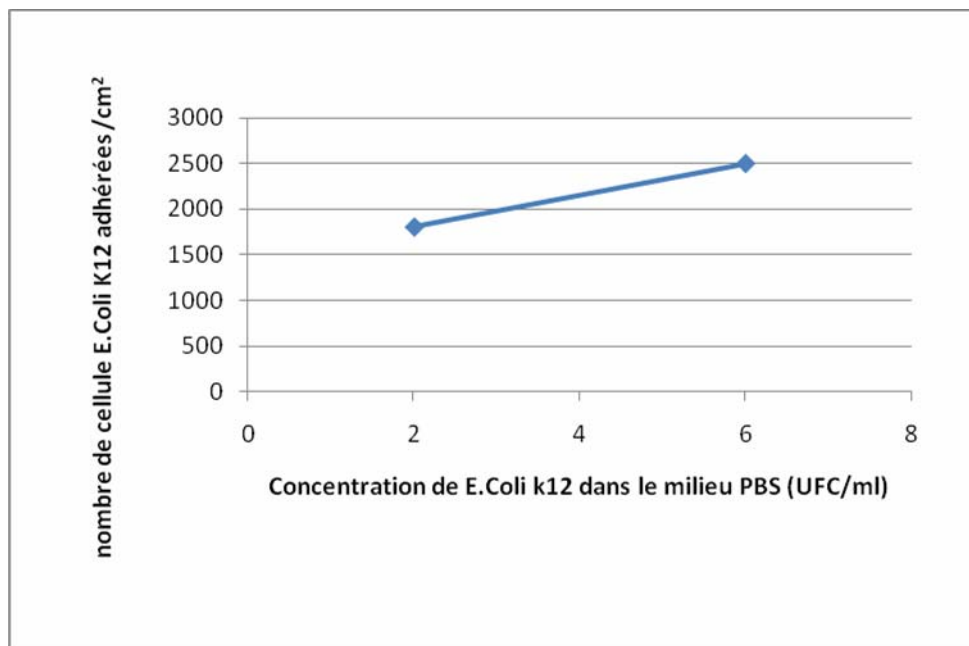
**Schéma 4**



**Figure III.12.** : Nombre de cellules *E. Coli k12* adhérentes en fonction de la concentration de la solution mère à 0,5 de D.O. dans différents milieux.



**Figure III.13.:** Variation du nombre de Bactéries *E.Coli* K12 adhérees sur un support en verre en fonction de la concentration de *E.Coli* K12 dans le milieu PBS.



**Figure III.14 :** Variation du nombre de Bactéries *E.Coli* K12 adhérees sur un support de Platine en fonction de la concentration de *E.Coli* K12 dans le milieu PBS.

**III.10.3.L'influence de la nature du support :****Tableau III.4.** : Influence de la nature du support sur le phénomène d'adhésion des *E.Coli K12* dans le PBS .

Concentration <i>E.coli k12</i> dans le milieu P.B.Sx10 <sup>5</sup> (U.F.C/ml)	2	6
Nombre <i>E.coli k12</i> adhérees sur un support en Platine/cm <sup>2</sup>	1800	2500
Nombre <i>E.coli k12</i> adhérees sur un support en verre / cm <sup>2</sup>	62	117

Le nombre de cellules qui adhèrent sur la lame en verre augmente quand la concentration de la solution mère à 0,5 DO augmente respectivement de  $2.10^{+5}$ ,  $4.10^{+5}$ ,  $6.10^{+5}$  et  $8.10^{+5}$  UFC/ml, et cela dans différents milieux d'étude à savoir :Eau distillée stérilisée ,Eau physiologique et PBS.(figure III .12.).

Il apparaît que, le nombre de cellules qui ont adhéré, sur la lame en verre dans le PBS (figure III.13.) est plus élevé que, celui dans l'eau physiologique ou l'eau distillée stérilisée. Ceci s'explique par ,le fait que la composition du PBS, riche en nutriments et de salinité proche à celle du cytoplasme, lui confère la meilleure efficacité de bioadhésion .Tandis que l'eau physiologique, pauvre en nutriments mais de même salinité que le PBS, le classe en deuxième position du point de vu efficacité en bioadhésion

La présence des nutriments et de la salinité, dans le milieu favorisent la survivance et le foisonnement des bactéries *E.Coli K12*. Le phénomène peut s'expliquer par, le fait qu'un équilibre par osmose s'établit en permanence, entre la membrane cytoplasmique et le milieu extérieur.

Par contre, dans l'eau distillée stérilisée, la cellule n'est plus alimentée par les nutriments dont elle dépend. Nous notons aussi que le phénomène d'osmose : Pénétration du milieu le moins concentré vers le milieu le plus concentré (cytoplasme), provoque chez la cellule l'incapacité de supporter la force de pénétration de l'eau. Elle commence à gonfler progressivement jusqu'à l'éclatement de sa membrane cytoplasmique (Turgescence).

A partir du tableau III.4., pour les deux concentrations choisies de  $2.10^{+5}$  et  $6.10^{+5}$  UFC/ml, nous observons que le nombre de cellules qui ont adhéré sur le support en Platine sont respectivement de 1800 et 2500 (figure III.14.), alors que ceux qui ont adhéré sur le support en verre sont respectivement de 62 et 117, cette différence en nombre de bactéries adhérentes sur un type de support (figure est due à des facteurs de surface tels que : surface spécifique, rugosité et morphologie du matériau choisi).

Pour les surfaces biologiques, la différence des propriétés physicochimiques des deux supports (verre, platine) doit être liée premièrement à leurs compositions chimiques différentes. En effet, comme pour les propriétés électrostatiques (Hamadi et al, 2005b), les autres propriétés, liées à chacun des supports, peuvent varier aussi en fonction des conditions physicochimiques du milieu ; la topographie (rugosité) des surfaces peut influencer considérablement ces propriétés physicochimiques (Bengoram et al, 2008).

Les images, obtenues par la microscopie optique, sont présentées dans la figure III.11. La bactérie *E.Coli K12* a la capacité d'adhérer sur le verre et sur le platine. Les cellules adhérentes sont sous forme d'agrégats sur les deux supports. Le phénomène d'agrégation semble être plus important sur le platine que sur le verre ; sur ce dernier, les cellules adhérentes sont distribuées sur toute la surface en formant des petits agrégats.

L'adhésion microbienne sur un substrat est souvent considérée comme le résultat des interactions physico-chimiques entre le substrat et la cellule microbienne. Ces interactions comprennent les interactions électrostatiques, les interactions de Van der Waals et les interactions acides - bases (donneur d'électrons – accepteur d'électrons). (Gallardo-Moreno *et al.*, 2004; Hamadi *et al.*, 2005a).

Il est chimiquement accepté que les cellules hydrophobes ont tendance à adhérer sur un substrat hydrophobe et les cellules hydrophiles sur un substrat hydrophile. Des travaux antérieurs ont rapporté que l'hydrophobicité ne peut pas expliquer systématiquement les résultats de l'adhésion microbienne sur un support ((McEldowney *et Fletcher* 1986 ; Partterpstra *et al.*, 1988 ; Sjollemma *et al.*, 1990) . Les interactions acides –bases jouent un rôle très important dans le phénomène d'adhésion (Henriques *et al.*, 2004; Hamadi *et al.*, 2005a ; Hamadi *et al.*, 2008c). (Van Oss 1993) a rapporté que les protéines peuvent être adsorbées sur une surface très hydrophile, tel que le verre, même si les interactions sont répulsives (électrostatiques) ou insuffisamment attractives (hydrophobes) grâce aux interactions acido-

basiques entre le fort caractère donneur d'électrons des protéines et le faible caractère accepteur d'électrons du verre. En se basant sur l'approche de Van Oss, nous pouvons déduire que l'adhésion de *E.Coli K12* sur le verre et le platine peut être due, en partie, aux interactions acide – bases entre la surface bactérienne, qui possède un caractère donneur d'électrons bien exprimé, et les supports qui sont faiblement accepteurs d'électrons.

## **Conclusion**

Il est maintenant établi que les bactéries vivant sous la forme de biofilm possédant de nombreuses différences phénotypiques par rapport à leurs congénères planctoniques. En particulier, les biofilms présentent une plus grande résistance aux agents antimicrobiens et aux stress physiques et environnementaux.

Nous avons étudié dans ce chapitre, la bioadhésion de la bactérie *E.Coli k12* sur un support sous forme de plaques en verre, dans les milieux : Eau distillée stérilisée ; Eau physiologique et une solution de Phosphate Buffer Saline (PBS). Et, un support en Platine dans le milieu PBS.

En se basant sur la courbe d'étalonnage spécifique à la bactérie *E.Coli k12* qui établit la relation entre le nombre de bactéries exprimé en UFC/ml et la densité optique (DO), nous avons préparé des solutions à 0,5 de DO, qui correspond à la phase de croissance de la bactérie.

Nous avons étudié l'influence de la concentration des bactéries dans le milieu sur le nombre de cellules adhérees, nous constatons que le nombre de cellules adhérees sur le support en verre augmente quand la concentration de la solution mère à 0,5 DO augmente respectivement de  $2.10^{+5}$ ,  $4.10^{+5}$ ,  $6.10^{+5}$  et  $8.10^{+5}$  UFC/ml, et cela dans les différents milieux.

Nous avons noté que le nombre de cellules adhérees dans le PBS est plus important que dans les deux autres milieux, et cela est dû à la composition du milieu d'étude qui se caractérise par sa salinité et la présence de nutriments nécessaires au foisonnement et à la survie des bactéries. La spécificité du PBS peut s'expliquer par le fait qu'un équilibre par osmose s'établit en permanence entre la membrane cytoplasmique et le milieu extérieur.

Dans l'eau distillée stérilisée, la cellule n'est plus alimentée par les nutriments dont elle dépend. Nous notons aussi que le phénomène d'osmose : Pénétration du milieu le moins concentré vers le milieu le plus concentré (cytoplasme), provoque chez la cellule l'incapacité

de supporter la force de pénétration de l'eau. Elle commence à gonfler progressivement jusqu'à l'éclatement de sa membrane cytoplasmique (Turgescence).

Par contre, pour les deux concentrations choisies de  $2.10^{+5}$  et  $6.10^{+5}$  UFC/ml, nous observons que le nombre de cellules qui ont adhéré sur le support en Platine sont respectivement de 1800 et 2500, alors que ceux qui ont adhéré sur le support en verre sont respectivement de 62 et 117, cette différence en nombre de bactéries adhérentes sur les deux types de support est due à des facteurs de surface tels que : surface spécifique, rugosité et morphologie du matériau choisi.

## Références bibliographiques

- Allion A.2000.** Etude de l'adsorption protéique aux interfaces solide-liquide : conséquence sur l'adhésion bactérienne. Diplômes d'Etude Approfondies en Sciences Alimentaires ENSIA.
- Allion A. 2004.**Mise au point d'une technique rapide pour déterminer *in situ* l'efficacité bactericide d'agents antimicrobiens. These de Doctorat de l'Universite de Massay INRA 18-49.
- Allison D.G., (2003).** The biofilm materix. *Biofouling* **19 (2)** : 139-50.
- Arciola C.R., Campoccia D., Baldassarri L., Donati M. E., P IRINI v., Gamberini S. and Barnes L. M., Lo M. F., Adams M.R. and Chamberlain A.H.L.1999.** Effect of Milk Proteins on Stainles steel surfaces *Applied and Environmental Microbiology*.**65** :4543-4548.
- Barhoumi. H. 2006.** Elaboration et caractérisations de nouvelles membranes enzymatiques pour application "biocapteur" en hémodialyse rénale. Thèse de doctorat. 40-43.
- Braindet R., Meylheuc T., Maher C. et Bellon Fontaine M. (1999)** *Listeria monocytogenes* Scott A: Cell surface charge, hydrophobicity and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. *J. Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5328-5333.
- Baikun L., Bruce E. L. (2004)** . Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces *.Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **36(2)** :81-90.
- Beveridge T. J., Makin S. A., kadurugamuwa J. L. and Li.Z. (1997).**Interreactions between biofilms and the environment. *FEMS Microbiol Rev* **20 (3-4)** : 291-303.
- Boulangé – Petermann L., Baroux B. et Bellon – Fontaine MN (1993).** The influence of metallic wettability on bacterial adhesion. *J. Adhesion. Sci. Technol.* **7**, 221 -230.
- Boulangé- Petermann L., Rault J. et Bellon-Fontaine MN. (1997)** Adhesion of *streptococcus thermophilus* to stainless steel with different surface topography and roughness. *Biofouling*. **11**, 201-216.
- Brooun A., Liu S. and Lewis K. (2000).** A dose –reponse study of antibiotic resistance in pseudomonas aeruginosa biofilms. *Antimicrob Agent Chemother* **44 (3)** :640-6.
- Chicurel M. (2000).** Bacterial biofilms and infections. Slimebusters. *Nature*;**408**: 284-6.
- Costerton J.W.and Lppain-ScottH.M.(1989).**Behavior of bacteria biofilms. *ASM New*(**55**) :650-654.
- Costerton, J. W., P. S. Stewart and E. P. Greenberg (1999).** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284(5418)**: 1318-22



**Costerton J. W.(1997).** Cleaning techniques for medical devices : biofilms. *Biomed Instrum Technol* **31(3)** :222-6,247.

**Costerton J. W., Montanaro L. and Arciola C. R. (2005).** Biofilm in implant infections : its production and regulation. *Int J Artif Organs* **28 (11)** : 1062-8.

**Chicurel M. 2000** Bacterial biofilms and infections. Slimebusters. *Nature*; **408**: 284-6.

**Critchley M.M., Pasetto R. and O' Halloran R.J.(2004).** Microbiological influences in 'blue water' copper corrosion. *J Appl Microbiol* **97 (3)** : 590-7.

**Davey M. E. and O'Toole G. A. (2000)** .Microbiol biofilm : from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* **64 (4)** : 847-67.

**Di Martino, P., A. Merieau, R. Phillips, N. Orange and C. Hulen (2002).** Isolation of an *Escherichia coli* strain mutant unable to form biofilm on polystyrene and to adhere to human pneumocyte cells: involvement of tryptophanase. *Can J Microbiol* **48(2)**: 132-7.  
(Stickler, 1999).

**Dunlop P., Olivier L., Byne T. and Mc Adams E. (2005).** Detection and removal of pathogenic biofilms on medical implant surfaces . *Stud Health Technol Inform* **117** :213-7.

**Dickson JS. et Koohmaraie M. (1989)** Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces. *App. Environ. Microbiol.* **55**, 832-836.

**Donlan R.M.and Costerton J.W.2002.** Biofilm : Survival Mécanisms of clinically relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews.* **15** : 167-193.

**Faille C., Jullien C., Fontaine F., Bellon- Fontaine MN., Slomianny C. et Benezech T. (2002)** Adhesion of bacillus spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. *Can. J. Microbiol.* **48**, 728-738.

**Filloux A, Michel G, Bally M. (1998)** GSP-dependent protein secretion in Gram-negative bacteria: the Xcp system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Rev*; **22**:177-98.

**Gallardo- Moreno AM., Gonzalez-Martin ML, Bruque JM., Perez-giraldo C. et Gomez-Garcia AC. (2002)** Temperature influence on the physicochemical surface properties and adhesion behaviour of *Enterococcus faecalis* to glass and silicone. *J. Adhesion. Sci. Technol.* **16**: 1215-1223.

**Ghigo J. M. (2003).** Are there biofilm-specific physiological pathways beyond a reasonable doubt ? *Res Microbiol* **154 (1)** : 1-8.

**Hamadi F., Latrache H., E. Mliji, b.Mallouki, M. Mabrouki , M. Ellouali.(2009)** Adhésion de *staphylococcus aureus* au verre et au t flon . *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.* Vol 3, N 1, p : 1-16.

**Hall-Stoodley L., Costerton J. W. and Stoodley P. (2004).** Bacterial biofilms : from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* **2** (2) : 95-108.

**Hamadi F., Latrache H., Elghmari A., Mabrouki M., Ellouali M. et Kuider N. (2004)** Effect of pH and ionic strength on hydrophobicity and electron donor and electron acceptor

**Hancock I. C.(1991).**Microbial Cellul Surface Architecture. In Microbial Cell Surface Analysis : *Structural and Physicochemical Methods*,eds.21-59.

**Hori K., Matsumoto S. (2008).**Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal*.10.1016/j.bej.2009.11.014

**Hope C. K. and Wilson M. (2006).** Biofilm structure and cell vitality in a laboratory model of subgingival plaque. *J Microbiol Methods*.

**Katsikogianni M. and Missirlis Y.F.(2004).** Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteriamaterial interactions M.

**Katsutoshi H. and Matsumoto S. 2009 .** Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal*.

**Karen O. (2008).** Biophysical approaches to study the dynamic process of bacterial adhesion. *Research in Microbiology*.**159**(6) :415-422.

**Jouenne T., Tresse O. and Junter G. A. (1994).** Agar-entrapped bacteria as an in vitro model of biofilms and their susceptibility to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett* **119** (1-2) : 237-42.

**Lewis K. (2001).** Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **45** (4) :999-1007

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

**O'Toole, G., H. B. Kaplan and R. Kolter (2000).** Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* **54**: 49-79.

**Parot S.(2007).** Biofilms électrostatif :Formation, caractérisation et mécanismes. Toulouse. France.pp :9-12.

**Prigent-Combaret C.,Brombacher E., Vidal O.2001 .** Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene. *J Bacteriol*; **183**: 7213-23.

**Reid G. (1999).** Biofilms in infectious disease and on medical devices. *Int J Antimicrob Agents* **11** (3-4) : 223-6 ; discussion 237-9.

**Reisner A., Hoiby N., Tolker-Nielsen T. and Molin S. (2005).** Microbial pathogenesis and biofilm development. *Contrib Microbiol* **12** : 114-31

**Sauer K., Cullen M. C., Richard A. H., ZEEF L. A., DAVIES D. G. and Gilbert P. (2004).** Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J Bacteriol* **186** (21) : 7312-26.

**Sauer K., CAMPER A. K., Ehrlich G. D., Costerton J. W. and Davies D. G. (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* **184** (4) : 1140-54.

**Stanley N.R. and Lazazzera B. A. (2004).** Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol Microbiol* **52** (4) : 917-24.

**Stewart P. and Costerton B. (2001a).** Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet* **358** :135-138.

**Stewart P. S. and Costerton J. W. (2001b).** Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358** (9276) :125-8.

**Stoodley H. L, Costerton JW, Stoodley P. (2004) .** Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**(2); 95-108.

**Tenke P., Kovacs B., Jackel M. and Nagy E. (2006).** The role of biofilm infection in urology. *World J Urol* **24** (1) : 13-20.

**Terri A., Camesano Y. L., Meera D. (2007).** Measuring bacterial adhesion at environmental interfaces with single-cell and single-molecule techniques. *Advances in Water Resources*, **30**(6-7) : 1470-1491.

**Vanhaecke E., Remon JP., Moors M., Raes F., De rubber D. et Van Peteghem A. (1990)** Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to 304 and 316L stainless steel: role of cell surface hydrophobicity. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 788-795.

**Van Loosdrecht MCM., Lyklema J., Norde W., Schraa G. et Zehnder AJB. (1987)** The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *J Appl Environ Microbiol* **53**, 1893-1897.

**Van der Meir H. C., Leonard A. J., Weerkamp A.H., Rouxhet P.G. and Busscher H. J. 1988.** Surface properties of *Streptococcus salivarius* HB and non fibrillar mutant. *Journal of Bacteriology* **70** :2462-6.

**Yatao L., Joshua S., Camesano T. A. (2008).** Adhesion forces between *Staphylococcus epidermidis* and surfaces bearing self-assembled monolayers in the presence of model proteins. *Biomaterials*. **29**(33) :4374-4382.

**Whiteley M, Bangera MG, Bumgarner RE, (2001).** Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*; **413**: 860-4.

**Zobell C. E. (1943).** The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *J Bacteriol* **46(1)** : 39-56.

# **Chapitre IV**

## **Spectroscopie d'impédance**

## IV.1. Introduction

Ces dernières années la spectroscopie d'impédance électrochimique, s'est imposée comme outil analytique puissant permettant de sonder les propriétés électriques de nombreux systèmes. D'autre part, les études théoriques de l'impédance d'électrodes modifiées permettent de comprendre les processus et les transformations chimiques associées à ces supports. L'intérêt et la quantité des informations qu'elle apporte dans l'étude des mécanismes réactionnels qui se déroulent à l'interface électrode/électrolyte ne sont plus à démontrer. (Lemrini 2006).

La spectroscopie d'impédance électrochimique locale, ou SIEL, a été mise au point par Lillard *et al.* ;1992. La fin des années 1990 apporte une nouvelle technique développée par Suter *et al.* ; 1997. Elle consiste en l'utilisation de micro-capillaire comme cellule électrochimique. Toutefois, cette dernière approche axée sur la réduction de la taille de la cellule diffère de celles citées précédemment (SECM, SVET, SRET, LEIS) qui sont basées sur la réduction de la surface mesurée au sein d'une cellule classique. (Jorcine 2006) Ainsi, la spectroscopie d'impédance pourrait constituer une alternative intéressante pour le suivi de la formation de biofilms bactériens sur des supports solides tels que le platine ou le verre. Dans ce chapitre nous nous intéressons à l'étude théorique de la spectroscopie d'impédance.

## IV.2. Théorie

En électrochimie on s'intéresse souvent aux processus et aux facteurs qui influencent le transport de charges à travers l'interface entre phases distinctes chimiquement (électrodes et électrolytes). Le plus souvent l'une des deux phases de part et d'autre de l'interface étudiée est un électrolyte dans lequel les charges sont transportées par le mouvement des ions. La deuxième phase est une électrode, c'est à dire une phase dans laquelle le transport des charges a lieu par le mouvement d'électrons. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous intéressons à l'interface métal/électrolyte.

Un tel transfert de charge, qui correspond au passage d'un courant électrique à travers l'interface électrochimique, a pour principal effet de produire une transformation chimique appelée réaction d'oxydoréduction.

### IV.2.1. Réaction d'oxydoréduction à l'interface métal/solution

Expérimentalement, le contrôle du potentiel de l'électrode indicatrice est équivalent à contrôler l'énergie des électrons dans l'électrode. En portant cette électrode à des potentiels plus négatifs l'énergie des électrons augmente, et ils peuvent éventuellement atteindre un niveau d'énergie suffisant pour occuper des positions vacantes qui existent sur certaines

espèces dans l'électrolyte. Lorsqu'il en est ainsi, un flux d'électrons (courant de réduction) circule de l'électrode vers la solution (figure 1.a) :  $A^+ + e^- \longrightarrow A$

Inversement on peut diminuer l'énergie des électrons en imposant un potentiel plus positif, et il peut en résulter que des électrons des solutés de l'électrolyte trouvent des conditions d'énergie plus favorables dans l'électrode et y soient transférés. Leur flux, de la solution vers l'électrode, est un courant d'oxydation (figure 1.b):  $A \longrightarrow A^+ + e^-$

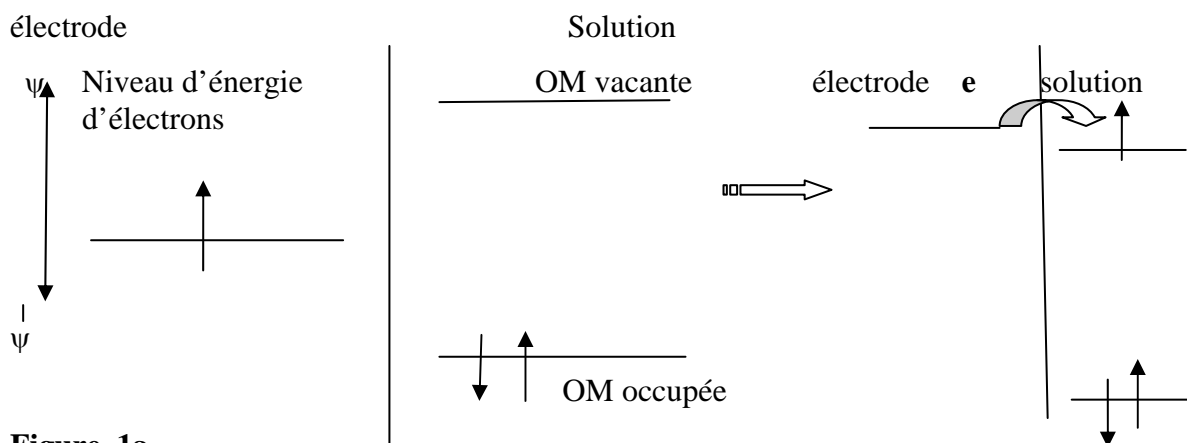


Figure. 1a

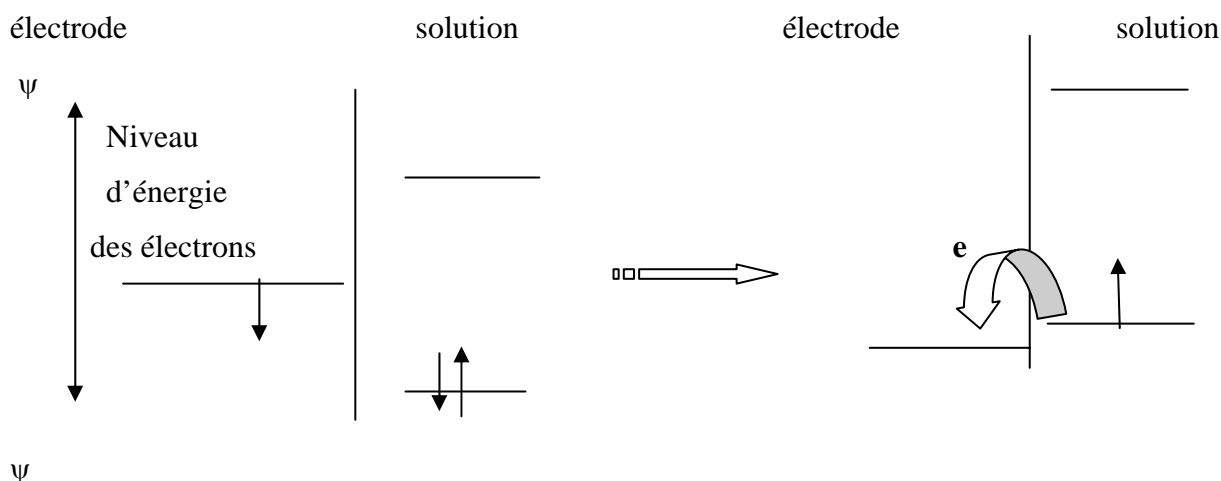


Figure1b

Figure IV.1.Représentation de la réduction (a) et de l'oxydation (b) d'une espèce A en solution.

Les orbitales moléculaires (OM) de l'espèce A qui sont représentées sur le schéma sont l'OM occupée la plus haute et l'OM vacante la plus basse.

Les potentiels critiques auxquels ces processus se produisent sont liés au potentiel normal,  $E_0$ , des substances chimiques considérées.

#### IV.2.2. Interface métal/solution

Lorsqu'un métal est placé en contact d'un électrolyte, une interface électrique est immédiatement développée. La zone de l'interface métal/solution où existent les espèces chargées est appelée double couche électrique. A un potentiel donné l'interface électrode/solution est caractérisée par une capacité de double couche,  $C_d$ .

Le coté de la double couche situé dans la solution est constitué de plusieurs couches. Celle, qui est la plus proche de l'électrode, est appelée couche d'Helmholtz. Elle contient les molécules de solvant et parfois certaines espèces (ions ou molécules) qui sont spécifiquement adsorbées. Le lieu des centres électriques des ions spécifiquement adsorbés est appelé plan interne d'Helmholtz (PIH). Il est situé à une distance  $x_1$  de l'électrode. Les ions solvatés ne peuvent s'approcher du métal qu'à une distance au plus égale à  $x_2$ ; le lieu des centres des ions solvatés est appelé plan externe d'Helmholtz (PEH). L'interaction des ions solvatés avec le métal chargé met en jeu uniquement des forces électrostatiques à grande distance. Ces ions sont dits non spécifiquement adsorbés. En raison de l'agitation thermique dans la solution, les ions non spécifiquement adsorbés sont situés dans une région appelée couche diffuse, qui s'étend du PEH au sein de la solution.

#### IV.2.3. Double couche : Modèles d'Helmoltz, Gouy-Chapmann et Stern

Comme cela a été mentionné dans le paragraphe précédent, le contact métal/électrolyte crée à l'intérieur de l'électrolyte une zone de charge d'espace au voisinage de l'interface.

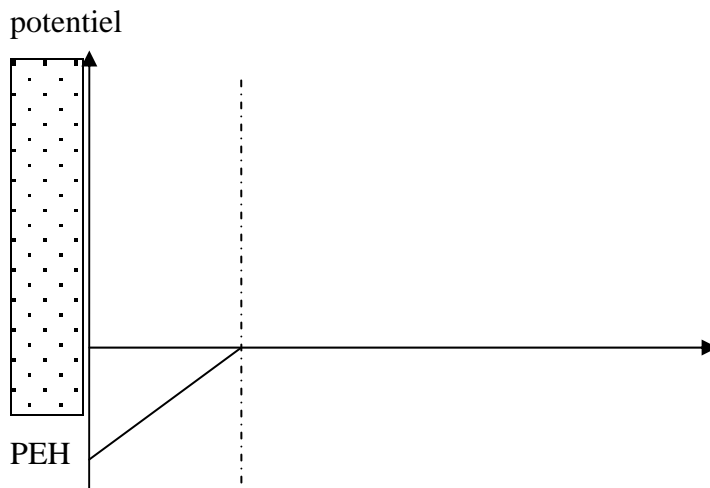
Cependant la structure exacte de cette zone reste très difficile à déterminer, c'est ce qui a donné naissance à plusieurs modèles :

En 1879, Helmholtz a introduit la notion de la double couche. D'après Helmholtz, l'interface électrode/solution se comporte comme un condensateur plan; une chute linéaire de potentiel entre le métal et la solution. L'électrode métallique porte une charge,  $q^M$ , et la solution porte une charge,  $q^S$  (le signe du métal par rapport à la solution dépend du potentiel). Dans tous les cas,  $q^M = -q^S$ . La charge sur le métal  $q^M$  est localisée dans une couche extrêmement mince ( $\sim 100\text{pm}$ ) à la surface du métal. La charge en solution  $q^S$  est constituée d'un excès soit de cations, soit d'anions au voisinage de la surface de l'électrode.

$$C_H = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{d_{PEH}} \quad (\text{IV.1})$$

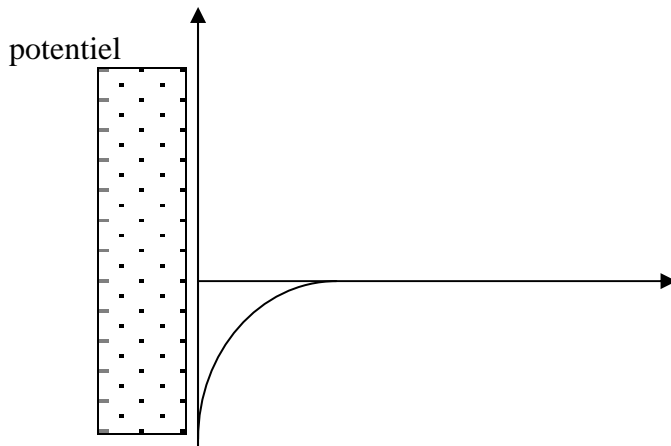
Où  $\epsilon_0$  est la permittivité du vide et  $\epsilon_r$  est la permittivité relative de l'électrolyte.





**Figure IV.2.** La variation du potentiel à l'interface conformément au modèle de Helmholtz

Le modèle de la double couche est simple mais il ne suffit pas à expliquer les résultats expérimentaux. Gouy et Chapmann ont amélioré le modèle d'Helmoltz en proposant un modèle où les ions qui forment la charge électrique de l'interface du côté solution ne sont plus localisés en totalité dans le plan d'Helmoltz mais ont une distribution décroissante avec la distance de l'électrode. Cette distribution résulte de l'équilibre entre les forces de nature électrique et celles de nature thermique. La double couche devient couche diffuse. La chute de potentiel va avoir elle aussi une décroissance en fonction de la distance de l'électrode en tendant asymptotiquement vers zéro au sein de la solution. L'approximation faite par Gouy et Chapmann est de considérer les ions comme des charges électriques ponctuelles.



**Figure IV.3.** Variation du potentiel avec la distance dans la couche diffuse.

La chute de tension à travers la zone de charge d'espace est donnée par

$$V(x) = V_0 e^{-\frac{x}{L_D}} \quad (\text{IV.2})$$

Où  $V_0$  est le potentiel sur la surface de l'électrode ( $x=0$ ), et  $L_D$  est la longueur de Debye qui représente l'épaisseur de la couche diffuse.

$$L_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_r V_t}{2n_0 z^2 q}} \quad (\text{IV.3})$$

Où  $v_t$  représente la tension thermique,  $v_t = \frac{KT}{q}$ ,  $n_0$  est le nombre d'ions par unité de volume (ions/l),  $z$  est la valence des ions et  $q$  est la charge d'un électron.

La capacité par unité de surface ( $F/m^2$ ) est donnée par :

$$C_G = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{L_D} \cosh\left(\frac{x V_0}{2 V_t}\right) \quad (\text{IV.4})$$

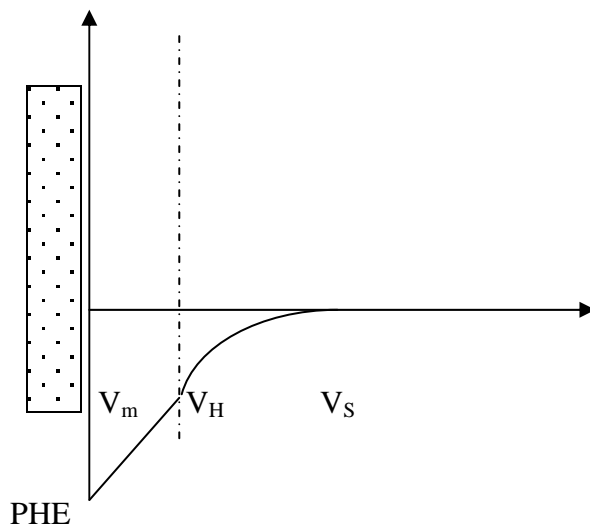
Où le terme ( $\frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{L_D}$ ) représente la capacité par unité de surface d'un condensateur plan dont les armatures sont séparées d'une distance  $L_D$ , l'effet des charges mobiles est compensé par le terme en cosinus hyperbolique.

Bien que le modèle de Gouy-Chapmann constitue une amélioration de celui d'Helmoltz, la valeur théorique de la capacité varie avec la tension appliquée beaucoup plus que la valeur observée expérimentalement, et aussi, elle est trop dépendante de la concentration ionique. Stern a rectifié cette divergence en combinant le modèle de Helmholtz avec celui de Gouy-Chapmann. Stern n'a pas fait l'approximation des charges ponctuelles du modèle de couche

diffuse et il a considéré que les ions ne peuvent pas s'approcher de l'électrode au delà d'une certaine distance critique. Les porteurs de charge en solution, selon la théorie de Stern, ont la même distribution que dans le cas de la couche diffuse avec la différence que la distribution ne commence pas à la surface de l'électrode ( $x=0$ ) mais à partir du plan d'Helmoltz. Ce qui implique deux chutes de potentiel :

$$V_M - V_S = (V_M - V_H) + (V_H - V_S) \quad (IV.5)$$

Où  $V_M$  est le potentiel de l'électrode,  $V_S$  le potentiel au sien de la solution et  $V_H$  le potentiel en solution au plan externe de Helmholtz.



**Figure IV.4.** La distribution du potentiel selon Stern.

Ainsi la capacité interfaciale totale est la combinaison de deux capacités en série :

$$\frac{1}{C_i} = \frac{1}{C_h} + \frac{1}{C_g} \quad (IV.6)$$

Où  $C_i$  est la capacité interfaciale totale de Stern,  $C_h$  est la capacité d'Helmoltz et  $C_g$  celle de Gouy-Chapmann.

#### IV.2.4. Processus faradique et non faradique:

Les électrodes sont le siège de deux types de processus. Le premier concerne les transferts d'électrons à travers l'interface métal/solution. Ce transfert électronique provoque une oxydation ou une réduction (phénomènes décrits dans le paragraphe précédent): on dit qu'il s'agit d'un processus faradique. Dans certaines conditions à une interface électrode/solution

donnée, il existe un domaine de potentiel où aucune réaction de transfert de charge n'a lieu parce que de telles réactions sont thermodynamiquement ou cinétiquement défavorisées (une électrode métallique plongée dans une solution de PBS (Phosphate Buffer Salin) ne comportant pas de couple redox). Cependant, d'autres processus tels qu'une adsorption ou une désorption peuvent se produire, et la structure de l'interface électrode/solution varie avec le potentiel et la composition de la solution. Ces processus sont appelés non faradiques.

### IV.3. Mesure d'impédance électrochimique

#### IV.3.1. Principe

La mesure d'impédance ou de l'admittance d'un système électrochimique s'effectue en appliquant au système une contrainte sous la forme d'une variation sinusoïdale de différence de potentiel électrique, de fréquence  $f = \omega/2\pi$ . La contrainte revient à surimposer une variation sinusoïdale  $\Delta E(t)$  du potentiel de l'électrode de travail à une valeur fixe  $E_0$  (généralement  $E_0$  est choisie de façon à avoir un courant nul dans la cellule électrochimique : le potentiel d'abandon) ; soit la loi de contrainte :

$$E(t) = E_0 + \Delta E(t) = \Delta E_0 \sin \omega t \quad (IV.7)$$

La réponse du système est un courant d'intensité  $I(t)$ , composante continue  $I_0$  (le courant correspondant au potentiel  $E_0$ , courant évidemment nul dans le cas où  $E_0$  est le potentiel d'abandon) et une composante alternative  $\Delta I(t)$ . Si  $I_0$  n'est pas nul, on opère dans les conditions où ce courant est stationnaire ( $I_0 = \text{constante}$ ).

$$I(t) = \Delta I_0 + \Delta I(t) = \Delta I_0 \sin(\omega t + \varphi) \quad (IV.8)$$

#### IV.3.2. Transfert de charge

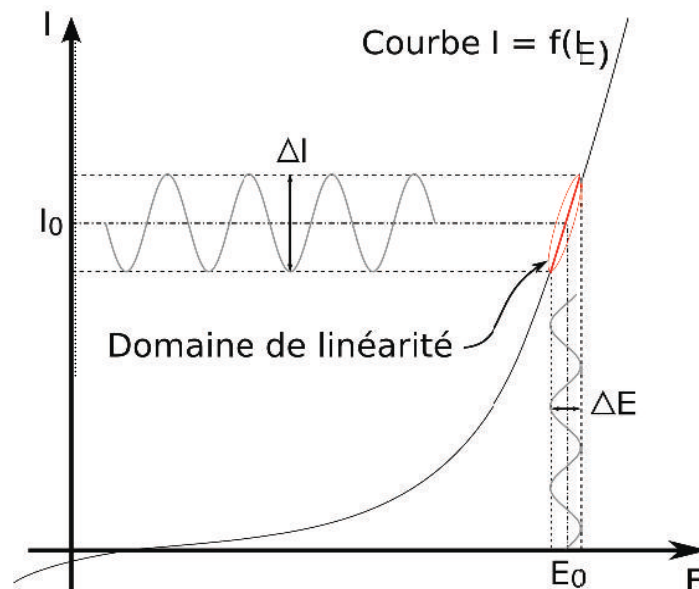
Par définition, la fonction de transfert d'un système linéaire est définie comme le rapport des transformées de Laplace des variations des fonctions de sortie et d'entrée. Pour un système linéaire la réponse du système à une perturbation est déterminée par une équation différentielle du nième ordre ou par un ensemble de  $n$  équations différentielles du premier ordre:

$$\sum_{i=1}^n a_i \frac{d^i y(t)}{dt^i} = \sum_{i=1}^n b_i \frac{d^i x(t)}{dt^i} \quad (IV.9)$$

Un système linéaire satisfait au principe de superposition qui établit que la fonction de sortie d'une combinaison linéaire de fonctions d'entrée est égale à la combinaison linéaire des fonctions de sortie respectives. La fonction de transfert s'écrit :

$$H(s) = \frac{\Delta \bar{y}(s)}{\Delta \bar{x}(s)} \quad (\text{IV.10})$$

Quand une interface est éloignée de son équilibre au moyen d'une source d'énergie externe, un flux de charge et de matière s'établit. Cela est dû à l'existence de réactions électrochimiques qui permettent le transfert des charges électriques entre le métal et l'électrolyte. Les lois élémentaires qui gouvernent la cinétique du transport de matière et les diverses réactions électrochimiques, ainsi que les couplages complexes entre ces processus élémentaires, imposent aux systèmes électrochimiques un comportement non linéaire. Toutefois, on peut montrer que le comportement d'un système non linéaire peut être entièrement défini en termes linéaires si les équations linéaires équivalentes sont connues en chaque point de la caractéristique stationnaire. Par conséquent, l'analyse locale de ce système non linéaire peut alors se limiter à la théorie des systèmes linéaires.



**Figure IV.5.** Schéma d'un système électrochimique non linéaire soumis à une perturbation Sinusoïdale.

Dans le cas d'une excitation sinusoïdale, nous avons :

$$Dx(t) = Dx \sin \omega t \quad (\text{IV.11})$$

Dont la transformé de Laplace est

$$\Delta x = \Delta X \frac{\omega}{\omega^2 + s^2} \quad (IV.12)$$

La fonction de sortie s'écrit ainsi

$$\overline{\Delta y} = H(s)\Delta \bar{x}(s) = \Delta X \frac{H(s)\omega}{s^2 + \omega^2} \quad (IV.13)$$

### IV.3.3. Résistance de la solution (Rs)

Cette résistance, modélise le phénomène de passage du courant entre l'électrode indicatrice (l'électrode de travail) et la contre électrode. Cette résistance dépend, principalement, de la résistivité de la solution, de l'aire et de la géométrie de l'électrode de travail.

$$R_s(\Omega) = \frac{\rho\sqrt{\pi}}{4\sqrt{A}} \quad (IV.14)$$

Où A est la surface en cm<sup>2</sup> et  $\rho$  est la résistivité de la solution.

### IV.3.4. Résistance de transfert de charge Rtc

La résistance de transfert de charge est définie par :

$$\frac{1}{R_{tc}} = \left[ \frac{\delta I_F}{\delta E} \right] \quad (IV.15)$$

Au potentiel d'équilibre la résistance de transfert de charge s'écrit

$$R_{tc} = \frac{RT}{nFI_0} \quad (IV.15)$$

### IV.3.5. Phénomène de diffusion et impédance de Warburg W

Nous allons centrer notre étude sur des tensions sinusoïdales, les ions restant confinés aux voisinages de PEH. Si la fréquence d'excitation est élevée ces ions ne peuvent pas suivre l'oscillation du champ et l'impédance de diffusion tend vers zéro. En 1899, Warburg propose un modèle qui décrit la dépendance en fréquence de l'impédance de diffusion

$$\left| Z_w = \frac{K}{\sqrt{f}} \right| \quad (IV.16)$$

Où k représente une constante déterminée par l'électrochimie et par la mobilité des ions impliqués dans la réaction de transfert de charge.

L'impédance de Warburg est placée en série avec la résistance de transfert de charge puisque la diffusion et le transfert de charge sont deux phénomènes qui se produisent successivement. En effet, les charges doivent diffuser du volume de la solution vers

l'interface pour contribuer aux réactions d'oxydoréduction. Cette impédance de Warburg a pour expression :

$$Z_w = (1 - j) \left( \frac{\delta}{\omega^{1/2}} \right) \quad (IV.16)$$

Avec

$$\sigma = \frac{RT}{n^2 F^2 A \sqrt{2}} \left[ \frac{1}{D_O^{0.5} C_O^0} + \frac{1}{D_R^{0.5} C_R^0} \right] \quad (IV.17)$$

Où A est l'aire de l'électrode,  $D_O$  et  $D_R$  représentent respectivement le coefficient de diffusion de l'oxydant et du réducteur,  $C_O^0$  et  $C_R^0$  sont les concentrations en oxydant et en réducteur dans la solution, T la température absolue, F est la constante de faraday et n le nombre d'électrons échangés.

Si les réactions électrochimiques sont lentes, la résistance de transfert de charge est donc élevée et domine la partie résistive. Par contre, si la cinétique de transfert de charge est rapide, l'impédance de diffusion l'emporte par rapport à la résistance de transfert de charge, et l'impédance varie en  $(-\omega^{-1/2})$ . Il est important de noter que la présence de microorganismes va transformer le comportement de l'interface d'un phénomène limité par la diffusion vers un phénomène limité par la vitesse de la réaction de transfert de charge, vraisemblablement dû à l'adsorption des microorganismes à la surface du métal. Si des protéines sont adsorbées à la surface, alors la valeur de la surface effectivement disponible pour l'échange des électrons est réduite. En conséquence, pour les applications biologiques où des protéines sont présentes, un changement dans les caractéristiques de l'électrode devrait se produire.

#### IV.4.Circuit électrique équivalent

##### IV.4.1.Résistance - condensateur en série

L'impédance de deux circuits en série est égale à la somme des impédances des éléments du circuit. En effet, la tension aux bornes du circuit est égale à la somme des tensions aux bornes de chaque élément, et le courant est identique à travers les éléments d'un circuit en série.

$$Z = \frac{\Delta E}{\Delta I} = \frac{\Delta E_1 + \Delta E_2}{\Delta I} = Z_1 + Z_2 \quad (IV.18)$$

Dans le cas présent d'une résistance et d'un condensateur en série, on a ainsi

$$Z(\omega) = Z_R(\omega) + Z_C(\omega) = R + \frac{j}{C\omega} \quad (IV.19)$$

La représentation de Nyquist de l'impédance donne une droite verticale qui à haute fréquences tend vers le point  $Z_R = R$

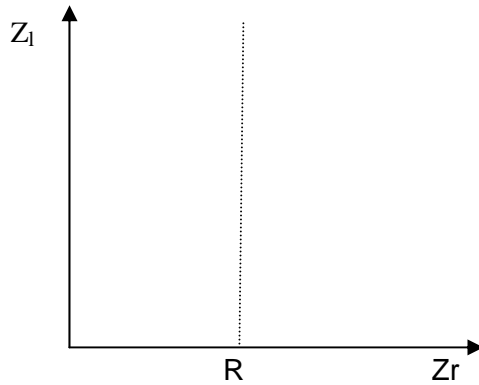


Figure IV.6. Diagramme de Nyquist de l'impédance

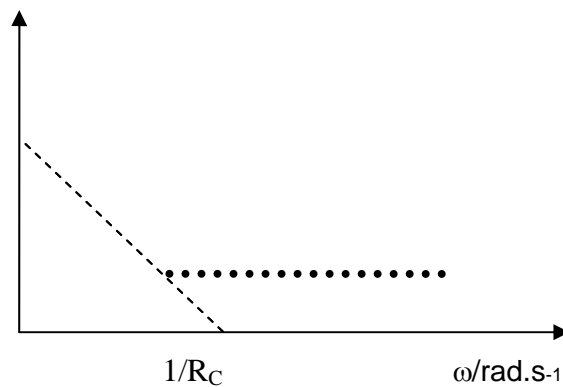
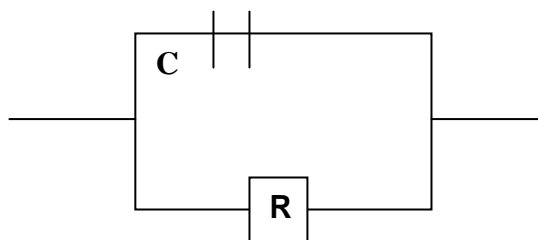


Figure IV.7. Diagramme de Bode

#### IV.4.2. Résistance - condensateur en parallèle

L'admittance d'un circuit d'éléments en parallèle est égale à la somme des admittances des éléments respectifs. En effet, le courant à travers le circuit est égal à la somme des courants à travers chaque élément, et la tension est la même aux bornes de tous les éléments.





**Figure IV.8.** Circuit résistance - condensateur en parallèle.

$$Y = \frac{\Delta I}{\Delta E} = \frac{\Delta I_1 + \Delta I_2}{\Delta E} = Y_1 + Y_2 \quad (IV.20)$$

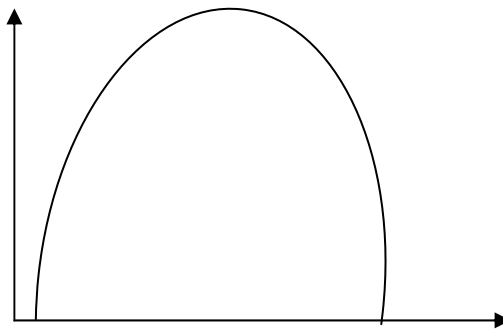
Dans le cas présent d'une résistance et d'un condensateur en parallèle, on a ainsi

$$Y(\omega) = Y_R(\omega) + Y_C(\omega) = \frac{1}{R} + jC\omega \quad (IV.21)$$

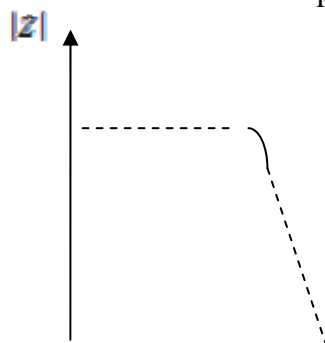
L'impédance est l'inverse de cette expression :

$$Z(\omega) = \frac{R}{1 + jRC\omega} \quad (IV.22)$$

Le diagramme de Nyquist de l'impédance est donc un demi-cercle dont la vitesse angulaire au sommet correspond à l'inverse de RC. A basse fréquence, l'impédance tend vers le point  $Z_R = R$ , et à haute fréquence l'impédance tend vers l'origine (figure IV.9). Le diagramme de Bode peut être schématisé par deux droites qui se coupent à la valeur angulaire  $1/RC$  comme illustre la figure IV.7..



**Figure IV.9.** Diagramme de Nyquist de l'impédance pour résistance - condensateur en parallèle.



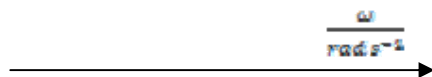


Figure IV.10. Diagramme de Bode d'un circuit résistance - condensateur en parallèle.

#### IV.4.3.Circuit de Randels

Le circuit électrique équivalent le plus souvent utilisé est celui de Randels . Il comporte une résistance  $R_s$  de l'électrolyte, une impédance de Warburg,  $Z_w$ , résultant de la diffusion des ions du volume de la solution à l'interface, la capacité de la double couche  $C_{dl}$  et la résistance de transfert de charge  $R_{tc}$  qui existe s'il y a un couple redox dans la solution.

Les éléments agissant en parallèle ( $C_{dl}$  et  $R_{tc}$ ,  $Z_w$ ) du circuit équivalent sont introduits car le courant total qui traverse l'électrode est la somme du courant faradique,  $I_F$ , et du courant capacitif,  $I_C$ .

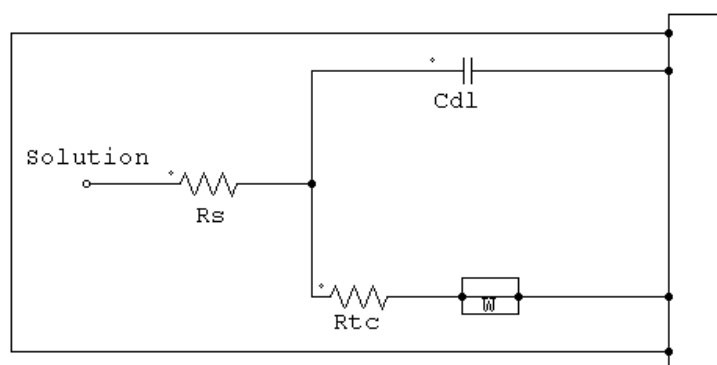


Figure IV.11.Modèle électrique de l'interface métal/solution.

Ce circuit équivalent formé d'éléments idéaux, capacités et résistances, ne peut pas tenir compte des imperfections de l'interface notamment de la rugosité et de l'inhomogénéité de la couche organique. Pour remédier à ce problème, une alternative intéressante consiste à substituer ces éléments idéaux par des impédances généralisées dites aussi des CPEs (constant phase élément) (Hillebrandt 2001 ; Abdelghani *et al* 2002) qui traduisent la non-linéarité et la dépendance en fréquences des impédances. En effet, il est établi que la rugosité et la porosité des électrodes peuvent être à l'origine d'une dispersion en fréquence des spectres d'impédance. Plus tard, il a été démontré que les électrodes qui sont le siège ou non d'un transfert de charge à l'interface, possèdent des impédances qui s'expriment sous la forme d'une loi d'échelle;

$$Z = K(\omega)^\alpha ; -1 \leq \alpha \leq 1 \quad (IV.23)$$

En particulier, Z représente une résistance si  $\alpha = 0$ , une capacité si  $\alpha = 1$ , une impédance de Warburg si  $\alpha = 0.5$  et une inductance si  $\alpha = -1$ .

#### IV.4.4. Diagramme d'impédance totale

Compte tenu de l'intervention, à l'interface électrode/électrolyte, d'un courant capacitif et d'une résistance  $R_s$ , la grandeur mesurable est l'impédance totale exprimée par la relation :

$$z = R_s + \frac{Z_F}{1+j\omega C_{dl}Z_F} = R_s + Z_F \frac{1-j\omega C_{dl}Z_F}{1+\omega C_{dl}Z_F} \quad (IV.24)$$

Or  $Z_F$  tend vers  $R_{tc}$  lorsque la fréquence est élevée. Alors l'équation 24 devient :

$$Z = R_s + R_{tc} \frac{1-j\omega C_{dl}R_{tc}}{1+\omega C_{dl}R_{tc}} \quad (IV.25)$$

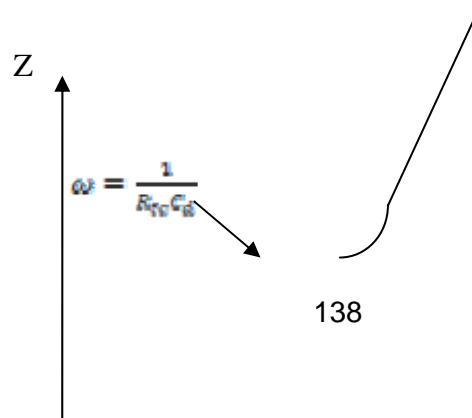
Ou les composantes réelle,  $Z_{re}$ , et imaginaire,  $Z_{Im}$ , de l'impédance peuvent s'exprime par:

$$R_s + \frac{R_{tc}}{1+(\omega C_{dl} R_{tc})^2} \quad (IV.26)$$

$$Z_{Im} = \frac{\omega C_{dl} R_{tc}^2}{1+(\omega C_{dl} R_{tc})^2} \quad (IV.27)$$

L'équation de l'impédance, équation 25, est l'équation d'un demi cercle de diamètre  $R_{tc}$  dont les extrémités, sur l'axe des réels, sont les points d'abscisse  $R_s$  et  $R_s+R_{tc}$ . La fréquence à laquelle correspond le sommet du demi-cercle a pour valeur  $f_c = \frac{1}{2\pi R_{tc} C_{dl}}$

Comme illustre la figure IV.12, le diagramme de Nyquist du circuit de Randles comprend un demi cercle dû à la résistance de transfert de charge  $R_{tc}$  et à la capacité de la double couche  $C_{dl}$ . Aux bases fréquences, l'impédance de Warburg est prédominante et le diagramme devient linéaire avec une pente égale à l'unité.



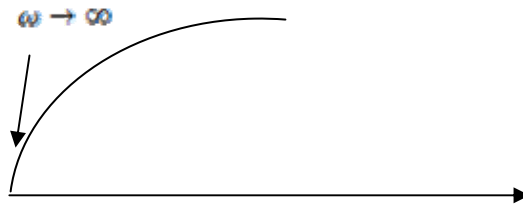


Figure IV.12. Diagramme de Nyquist de l'impédance pour un circuit de Randels.

#### IV.5. Résultats et discussions

Notre étude consiste à s'assurer de la bioadhésion d'une population de bactéries qui est la *E.Coli K12* en formant des biofilms sur un support solide. Les mesures de spectroscopie d'impédance sont faites dans la gamme des fréquences allant des hautes fréquences (100KHz) vers les basses fréquences (5mHz), au potentiel libre, avec une perturbation sinusoïdale de 5mV, appliquée par rapport à une électrode de référence.

Le dispositif expérimental utilisé pour tracer des courbes d'impédances électrochimiques est l'ensemble Potentiostat/ Galvanostat PGZ 301 associé au logiciel «VoltaMaster 4» et relié à une cellule électrochimique à trois électrodes :

\*Electrode de travail en Platine à plaque de marque [XM120 RADIOMETER ANALYTICAL partie active plaque de platine=0,25cm<sup>2</sup>].

\*Electrode de référence au calomel de marque [RADIOMETER ANALYTICAL] (E<sub>T=25°C</sub>=224mV).

\* Electrode auxiliaire en Platine à fil [RADIOMETER ANALYTICAL] de Platine=1cm.

L'électrolyte est une solution de P.B.S.

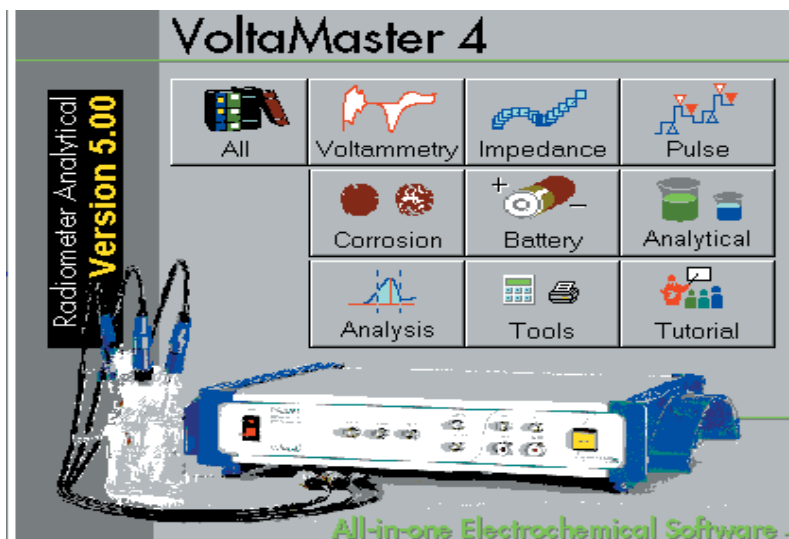


Figure IV. 13. Dispositif expérimental

Dans ce travail nous avons étudié la formation du biofilm sur une plaque de Platine de dimensions (0.5cm×0.5cm) en présence de différentes concentrations en *E. Coli* K12 dans le milieu PBS. La caractérisation a été faite par Spectroscopie d'impédance électrochimique (E.I.S).

Les diagrammes d'impédance électrochimique ont été établis pour les concentrations en *E. Coli* K12 suivantes :  $2.10^{+5}$ ,  $4.10^{+5}$ ,  $5.10^{+5}$ ,  $6.10^{+5}$ ,  $7.10^{+5}$  et  $8.10^{+5}$  UFC/ml ; et une Electrode de platine sans biofilm comme référence, afin de préciser et de distinguer les différents phénomènes mettant en jeu la surface métallique, le biofilm et l'électrolyte.

Ensuite, nous avons déterminé les paramètres électrochimiques liés à ces phénomènes (résistance de transfert de charge  $R_t$  et la capacité de la double couche  $C_{dl}$ ).

Les mesures d'impédances électrochimiques consistent à étudier la réponse du système électrochimique à une perturbation, qui est le plus souvent un signal alternatif de faible amplitude. Les résultats des mesures d'impédances, effectuées dans un large domaine de fréquence, permettent de séparer les processus réactionnels consécutifs ou simultanés caractérisés par des temps de relaxation différents. L'impédance électrochimique globale peut comporter plusieurs composantes traduisant l'influence des différents processus (transfert de charges, diffusion, adsorption).

A hautes fréquences, seuls les processus rapides sont caractérisés; par contre, lorsque la fréquence appliquée diminue, la contribution des étapes plus lentes apparaît : phénomènes de transport ou de diffusion en solution.

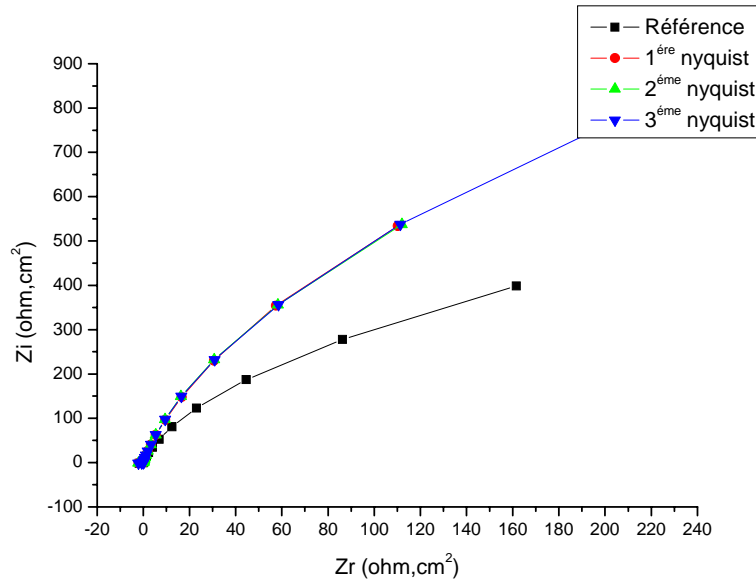
Les diagrammes d'impédance se présentent généralement sous la forme de deux boucles: la boucle aux hautes-fréquences (HF) qui correspond au transfert de charge et celle aux basses fréquences (BF) qui est associée au transfert de matière. Dans le cas de la bioadhésion, le premier phénomène est dû à un transfert de charges rapide et le deuxième phénomène est attribué à la désorption des bactéries de la surface métallique .

La réponse impédancémétrique, donnée par la variation de l'impédance complexe : représentation de la partie imaginaire de l'impédance complexe en fonction de la partie réelle de l'impédance ( $\text{Im}(Z) = f(\text{Re}(Z))$ ), appelée Nyquist.. La réponse obtenue par mesure d'impédance est caractérisée par une bonne linéarité étendue vers les hautes concentrations (H.Barhoumi 2006).

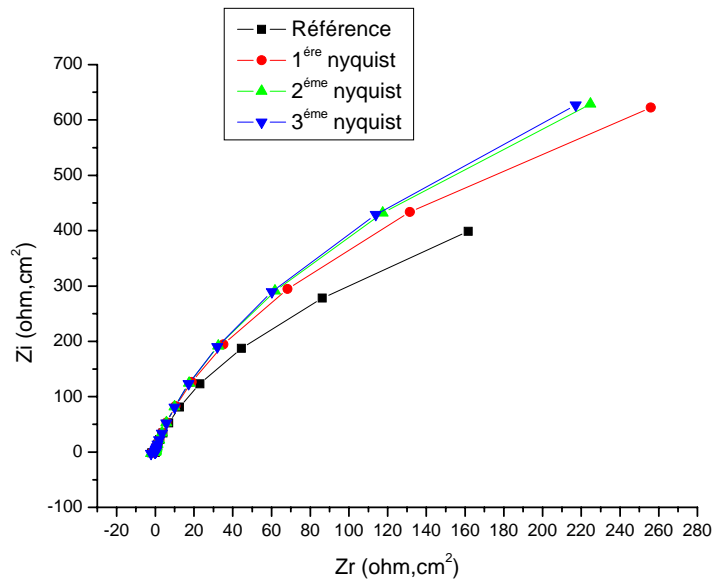
Tous les diagrammes d'impédance sont obtenus en effectuant un balayage en fréquences de 100KHz jusqu'à 5 mHz.

Dans ce travail les courbes sont obtenues sous forme de Nyquist. Elles se caractérisent par une portion de boucle demie centrée sur l'axe des réels. Cette portion de boucle est due à un transfert de charge entre la surface métallique et l'électrolyte, c'est le cas des courbes obtenues à partir de solution non contaminée par les *E. Coli K12* (Référence).

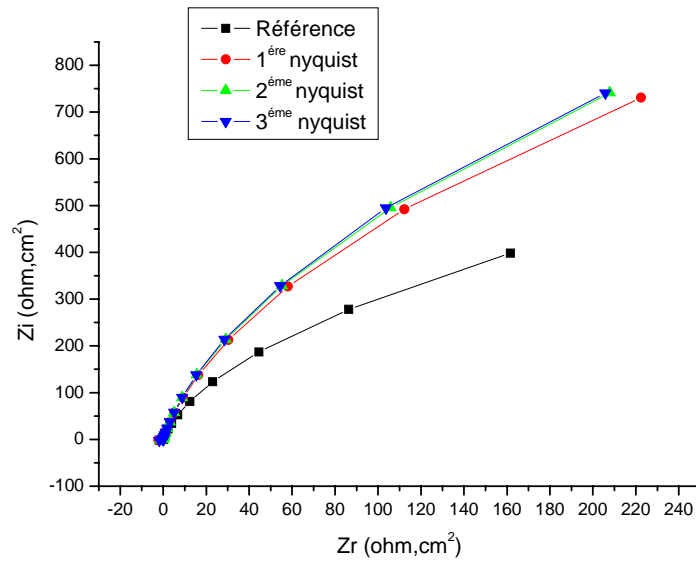
Pour chaque concentration de *E.Coli K12*, nous avons tracé trois essais consécutifs d'impédance, réalisés pendant 20 minutes chacun dans la solution PBS ; nous avons remarqué que les courbes se superposent, ce qui montre que le biofilm adhère bien (figures IV.14 ; IV.15 ; IV.16 et IV.17).



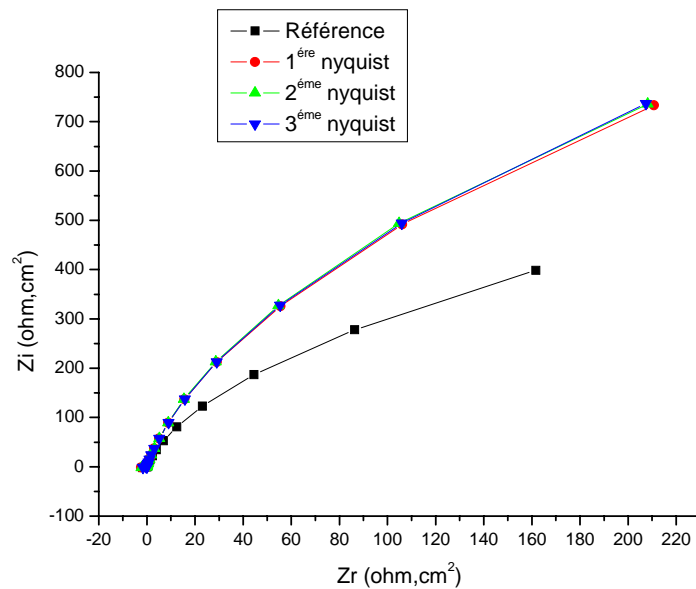
**Figure IV.14. :** Diagramme d'impédance d'un biofilm à  $2 \times 10^5$  UFC /ml de *E.Coli K12* dans le P.B.S .



**Figure IV.15. :** Diagramme d'impédance d'un biofilm à  $4 \times 10^5$  UFC /ml de *E.Coli K12* dans le P.B.S.



**Figure IV.16.** : Diagramme d'impédance d'un biofilm à  $6 \times 10^5$  UFC /ml de *E.Coli K12* dans le P.B.S.

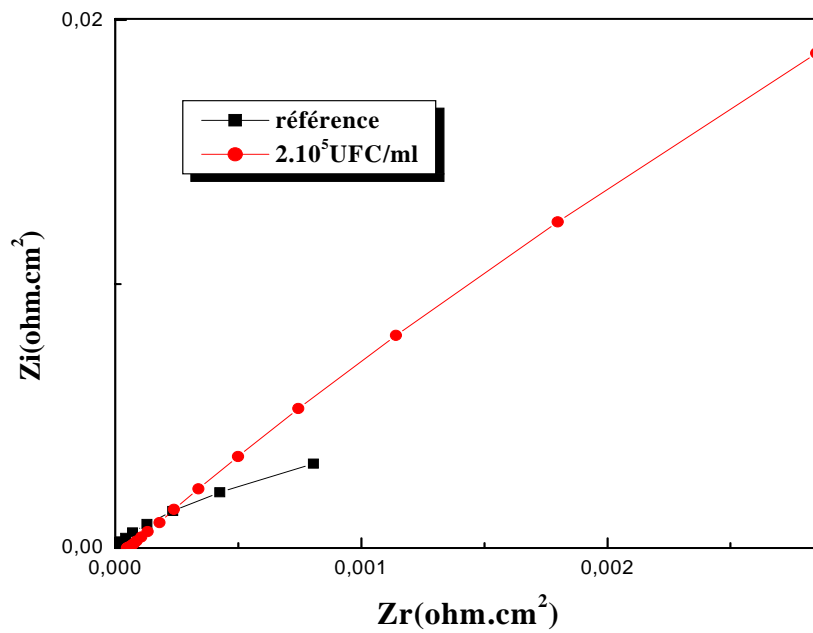


**Figure IV.17.** : Diagramme d'impédance d'un biofilm à  $8 \times 10^5$  UFC /ml de *E.Coli K12* dans le P.B.S.

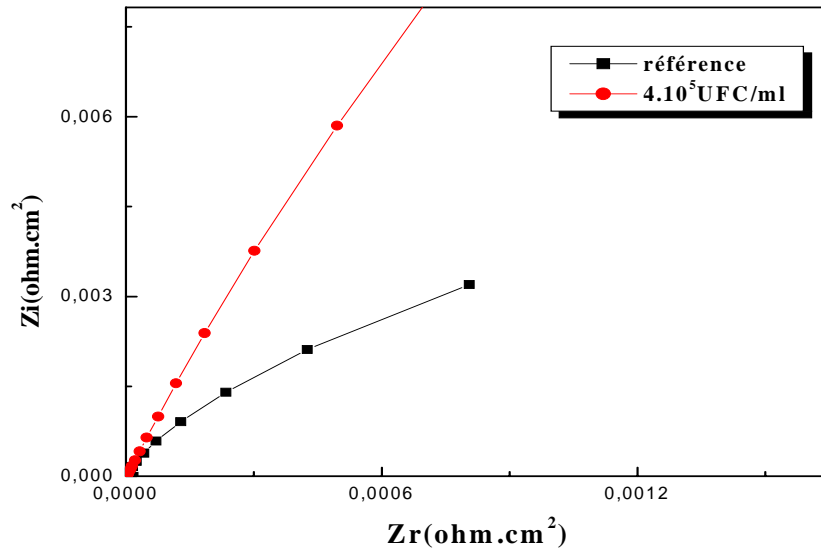
A partir de cette donnée, nous avons tracé une seule Nyquist par concentration que nous comparons à sa référence sans biofilm.



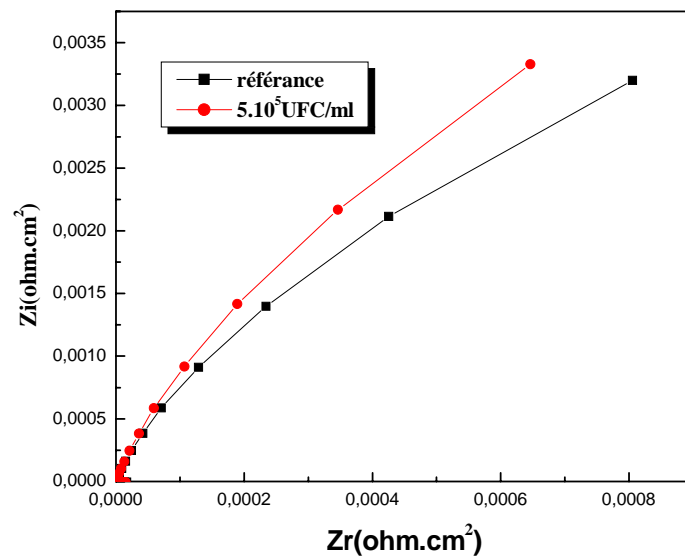
Les figures IV.18 ;IV.19 ;IV.20 ;IV.21 ;IV.22 ;et IV.23 , représentent les réponses d'impédance dans le plan de Nyquist pour l'électrode de platine nue et l'électrode de platine plongée dans une solution de PBS ,contaminée par les *E.Coli k 12* aux concentrations respectives suivantes :  $2.10^{+5}$ ,  $4.10^{+5}$ ,  $5.10^{+5}$ ,  $6.10^{+5}$ ,  $7.10^{+5}$  et  $8.10^{+5}$  UFC/ml .



**Figure IV.18.** : Diagramme d'impédance d'un biofilm à  $2.10^5$ UFC/ml d'E Coli K12 dans le PBS.



**Figure IV.19.:** Diagramme d'impédance d'un biofilm à  $4.10^5$  UFC/ml de E Coli K12 dans le PBS.



**Figure IV.20.:** Diagramme d'impédance d'un biofilm à  $5.10^5$  UFC/ml d'E Coli K12 dans le PBS.

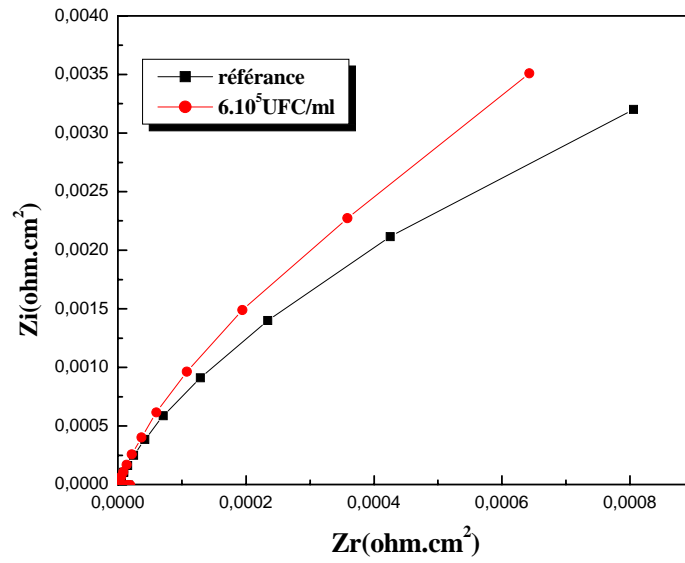


Figure IV.21.: Diagramme d'impédance d'un biofilm à  $6.10^5$ UFC/ml d'E Coli K12 dans le PBS.

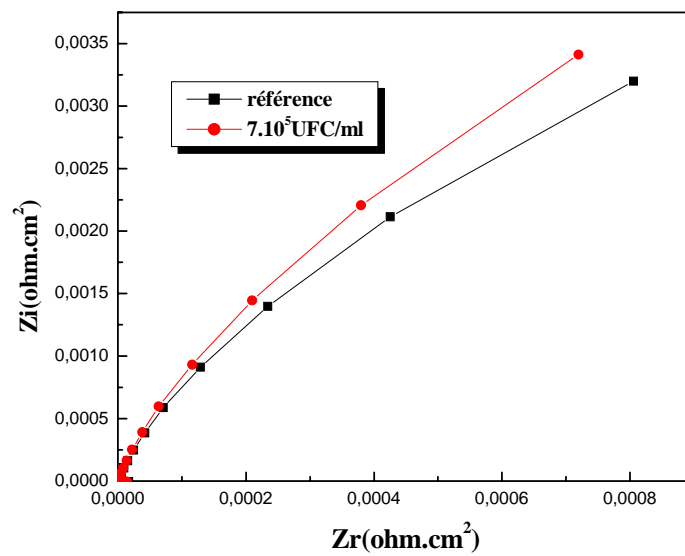
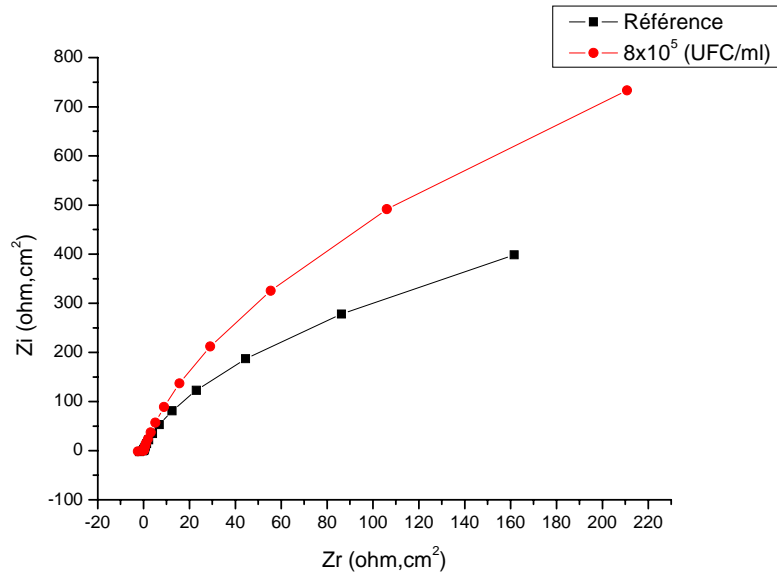


Figure IV.22.: Diagramme d'impédance d'un biofilm à  $7.10^5$ UFC/ml d'E Coli K12 dans le PBS.



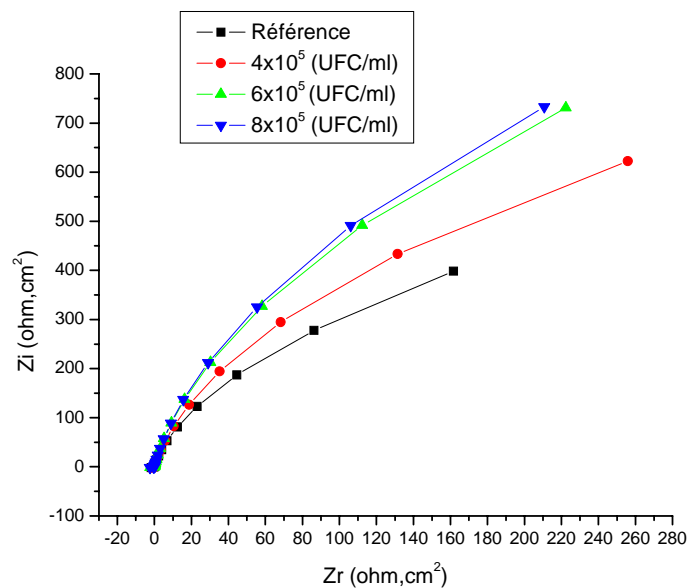
**Figure IV.23.:** Diagramme d'impédance d'un biofilm à  $8 \cdot 10^5$  UFC/ml d'E Coli K12 dans le PBS.

L'addition de la solution contaminée par *E.Coli k12* conduit à l'augmentation de la taille du spectre d'impédance ayant la forme d'un demi-cercle plus au moins aplatie, caractérisant la formation d'une couche qui adhère sur la surface de l'électrode de Platine (figure IV.24). Ce phénomène a été mis en évidence dans un travail antérieur (Morakchi et al 2008).

Pour chacun des essais, nous observons que les diagrammes de Nyquist se caractérisent par une augmentation des valeurs imaginaire et réelles d'une façon linéaire est proportionnelle au temps de contact ; ce qui justifie l'apparition d'un mouvement électronique dans la zone interface liquide –solide.

Nous remarquons clairement une augmentation de la résistance de transfert de charge en ce qui concerne la concentration des bactéries dans l'électrolyte ; ceci est le résultat de l'enregistrement des demi- cercles plus larges que ceux de la référence pour chaque concentration.

Sur la figure IV.24, nous observons que la taille de la boucle augmente progressivement en fonction de l'augmentation de la concentration des *E Coli K12*, cela est attribué à la croissance des biofilms adsorbés sur la surface métallique.



**Figure IV.24.:** Diagramme d'impédance d'un biofilm à différentes concentrations d'E .Coli K12 dans le PBS.

Les différents paramètres électrochimiques déduits des diagrammes d'impédance sous forme de Nyquist sont regroupés dans le tableau IV.1.

**Tableau IV.1.:** Paramètres électrochimiques déduits des courbes de Nyquist

Concentration .10 <sup>5</sup> (UFC/ml)	Référence	2	4	5	6	7	8
C <sub>dl</sub> (µF/cm <sup>2</sup> )	21,200	16.647	13,02	12,95	11,09	9,61	1,745
R <sub>1</sub> (KΩ.cm <sup>2</sup> )	20.10 <sup>-4</sup>	5449.10 <sup>-4</sup>	9848.10 <sup>-5</sup>	2549.10 <sup>-6</sup>	1084.10 <sup>-6</sup>	2916.10 <sup>-5</sup>	237.10 <sup>-5</sup>
R <sub>2</sub> (KΩ.cm <sup>2</sup> )	1195	2819	2905	3008,08	3135,45	3226,16	14,41
R <sub>2</sub> -R <sub>1</sub> =R <sub>t</sub> (KΩ.cm <sup>2</sup> )	1194,95	2818,45	2904,9	3008,077	3135,34	3226,15	14,40

Ces résultats montrent que:

- (a) la résistance R<sub>1</sub> varie dans le sens d'une augmentation d'impédance ;

-(b) la CPE (constant phase élément) diminue ; la diminution de la CPE est due probablement à une augmentation de l'épaisseur du biofilm (Helali 2000).

D'après ce tableau, nous constatons que la résistance de transfert  $R_t$  augmente en fonction de la concentration jusqu'à la valeur  $7.10^5$  UFC/ml, puis elle diminue. La valeur de la résistance de l'électrolyte ( $R_1$ ) est relativement faible, car nous travaillons dans des solutions biologiques qui contiennent de nombreux sels ; la solution est peu résistive.

L'évolution des spectres d'impédance en fonction des concentrations confirme la formation d'une couche de biofilms ; ce phénomène se traduit par l'augmentation de la résistance de transfert de charge parallèlement à une diminution de la capacité de la double couche. Ces essais de spectroscopie d'impédance électrochimiques ont permis de confirmer la formation de biofilms sur la surface du support en platine.

## Conclusion

La caractérisation du biofilm par spectroscopie d'impédance électrochimique est représentée par des courbes de Nyquist, Pour chaque concentration de *E. Coli K12* dans la solution, nous observons une seule boucle capacitive demi-centrée sur l'axe des réels. La taille de la boucle augmente progressivement en fonction de l'augmentation de la concentration des *E Coli K12*, cela est attribué à la croissance des biofilms adsorbés sur la surface métallique. Ce premier phénomène correspond à un transfert de charges rapide qui se produit aux hautes fréquences. Tandis qu'aux basses fréquences, il apparaît un deuxième phénomène relativement lent qui est dû à la désorption des bactéries de la surface métallique.

La cinétique de désorption du biofilm est exprimée par trois Nyquist consécutives dont la durée de chacune est de 20 mn, pour toutes les concentrations utilisées ; nous avons observé que les trois courbes se superposent, cela montre la bonne adhérence du biofilm, un dénombrement bactériologique corrobore ce résultat.

Les paramètres électrochimiques, la résistance de transfert  $R_t$  et la capacité de la double couche  $C_{dl}$ , déduits des courbes de Nyquist, montrent que la  $R_t$  augmente quand la  $C_{dl}$  diminue. Cela pourrait être attribué d'une part au blocage croissant de transfert de charges à la surface de l'électrode, et d'autre part, à la diminution de la surface de contact liée à l'adhésion du biofilm.

### Références bibliographiques

**Abdelghani A., S.Hleli, K. Cherif 2002.** Optical and electrochemical characterisation of Self Assembled Octadecyltrichlorosilane on modified silicon electrodes, *Materials Letters*, 6 (6) - 1064.

**BARHOUMI . H. 2006.**Thèse en Co-tutelle. .Elaboration et caractérisations de nouvelles membranes enzymatiques pour application "biocapteur" en hémodialyse rénale .pp ;45-60.

**Helali. S. 2005.**These en co-tutelle. Conception et realisation de materiaux biofonctionels pour des dispositifs capteurs impedimetriques. France – Tunisie.

**Hillebrandt H. Abdelghani A., Abdelghani C., Sackmann E. 2001.** Electrical and optical characterization of thrombin-induced permeability of cultured endothelial cell monolayers on semiconductor electrode arrays, *Appl. Phys. A* **73 (5)** - 539.

**Jorcin J.B .**Thèse. Spectroscopie d'impédance électrochimique locale : caractérisation de la delamination des peintures et de la corrosion des alliages Al-Cu. Toulouse-France.

**Lemrini .W.2006.** Mémoire « Contribution à l'étude des paramètres cinétiques de l'ascorbate oxydase de courgette verte ( *Cucurbita pepo medullosa* ).Ebauche d'un capteur optique pour le dosage de l'acide ascorbique. » –Tlemcen- Algérie. pp :32-39.

**Lillard R. S., Moran P. J. et Isaacs H. S. 1992.** A Novel Method for Generating Quantitative Local Electrochemical Impedance Spectroscopy. *J. Electrochem. Soc.*, **139(4)**, 1007–1012.

**Morakchi K., Hamel A., Zazoua A. et Kherrat. R. 2008.** Caractérisation par spectroscopie d'impédance électrochimique des inhibiteurs de corrosion destinés au circuit de refroidissement *Revue des Energies Renouvelables Vol. 11 N°3* 357 – 362.

**Suter T. et Bohni H. 1997 :** A new microelectrochemical method to study pit initiation on stainless steels. *Electrochimica Acta*, 42(20-22), 3275–3280.

**Suter T. et Alkire R. C.2001:** Microelectrochemical Studies of Pit Initiation at Single Inclusions in Al 2024-T3. *J. Electrochem. Soc.*, 148(1), B36–B42.



# **Conclusion générale**

## Conclusion générale

L'objectif de ce travail est l'utilisation de la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) pour évaluer l'activité des bactéries soit en milieu aqueux contaminé, soit adhéree sur une surface solide comme le platine, en vue de la conception d'un capteur bactérien impédimétrique. Les traitements biocides utilisés se basent sur l'électrochloration en régime bipolaire pulsé (RBP) où les paramètres suivants ont été appliqués : champ électrique (C.E.); champ électrique - Chlore actif (C.E.-C.A.); Champ électrique - Chlore actif - ions en solution (C.E.-C.A.-I.S.). Les résultats des essais de traitements biocides ont montré d'une manière évidente que les traitements biocides par électrochloration en régime bipolaire pulsé (RBP) sont plus efficaces que les autres méthodes de traitements biocides. Les Staphylocoques sont très résistants aux agents antibactériens, certaines souches résistent même à de nombreux antibiotiques. Cependant, nous observons que les bactéries Staph (+) et Staph (-) ont des sensibilités spécifiques selon les types de traitements. Une plus grande efficacité d'inactivation des Staph (+) et Staph (-) est obtenue avec l'effet synergique du traitement biocide champ électrique –chlore actif (CE-AC). Le temps d'inactivation des deux bactéries varie : l'inactivation complète des SCN est atteinte en 30 secondes seulement, alors que les SCP exigent un temps de contact de 20 minutes avant de parvenir à une inactivation complète. La bioadhésion de la bactérie *E.Coli K12* sur des supports solides, le platine et le verre, a été étudiée après immersion dans les trois types de solutions suivants : eau distillée ; eau physiologique et le P.B.S. , dans ce dernier , nous avons étudié l'influence de la concentration des bactéries sur le nombre de cellules adhérees, nous avons constatés que le nombre de cellules adhérees sur le support en Platine augmente quand la concentration de la solution mère à 0,5 de D.O. augmente respectivement de  $2.10^{+5}$  ,  $3.10^{+5}$   $4.10^{+5}$  ,  $5.10^{+5}$   $6.10^{+5}$   $7.10^{+5}$  et  $8.10^{+5}$  UFC/ml ; cela est du à la composition du milieu qui se caractérise par sa salinité et la présence de nutriments nécessaire au foisonnement et à la survie des bactéries. La caractérisation du biofilm sur le verre a été effectuée par le microscopie optique, tandis que la formation de biofilm sur le platine a été caractérisé par spectroscopie d'impédance électrochimique. Les résultats sont représentés par des courbes de Nyquist, Pour chaque concentration de *E. Coli K12* dans la solution, la taille de la boucle augmente progressivement en fonction de l'augmentation de la concentration des *E Coli. k12*, cela est attribué à la croissance des biofilms adsorbés sur la surface métallique. Ce premier phénomène correspond à un transfert de charges rapide qui se produit aux hautes fréquences .Tandis qu'aux basses fréquences, il apparaît un deuxième phénomène relativement lent qui

est due à la désorption des bactéries de la surface métallique. La cinétique de désorption du biofilm est exprimée par trois Nyquist consécutives dont la durée de chacune est de 20 mn, pour toutes les concentrations utilisées, nous avons observé que les trois courbes se superposent, cela montre la bonne adhérence du biofilm, le dénombrement bactériologique le corrobore. Ces résultats montrent que la spectroscopie d'impédance est une méthode de choix pour la détection des biofilms bactériens sur la surface solide même pour des concentrations en bactéries infiniment petites.

En perspective, sur la base de ce travail, il est possible d'envisager la mise au point d'un biocapteur impédimétrique.

# **Annexes**

# Résumés

## Résumé

La désinfection de l'eau peut être obtenue par divers processus chimiques et physiques. Parmi lesquels, la désinfection électrochimique a émergé comme l'une des solutions de substitution à la chloration. Dans ce travail nous avons étudié l'effet d'inactivation des bactéries Staphylocoques coagulase positive (SCP) et les Staphylocoques coagulase négative (SCN) par électrochloration directe sous une polarisation bipolaire pulsée. Pour cela, l'eau volontairement contaminée à différentes concentrations en bactéries a été traitée dans une cellule électrochimique en utilisant une électrode en aciers inoxydable de types AISI430 et en platine. Les résultats des essais de traitements biocides ont montré d'une manière évidente que les traitements biocides par électrochloration en régime bipolaire pulsé (RBP) sont plus efficaces que les autres techniques de traitements biocides.

La formation d'un biofilm bactérien sur une surface solide est un phénomène complexe dans lequel des processus physiques, chimiques, et biologiques sont impliqués. Dans ce travail, l'adhésion de la bactérie *E. Coli K12* sur deux supports solides différents, qui sont le verre et le platine, a été étudiée par spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS). Cette technique est efficace, même pour de très faibles concentrations en bactéries. La caractérisation a été effectuée pour différentes concentrations de la solution mère de densité optique 0,5 de densité optique (D.O.). Pour chaque concentration d'*E. Coli K12*, la taille de la boucle augmente progressivement en fonction de l'augmentation de la concentration des *E. Coli. k12*, cela est attribué à la croissance des biofilms adsorbés sur la surface métallique. Ce premier phénomène correspond à un transfert de charges rapide qui se produit aux hautes fréquences. Tandis qu'aux basses fréquences, il apparaît un deuxième phénomène relativement lent qui est dû à la désorption des bactéries de la surface métallique. La cinétique de désorption du biofilm est exprimée par trois courbes de Nyquist consécutives dont la durée de chacune est de 20 mn. Pour toutes les concentrations utilisées, nous avons observé que les trois courbes se superposent, cela indique une bonne adhérence du biofilm. Le dénombrement bactériologique le corrobore.

Sur la base de ce travail, il est possible d'envisager la mise au point d'un biocapteur impédimétrique.

**Mots clés :** Polarisation bipolaire pulsée, désinfection, bioadhésion, *E. Coli K12*,  
Staphylocoques coagulase positive, Staphylocoques coagulase négative,

## **Abstract**

The disinfection of water can be obtained by various chemical and physical processes. Among which, electrochemical disinfection has emerged as one of the solutions to chlorination substitution. In this work we studied the effect of inactivation of the Positive Staphylococcus Coagula bacteria and the Negative Staphylococcus Coagula by direct electrochloration under a pulsed bipolar bias.

For that, intentionally contaminated water with various concentrations in bacteria was treated in an electrochemical cell by using an electrode out of stainless steels of type AISI430 and platinum. The test results of biocide treatments showed in an obvious way that the biocide treatments by electrochloration in pulsed bipolar regime are more efficient than the other biocide treatment techniques.

The formation of a bacterial biofilm on a solid surface is a complex phenomenon in which physical, chemical, and biological processes are involved. In this work, the adhesion of the bacterium *E.Coli K12* on two different solid supports, which are glass and platinum, was studied by electrochemical impedance spectroscopy. This technique is efficient, even for very small concentrations in bacteria. The characterization was carried out for various concentrations of the mother solution of density 0,5 of optical density. For each concentration of *E Coli K12*, the size of the loop increases gradually according to the increase in the concentration of *the E Coli. k12*, that is attributed to the growth of the biofilms adsorbed on metallic surface. This first phenomenon corresponds to a fast transfer of charge which occurs at high frequencies. While at low frequencies, it appears a second relatively slow phenomenon which is due to the desorption of the bacteria of the metallic surface. The kinetics of desorption of the biofilm is expressed by three consecutive Nyquist curves of which the duration of each one is 20 mn. For all the used concentrations, we observed that the three curves are superimposed, this indicates a good adherence of the biofilm. The bacteriological enumeration corroborates it. On the basis of this work, it is possible to consider the development of an impedimetric biosensor.

**Key words:** Pulsed bipolar bias, disinfection, bioadhésion, E Coli K12, Positive Staphylococcus coagula, Negative Staphylococcus coagulase.

## ملخص

يمكن تحقيق تعقيم المياه بواسطة المواد الكيميائية والعمليات الفيزيائية المختلفة من بينها ، برزت

، على الزجاج والبلاستيك واستعملنا لذلك المقاومة

الكهروكيميائية الطيفية. هذه التقنية فعالة حتى بالنسبة لتركيزات منخفضة جدا من البكتيريا.

K12 ويعزى ذلك إلى نمو الأغشية الحيوية كثف على سطح المعدن.

لجميع التركيزات المستخدمة

، لاحظنا أن يتم فرضه على المنحنيات الثلاثة ، لأنه يدل على التصاق جيدة من بيوفيلم. ويعزز العد

البكتيري. واستنادا إلى هذا العمل، فمن الممكن أن نتصور وضع جهاز حساس نستعمل فيه نفس المبدأ.

**الكلمات المهمة:** المكورات العنقودية السلبية المخثرة- بكتيرية K12 – تيار ثنائي التناوب- المعالجة –

SCN-SCP



## ملخص

يمكن تحقيق تعقيم المياه بواسطة المواد الكيميائية والعمليات الفيزيائية المختلفة من بينها ، برزت

، على الزجاج والبلاستيك واستعملنا لذلك المقاومة الكهروكيميائية الطيفية. هذه التقنية فعالة حتى بالنسبة لتركيزات منخفضة جدا من البكتيريا.

ويعزى ذلك إلى نمو الأغشية الحيوية كثف على سطح K12 المعدن.

لجميع

التركيزات المستخدمة ، لاحظنا أن يتم فرضه على المنحنيات الثلاثة ، لأنه يدل على التصاق جيدة من بيوفيلم. ويعزز العد البكتيري. واستنادا إلى هذا العمل ، فمن الممكن أن نتصور وضع جهاز حساس نستعمل فيه نفس المبدء.

الكلمات المهمة ،المكورات SCN-SCP -تيار ثنائي التناوب- المعالجة -K12بكتيرية



## ملخص

يمكن تحقيق تعقيم المياه بواسطة المواد الكيميائية والعمليات الفيزيائية المختلفة من بينها ، برزت

، على الزجاج والبلاستيك واستعملنا لذلك المقاومة الكهروكيميائية الطيفية. هذه التقنية فعالة حتى بالنسبة لتركيزات منخفضة جدا من البكتيريا.

K12 ويعزى ذلك إلى نمو الأغشية الحيوية كثف على سطح

المعدن.

لجميع

التركيزات المستخدمة ، لاحظنا أن يتم فرضه على المنحنيات الثلاثة ، لأنه يدل على التصاق جيدة من بيوفيلم. ويعزز العد البكتيري. واستنادا إلى هذا العمل، فمن الممكن أن نتصور وضع جهاز حساس نستعمل فيه نفس المبدأ.

**الكلمات المهمة:** المكورات العنقودية السلبية المخثرة- بكتيرية K12 – تيار ثنائي التناوب- المعالجة

SCN-SCP-

