

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	xi
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE II	
REVUE DE LITTÉRATURE	3
2.1 Les cibles bactériennes	3
2.1.1 Définitions et caractéristiques.....	3
2.1.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	3
2.1.3 <i>Salmonella enterica</i>	4
2.1.4 <i>Escherichia coli</i>	5
2.2 Les agents bioactifs	7
2.2.1 Les anticorps	7
2.2.2 Les aptamères	9
2.2.3 Les antibiotiques traditionnels	10
2.2.4 Les bactériophages.....	11
2.3 Les bactériophages	12
2.3.1 Caractéristiques et structure.....	12
2.3.2 Les familles de bactériophages	13
2.3.3 Les cycles lytiques	14
2.3.4 La multiplicité d'infection	15
2.3.5 L'entérobactériophage T4.....	17
2.3.6 Le développement du bactériophage T4.....	18
2.3.7 Intérêts pratiques des bactériophages	20

2.4	La fabrication du papier.....	21
2.4.1	Les fibres de bois	21
2.4.2	La formation du papier	22
2.4.3	La conversion du papier.....	23
2.5	Les papiers bioactifs	25
2.5.1	La fixation des agents sur les papiers	25
2.5.2	États des avancements à l'UQTR	28
2.5.3	Sélection des procédés en vue d'une production pilote.....	30

CHAPITRE III

DÉTERMINATION DES CONDITIONS D'APPLICATION DES BACTÉRIOPHAGES..... 31

3.1	Matériels et méthodes.....	31
3.1.1	Production des bactériophages.....	31
3.1.2	Purification des bactériophages	32
3.1.3	Décompte des plages de lyses.....	33
3.1.4	Décompte par ordinateur	34
3.1.5	Tests des puits.....	34
3.1.6	Tests d'exposition aux températures élevées.....	35
3.1.7	Tests d'exposition aux différents pH.....	35
3.2	Résultats des conditions d'opérations des bactériophages	36
3.2.1	Tolérances aux températures élevées.....	36
3.2.2	Tolérance des bactériophages aux conditions de pH.....	39
3.2.3	L'influence des sauces de couchage sur la bioactivité	41
3.3	Discussion.....	42
3.3.1	Les conditions d'opérations en température	42
3.3.2	Les conditions d'opération en pH.....	43
3.4	Conclusions sur les conditions opératoires d'application des phages	44

CHAPITRE IV

PROCÉDÉS DE FABRICATION DES PAPIERS BIOACTIFS À L'ÉCHELLE PILOTE 45

4.1	Matériel et méthodes	45
4.1.1	Courbe de croissance d' <i>Escherichia coli B</i>	45

4.1.2	Préparation des inocula bactériens et viraux.....	46
4.1.3	Préparation des expériences en bioréacteurs	46
4.1.4	Filtration tangentielle des bactériophages.....	48
4.1.5	Méthodes de couchages	49
4.2	Résultats des essais pilotes	51
4.2.1	Mise à l'échelle de la production de bactériophages	51
4.2.2	Première fermentation en bioréacteur	53
4.2.3	Couchage en usine pilote	57
4.3	Discussion.....	59
4.3.1	Production de bactériophages en bioréacteur pilote	59
4.3.2	Procédé de couchage.....	62
CHAPITRE V		
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		65
5.1	Conclusion.....	65
5.2	Perspectives	67
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		69
ANNEXE A		
COLORATION DE GRAM (FISHER)		76
ANNEXE B		
PROTOCOLE DE CONGÉLATION DES BACTÉRIES		79
ANNEXE C		
CODE DE LA SÉQUENCE D'ANALYSE (C++).....		81
ANNEXE D		
RÉSULTATS BRUTS DÉCOMPTE COURBE DE CROISSANCE.....		82

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
2.1	Étapes de la transcription lors de l'infection d' <i>E. coli</i> par T4	20
3.1	Activité antibactérienne des phages T4 après incubation à 60 °C et 70 °C...	37
3.2	Paramètres des expériences sur la tolérance au pH	40
3.3	Solution de couchages.....	42
4.1	Paramètres initiaux de la première fermentation	48
4.2	Paramètres initiaux de la seconde fermentation.....	48
4.3	Résultats du couchage par pulvérisation : papier à résistance humide	58
4.4	Résultats du couchage par pulvérisation : papier à base de pâte thermomécanique (TMP).....	58
4.5	Résultats du couchage par rotogravure	59

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
2.1	Structure d'un anticorps.....	8
2.2	Représentation d'un aptamère ciblant une protéine.....	10
2.3	Le cycle lytique chez les <i>Myoviradea</i>	14
2.4	Population bactérienne par rapport au nombre de bactériophages fixés sur la paroi pour des MOI de 0,5 1,0 et 1,5	16
2.5	Le bactériophage T4	17
2.6	Couchage à lame	23
2.7	Couchage par rotogravure.....	24
2.8	Couplage d'anticorps ou d'aptamère d'ADN sur du microgel carboxylé (MG : Microgel, APT : Aptamère, SP : Streptavidine, IgG : Immunoglobuline)	26
2.9	Adhésion du phage par la méthode du « Cellulose Binding Domain »	27
2.10	Liaison chimique entre la cellulose et un aptamère	28
3.1	Superposition des couches dans les plages de lyses	33
3.2	Algorithme du traitement numérique.....	34
3.3	Activité antibactérienne des phages T4 après un traitement thermique à 60 °C	37
3.4	Activité relative des phages par rapport au temps d'exposition à une température de 60 °C	38
3.5	Influence du pH en fonction du temps.....	39
3.6	Concentration relative des phages en fonction du pH	41
4.1	Étapes de la production pilote.....	45
4.2	Principe de la filtration tangentielle.....	49

4.3	Schéma simplifié des méthodes de couchage utilisées dans la fabrication de papiers bioactifs	50
4.4	Machine de couchage pilote d'Innofibre	51
4.5	Courbe de croissance de <i>E. coli</i> dans le TSB.....	52
4.6	Absorbance du mélange TSB+ <i>E. coli</i> à 650 nm pendant la croissance.....	53
4.7	Évolution du pH, de la saturation d'oxygène et de l'antimousse lors de la première réaction.....	54
4.8	Absorbance à 650 nm du milieu lors de la première réaction.....	55
4.9	Évolution du pH, de la saturation en oxygène et de l'anti-mousse lors de la seconde réaction	56

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNsi	Acide ribonucléique interférant
CIC	Centre international de couchage
CNETE	Centre national en électrochimie et en technologies environnementales
CRML	Centre de recherche sur les matériaux lignocellulosiques
gp#	Nom générique des produits génétiques (gene product)
IDE	Innovation et développement économique Trois-Rivières
Kpb	Kilo paires de base
MOI	Multiplicity of Infection, Multiplicité d'infection
PPG	Polypropylène-glycol
T4	Entérobactériophage type 4
TMP	Thermo-Mechanical Pulp, pâte thermomécanique
TSB	Trypticase Soy Broth
TSA	Trypticase Soy Agar
UFC	Unité formatrice de colonie
UFP	Unité formatrice de plaque
UQTR	Université du Québec à Trois-Rivières

CHAPITRE I

INTRODUCTION

L'agence de la santé publique du Canada estime que chaque année un Canadien sur huit (4 millions) sera atteint d'une maladie de source alimentaire [1]. À cause de la mondialisation et du commerce des aliments, les contaminations alimentaires peuvent engendrer des épidémies d'ampleur internationale et avoir de fortes conséquences économiques. Aux États-Unis seulement, les pertes économiques dues aux contaminations alimentaires sont estimées à 34,5 milliards de dollars annuellement [2]. Il existe de nombreux exemples récents de ce type d'événement : les contaminations des légumes en Allemagne (2011) [3], les problèmes de la viande contaminée chez *XL Food* (2012) [4] et le problème de la listériose dans les fromages au lait cru au Québec (2008) [5].

Les contaminations peuvent survenir tout au long du traitement d'un aliment : un dépôt de viande oublié dans un mécanisme, un mélange de produits crus et cuits ou encore un bris dans la chaîne du froid... La totalité de ces contaminations affecte la vie de millions de personnes [6,7]. Le contrôle systématique de tous les aliments d'une chaîne n'est pas envisageable d'un point de vue technique et économique. Alors, comment minimiser les risques de contamination alimentaire? Une des meilleures réponses à cette question concerne les emballages alimentaires. Avec de nouvelles technologies, il est maintenant possible de développer des emballages intelligents permettant de détruire ou de contrôler les agents pathogènes et d'ainsi prévenir de futurs incidents.

Ces emballages intelligents sont notamment développés par le réseau pancanadien SENTINEL qui réunit onze universités, dont l'UQTR, et cinq entreprises [8]. Son objectif est de développer les technologies et les techniques nécessaires à la production

de papier bioactif, c'est-à-dire un papier révolutionnaire qui permet la détection, la capture ou la destruction d'agents pathogènes.

Il existe un grand nombre d'agents bioactifs pouvant être utilisés pour les papiers d'emballage. Dans le cadre des études menées à l'UQTR, les bactériophages ont été choisis afin d'apporter des propriétés antibactériennes au papier. Les bactériophages sont des virus qui ciblent seulement les procaryotes, la grande famille des bactéries. Ils permettent aux papiers bioactifs de tuer les micro-organismes pathogènes pouvant se trouver sur un aliment sans causer de tort au consommateur.

Les papiers bioactifs pouvant accomplir ces tâches sont déjà produits en laboratoire, cependant aucune production à l'échelle pilote n'avait encore été réalisée. Ainsi, les travaux de cette maîtrise ont comme objectifs de déterminer les paramètres clés de la production de papiers bioactifs à base de phages et de valider la mise à l'échelle des procédés. Pour atteindre ces objectifs, des travaux ont été réalisés afin de déterminer les conditions idéales de température et de pH pour l'utilisation des bactériophages. Les résultats obtenus à l'aide de ces expériences ont été utilisés pour effectuer une production à l'échelle (pré)commerciale.

Ce document débute par une revue de littérature présentant les cibles bactériennes. Cette partie comprend une description de l'organisme, des effets sur la santé et quelques indices épidémiologiques. La partie suivante concerne la production des papiers afin de permettre une meilleure compréhension des phénomènes physiques et chimiques de la production papetière. Par la suite, les phages sont décrits. Nous insistons principalement sur le phage T4, notre phage cible, et des interactions entre les phages et le papier. Les résultats et les discussions sont divisés en deux grandes sections : la détermination des conditions d'opérations des bactériophages et la mise à l'échelle des procédés.

CHAPITRE II

REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Les cibles bactériennes

2.1.1 Définitions et caractéristiques

Les bactéries sont des micro-organismes qui font partie du domaine des *Procaroyotes*. Elles sont donc très différentes des cellules animales et ne sont pas exposées aux mêmes virus. Les bactéries sont des êtres unicellulaires qui n'ont généralement pas besoin d'un hôte pour se reproduire. Elles peuvent vivre dans toutes sortes d'environnements, même les plus extrêmes, ce qui les rend particulièrement difficiles à contrôler. La ténacité de tels organismes est un problème majeur pour la conservation des aliments.

Si les bactéries perturbent le fonctionnement de l'organisme hôte, elles deviennent et sont alors dites pathogènes. Trois bactéries ont été sélectionnées, par rapport à leur dangerosité et à leur présence généralisée, comme cibles pour développer les premiers types de papiers bioactifs expérimentaux [7,9]. Il s'agit d'*Escherichia coli*, de *Salmonella* sp. et de *Listeria monocytogenes*. Chaque bactérie est présentée avec ses caractéristiques et une illustration d'une contamination documentée.

2.1.2 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes a été décrite pour la première fois en 1927 par Murray et Pirie [10]. C'est une bactérie en forme de bâtonnet Gram positif¹ (voir Annexe A pour le

¹ La coloration de Gram permet l'observation sous microscope d'une infiltration d'iode dans le cytosol d'une bactérie. Ce phénomène permet de conclure qu'une structure externe appelée paroi bactérienne est absente.

protocole utilisé) qui mesure entre 0,4 µm et 0,5 µm [11]. Sous le microscope elle se présente en chaînette et, parfois, elle semble ronde. Elle possède un flagelle qui n'est exprimé qu'entre les températures de 20 °C et 25 °C. Cette bactérie ne sporule pas, et peut croître entre des températures de 0,4 °C et 50 °C. Il s'agit d'une bactérie aéro-tolérante et elle provoque une bêta-hémolyse dans les géloses au sang.

Listeria monocytogenes se développe à l'intérieur des cellules d'un hôte, ce qui la protège d'une partie du système immunitaire et de plusieurs antibiotiques. Lorsque la bactérie est maintenue dans le système digestif, la maladie occasionnée est une gastro-entérite. Elle peut également provoquer la listériose qui est une maladie plus grave atteignant le système nerveux central et provoquant des méningites. Près de 24 % des cas de listériose sont mortels [12]. Le taux de mortalité augmente lorsque les infections néonatales sont prises en compte.

Cette bactérie affecte en moyenne 132 individus chaque année au Canada [5]. Aux États-Unis en 2000 elle a touché 2 518 personnes [7]. Elle est principalement découverte dans les fromages au lait cru et différents produits laitiers. Une grande partie des contaminations à la *Listeria* provient de fromages traités qui ont été en contact avec des fromages au lait cru.

Une épidémie de listériose a eu lieu au Québec en 2008. Lors de cette épidémie, 93 cas d'une infection à la souche LM P93 ont été rapportés au ministère de la Santé et des Services sociaux du Québec. C'est la poursuite de cette souche qui a provoqué le retrait de plusieurs fromages sur le marché québécois. Parmi ces cas, il y eut 22 morts, deux usines furent inspectées et fermées et un large rappel concernant plus de 300 commerces a dû être ordonné [5].

2.1.3 *Salmonella enterica*

Salmonella enterica a été décrite pour la première fois par l'américain Theobald Smith en 1885 qui la distingua des autres entérobactéries à cause de son

incapacité à fermenter le lactose et à sa grande mobilité [13]. *Salmonella Enterica* est une bactérie Gram négatif en forme de bâtonnet mesurant de 0,7 à 1,5 µm sans compter les flagelles. Elle est généralement mobile et possède plusieurs flagelles qui entourent la bactérie. *Salmonella Enterica* possède peu de souches pouvant être invasives, certaines sont même incapables de survivre dans le corps humain.

Les souches de *Salmonella* les plus répandues sont *Salmonella Enterica Enteritidis*, *heidelberg* et *typhi*. Elles peuvent engendrer une gastro-entérite, envahir rapidement les processus typhoïdes et causer des septicémies. Lors de son infection, la bactérie peut envahir les cellules de son hôte. Elle se protège ainsi d'une partie du système immunitaire et de plusieurs traitements. Les traitements aux antibiotiques sont de moins en moins efficaces à cause de l'émergence de souches résistantes [14]. Aux États-Unis en 2000, il y a eu 1,4 million de cas d'infections dues à *Salmonella* [7].

Une éclosion bactérienne de *Salmonella entérina* a eu lieu dans un restaurant en Angleterre affectant près de 60 personnes. Après une analyse de la souche, qui se trouvait être *Salmonella entérina Phage Type 8*, les analystes ont pu isoler 53 cas de contamination à la souche PT8 et ils ont décelé une densité de près de 3×10^8 UFC dans les pâtes! [15]

2.1.4 *Escherichia coli*

Escherichia coli est une bactérie Gram négatif à aérobie facultative identifiée en 1885 par Theodor Escherich [16]. Elle est présente dans la flore intestinale de presque la totalité des mammifères dont l'homme. Elle colonise les intestins humains dès les premiers instants de vie où elle développe une relation commensale avec son hôte. Elle est d'ailleurs une des principales composantes de la flore intestinale humaine [17]. Cette occupation est bénéfique puisqu'elle empêche la colonisation des intestins par des bactéries néfastes [18]. *E. coli* peut croître dans une grande variété d'environnements et utiliser un grand nombre de sources de carbone comme l'acétate, le succinate, le glycérol [19], le galactose, le mannitol et le glucose [20]. Elle peut se développer dans

des environnements dépourvus d'oxygène en utilisant plusieurs mécanismes d'intégration anaérobie des sucres, comme la fermentation lactique et la fermentation alcoolique (anaérobiose). Elle peut aussi croître en présence d'oxygène et utiliser des réactions aérobiques (aérobiose).

Escherichia coli peut demeurer active et croître entre les températures de 15 °C et 45 °C. La bactérie se développe au maximum de son potentiel à des températures proches de 37 °C et à un pH neutre. *Escherichia coli* peut survivre à des chocs au froid dans des milieux légèrement acides [21]. Elle peut résister, sans croître, à des températures inférieures à -20 °C pendant des périodes de temps pouvant dépasser 9 mois [22]. D'autre part, la bactérie ne résiste pas plus d'une minute à des températures supérieures à 62,8 °C [22].

E. coli est une des bactéries les plus diversifiées, seulement 20 % de son génome est conservé dans toutes les souches. Une grande partie de ces souches ne présente pas de danger pour la santé, mais certaines sont particulièrement dangereuses [23]. Les souches d'*Escherichia coli* sont habituellement identifiées par leur sérotype. Les antigènes utilisés sont ceux d'une molécule de la membrane bactérienne (O) et ceux des flagelles (H) pouvant être présents sur la bactérie [24].

Par exemple, la souche O157:H7 est particulièrement connue à cause des dangers qu'elle représente dans la viande hachée. Cette souche est dite « Entero hémorragique », c'est-à-dire qu'elle va entraîner des hémorragies dans les intestins. La principale cause en est la présence d'une toxine de type *shiga* dans le cytosol de la bactérie [24,25]. Cette souche possède aussi la capacité de s'accrocher à la paroi des cellules tapissant les intestins, cette capacité va également créer des perturbations et rendre inefficace le réflexe naturel de la diarrhée.

La souche O104:H4 est une souche plus rare que la précédente. Elle a causé des problèmes en Allemagne et en France en 2011 lors de la contamination de graines germées [26]. Dans l'organisme humain, cette souche est la cause de gastro-entérites et

d'infections urinaires. Elle possède une résistance supplémentaire aux antibiotiques traditionnels.

La souche B est une bactérie cultivée en laboratoire très utilisée dans des domaines tels que la microbiologie. Elle ne possède pas de caractéristiques pouvant causer une pathologie : ce qui la rend très peu dangereuse pour l'homme. Elle est donc utilisée comme bactérie modèle en laboratoire. Pour effectuer les essais au niveau industriel, *Escherichia coli* a été sélectionnée comme bactérie cible puisqu'elle dispose d'une souche modèle très répandue et peu dangereuse. Elle est donc indiquée pour les premières séries d'essais, en période de mise en place de méthodes, où plusieurs failles de sécurité peuvent se présenter.

Les trois bactéries décrites ci-dessus nommées sont les bactéries cibles du réseau SENTINEL, car, vu qu'elles sont la cause de nombreux problèmes dans l'alimentation, elles ont été prises comme « cibles prioritaires ». Afin de les inhiber, de les détruire ou de les contrôler, différents produits d'origine biologique peuvent être utilisés : ils sont présentés à la section suivante.

2.2 Les agents bioactifs

Les agents bioactifs sont les organismes clefs qui vont permettre de capturer ou de détruire les agents pathogènes. Les recherches au sein du réseau SENTINEL utilisent les agents issus principalement de quatre groupes : les anticorps, les aptamères (ADN et ARN), les antibiotiques et les bactériophages. Les avantages et les désavantages de ces cinq groupes sont décrits dans la prochaine partie du document.

2.2.1 Les anticorps

Les anticorps sont des immunoglobulines qui font naturellement partie du système de défense immunitaire. Ils sont produits par les lymphocytes pour défendre l'organisme d'invasion bactérienne, virale ou parasitaire [27]. Ces molécules possèdent une structure

en Y (Figure 2.1) permettant l'attachement à des molécules appelées antigènes. Les deux pointes du Y sont composées de chaînes variables permettant l'attachement à un antigène. La troisième pointe permet généralement l'interaction avec un des nombreux mécanismes de défense du corps.

Le type de mécanisme qu'ils intègrent ou utilisent détermine le groupe d'immunoglobuline. Par exemple, les IgG possèdent un fragment constant qui interagit avec le récepteur au fragment constant (Fc), une protéine qui se retrouve à la surface de cellules effectrices (ex : lymphocytes). Les IgG aident ainsi la phagocytose de leur cible et empêchent toute interaction avec l'organisme [27].

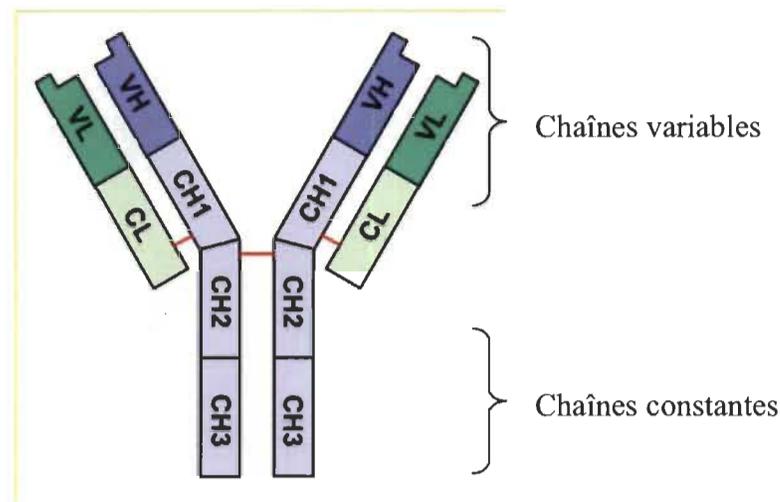


Figure 2.1 Structure d'un anticorps.

Dans l'organisme les anticorps ne détruisent pas leurs cibles, ils sont utilisés par le corps comme intermédiaire dans une réaction subséquente ou comme inhibiteur. Dans le cadre d'une utilisation dans la fabrication de papiers bioactifs, les anticorps permettent l'observation d'une agglutination, l'attachement de la bactérie à une surface ou au signalement de la présence de la bactérie par un procédé intermédiaire [28–30]. La production d'anticorps est, en ce moment, limitée aux laboratoires, ce qui les rend difficilement applicables pour une application commerciale à grande échelle.

2.2.2 Les aptamères

Les aptamères sont des oligo/polynucléotides, c'est-à-dire des polymères composés de nucléotides. Ces chaînes peuvent-être composées d'acide désoxyribonucléique (ADN), d'acide ribonucléique (ARN) ou encore d'un dérivé d'une des deux chaînes [31]. Les aptamères peuvent être utilisés de plusieurs façons afin d'interagir avec les bactéries.

Une des méthodes standard est l'utilisation de la courte chaîne d'ADN ou d'ARN interférent (ARNsi). Ces molécules s'hybrident avec l'ARN messenger dans le cytosol d'une bactérie ce qui permet de bloquer la production d'une protéine cible. La cascade d'événements entraîne des effets dépendant de la protéine ciblée par l'ARNsi [32]. Ceci pourrait provoquer la destruction de la bactérie lorsque l'ARN messenger ciblé produit une protéine essentielle. Malgré une grande utilité en recherche, cette technique demande l'injection d'ARN dans les organismes ciblés. L'ARNsi peut également être inséré à l'intérieur d'un virus [33].

Une autre méthode d'utilisation des aptamères est la localisation de la présence d'une séquence dans un organisme. L'aptamère est produit de manière à former une boucle grâce à une région contenant un palindrome. La boucle s'ouvre lorsque l'aptamère s'attache à une série d'acides aminés cibles révélant ainsi un marqueur [34,35]. Le marqueur, par exemple une molécule fluorescente, est seulement exposé quand l'aptamère est lié à la cible.

La figure 2.2 illustre l'utilisation d'une boucle palindromique. La boucle varie entre un état fermé (a) où le marqueur est obstrué et un état déployé lorsque le marqueur est activé (b, puis c). Lorsque la molécule rencontre la cible, l'aptamère reste bloqué dans cet état (d) et le marqueur est alors apparent.

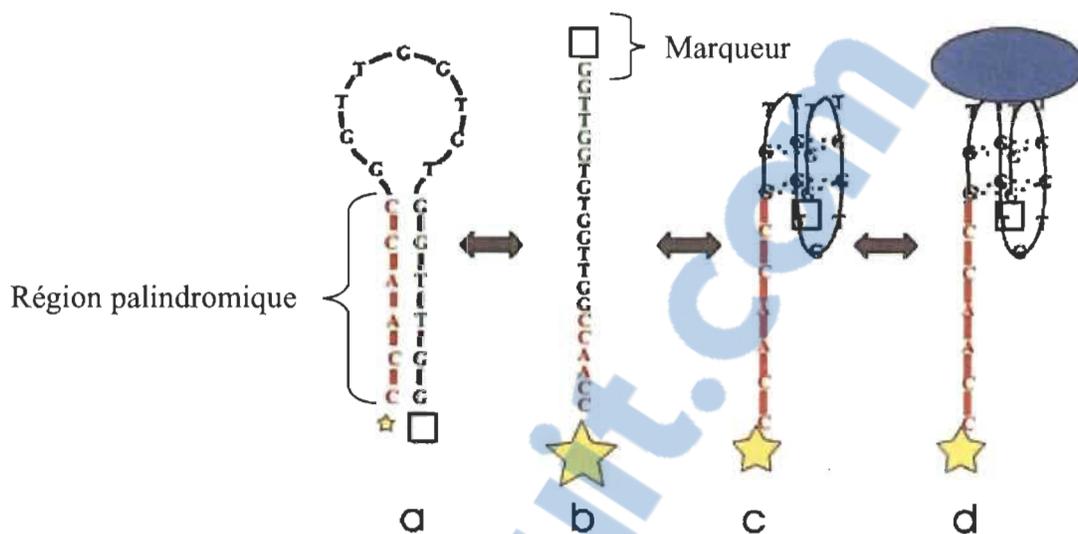


Figure 2.2 Représentation d'un aptamère ciblant une protéine.

Dans le cas des papiers bioactifs, c'est surtout la méthode permettant la détection bactérienne qui est utilisée. Les aptamères détectent alors une protéine bactérienne qui en traduit sa présence. Ils pourraient être utilisés, par exemple, dans une encre bioactive qui changerait de couleur lorsque l'aliment est contaminé. Cependant, il n'y a aucun contrôle de la population bactérienne, seulement identification.

2.2.3 Les antibiotiques traditionnels

Les antibiotiques sont des molécules qui interagissent avec les bactéries en interférant avec les voies métaboliques de ces dernières. Les voies ciblées par l'antibiotique déterminent la gamme de bactéries affectées. Lorsqu'un antibiotique atteint une voie métabolique largement répandue, on parle d'un antibiotique à large spectre. Dans le cas contraire, on parle d'un antibiotique spécifique.

Un exemple bien connu d'antibiotique est la pénicilline. La pénicilline est un antibiotique de la famille des bêta-lactamines. Les pénicillines les plus utilisées sont la *benzylpénicilline* (G) et la *phénoxyéthylpénicilline* (V). Ces molécules sont produites par des levures de la famille *pénicillium*. Elles attaquent normalement les bactéries Gram positifs (*L. monocytogenes*) en rendant la membrane de peptidoglycane perméable [36].

L'ajout d'une chaîne latérale à la pénicilline la rend efficace contre les bacilles Gram négatifs (*E. coli*, *Salmonella*). Cette variété de pénicilline est appelée *aminopénicillines*.

Une des principales problématiques avec les antibiotiques est le développement de résistance chez les bactéries. Les bactéries résistantes se développent après l'exposition d'une population à un antibiotique. Plus les bactéries sont exposées à un antibiotique, plus il y a de chance qu'elles acquièrent une résistance contre celui-ci. La résistance peut se développer de plusieurs façons, mais parfois, très rapidement. Le médecin doit alors utiliser des mélanges d'antibiotiques ou des antibiotiques moins prescrits, donc moins communs et plus chers, pour endiguer l'infection.

Un exemple de mécanisme de protection que les bactéries peuvent développer est la production d'une protéine inhibant l'antibiotique. Ceci est particulièrement vrai avec la pénicilline. Les bactéries résistantes vont fréquemment acquérir un gène qui permet la production de bêta-lactamase. Il s'agit d'une enzyme qui dégrade la pénicilline. Lorsque cette situation a été repérée, des recherches ont dû être effectuées pour synthétiser de nouvelles formes de pénicilline résistantes au bêta-lactamase [36]. Malheureusement, c'est une question de temps avant que de nouvelles souches de bactéries ne développent une solution pour résister à la nouvelle molécule.

2.2.4 Les bactériophages

Les bactériophages² sont des prédateurs naturels pour les bactéries. Ce sont des virus mesurant en général entre 20 et 300 nm. Il existe de nombreuses familles de bactériophages avec des caractéristiques très diversifiées. Les phages sont des éléments bioactifs spécifiques qui ciblent un seul genre de bactérie.

Il existe une grande variété des bactériophages dans l'environnement ciblant tous les types de bactéries. Il est donc très facile de créer des cocktails de bactériophages

² « Bactériophage » est un mot qui est l'union de « bactérie » et de « phage ». Ce qui signifie littéralement « mangeur de bactérie ».

exploitant différents éléments de la bactérie, ce qui rend le mélange (un « cocktail » de phages) beaucoup plus efficace et évite l'évolution vers des bactéries résistantes. Il est aussi facile de trouver de nouveaux phages pour cibler de nouvelles bactéries. Les bactériophages ont l'avantage de pouvoir diversifier leurs codes génétiques et d'évoluer avec leurs hôtes. Même si les bactéries développent des résistances à force d'être exposées, les bactériophages développent eux aussi naturellement de nouveaux mécanismes qui vont leur permettre de contourner les nouvelles résistances des bactéries. Cet avantage rend les bactériophages extrêmement pertinents et adaptés comme alternative aux antibiotiques, ces derniers préservent ainsi leur efficacité dans le domaine médical.

En résumé, les bactériophages possèdent plusieurs avantages par rapport aux autres éléments bioactifs :

- Les phages sauvages ont déjà obtenu l'autorisation des organismes de contrôle de divers pays afin d'être utilisés dans l'alimentation [37].
- Ils sont relativement simples à produire et peu coûteux.
- Ils possèdent des mécanismes innés pour s'adapter et se reproduire.

C'est pour ces raisons qu'ils ont été sélectionnés dans le réseau SENTINEL et dans notre projet afin d'effectuer la production commerciale de papier bioactif. La section suivante présente en détail les caractéristiques de cet agent bioactif.

2.3 Les bactériophages

2.3.1 Caractéristiques et structure

Les bactériophages possèdent tous la même structure générale : une capsule de protéines appelée capside et une charge virale qui correspond à leur code génétique. La capside permet au bactériophage de protéger son code génétique contre le milieu, de détecter les organismes hôtes potentiels et de faciliter l'entrée de la charge virale dans

l'hôte [17]. Les protéines composant la capsidie sont appelées les capsomères [17]. Parmi les protéines capsomériques, certaines permettent l'adhésion du bactériophage à l'hôte et sont donc appelées les adhésines.

La deuxième composante des phages est cruciale : il s'agit de la charge virale. Cette charge contient le génome du phage qui est codé soit sur de l'ADN ou de l'ARN. Il peut être présent sous la forme double ou simple. La nature de la charge virale est un outil de classement important.

2.3.2 Les familles de bactériophages

Les bactériophages font partie du règne des virus, tous les virus sont séparés par leur caractéristique épigénétique, c'est-à-dire le mode de stockage génétique qu'ils emploient [38]. Les virus sont séparés en sept groupes :

1. Les phages contenant deux brins d'ADN (dsDNA),
2. Les phages contenant un seul brin d'ADN (ssDNA),
3. Les phages contenant deux brins d'ARN (dsRNA),
4. Les phages contenant seulement un brin d'ARN codant (ssRNA+),
5. Les phages contenant seulement un brin d'ARN non codant (ssRNA-),
6. Les phages utilisant un brin d'ARN et une reverse transcriptase (ssRNA(rev)), et
7. Les phages utilisant un brin d'ADN et une reverse transcriptase (ssDNA(rev)).

Il existe par la suite de nombreuses familles. Par exemple, un des bactériophages les plus étudiés, le bactériophage T4 est dans le groupe 1 (les virus dsDNA) et fait partie de l'ordre des *Codoviradea* et de la famille des *Myoviradea*. Cette famille possède la particularité d'avoir une structure tubulaire qui favorise l'injection de l'ADN dans la bactérie hôte.

2.3.3 Les cycles lytiques

Il existe deux types de cycle viraux. Le cycle lytique et le cycle lysogénique. Le cycle lytique est un cycle de réplication virale qui va aboutir à la mort de la bactérie hôte en provoquant la lyse de cette dernière. Le cycle lysogénique permet aux virus de se répliquer sans provoquer la lyse de l'hôte. L'ADN du virus va se reproduire en même temps que celui de l'hôte, contaminant ainsi les bactéries filles. Il existe des virus n'utilisant que le cycle lytique; ces phages dits « virulents » sont ceux recherchés et sélectionnés pour la fabrication de papiers bioactifs.

Les étapes du cycle lytique sont présentées à la figure 2.3. Chez les *Myoviradea*, la première étape est la détection des protéines sur la paroi bactérienne (1). Dans cette étape le phage utilise les adhésines pour détecter la présence de l'hôte. Lorsqu'un certain nombre d'adhésines est fixé, le bactériophage change de conformation. Ce changement de conformation libère des protéines qui provoquent l'injection de la charge virale dans le cytosol de la bactérie (2). Par la suite, il y a un détournement des outils de la bactérie qui commence à produire des éléments aidant la fabrication du phage et l'ADN de l'hôte subit un processus d'hydrolyse (3). L'ADN viral est répliqué, puis interprété. Le bactériophage est assemblé (4) et à la fin du cycle, des enzymes provoquent la lyse de la paroi bactérienne (5).

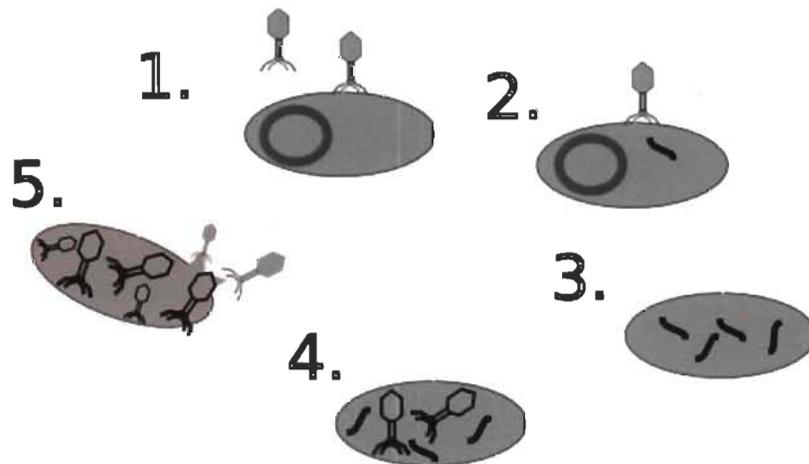


Figure 2.3 Le cycle lytique chez les *Myoviradea*.

Lorsque la bactérie se prépare à se dupliquer, le matériel disponible à la reproduction et la réparation du code génétique sont élevés. Ce matériel est utilisé par le bactériophage pour infecter la bactérie de manière efficace [39]. Le bactériophage est donc plus efficace quand une majorité de bactéries est en train de se dupliquer, c'est-à-dire durant la phase exponentielle de la croissance bactérienne.

2.3.4 La multiplicité d'infection

La multiplicité d'infection (MOI ou Multiplicity of Infection) correspond au ratio phage/bactéries (un MOI de 1 indique qu'il y a un phage pour une bactérie, un MOI de 0,5 indique qu'il y a numériquement un demi-phage pour une bactérie). Le nombre réel de phages ou de virus qui entrent dans une cellule donnée est un processus statistique : certaines cellules peuvent être infectées par plus d'une particule virale et d'autres peuvent ne pas être infectées. La probabilité d'infection en fonction du MOI est estimée en utilisant une distribution de Poisson (Équation 1). Cela permet de connaître le pourcentage de la population bactérienne infectée par n bactériophages lors d'une infection à un MOI de m [40,41].

Équation 1 : Formule estimant le nombre de phages infectant une bactérie

$$\frac{\lambda^n * e^{-m}}{n!}$$

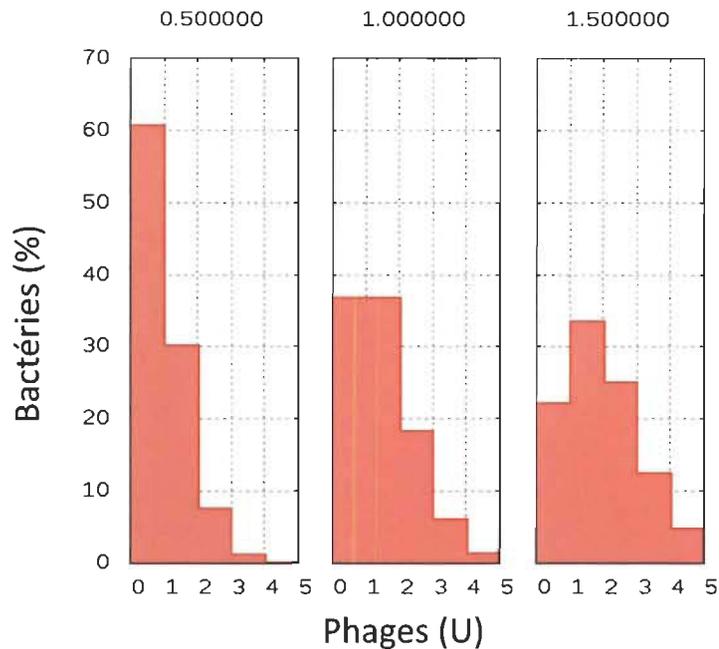


Figure 2.4 Population bactérienne par rapport au nombre de bactériophages fixés sur la paroi pour des MOI de 0,5 1,0 et 1,5.

En fonction de l'équation 1, la figure 2.4 illustre la quantité de bactéries par rapport au nombre de phages l'attaquant. D'après ces données, les probabilités d'infection sont de : 38 % de bactéries pour un MOI de 0,5, 65 % pour un MOI de 1,0 et un 78 % pour un MOI de 1,5. Cette formule n'est cependant pas valide lorsque les concentrations bactériennes sont en dessous de 1×10^7 [42]. Elle ne peut donc pas être utilisée, par exemple, pour les calculs concernant les bactéries dans un morceau de viande.

Dans le cadre de la production de bactériophages, le rendement est dépendant de la croissance bactérienne. Une trop forte concentration de phages peut nuire au développement des bactéries. Il est donc important que le MOI initial soit modéré pour favoriser une croissance bactérienne optimale.

2.3.5 L'entérobactériophage T4

L'entérobactériophage T4 est un bactériophage de la famille des *Myoviradea* et possède une charge virale à double brin d'ADN. Il utilise principalement *Escherichia coli* comme hôte pour se reproduire. Ce virus est très présent dans l'environnement puisque son hôte l'est aussi. C'est un phage virulent, ce qui rend son utilisation extrêmement intéressante pour éliminer des populations bactériennes. Le phage au complet mesure 115 nm de long et 85 nm de large [43]. Le phage est séparé en trois sous-sections : la tête, la queue et la base (Figure 2.5).

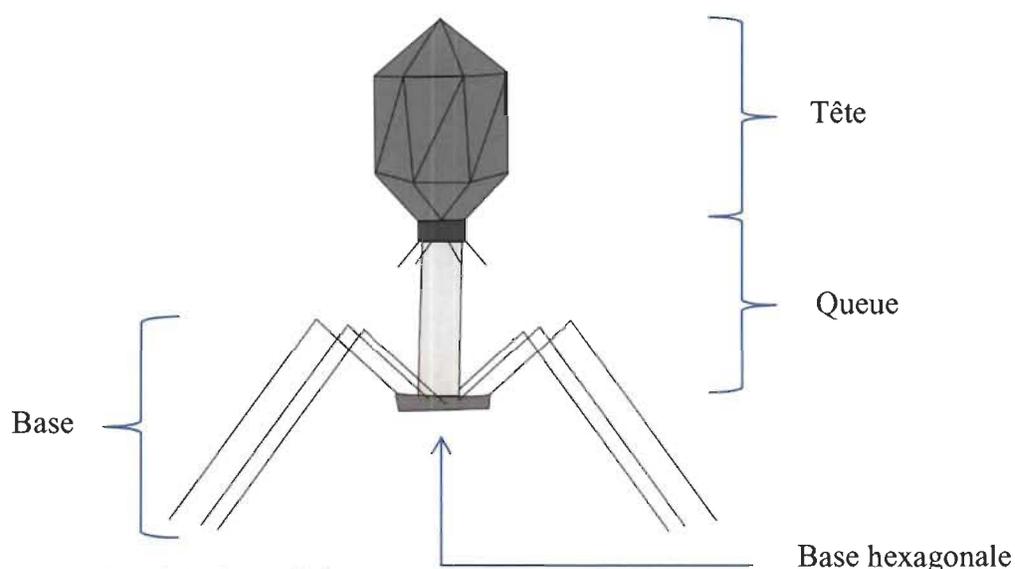


Figure 2.5 Le bactériophage T4.

La tête est composée de 12 sortes de protéines qui forment une structure possédant près de 3 000 chaînes. Les principales protéines composant la structure sont la protéine gp23, gp24 et gp20. La structure composant la tête du phage possède aussi des protéines non essentielles appelées *hoc* et *soc*. Elles sont très utilisées lors des manipulations génétiques pour ajouter des propriétés à la tête du phage [44]. Cette structure protège la charge virale qui est composée d'un chromosome d'ADN double brin de 172 kpb. Les molécules d'ADN situées dans la tête rendent la capsid légèrement négative.

La queue du phage est particulièrement intéressante, mais complexe. Plus de 22 protéines sont impliquées dans sa fabrication, dont plusieurs chapronines [45] permettant de les assembler sous contrainte [43]. La queue est composée de deux cylindres concentriques, un cylindre contractile à l'extérieur et un cylindre non contractile à l'intérieur. Au centre des deux cylindres un espace de 400 picomètres permet à la charge virale de transiter vers la bactérie hôte.

Le phage dispose de 6 fibres longues fixées à la base hexagonale. Les fibres longues se composent des protéines gp34 à la protéine gp37. La protéine utilisée comme adhésine est située à l'extrémité des fibres longues; il s'agit de gp37 [45]. Lorsque les adhésines sont fixées, une réaction entraîne la libération des protéines composant la base hexagonale. Le changement de conformation dans la base provoque une contraction de la queue menant à l'injection de l'ADN dans la bactérie.

Ce sont les propriétés des adhésines gp37 et gp38 qui contrôlent la spécificité du phage. Dans la littérature, il est possible de trouver des articles traitant des mutations apportées à la protéine gp37 permettant au phage T4 d'attaquer d'autres micro-organismes qu'*Escherichia coli* comme *Yersinia Pseudotuberculosis* [46]. De telles prouesses démontrent la grande capacité d'adaptation du bactériophage.

2.3.6 Le développement du bactériophage T4

La pénétration de la charge virale dans le cytosol ne garantit pas le succès de l'infection. Le code doit être interprété par la cellule hôte et les protéines virales doivent être produites. Pour réussir, la stratégie de conquête du bactériophage T4 se base sur une course à la ressource. Le bactériophage détourne les éléments produisant les protéines à son profit, détruit le code génétique de l'hôte, puis se reproduit. Ces étapes sont contrôlées par trois différents types de promoteurs présents dans le bactériophage : les promoteurs précoces, les promoteurs médians et les promoteurs tardifs. Il est possible de suivre le texte ci-dessous en s'aidant du tableau 2.1 qui résume les étapes.

L'ADN du bactériophage contient des promoteurs beaucoup plus performants que la cellule cible. L'ARN polymérase de la bactérie s'y fixe donc de manière préférentielle et amorce la traduction du code. Cette étape mène à la production d'enzyme digérant l'ADN de l'hôte, avec des éléments permettant la transcription de l'ADN viral et d'autres éléments permettant la fabrication d'une base virale [47]. Après cette étape, la mort de la cellule est inévitable.

Au cours de l'infection, des changements dans l'ARN polymérase de la bactérie sont effectués. Les produits génétiques MotA et AsiA permettent l'attachement de l'ARN polymérase aux promoteurs médians [47,48]. Lors de cette étape, le matériel manquant pour la réplication est produit en plus de certains éléments nécessaires à la fabrication des protéines de la capsid.

Près de trois minutes après l'infection, les protéines gp55 et gp33 interagissent avec l'ARN polymérase afin de favoriser les promoteurs tardifs et démarrer la dernière étape. Les protéines gp44, gp55 et gp 62 permettent l'attachement du réplisome³ sur des fragments d'ARN et initient ainsi la réplication de la charge virale [47]. C'est aussi lors de cette étape que les éléments composant la capsid sont produits.

³ Le réplisome est un complexe d'enzymes permettant la réplication du code ADN d'un organisme.

Tableau 2.1
Étapes de la transcription lors de l'infection d'*E. coli* par T4

ÉTAPES	PRÉCOCES	MÉDIANES	TARDIVES
Déclencheurs	Affinité élevée des promoteurs viraux avec les polymérases	Mutation dans les polymérases et gp mota et asia	gp 55 et gp33
Effet des produits génétiques	<ul style="list-style-type: none"> - Mutation du code de polymérase - Destruction de l'ADN bactérien - Production d'éléments de transcription 	<ul style="list-style-type: none"> - Production d'éléments de transcription - Production d'éléments de la capsid 	<ul style="list-style-type: none"> - gp44, gp55 et gp62 causent l'attachement du réplisome - Réplication du code virale - Production d'éléments de la capsid - Encapsulation

Quelques-uns de ces nouveaux bactériophages possèdent des différences qui sont dues à la recombinaison génétique. Ce phénomène est essentiel puisqu'il permet une diversification de la population de phages et aide ainsi à l'adaptation de ces derniers [39]. Vingt minutes après l'infection, le bactériophage provoque la lyse de la bactérie qui libère près de 200 nouveaux bactériophages.

2.3.7 Intérêts pratiques des bactériophages

Les bactériophages possèdent plusieurs avantages par rapport aux autres agents bioactifs pouvant être utilisés pour la fabrication de papiers d'emballage bioactifs :

- Les bactériophages se reproduisent dans les bactéries par eux-mêmes; ce qui en rend la production aisée et peu coûteuse.
- Ils sont spécifiques : ils ciblent donc seulement les bactéries désirées. Ce qui peut être utile pour protéger les produits fermentés comme les fromages et les yogourts.

- L'aliment contaminé devient son propre générateur de bactériophages, car les bactéries présentes permettent de produire de nouvelles particules virales qui se propagent dans l'aliment.

Pour être manipulés facilement, les bactériophages ont besoin d'un support. Le papier se présente comme un substrat idéal, de par un faible coût, une versatilité reconnue et un caractère biodégradable. Pour appliquer les bactériophages sur la surface d'un papier, il est nécessaire de connaître les différentes technologies papetières. Celles-ci sont sommairement présentées au chapitre suivant.

2.4 La fabrication du papier

Dans cette section, nous nous intéressons tout d'abord aux fibres de bois, le matériau de base utilisé dans la formation du papier et les technologies de conversion de celui-ci.

2.4.1 Les fibres de bois

Les types de fibres provenant de l'exploitation des forêts sont distingués en deux catégories. Il y a des fibres provenant des bois de feuillus (angiospermes) comme l'érable, le chêne et le bouleau et les fibres provenant des bois de résineux (gymnospermes) comme l'épinette, le pin et le sapin. Cette séparation est fonction de propriétés spécifiques de chaque catégorie de fibre. Les fibres provenant des bois de résineux sont habituellement plus longues et plus épaisses comparativement aux fibres provenant des bois de feuillus [49]. Au Québec, les industries papetières utilisent principalement les bois provenant d'arbres résineux.

La fibre de bois correspond histologiquement aux trachéides de l'arbre, elle est principalement composée de polysaccharides comme la cellulose, des hémicelluloses et la lignine. La cellulose est un polymère linéaire dont le monomère est la cellobiose. La cellobiose est formée de deux molécules de glucose liées en configuration bêta 1,4 [50].

L'importante présence de la cellulose dans les plantes en fait le polymère organique le plus répandu sur la terre. L'hémicellulose se compose, quant à elle, d'une matrice de plusieurs saccharides ramifiés et la lignine de plusieurs molécules principalement aromatiques, dont la composition exacte n'a pas encore été complètement déterminée, même si on en connaît plusieurs configurations chimiques. La fibre en elle-même possède une charge négative en surface; ce point est important, car le phage T4 possède aussi une charge négative dans la partie caudale.

2.4.2 La formation du papier

Dans une machine à papier standard, il existe trois sections : la partie humide, la section des presses et la sécherie. Dans la section humide, la suspension fibreuse (de la pâte très diluée, à moins de 1 % de concentration) est d'abord projetée sur la toile au niveau d'une caisse de tête (ou caisse d'arrivée). La caisse de tête a pour objectif de défloculer et de répartir la suspension fibreuse (pâte) sur la toile. La toile de machine est une bande sans fin qui permet d'égoutter l'eau de la suspension fibreuse. Les premières parties de la table plate sont des « racles », situées sous la toile, qui permettent d'égoutter un maximum d'eau par dépression. Par la suite, des caisses aspirantes, situées elles-aussi sous la toile, poursuivent le travail d'extraction d'eau. Dans cette partie de la machine, les fibres se superposent et se lient entre elles grâce à différentes réactions physiques; ce phénomène est relié aux liaisons hydrogène (« hydrogen bonding ») [49].

Ensuite, la toile passe dans la section des presses qui contient une série de rouleaux qui vont continuer d'essorer le papier. Les rouleaux peuvent posséder différentes conformations (presse simple, double presse, presse dite « Jumbo », presse à large contact dite presse à « sabot », etc.). En fonction de la pression exercée sur le papier dans la section des presses, il n'est plus possible d'essorer économiquement davantage la feuille, le papier entre dans la sécherie où il est séché à grande vitesse par passages répétés sur des cylindres sécheurs, à haute température. Les sécheries peuvent atteindre près de 170 °C pour fonctionner de manière optimale.

Une fois toutes ces étapes franchies, le papier est enroulé sous forme de bobines (dites « bobines mères »). Le papier demeure chaud une certaine période de temps après sa sortie de sécherie. Dans une étape subséquente, hors machine à papier, des bobineuses vont convertir la bobine mère en rouleaux de papier de divers diamètres et de tension d'enroulement contrôlée. Par exemple, le « Center Wind » permet d'enrouler le papier de manière à ce qu'il soit moins serré sur lui-même.

2.4.3 La conversion du papier

Une fois le papier fabriqué, il est possible de lui rajouter des fonctions grâce à des procédés de conversion. Le couchage est un de ces procédés. Il permet l'ajout d'un enduit, appelé sauce de couchage, sur le papier. L'enduit contient des éléments permettant d'améliorer certains aspects clefs du papier comme d'en améliorer le lissé (inverse de la rugosité) et lui donner un aspect uniforme [51]. La sauce de couchage contient normalement diverses charges minérales, et souvent un haut taux de solides possible pour économiser les coûts de séchage subséquents [51].

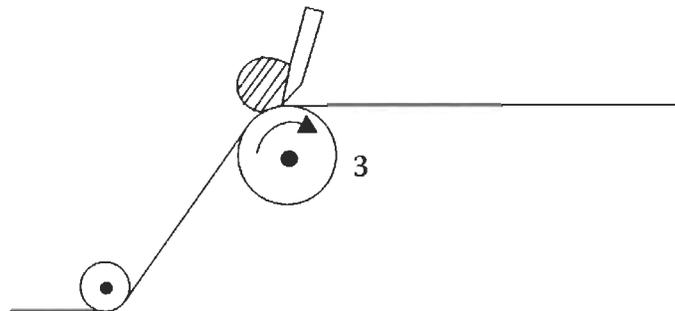


Figure 2.6 Couchage à lame.

Le couchage à lame 9 (Figure 2.6) est un procédé dans lequel la sauce de couchage est étendue par une lame métallique s'appuyant sur le papier. Le procédé permet de déposer une mince couche de sauce sur le papier. La dose exacte qui y est déposée dépend énormément du papier, de la sauce utilisée et des conditions d'opération de la coucheuse. La pression sur la lame, un des éléments de contrôle de l'épaisseur de la sauce de couchage, occasionne de plus un phénomène de cisaillement qui pourrait nuire,

voire détruire les éléments bioactifs [52]. Finalement, pour une opération adéquate de la coucheuse, une certaine formulation *ad hoc* (souvent confidentielle) est nécessaire pour assurer une viscosité moyenne.

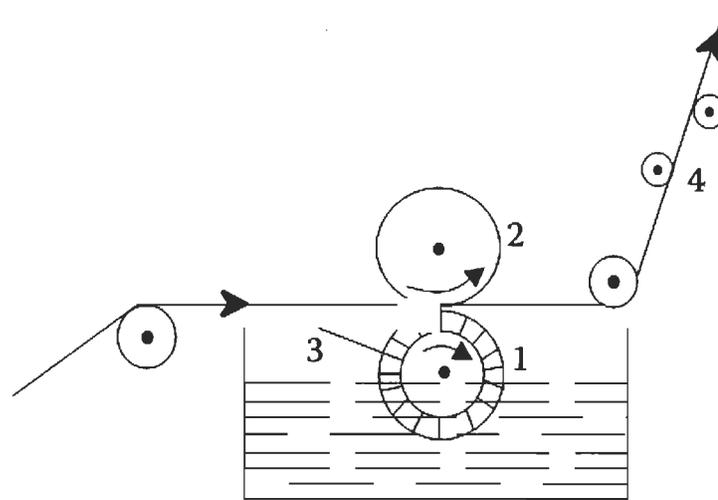


Figure 2.7 Couchage par rotogravure.

Le couchage par rotogravure (Figure 2.7) permet de déposer la sauce de couchage sur le papier grâce à un rouleau gravé de cellules. Cette méthode provoque moins de contraintes de cisaillement.

Enfin, le couchage par pulvérisation est une méthode peu utilisée dans l'industrie papetière. Elle consiste à pulvériser à l'aide d'une buse un produit sur le papier. La quantité de produits déposés sur le papier est contrôlée à l'aide de la fréquence de pulvérisation et du type de buse utilisé. Cette méthode comporte l'avantage de pouvoir fonctionner avec des produits qui ont une viscosité faible.

Ces différentes technologies peuvent être utilisées pour l'application de bactériophages. Les premiers travaux effectués sur la conception des papiers bioactifs dans le cadre de SENTINEL sont présentés à la section suivante.

2.5 Les papiers bioactifs

Lors des chapitres précédents, nous avons présenté les approches qui ont menées à la sélection des bactériophages sur des supports papetiers pour créer des emballages bioactifs. Il est cependant nécessaire d'utiliser les meilleures méthodes pour créer une union performante, une symbiose « papier-phages ». Différentes méthodologies ont été développées dans la littérature. Ces idées sont décrites à l'aide de trois sections : la première concerne uniquement la fixation, la seconde l'efficacité des papiers une fois formés et la dernière partie se concentre sur les travaux menés par notre équipe à l'UQTR.

2.5.1 La fixation des agents sur les papiers

Les éléments bioactifs doivent être intégrés au papier et demeurer actifs durant la période d'utilisation. Le professeur Robert Pelton, directeur scientifique du réseau SENTINEL, a séparé les méthodes de fixation en quatre grandes catégories : les molécules porteuses, les applications biochimiques, l'adsorption physique et les liaisons chimiques [44,53].

Les molécules porteuses sont des macromolécules qui forment un pont entre les agents bioactifs et la cellulose. Un des meilleurs exemples est l'utilisation de microgel pour fixer des molécules d'ADN sur le papier [44,54,55]. Cette technique est illustrée à la figure 2.8. Les molécules porteuses permettent un contrôle accru sur la manière dont l'élément est relâché. Elle permet aussi d'attacher solidement des éléments qui ont peu d'affinité avec la cellulose (ADN, ARN, anticorps...). Elles ont cependant le désavantage de complexifier les procédés de fabrication.

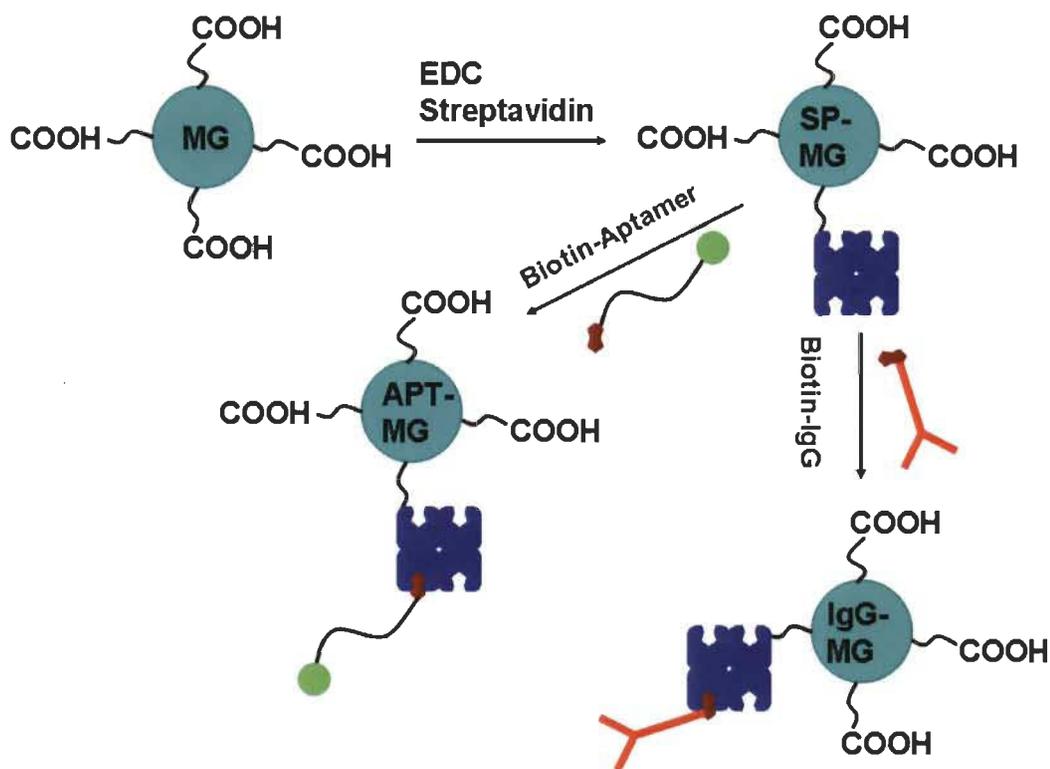


Figure 2.8 Couplage d'anticorps ou d'aptamère d'ADN sur du microgel carboxylé (MG : Microgel, APT : Aptamère, SP : Streptavidine, IgG : Immunoglobuline) [44].

Les méthodes biochimiques consistent à modifier l'agent bioactif pour lui adjoindre un groupement lui permettant d'adhérer à la cellulose. Une des méthodes les plus intéressantes est la modification génétique du bactériophage pour remplacer le site *hoc* sur la capside par un site de liaison à la cellulose; c'est ce qui est appelé le « Cellulose Binding Domain » (de la terminologie anglaise ou « domaine de liaison de la cellulose ») qui est illustré à la figure 2.9 [56]. Si l'adhésion est fonctionnelle, cette méthode qui reste onéreuse n'est pas encore approuvée par les autorités sanitaires.

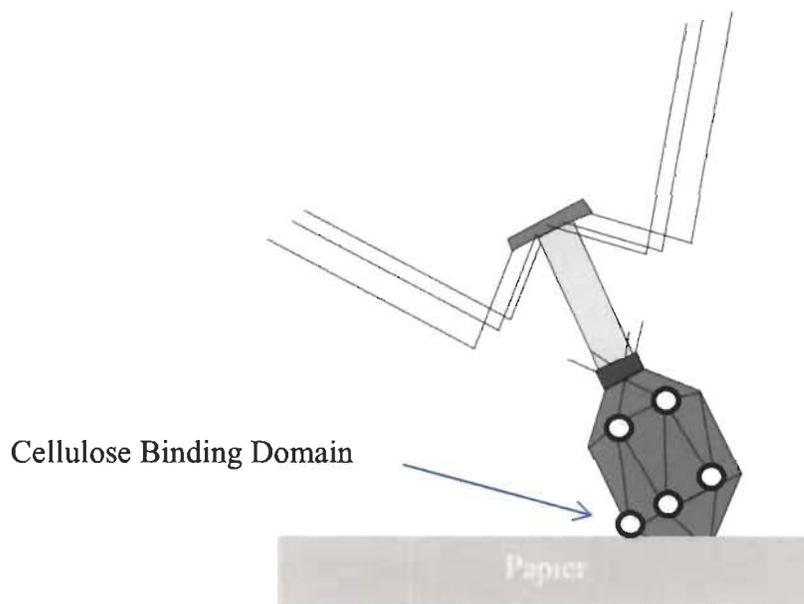


Figure 2.9 Adhésion du phage par la méthode du « Cellulose Binding Domain ».

Les méthodes chimiques impliquent une modification de la structure chimique de la cellulose pour l'adhésion des agents bioactifs. Par exemple, il est possible de lier des aptamères d'ADN directement sur le papier en créant un site actif sur la cellulose. Pour ce faire, le NaIO_4 est utilisé pour oxyder la molécule de cellulose, la réaction est présentée dans la figure 2.10. Cette réaction possède l'avantage de fixer solidement l'élément bioactif au papier, ce qui implique une bonne rétention. Cependant, vu que la cellulose possède très peu de sites réactifs, les fixations chimiques demandent plusieurs manipulations et l'intervention de produits pouvant être toxiques.

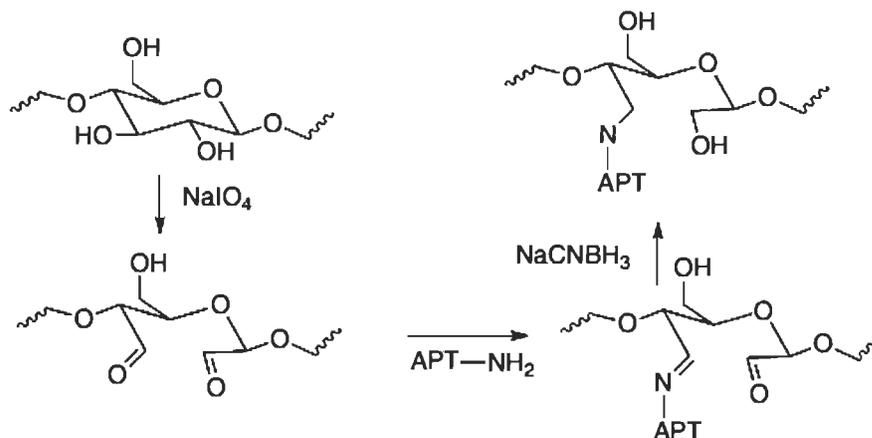


Figure 2.10 Liaison chimique entre la cellulose et un aptamère.

Les méthodes physiques correspondent à la physisorption de l'agent bioactif sur les fibres cellulosiques. Les agents bioactifs peuvent adhérer à la cellulose par une combinaison des forces de Van der Waals, électrostatiques et osmotiques. Les forces de Van der Waals sont causées par les moments dipolaires des molécules. Il s'agit d'une interaction faible comparativement aux interactions chimiques (ou à la liaison hydrogène). Les forces électrostatiques sont causées par une polarité présente dans une molécule. Les liens formés ainsi sont moins forts que les liens covalents et ils sont donc brisés facilement. Cette méthode relâche facilement l'élément bioactif dans le milieu, ce qui est un avantage dans le contrôle antibactérien, mais un inconvénient pour la détection. Elle est aussi plus simple à mettre en œuvre que les autres.

La dernière méthode présentée est la méthode retenue pour les essais à l'UQTR. Les travaux réalisés sont présentés à la section suivante.

2.5.2 États des avancements à l'UQTR

Dans le cadre du réseau SENTINEL, le groupe de recherche de l'UQTR s'est spécialisé sur la production à grande échelle de papiers bioactifs en utilisant des méthodes et des équipements de production papetière. Les premières études se sont portées sur les différents modes d'application des bactériophages, puis sur les modifications permettant d'améliorer l'activité des papiers.

Pour mesurer l'efficacité des papiers formés, une méthode spécifique a été développée par Tarik Jabrane [57]. Celle-ci est basée sur la mesure des zones de lyses que forment les papiers bioactifs sur une gélose contaminée. Cette méthode rappelle grandement les tests d'antibiogramme à la différence que le papier est lui aussi évalué, concomitamment. Un des points forts de la méthode est le rapprochement facile de la diffusion des phages dans le milieu d'agar avec leur diffusion dans la viande. Lorsque la méthode est appliquée avec rigueur, il est alors possible de faire un lien entre la taille de la zone de lyse formée par la diffusion des phages et son efficacité à tuer les bactéries présentes.

Des essais d'intégration de bactériophages ont été réalisés à l'aide de trois méthodes différentes : l'impression par rotogravure [52,57,58], le couchage à lame [57,58] et le dépôt lors de la formation du papier [59]. L'impression par rotogravure semble être efficace pour coucher les bactériophages sur le papier. La vitesse et la pression utilisées lors du transfert à un impact sur l'activité des phages. Les résultats obtenus semblent démontrer qu'une force de 400 N (pression linéaire appliquée sur 3,2 cm) couplée à une vitesse de 2 m/s donne les meilleurs résultats [58]. Le couchage à lame a lui aussi démontré son efficacité. La distance de la lame et la vitesse de couchage ont influencé le grammage déposé et par conséquent la bioactivité finale du papier. Un grammage plus élevé provoque une plus grande zone de lyse [58]. D'autre part, le dépôt de phages lors de la formation du papier ne permet pas l'intégration optimale des phages : une perte d'agent bioactif a été observée dans les effluents.

Lors de ces différents essais, il a été remarqué qu'une certaine humidité était nécessaire pour assurer l'activité des phages. Une formulation intégrant de la gélatine a permis la conservation de l'humidité dans le papier, ce qui en a maintenu l'efficacité bioactive. D'autre part, des essais ont porté sur la modification de la charge de surface des fibres cellulosiques. Les fibres cellulosiques ont naturellement une charge négative en surface, de même que la tête du phage T4. Afin d'améliorer l'affinité entre la capsid et le papier, un polyélectrolyte cationique a été déposé sur les fibres. Cette technique a prouvé son efficacité en impression [60] et lors de la formation papetière [59].

2.5.3 Sélection des procédés en vue d'une production pilote

Il est possible d'ajouter les phages directement lors de la formation du papier. Cependant, le long passage en sécherie (combinaison négative de hautes températures et de temps de séjour) n'est pas favorable à une telle option. Par conséquent, les trois méthodes de couchages présentées dans ce document semblent être préférables pour appliquer les bactériophages sur les papiers. Cependant, la méthode de couchage à lame demande une viscosité qui n'est pas présente dans la solution de bactériophages purs (essentiellement celle de l'eau). Elle nécessite donc l'ajout d'un adjuvant permettant d'épaissir la sauce de couchage, ce qui dilue la solution et donc diminue la densité de phages en surface du papier.

La rotogravure a été sélectionnée comme première méthode de couchage à l'échelle pilote. Elle peut être utilisée avec une solution simple (phages seuls ou phages + gélatine). Cet équipement est disponible à l'échelle pilote à Innofibre (CÉGEP de Trois-Rivières). D'autre part, vu la viscosité de nos solutions de phages similaire à celle de l'eau, lors de discussions avec certains contacts industriels, nous avons aussi considéré l'utilisation de la pulvérisation. De même que la rotogravure, cette technique ne nécessite pas de formulation complexe. Cette technique peu répandue a été réalisée avec l'équipement du Centre International de Couchage (CIC) sous la direction du Dr Daniel Matte, aussi membre de l'équipe du professeur Patrice Mangin. En termes de formulation, les sauces de couchages seront constituées soit de phages seuls ou d'un mélange de phages et de gélatine.

Avant de pouvoir effectuer ces essais, les conditions d'opération des agents bioactifs restent à déterminer pour assurer leur viabilité dans les procédés.

CHAPITRE III

DÉTERMINATION DES CONDITIONS D'APPLICATION DES BACTÉRIOPHAGES

3.1 Matériels et méthodes

3.1.1 Production des bactériophages

La production des bactéries et des bactériophages est réalisée dans un bouillon tripticase soja (Trypticase Soy Broth : TSB) de la compagnie Becton, Dickinson and Company (BD). Le milieu TSB a été sélectionné pour plusieurs raisons. Premièrement, le mélange est constant, et deuxièmement, il est disponible en grande quantité, ce qui nous permet d'utiliser le même produit à l'échelle laboratoire et à l'échelle pilote. De plus, il est utilisé en clinique et est compatible avec les standards de l'industrie alimentaire [61]. Lors des expériences présentées ici, le milieu contiendra toujours une concentration de 30 g/l de TSB.

Les bactéries utilisées lors des expérimentations sont des *Escherichia coli* de souche B ATCC-11303 provenant de l'UQTR. Les bactériophages sont des T4 sauvages provenant de l'Université de Guelph. Les techniques utilisées pour faire croître et purifier les phages en laboratoire s'inspirent en grande partie des techniques utilisées par Tarik Jabrane, étudiant doctorant sur ce même projet [57, 60].

Avant chaque inoculation, le milieu est stérilisé grâce à un autoclave horizontal pendant 30 minutes à 125 °C. Cette étape permet l'élimination des organismes non désirés (spores, virus, levures...) avant la croissance des bactéries. Après la stérilisation, les bactéries sont ajoutées à un bouillon TSB de 10 ml à partir d'un frottis d'une souche congelée (protocole disponible à l'annexe B) à -80 °C. Ces petits inocula sont entreposés à 37 °C et agités pendant 14 heures. Après la période d'incubation, 20 ml des petits

inocula d'une concentration approximative de 1×10^{14} UFC/ml sont ajoutés à un volume de 2 litres de bouillon. Cette solution est incubée à 37°C sous agitation pendant 36 heures. Une solution de 20 ml de bactériophages à 1×10^9 UFP/ml est ajoutée à la solution au début ou après 4 h d'incubation.

3.1.2 Purification des bactériophages

Une fois que la croissance des bactériophages est terminée, il est nécessaire de les séparer des bactéries. Pour purifier les bactériophages, il faut d'abord centrifuger la solution. La centrifugation se fait à 2000 tours par minutes pendant 20 minutes, ce qui permet de retirer les plus grosses particules trouvées dans le milieu.

Par la suite, le surnageant doit être filtré. Pour réaliser cette étape, des unités de filtrations frontales sont utilisées, ce sont les unités jetables (Millipore Stericap Plus) et les unités réutilisables (Thermo Scientific Nalgene Reusable Filter Holders). Les unités réutilisables nécessitent plusieurs manipulations : les filtres doivent être posés manuellement et l'unité doit être stérilisée à l'autoclave. Les dispositifs jetables sont stérilisés à l'usine et ne sont utilisés qu'une seule fois. Ils ont l'avantage d'être plus performants et d'être plus faciles à utiliser. Le chargement des deux types d'unités est fait grâce à un tube stérile reliant l'unité et le milieu à filtrer. Lors des filtrations, la cuve réceptrice est mise sous vide ce qui force le milieu à travers le filtre. Deux filtrations sont faites, une à $2,0\ \mu\text{m}$ et une autre à $0,4\ \mu\text{m}$. C'est la seconde filtration qui permet réellement de retirer les bactéries du milieu.

Les filtrats obtenus à la suite de ces manipulations contiennent moins de bactéries qu'il est possible d'en détecter. Cette solution est prête à l'emploi. Il faut la conserver au froid puisque quelques bactéries peuvent avoir traversé le dernier filtre.

3.1.3 Décompte des plages de lyses

Les plages de lyses sont faites à l'aide de boîtes de Pétri contenant deux couches de gélose superposées comme présentées à la figure 3.1. La première couche, au fond, est une gélose contenant 40 g/l d'agar tripticase soja (Trypticase Soy Agar : TSA) de chez BD. La seconde couche est un milieu TSB avec un ajout de 0,7 % d'agar provenant de Fisher. La couche du dessus contient donc moins d'agar que la première. Elle est beaucoup plus facile à liquéfier ($\approx 60\text{ }^{\circ}\text{C}$). C'est dans cette couche que les bactéries et les bactériophages seront mélangés. Les bactéries entrant en contact avec la particule virale sont détruites et ne peuvent se reproduire, créant ainsi un trou dans le tapis bactérien. Ainsi, la technique des plages de lyses consiste à compter les plages que l'absence de bactérie forme sur un tapis bactérien.

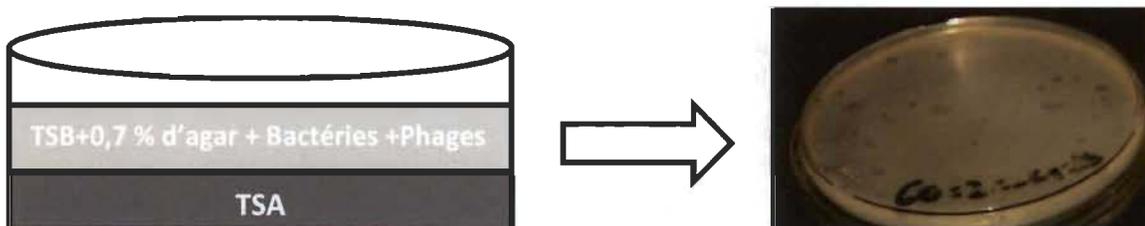


Figure 3.1 Superposition des couches dans les plages de lyses.

Pour effectuer les tests de plage de lyses, des tubes contenant 4 ml de TSB+0,7 % d'agar sont déposés dans un bain-marie à $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Lorsque le tube de gélose est liquide, il est retiré du bain-marie et lorsqu'il ne provoque plus de douleur au contact de la peau 1 ml de bactérie d'une concentration de 1×10^{14} UFC/ml est ajouté. Par la suite, 25 μl du milieu dont les phages doivent être comptés sont ajoutés au tube. Ensuite, le tube est versé et étalé délicatement sur une boîte de Pétri contenant une couche de TSA. Une fois la gélose solidifiée, les boîtes de Pétri sont incubées à la température de croissance de la bactérie ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Pour être considérées valides, les géloses doivent contenir moins de 200 plages. Il est donc nécessaire de préparer des dilutions. Les dilutions sont préparées dans des tubes d'eau contenant 0,9 % de chlorure de sodium (NaCl). Chaque tube contient un volume

de 4,5 ml. Il suffit donc d'ajouter 0,5 ml d'une solution dans un tube pour la diluer du dixième (1/10).

3.1.4 Décompte par ordinateur

Pour effectuer les décomptes des plages de lyse plus rapidement il est possible d'utiliser un logiciel de décompte cellulaire. Ce logiciel a été développé dans le cadre de ces travaux afin de fournir un outil rapide de décompte. Le logiciel permet le contrôle d'une caméra par un ordinateur. Il gère l'acquisition des images ainsi que la détection des zones de lyses. Le programme utilise la bibliothèque OpenCV pour la manipulation de l'image ainsi que l'analyse des éléments. L'algorithme permettant la détection des zones de lyses a été schématisé à la figure 3.2. Le code C++ concernant la partie du traitement de l'image est disponible en annexe C.

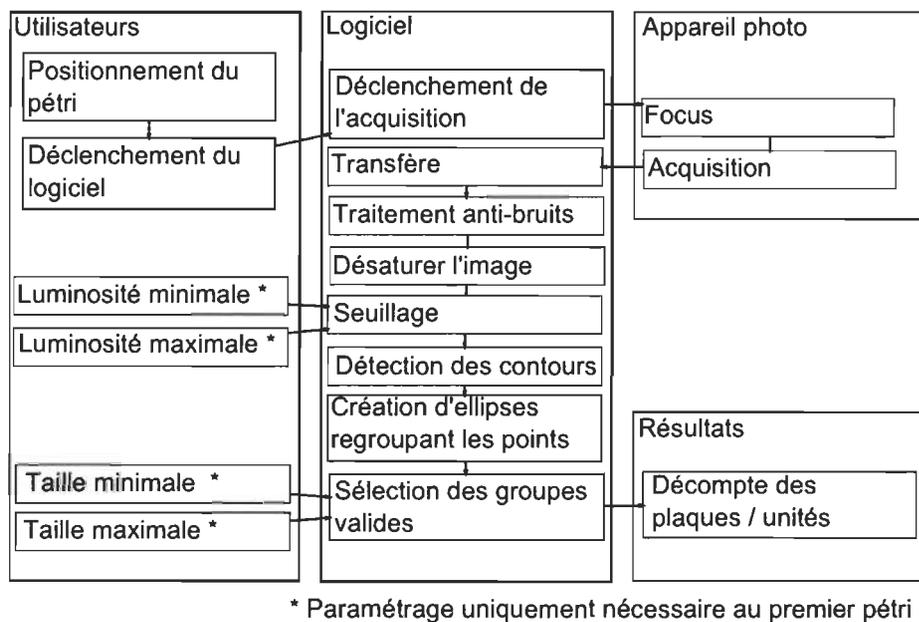


Figure 3.2 Algorithme du traitement numérique.

3.1.5 Tests des puits

Les tests des puits ont comme objectif de repérer l'activité antibactérienne d'un liquide. Ils sont produits sur des géloses TSA sur lesquelles a été déposée une couche de

TSB+0,7 % contenant des bactéries. Une fois les couches séchées, des puits y sont creusés grâce à un emporte-pièce en verre stérile. Par la suite 200 µl sont versés dans le puits. Le liquide va se diffuser dans la gélose avec le temps créant ainsi une zone de lyse dont les qualités peuvent être évaluées. Les tests préliminaires ainsi que les tests sur les sauces de couchages utilisent ce procédé.

3.1.6 Tests d'exposition aux températures élevées

Les tests d'exposition aux températures élevées ont fortement été inspirés des tests de dégradation effectuée sur les protéines [62–64]. La capsid du bactériophage T4 contient plusieurs protéines sous contrainte ce qui peut rendre le bactériophage très sensible à la température.

Les tests préliminaires ont d'abord été effectués pour donner une fourchette de températures intéressantes. Ces essais sont effectués en exposant les bactériophages aux températures de 60 °C, 65 °C, 70 °C et 75 °C. Cinq éprouvettes de 5 ml de bactériophages sont déposées dans un bain-marie dont l'eau est à la température cible. Par la suite, la qualité des zones de lyse est évaluée à l'aide de la technique des puits.

Pour effectuer des expériences quantitatives sur l'activité des phages par rapport à la température, 1 ml de bactériophage filtré est déposé dans des tubes refermables (Eppendorf). Ils sont d'abord conditionnés à la température de la pièce, puis plongés dans un bain-marie réglé à la température de 60 °C ou 70 °C. Les échantillons y demeurent pour des temps variant entre 1 et 60 minutes. Le temps de l'exposition est chronométré à partir du dépôt des échantillons dans le bain-marie.

3.1.7 Tests d'exposition aux différents pH

Les tests d'exposition au pH sont eux aussi inspirés de tests existants sur des protéines [62–64]. Ils sont basés sur le fait que les acides aminés qui composent les protéines peuvent interagir de manière différente selon le pH.

Les tests préliminaires sont réalisés en déposant les bactériophages dans des solutions d'acide chlorhydrique ajustées à des pH entre 3,5 et 6,5 puis dans des solutions d'hydroxyde de sodium entre 7,5 et 10,0. Le mélange est ensuite déposé dans des boîtes de Pétri en suivant le protocole des puits. Pour obtenir des résultats quantitatifs sur la survie des phages au pH, 0,5 ml de solution de phage est déposé dans des tubes à essai contenant 4,5 ml d'eau au pH désiré. L'hydroxyde de sodium et l'acide chlorhydrique sont utilisés pour créer les solutions aux pH désirés. Pour chaque tube, un tube permettant de neutraliser le pH a été préparé. Une série d'essais a été faite pour évaluer l'influence d'un pH de 7,0 et de 4,0 en fonction du temps. Puis une autre série a évalué l'influence du pH entre 3,5 et 9,0 pour une exposition d'une heure.

3.2 Résultats des conditions d'opérations des bactériophages

Les bactériophages représentent probablement l'option la plus pertinente pour la conception d'emballages alimentaires bioactifs. Cependant, il est nécessaire de déterminer leurs conditions d'opérations, c'est-à-dire leur résistance dans les procédés papetiers. Les deux principales contraintes retenues sont la température et le pH. De plus, l'influence des sauces de couchage sur l'activité des bactériophages est ici considérée. Les résultats des expériences menées en laboratoires sont présentés dans cette section.

3.2.1 Tolérances aux températures élevées

Le bactériophage T4 possède une charge virale composée d'ADN double brin, cependant, il est connu que l'ADN se dénature à 74 °C. Dans les procédés papetiers, les températures atteintes par les sècheries peuvent dépasser les 120 °C, mais pour des temps relativement courts. Des températures élevées peuvent aussi être atteintes lors de la préparation des sauces de couchage. Par exemple, lors de la préparation de l'amidon, la solution doit être chauffée à 70 °C pendant une demi-heure. Le but des expériences est donc d'étudier l'influence des facteurs températures/temps sur l'efficacité des phages.

Pour encadrer les expériences, des tests préliminaires ont été menés. La méthode des puits a été utilisée à 60 °C et 70 °C. Une illustration des puits est présentée sur la figure 3.3, puis les résultats d'activité biologique sont synthétisés au tableau 3.1.



Figure 3.3 Activité antibactérienne des phages T4 après un traitement thermique à 60 °C.

Tableau 3.1

Activité antibactérienne des phages T4 après incubation à 60 °C et 70 °C

TEMPS D'INCUBATION (MIN)	ACTIVITÉ À 60 °C	ACTIVITÉ À 70 °C
1	++	++
2	++	++
4	++	++
8	++	+
12	++	+
16	++	-
18	++	-
24	++	-
32	++	-
40	++	-
44	++	-
46	++	-
50	++	-
54	++	-
56	++	-
58	++	-

++ Activité antibactérienne forte + Activité antibactérienne moyenne - Absence d'activité

Ces essais montrent qu'à 60 °C les phages restent actifs pendant au moins une heure. À 70 °C, la dégradation est beaucoup plus rapide et aucune activité n'est détectée au-delà de 16 minutes.

Afin de quantifier ces résultats, des mesures précises de la concentration des phages ont été effectuées. L'expérience s'est faite à l'aide de près de 300 géloses, car chaque point était traité en duplicata et les dilutions nécessaires pour établir une courbe juste étaient *a priori* inconnues. La figure 3.4 présente les résultats obtenus grâce aux expérimentations.

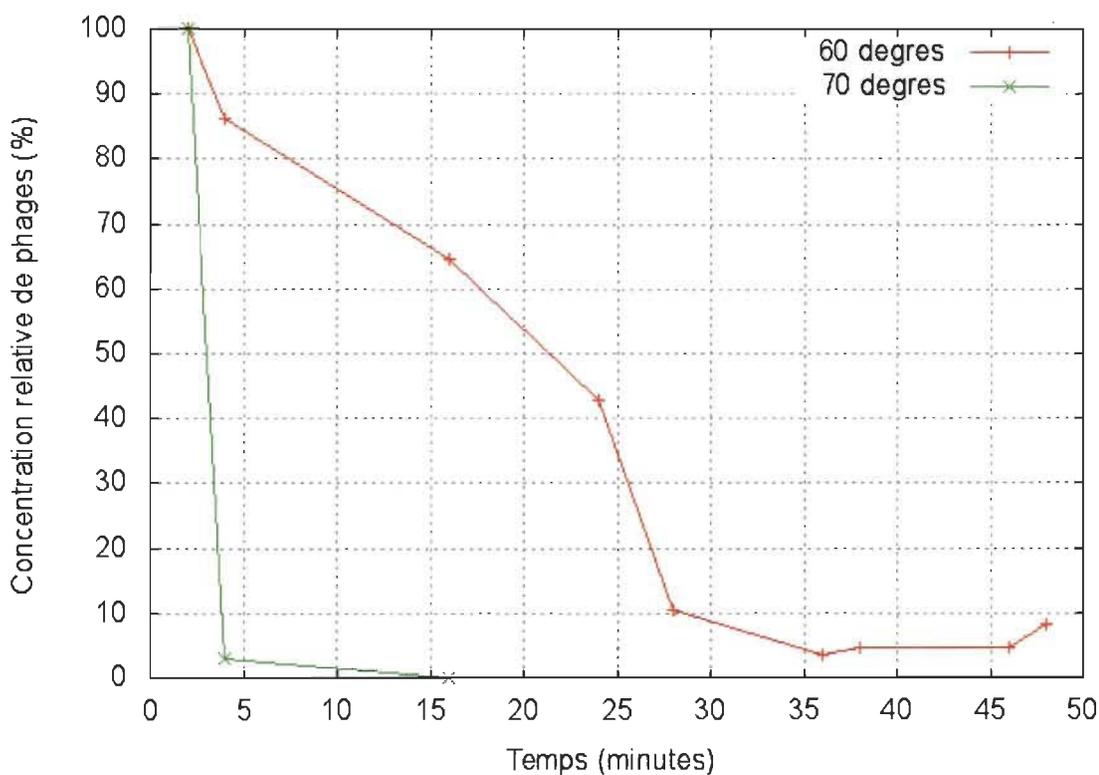


Figure 3.4 Activité relative des phages par rapport au temps d'exposition à une température de 60 °C.

Les courbes affichées sur la figure 3.4 représentent la concentration de phages actifs relativement à la concentration de départ de l'expérience. La concentration de départ était de 2×10^{10} UFP/ml. À la température de 60 °C, la quantité de phages actifs baisse de manière constante jusqu'à atteindre 10 % au bout de 28 minutes. Un plateau se

forme après 35 minutes à 4 % de la quantité de phages initiale. Pour les essais effectués à 70 °C, la quantité de phages actifs diminue drastiquement en seulement 4 minutes. Elle devient non mesurable au bout de 15 minutes. L'expérience préliminaire et l'expérience quantitative ont des résultats concordants qui montrent la sensibilité des phages en fonction de la température et du temps.

3.2.2 Tolérance des bactériophages aux conditions de pH

Plusieurs expériences ont été faites pour évaluer la tolérance des bactériophages aux conditions de pH. La première expérience a comme objectif d'étudier l'influence de différents pH dans le temps sur l'activité des phages. Deux séries ont été réalisées : une à pH 4,0 et l'autre à pH 7,0 pour une durée maximale de 20 minutes. Les résultats sont présentés à la figure 3.5.

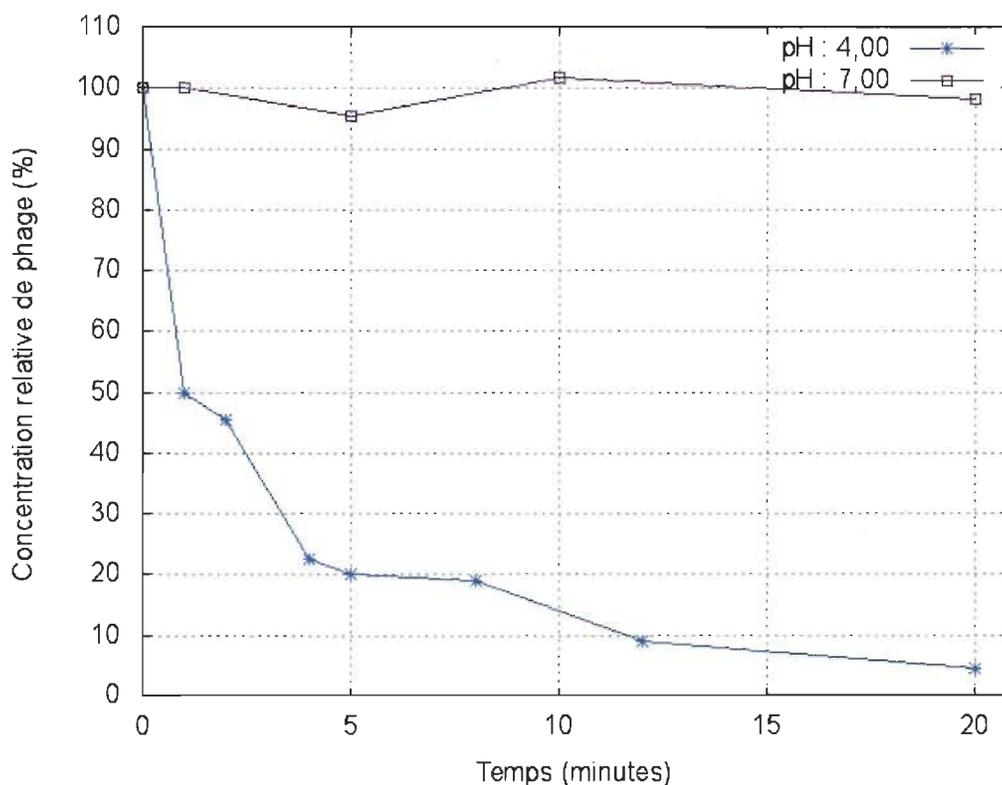


Figure 3.5 Influence du pH en fonction du temps.

D'après cette figure, à pH 7,0 la concentration des bactériophages reste stable durant 20 minutes. À pH 4,0 la concentration de bactériophage chute durant les 10 premières minutes puis se stabilise autour de 5 %.

La deuxième partie d'expérimentation porte sur l'activité des phages en fonction du pH. La technique utilisée pour compter les phages (plage de lyse) est sensible au pH, par conséquent deux méthodologies ont été utilisées. La première utilise des solutions tampons au pH désiré qui ne sont pas neutralisées avant d'être mises en contact avec les bactéries. La seconde méthode utilise une base et un acide fort; ce qui permet de réaliser des solutions à différents pH et de les neutraliser avant qu'elles ne soient mises en contact avec les bactéries.

Tableau 3.2

Paramètres des expériences sur la tolérance au pH

	TAMPON	NEUTRALISÉ
Intervalles pH	4,5 – 8,0	5,0 – 9,0
Neutralisation	Non	Oui
Solution tampon	Oui	Non

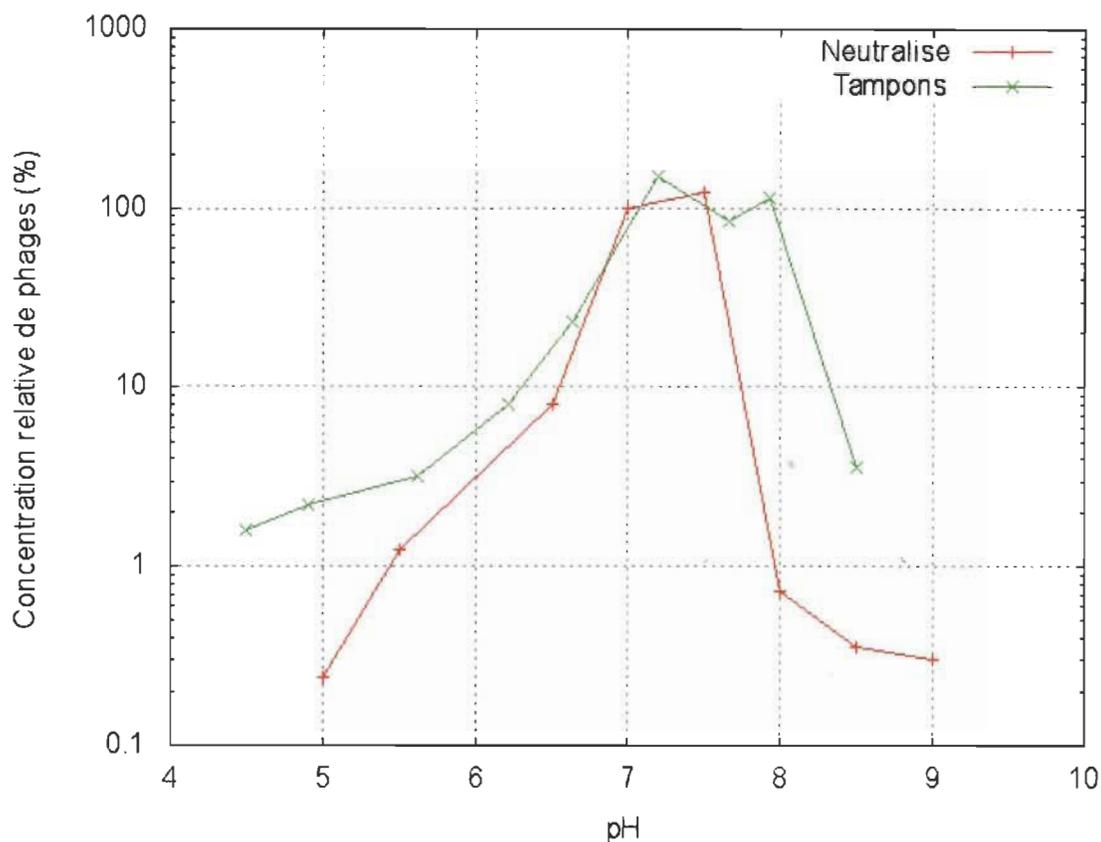


Figure 3.6 Concentration relative des phages en fonction du pH.

La figure 3.6 présente les résultats de ceux-ci. La concentration relative de bactériophages évolue de manière similaire dans les deux expériences. Entre un pH de 7,0 et de 7,5, les deux courbes montrent un plateau situé près des 100 %. Entre le pH de 4,0 et 7,0, la concentration de bactériophages actifs diminue de manière significative pour les deux expériences. Une différence est constatée au-dessus du pH 7,5 : les expériences avec neutralisation montrent une chute importante dans la concentration des bactériophages, tandis que sans neutralisation le plateau est prolongé jusqu'à pH 8,0.

3.2.3 L'influence des sauces de couchage sur la bioactivité

Les sauces utilisées lors du couchage des papiers peuvent contenir différents additifs (modifiants rhéologiques). Les composants seuls ont été testés pour observer leur effet sur la croissance des bactéries. Par la suite, l'activité biologique des phages a

été testée dans des mélanges phages et composants. Le tableau 3.3 résume les résultats des tests de bioactivité des produits menés à l'aide de la technique des puits.

Tableau 3.3
Solution de couchages

SOLUTION	BIOACTIVITÉ
Amidon seul	Non
CMC seul	Non
Sterocoll FS ⁴ seul	Non
CMC et phage T4	Oui
Amidon et phage T4	Oui
Sterocoll FS et phage T4	Oui

L'amidon seul, la CMC (carboxy-méthyl-cellulose) et le Sterocoll seul ne provoquent pas de zone de lyse. L'ajout du bactériophage provoque une zone de lyse dans toutes les sauces de couchage. Les composants testés n'interfèrent donc ni avec les bactéries ni avec les bactériophages.

3.3 Discussion

3.3.1 Les conditions d'opérations en température

Les conditions de production des papiers restreignent l'utilisation des bactériophages. En effet, les données indiquent que les bactériophages sont sensibles à des températures supérieures à 60 °C. À cette température, il y a une perte de près de 96 % de la population de bactériophages après 30 minutes. Cependant, ils ne sont pas tous détruits après une heure. Une faible proportion ($\approx 4\%$) des phages semble donc résister à cette température. À 70 °C après 4 minutes, la population a diminué de 98 %. Après 16 minutes, la totalité des phages semble inactive. Ces résultats sont similaires aux résultats obtenus par d'autres travaux sur le bactériophage T4 [65].

⁴ Le Sterocoll FS est un épaississant commercial de BASF composé d'un copolymère d'éthyl-acrylate et d'acide carboxylique.

Les trois étapes clefs de l'intégration des bactériophages dans les procédés papetiers sont la formulation de la sauce de couchage, le passage dans la sécherie et l'enroulement (bobinage). Pour la formulation de la sauce, certains additifs tels que l'amidon, la CMC ou la gélatine doivent être préparés à chaud. Les bactériophages devront donc être ajoutés au mélange en fin de préparation en s'assurant que celui-ci est en dessous de 60 °C. Le passage en sécherie est l'étape critique. Lors de cette étape, les bactériophages nouvellement couchés sont exposés à des températures supérieures à 120 °C, mais pendant un court laps de temps. Ces conditions ne sont pas celles testées dans ces expériences, mais les travaux de Tarik Jabrane *et al.* [52,57] ont démontré que les papiers bioactifs soumis à une étape de séchage courte demeurent actifs. En fin de production, le papier enroulé conserve une partie de la chaleur acquise en sécherie. Les rouleaux refroidissent lentement, pendant plusieurs heures. D'après nos expériences, si les rouleaux conservent une température de 60 °C pendant plus de 30 minutes une proportion importante de bactériophages sera inactivée. Il est donc important dans la production de papiers bioactifs de limiter l'usage de la sécherie, mais aussi de contrôler la température du rouleau produit. Pour ce faire, un système de refroidissement serait à envisager.

3.3.2 Les conditions d'opération en pH

La production papetière peut inclure des environnements acides ou alcalins. Les résultats des essais développés dans ce projet de maîtrise indiquent que les bactériophages sont très sensibles aux pH. À pH neutre la population de bactériophages actifs reste stable dans le temps. À un pH 4,0, 50 % des bactériophages sont inactivés en une minute et 96 % sont inactivés au bout de 20 minutes. D'autre part, pour un temps fixe, les bactériophages sont stables entre le pH de 7,0 et de 7,5. Au moins 90 % de la population est inactivée en une heure à l'extérieur de cet intervalle de pH.

Les deux méthodologies employées pour déterminer la gamme de pH ont donné des résultats similaires. Seules les valeurs à pH 8,0 sont discordantes (100 % pour la méthode tampon et 0,8 % pour la méthode neutralisée). La concentration des phages

actifs évolue de manière drastique en dehors du plateau, une simple différence d'un demi-point de pH pourrait avoir entraîné cette différence. La conservation d'un pH neutre sera donc essentielle lors de la préparation des sauces de couchage.

3.4 Conclusions sur les conditions opératoires d'application des phages

Les objectifs des essais laboratoires étaient de déterminer les conditions d'opération pour utiliser pleinement le potentiel des bactériophages. Premièrement, nous avons trouvé qu'il est important de contrôler la température et le temps d'exposition afin de restreindre l'énergie transférée aux bactériophages qui semble, selon les travaux antérieurs du groupe, être le facteur prédéterminant de la survie des bactériophages. Deuxièmement, nous avons vu qu'il est aussi important de limiter le temps d'exposition à des pH non neutres. Par conséquent, le temps de contact bactériophage-milieu devient un facteur important lorsque les conditions des milieux se situent à l'extérieur des zones optimales, c'est-à-dire de moins de 60 °C et/ou d'un pH compris entre 7,0 et 7,5. Enfin, nous avons trouvé que les additifs de couchage n'influencent pas significativement l'activité biologique des bactériophages.

Certaines opérations papetières sont nécessairement à l'extérieur du cadre idéal pour les bactériophages. Les résultats indiquent qu'en contrôlant le temps, en dehors de ce cadre idéal, il est possible de limiter les pertes d'activité et donc de conserver l'efficacité d'un papier bioactif. Toutes ces conclusions ont servi de base pour la mise en pratique industrielle lors des expériences à l'échelle pilote.

CHAPITRE IV

PROCÉDÉS DE FABRICATION DES PAPIERS BIOACTIFS À L'ÉCHELLE PILOTE

4.1 Matériel et méthodes

Pour préparer l'ensemble des produits nécessaires à la réaction, les étapes d'un plan d'expérience ont été planifiées et suivies de manière rigoureuse. La production de papiers bioactifs à base de phages a été déterminée par la séquence suivante, dans l'ordre : production à petite échelle de bactéries et de bactériophages, production à grande échelle des bactériophages, purification et finalement couchage. Entre chaque grande étape des contrôles nous ont permis de vérifier et de connaître la qualité des produits (contamination et concentration) et de les qualifier ainsi pour l'étape suivante. Ces étapes ainsi que les méthodes particulières aux essais à grande échelle sont décrites dans ce chapitre. La figure 4.1 permet de suivre visuellement les étapes nécessaires à la production d'un papier bioactif à l'échelle pilote.

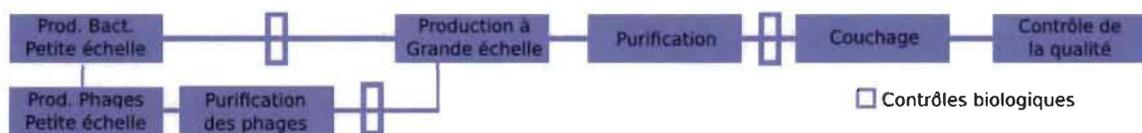


Figure 4.1 Étapes de la production pilote.

4.1.1 Courbe de croissance d'*Escherichia coli B*

Afin de suivre la croissance d'*Escherichia coli B* lors des essais en bioréacteur une courbe de croissance a été réalisée. Deux Erlenmeyers contenant 1,8 litre de solution TSB ont été inoculés à l'aide de 200 ml de bactéries d'une concentration de 1×10^{14} UFC/ml. Toutes les heures une partie aliquote est prélevée pour en mesurer l'absorbance de 540 à 750 nm et mesurer la concentration bactérienne [66]. Pour créer

une courbe fiable, la longueur d'onde de 650 nm a été sélectionnée, car elle apparaît comme étant la plus sensible aux variations de la population bactérienne. La concentration des bactéries a été déterminée par microscopie à l'aide d'une chambre de Petroff-Hausser. Le décompte a été à la fois manuel et automatisé avec la méthode optique/semi-automatique décrite à la section 3.1.4.

4.1.2 Préparation des inocula bactériens et viraux

En suivant les protocoles décrits à la section 3.1.1, les procédés débutent avec la production d'un litre de bactérie *Escherichia coli* B. Cette première production permet de faire croître 4 litres de bactéries et 4 litres de bactériophages qui servent d'inocula lors de la production à grande échelle. Pour garantir des résultats optimaux, toutes les fermentations sont réalisées à l'aide d'un inoculum représentant 10 % du volume à fermenter à une concentration de 1×10^8 UFC/ml.

L'étape qui suit est la purification des bactériophages afin d'éliminer les bactéries. La purification est faite à l'aide des mêmes techniques que celles utilisées lors des expériences en laboratoire, c'est-à-dire une centrifugation suivie par des microfiltrations à l'aide de dispositifs frontaux. Avant la production à grande échelle les solutions de bactéries sont étalées sur Pétri et les colonies sont observées sous microscope avec la coloration de Gram afin de détecter toutes contaminations potentielles. La concentration des solutions de bactériophages est aussi évaluée à l'aide de la technique des plages de lyses.

4.1.3 Préparation des expériences en bioréacteurs

La croissance pilote a été réalisée dans un bioréacteur Infors-HT de Techfors de 150 litres au parc micro-sciences d'Innovation et de Développement Économique (IDE) de Trois-Rivières. Le bioréacteur est équipé de sondes reliées à un ordinateur permettant de recueillir plusieurs paramètres en continu lors de la réaction (pression d'O₂, température, pH, présence de mousse).

Pour préparer la réaction, 2,7 kg de milieu TSB est pesé puis mélangé avec 90 litres d'eau, directement dans le réacteur. Par la suite, le bioréacteur est stérilisé à la vapeur pendant 2 heures à 121,5° et 15 psig. Pour contrôler le pH, deux solutions de 2 litres à 4 N de NaOH et de H₂SO₄ ont été préparées. Les tubes et les contenants de NaOH, de H₂SO₄ et d'anti-mousse sont stérilisés à l'autoclave puis attachés au bioréacteur. Chaque tube passe dans sa propre pompe contrôlée par ordinateur, ce qui permet de connaître le volume de solution injectée. Pour les fermentations, la température est maintenue à 37,0 ± 0,1 °C et le pH est contrôlé à 7,0 ± 0,1.

L'inoculum bactérien préparé dans l'étape précédente est versé par le sommet du bioréacteur à l'aide d'un entonnoir stérile. Cette étape est faite sous la flamme d'un chalumeau lorsque l'entrée d'air du bioréacteur est activée. Ces éléments permettent de réduire les risques de contamination venant de l'extérieur.

Lors de la croissance, des aliquotes sont prélevés toutes les quatre heures. La valve de prélèvement est stérilisée grâce à un système automatisé pendant cinq minutes puis nettoyée à l'éthanol avant le prélèvement. Un test d'absorbance à 650 nm est fait sur une partie de l'aliquote prélevée ainsi que des tests de coloration de Gram. Les tests d'absorbances permettent de suivre la concentration bactérienne grâce aux données recueillies lors de l'évaluation de la courbe de croissance effectuée en laboratoire. Une partie de l'aliquote est congelée pour un référencement ultérieur.

Deux réactions ont été faites. Les paramètres initiaux de la première réaction sont présentés dans le tableau 4.1. L'inoculum bactérien est de 4 litres ainsi que l'inoculum viral. Les deux inocula sont versés au départ de la réaction. Pour le premier essai du bioréacteur, le MOI est de 1; ce qui signifie que près de 60 % des bactéries de la première génération sont attaquées par au moins un phage.

Tableau 4.1

Paramètres initiaux de la première fermentation

PARAMÈTRE	VALEUR
Oxygénation	100 %
Agitation	200 trs/min
Anti-Mousse	PPG
M.O.I.	1,0 à 0 h

Pour la seconde réaction, les paramètres initiaux sont présentés dans le tableau 4.2. L'inoculum bactérien a été versé au début de la réaction. Un volume de 3 litres de bactériophages a été versé 4 heures après l'inoculum bactérien. Le MOI lorsque les bactériophages sont ajoutés est près de 0,5; ce qui signifie que lors de la première génération, 35 % des bactéries entrent en contact avec au moins une particule virale.

Tableau 4.2

Paramètres initiaux de la seconde fermentation

PARAMÈTRE	VALEUR
Oxygénation	30 %
Agitation	200 trs/min
Anti-Mousse	AFE-1520
M.O.I.	0,5 à 4 h

4.1.4 Filtration tangentielle des bactériophages

Après la réaction en bioréacteur, le milieu doit être filtré. La filtration tangentielle semble la solution la plus appropriée par rapport au volume à traiter. Ce type de filtration permet de séparer les bactériophages de manière continue. Cette méthode de filtration possède aussi l'avantage de provoquer moins de colmatage que la filtration frontale. La figure 4.2 montre le principe du procédé sous forme schématique. Les losanges représentent les particules de taille supérieure et les triangles les particules de taille inférieure à la porosité des membranes.

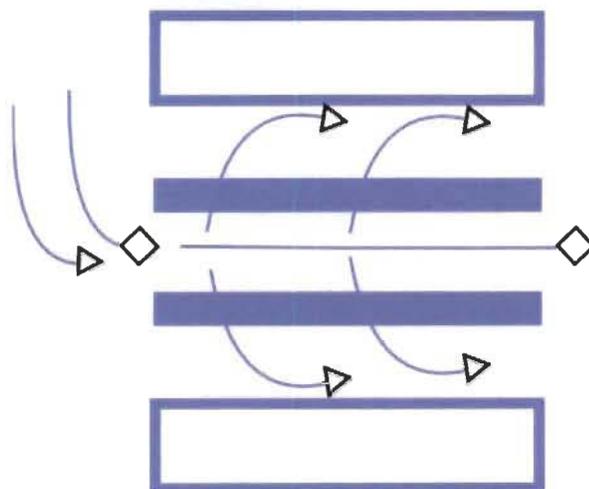


Figure 4.2 Principe de la filtration tangentielle.

Les machines permettant un type de filtration tangentielle peuvent être directement branchées sur le bioréacteur qui agit alors comme réservoir. Cette configuration réduit aussi les chances de contamination de la solution de bactériophages. Lors de la première fermentation, la filtration s'est déroulée à l'IDE et la seconde au Centre National en Électrochimie et en Technologies Environnementales (CNETE) qui possède des systèmes adaptés (et adaptables à nos conditions) et l'expertise de filtration tangentielle. Dans les deux centres, la technique utilisée est la microfiltration. Les filtres employés sont des tubes de céramique ayant des pores de $2,0 \mu\text{m}$ lors de la phase de préfiltration et des pores de $0,2 \mu\text{m}$ lors de l'étape de filtration.

4.1.5 Méthodes de couchages

Une fois les bactériophages purifiés, ils sont prêts à être couchés sur le papier support. Pour ce faire, deux méthodes de couchage ont été employées sur deux machines pilotes différentes. La figure 4.3 résume le parcours suivi par le papier dans les deux machines. Le papier support est placé au poste de départ (dérouleuse) puis il passe sur des rouleaux le dirigeant vers le dispositif ou station de couchage.

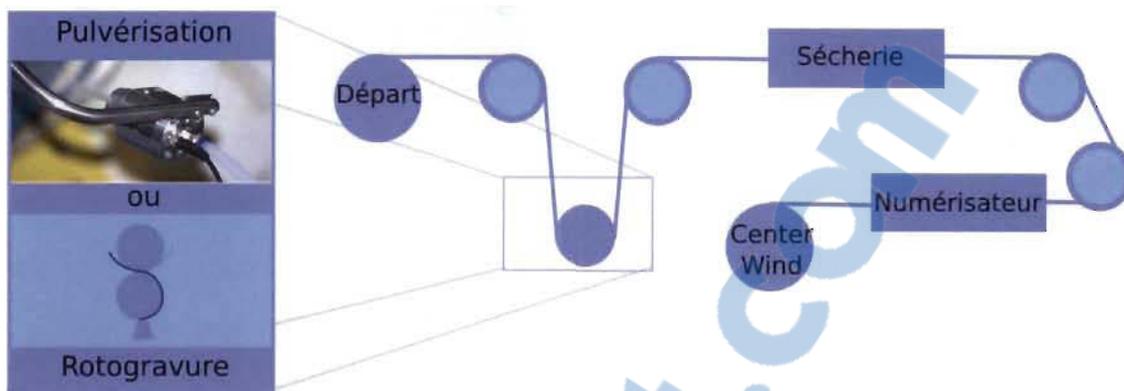


Figure 4.3 Schéma simplifié des méthodes de couchage utilisées dans la fabrication de papiers bioactifs.

Pour effectuer le couchage par pulvérisation, la machine du Centre International de Couchage (CIC) a été utilisée. Une unité de pulvérisation mobile a été ajoutée à la machine de couchage puis ajustée pour les essais. Cette unité pulvérise des jets très rapides de la solution de phages. La pression de pulvérisation était de 2,07 bars (30 psi) ce qui correspond à un débit théorique de 988 ml/minute. C'est la vitesse du rouleau qui détermine la quantité de produits bioactifs couchée. Les vitesses de la machine utilisées ont été de 150 à 400 m/minute. Les essais ont été effectués sur deux papiers différents, un papier 100 % pâte thermomécanique (TMP) et un papier kraft résistant à l'état humide. De plus, deux sauces ont été employées : la solution de bactériophage pure et une solution contenant des bactériophages et de la gélatine à 2 %. Pour ces essais, la sécherie n'était pas activée; la distance parcourue et la vitesse de la machine suffisant à sécher le papier. En fin de procédé, un dispositif appelé « Center Wind » permettant d'enrouler à moindre pression le papier a été utilisé sur une série d'essais afin de limiter les phénomènes de friction : cause potentielle de dégradation des bactériophages (par énergie transmise).

Les couchages par rotogravure ont été effectués à l'Université du Québec à Trois-Rivières avec la machinerie et l'équipe d'Innofibre du CÉGEP de Trois-Rivières. La figure 4.4 représente le schéma de la machine utilisée. Sur cette machine le papier 100 % TMP n'a pu être utilisé à cause d'une trop faible résistance à l'état humide. Les essais ont été réalisés aux vitesses de 55 et 110 m/minute. Dans ces essais, la sécherie à

air pulsé a été utilisée. La température de l'air a été fixée à 150 °C. Les solutions avec et sans gélatine ont aussi été utilisées.

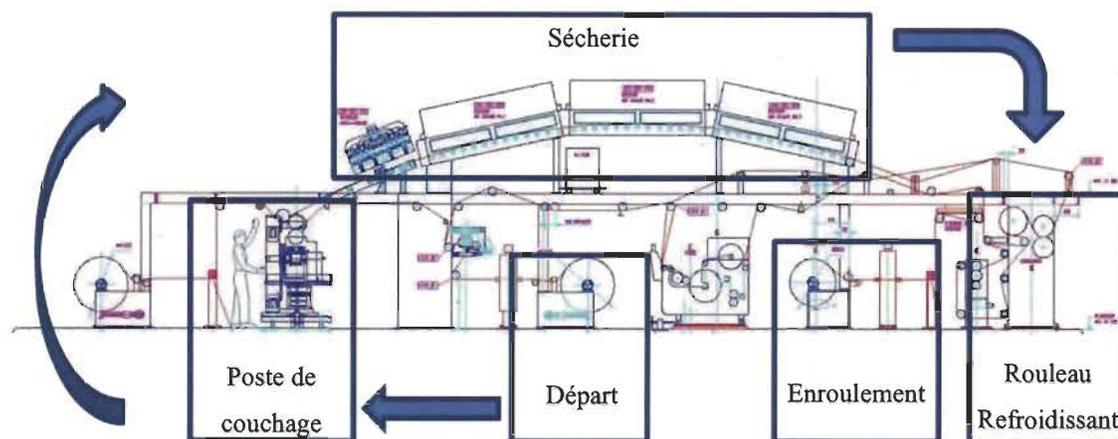


Figure 4.4 Machine de couchage pilote d'Innofibre.

4.2 Résultats des essais pilotes

Il faut ici se rappeler que des papiers bioactifs ont déjà été produits et ont prouvé leur efficacité en laboratoire. Pour en produire à plus grande échelle, il est nécessaire de maîtriser la production de bactériophages en grande quantité et d'assurer leur intégration aux procédés papetiers. Les résultats des essais de mise à l'échelle sont présentés dans la section suivante.

4.2.1 Mise à l'échelle de la production de bactériophages

4.2.1.1 Courbes de croissances d'*Escherichia coli* B

Pour suivre la concentration de bactéries dans la solution lors des essais en bioréacteur, il est possible d'utiliser des décomptes cellulaires et des mesures d'absorbance. Le suivi des décomptes cellulaires a été fait en laboratoire dans des fioles de 2 litres. Elle est constituée de deux séries d'expériences (chacune de deux fioles), les résultats sont présentés à la figure 4.5 et les données brutes sont disponibles à

l'annexe D. La courbe commence par un plateau lors des deux premières heures d'incubation que nous relierons au phénomène d'adaptation des bactéries à un nouveau milieu. Les bactéries entrent ensuite dans une phase de croissance qui devient exponentielle après 4 heures. La production stagne par la suite, soit 6 heures après le début de la fermentation. La réaction a été arrêtée après l'apparition du plateau représentant la phase stationnaire de la croissance bactérienne.

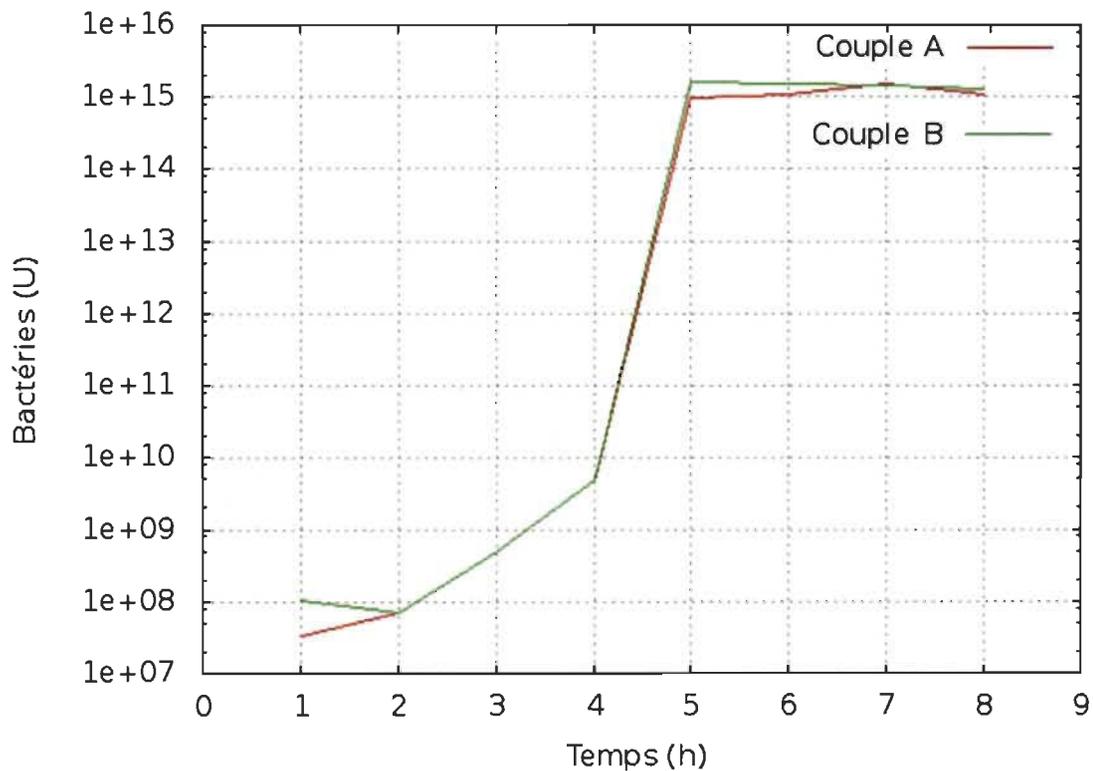


Figure 4.5 Courbe de croissance de *E. coli* dans le TSB.

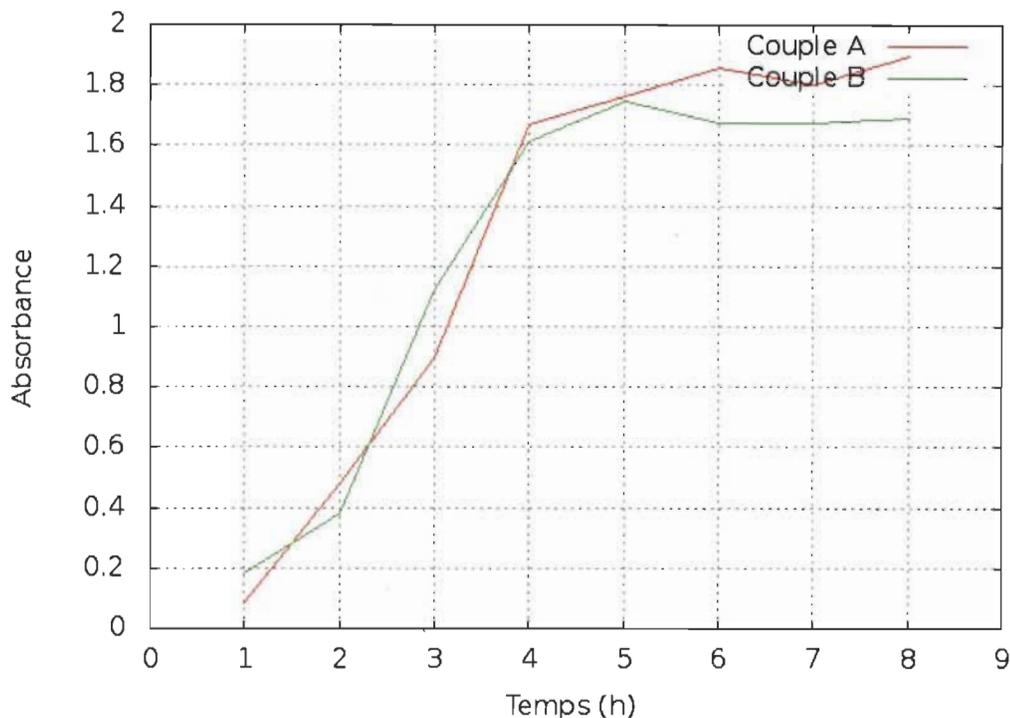


Figure 4.6 Absorbance du mélange TSB+*E. coli* à 650 nm pendant la croissance.

En parallèle, l'absorbance à 650 nm a été mesurée. Les résultats sont présentés à la figure 4.6. Les courbes obtenues par chaque technique suivent le même comportement. Les deux techniques peuvent donc être utilisées pour le suivi de croissance en bioréacteur.

4.2.2 Première fermentation en bioréacteur

Lors de la première fermentation, les inocula viraux et bactériens ont été ajoutés à 16 h lors de la première journée. Après 4 heures de fermentation, la mousse a commencé à atteindre les sorties d'air du bioréacteur. L'anti-mousse utilisé initialement, le polypropylène-glycol (PPG) n'était pas efficace. L'antimousse a été changé par un autre plus performant : une émulsion de silicone active de chez Sigma Aldrich nommé Sigma-A5633.

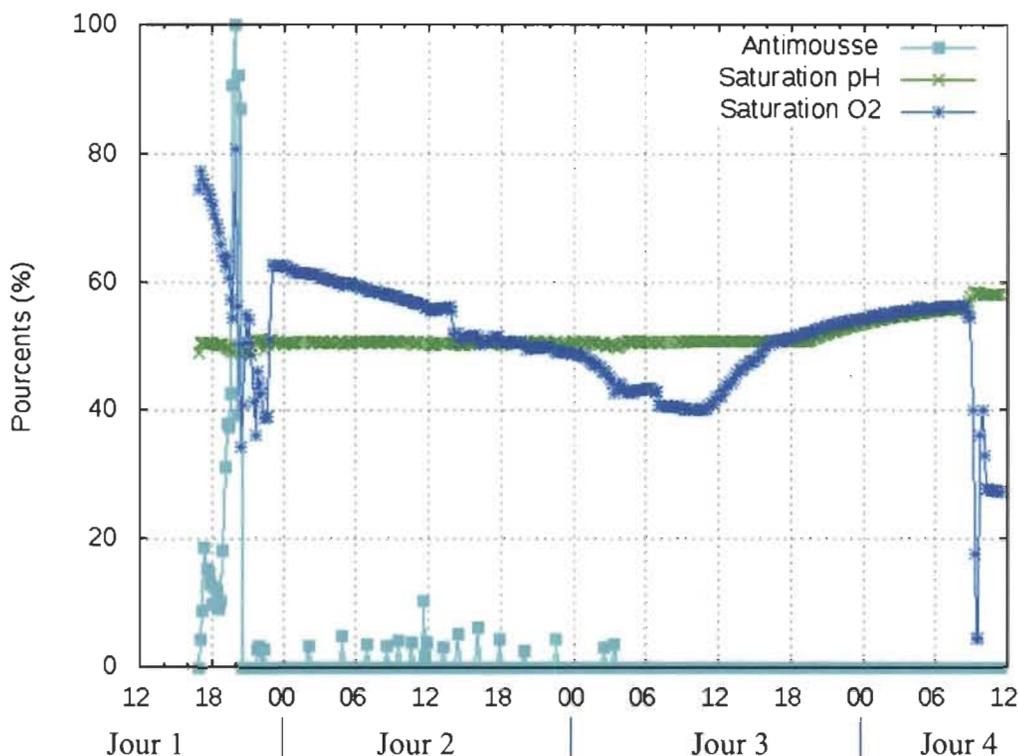


Figure 4.7 Évolution du pH, de la saturation d'oxygène et de l'antimousse lors de la première réaction.

La figure 4.7 permet de suivre le pH, la saturation en oxygène et l'ajout d'antimousse. Le pH y est représenté en pourcentage pour motifs de comparaison et d'uniformisation d'unités de la figure : 50 % représentent un pH de 7,0 et 100 % un pH de 14,0. Le pH reste stable tout au long de la réaction grâce à l'ajout contrôlé d'acide et de base. L'antimousse est représenté en pourcentage d'activité. L'augmentation subite en début de réaction est reliée à l'inefficacité du PPG. Le changement d'antimousse a permis de réduire efficacement la mousse formée pendant la réaction. L'oxygène est représenté sous forme de saturation, 100 % représentent donc 10 mg/l d'oxygène dissous. Après avoir lancé la réaction, la courbe représentant l'oxygène dissous diminue; ce qui indique une consommation d'oxygène. Ce phénomène est une conséquence de la croissance bactérienne. Lorsque la mousse s'accumule après 4 heures, des perturbations empêchent une lecture convenable de la saturation d'oxygène. Une fois stabilisé vers 23 h de la première journée, l'oxygène dissous continue à chuter jusqu'à 12 h de la troisième journée. Par la suite, l'oxygène remonte jusqu'à la fin de l'expérience.

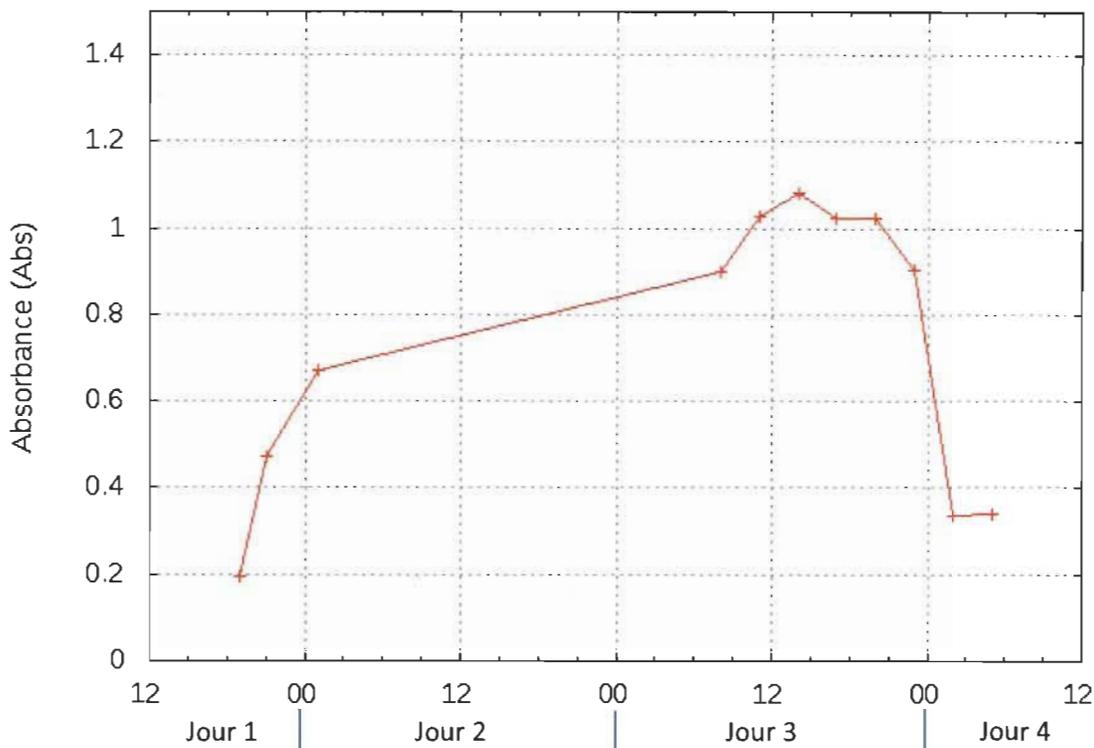


Figure 4.8 Absorbance à 650 nm du milieu lors de la première réaction.

La figure 4.8 montre l'absorbance du milieu lors de la réaction. Il est possible de voir une forte croissance du départ jusqu'à 5 heures puis une croissance plus modérée par la suite. Après 32 heures, on note l'apparition d'un plateau, puis une baisse de l'absorbance après 43 heures.

Une microfiltration en sortie du bioréacteur a été effectuée. Cependant, des bris dans la membrane ont empêché la récupération des bactériophages. Une seconde fermentation a donc été programmée.

4.2.2.1 Seconde fermentation

Pour effectuer la seconde fermentation, l'antimousse Sigma-A5633 a été conservé. La réaction de fermentation a été démarrée à 16 h, l'oxygénation était paramétrée à la limite minimale de l'aérobie (30 %). Les 3 litres d'inoculum viral ont été versés 4 heures après l'inoculation bactérienne, pendant la phase de croissance.

La saturation en oxygène a été la variable la plus active lors de la seconde fermentation (Figure 4.9). Pour maintenir une saturation d'O₂ de 30 %, l'ordinateur avait comme instruction de compenser tout manque en augmentant l'alimentation en air et l'agitation, alternativement. Les instructions inverses avaient été données pour diminuer la quantité d'oxygène dissous. En même temps, la population bactérienne devait s'ajuster à ces changements. Ce sont donc les ajustements à répétition et à la croissance bactérienne fluctuante qui ont causé des variations importantes.

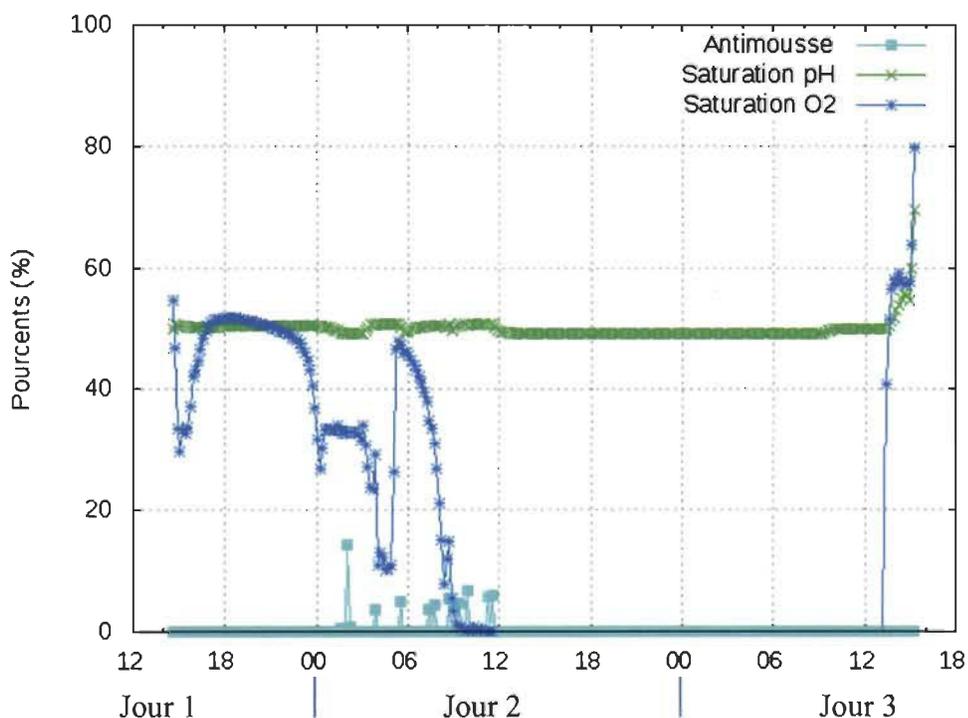


Figure 4.9 Évolution du pH, de la saturation en oxygène et de l'anti-mousse lors de la seconde réaction.

La seconde fermentation s'est terminée le second jour après des tests de coloration de Gram qui se sont révélés positifs. Le mélange est resté sans oxygène avec une légère agitation pendant une journée en attendant la disponibilité du système de filtration. Le troisième jour, la solution a été transférée dans des contenants désinfectés à l'aide d'eau de javel. Les contenants ont par la suite été transportés au CNETE qui a effectué les filtrations. Le CNETE a effectué une préfiltration à 2 µm, puis une filtration à l'aide de filtre en céramique possédant des pores de 0,2 µm. Après la filtration, 80 litres de

bactériophages purifiés d'une concentration de 1×10^5 UFP/ml ont été collectés. La solution filtrée a été stockée en chambre froide (4 °C) en attendant les essais de couchage.

4.2.3 Couchage en usine pilote

La rotogravure et la pulvérisation sont les techniques qui ont été sélectionnées pour l'application des bactériophages à grande échelle. Ils sont plus simples à utiliser avec la solution qui est très peu visqueuse et semble être moins dommageable en terme de cisaillement pour garantir la survie des bactériophages [52].

4.2.3.1 Couchage par pulvérisation

Les tableaux suivants résument les paramètres ainsi que les résultats correspondants pour les douze essais qui ont été menés. Le tableau 4.3 rassemble les essais sur le papier à résistance humide et le tableau 4.4, les essais faits sur le papier à base de pâte mécanique.

La bioactivité a été évaluée sur les papiers qui ont été conditionnés dans un laboratoire à atmosphère contrôlée (23 °C et 50 % d'humidité) pendant 24 heures; ce qui a permis de réduire l'impact de l'humidité de la feuille sur l'expérience. Les papiers ont été évalués à l'aide de la technique de la zone de lyse. Chaque essai possédait trois pastilles de papier déposées sur trois géloses différentes.

Tableau 4.3

Résultats du couchage par pulvérisation : papier à résistance humide

ESSAIS	GÉLATINE	VITESSE (M/MIN)	CENTER WIND	BIOACTIVITÉ
1	Sans	150	Sans	Non
2	Sans	300	Sans	Non
3	Sans	400	Sans	Non
4	Sans	150	Avec	Oui
9	2 %	150	Sans	Oui
10	2 %	300	Sans	Oui
11	2 %	400	Sans	Oui
12	2 %	150	Avec	Oui

Tableau 4.4

Résultats du couchage par pulvérisation : papier à base de pâte thermomécanique (TMP)

ESSAIS	GÉLATINE	VITESSE (M/MIN)	CENTER WIND	BIOACTIVITÉ
5	Sans	150	Sans	Non
6	Sans	300	Sans	Non
7	Sans	400	Sans	Non
8	Sans	150	Avec	Non
13	2 %	150	Sans	Oui
14	2 %	300	Sans	Oui
15	2 %	400	Sans	Non
16	2 %	150	Avec	Oui

Grâce à ces résultats, il est possible de constater l'importance de la présence de gélatine. En effet, les essais sans gélatine ne présentent pas de bioactivité excepté lors de l'utilisation du « Center Wind ». Il est aussi possible d'observer que la vitesse ne semble pas influencer le résultat pour une même formulation, sauf pour l'essai 15. Ce dernier correspond au seul résultat avec gélatine qui ne présente pas de bioactivité.

En dehors de la production de papier bioactif, des contaminations ont été détectées sur les pastilles provenant des papiers kraft à résistance humide. Les papiers ont donc été

évalués seuls pour savoir s'ils pouvaient ou non être la source de contamination. Les tests se sont avérés positifs, ce qui confirme que le papier lui-même contenait à l'origine des microorganismes. Les contaminations n'ont cependant pas influencé le résultat.

4.2.3.2 Couchage par rotogravure

Le tableau 4.5 résume les conditions importantes du couchage par rotogravure et les résultats des tests de bioactivité.

Tableau 4.5
Résultats du couchage par rotogravure

ESSAIS	GÉLATINE	VITESSE (M/MIN)	BIOACTIVITÉ
1	Sans	55	Non
2	2 %	55	Oui
3	Sans	110	Non
4	2 %	110	Oui

Encore une fois, la gélatine semble être essentielle à l'obtention de résultats positifs concluants. Les essais effectués avec la sauce contenant la gélatine sont les seuls à présenter une bioactivité. Les résultats indiquent aussi que la vitesse du papier n'influence pas la bioactivité, et ce, bien qu'elle affecte aussi le temps de passage dans la sécherie. La température du papier à la sortie de la sécherie se situait autour de 70 °C dans tous les essais.

4.3 Discussion

4.3.1 Production de bactériophages en bioréacteur pilote

Les productions de bactériophages à l'échelle pilote sont valides. Elles ont permis d'acquérir plusieurs données importantes et de développer une certaine expérience dans notre groupe pour ce type de procédé. En premier lieu, la première fermentation a

démontré l'inefficacité du PPG comme antimousse. L'émulsion de silicone a fait preuve d'une grande efficacité. Cette émulsion est d'ailleurs accréditée pour le contact alimentaire. Les données de saturation en oxygène et la courbe d'absorbance obtenues ont un comportement concordant. Lors de la croissance bactérienne, l'absorbance augmente et la saturation en oxygène diminue. L'absorbance semble aussi nous indiquer que la croissance arrive à la phase stationnaire après 36 heures de réaction. La croissance avec les bactériophages est donc trois fois plus longue que la croissance bactérienne seule. Après 44 heures, l'absorbance décroît indiquant la dégénérescence des bactéries. Le temps optimal pour la production de bactériophage se situe donc aux alentours de 36 heures.

La filtration effectuée à l'IDE n'a pas fonctionné convenablement. Probablement par manque d'expérience, car c'était la première fois que le technicien utilisait la machinerie, des erreurs d'utilisation et de manipulation pourraient expliquer une partie des problèmes rencontrés. Il est donc impossible de conclure définitivement sur l'efficacité de la filtration directe. Toutefois, après des discussions avec les experts du CNETE, il est apparu qu'il était préférable d'effectuer une préfiltration de l'ordre de 2,0 μm avant de filtrer à plus petit calibre.

La seconde fermentation a démarré sans bactériophages. Ils ont été ajoutés après 4 heures de culture dans la phase exponentielle de croissance selon la courbe obtenue au laboratoire. Cette méthodologie a été proposée par l'équipe du professeur Mansel Griffiths de l'Université de Guelph, aussi membre du réseau SENTINEL. L'objectif de ce protocole est de permettre à la population bactérienne de se développer afin d'obtenir de meilleurs rendements. D'avoir un MOI plus bas, ajouté plus tard dans la croissance, permet ainsi de modérer la destruction des bactéries; ce qui permet ainsi de conserver une population plus importante d'hôtes potentiels et donc d'optimiser la production des bactériophages. Les données d'absorbance obtenues en laboratoire (sans les phages) et lors de la première réaction semblent supporter cette idée. En effet, après 4 heures de croissance sans les bactériophages au laboratoire, l'absorbance est beaucoup plus élevée qu'à n'importe quel point durant la fermentation en bioréacteur.

Après 16 heures de fermentation, la présence de bactéries Gram positif a été détectée dans les tests en microscopie, la réaction a donc été stoppée. Les résultats positifs observés lors de la coloration de Gram étaient possiblement des faux positifs engendrés par la concentration élevée de bactéries.

La saturation en oxygène lors de la seconde fermentation varie grandement à cause du contrôle imposé à 30 %, paramètre qui avait été fixé pour réduire les risques de contaminations. Il est donc difficile de suivre l'évolution de la population bactérienne comme lors de la première fermentation. *Escherichia coli* peut utiliser des cycles aérobiques et anaérobiques ce qui ajoute aux perturbations de la lecture de la saturation en oxygène. Ce contrôle n'est pas obligatoire et occasionne plus de contraintes que de bénéfices. Par conséquent, ce contrôle n'est pas pertinent pour ce type de production.

Suite à ces deux expériences, les recommandations pour la production de bactériophages sont :

- Faire toutes les manipulations dans un seul laboratoire afin d'éviter les risques liés aux transports (contamination, bris de matériel...).
- Utiliser la fermentation en aérobie. Cela permet un suivi plus simple et un meilleur contrôle de la réaction.
- La mesure de l'absorbance du milieu semble être la méthode la plus pratique pour le suivi de la réaction (simple, matériel disponible, rapide).
- Selon les paramètres utilisés, le temps d'incubation idéal serait de 36 heures.
- Utiliser des émulsions de silicone comme anti-mousse.
- Pour éliminer les bactéries présentes dans le milieu, une préfiltration à 2,0 μm suivit d'une filtration à 0,2 μm semble adéquat et suffisant.

Pour optimiser la production de bactériophages, il serait judicieux de tester des milieux différents par exemple une dilution du milieu TSB ou l'utilisation d'eaux

résiduelles. À moyen terme, il est envisageable de mettre en place des procédés de production en continu.

4.3.2 Procédé de couchage

Les essais de couchages réalisés au CIC ont démontré la faisabilité de la production de papiers bioactifs à l'échelle commerciale. La pulvérisation est un procédé efficace pour coucher les bactériophages sur le papier. Il s'agit d'un système simple, versatile et peu dispendieux. Ce système n'est pas courant dans le milieu papetier, mais il y est facilement adaptable. Lors de ces essais, aucune limite en termes de vitesse n'est apparue. Malgré la concentration limitée de bactériophage, des papiers fonctionnels ont été fabriqués à 400 m/minute sur une base de papier résistant à l'état humide. Pour le papier TMP, les résultats ont été positifs pour les vitesses de 150 et de 200 m/minutes. Cependant, aucune bioactivité n'a été mesurée à 400 m/minute. Ce résultat peut s'expliquer par la capacité d'absorbance supérieure du papier. Nous proposons comme explication que les phages sont peut-être piégés dans la structure interne du papier, donc inefficaces, car sans contact potentiel en surface. En outre, le dispositif du «Center Wind» semble apporter une contribution au maintien de la bioactivité. Par conséquent, comme nous l'avions estimé, il est possible que le cisaillement causé par l'enroulement provoque la destruction partielle des bactériophages.

Les essais de couchage par rotogravure réalisés à Innofibre confirment l'efficacité du procédé de couchage à l'échelle pilote. Toutefois, l'important apport d'eau entraîne plusieurs difficultés : la sécherie devient obligatoire, les vitesses sont faibles et le papier final gondole au séchage. Afin d'améliorer la qualité du papier produit par ce procédé il serait intéressant d'utiliser une machine comportant un parcours plus grand, des températures de séchage plus élevées, une sauce plus concentrée ou des alvéoles de gravure (cellules) apportant des quantités moindres d'eau au papier (avec alors des concentrations initiales en phages plus importantes).

Dans les deux procédés de couchage, la gélatine apparaît comme un élément nécessaire au maintien de l'activité des phages. Étant donné qu'au CIC aucune sécherie n'a été employée, la gélatine semble permettre le maintien de l'humidité dans le papier. Cette humidité est essentielle à l'activité du papier bioactif.

D'autre part, les essais de couchage ont révélé une problématique qui n'avait pas été détectée en laboratoire : l'odeur de la solution des résidus cellulaires des bactéries, voire des bactériophages. Cette odeur désagréable particulièrement présente lors du couchage a entraîné certains désagréments chez les opérateurs. De plus, le papier final conserve une odeur inappropriée qui le rendrait impropre à un papier d'emballage. Dans le cadre d'un papier d'emballage alimentaire, cet aspect n'est effectivement pas tolérable. Pour y remédier, un travail doit être fait en amont sur la solution de bactériophages. Une voie prometteuse serait d'effectuer une meilleure purification, par exemple une ultrafiltration isolant les bactériophages des résidus présents dans la solution. Une approche complémentaire serait de tester des milieux de culture provoquant moins d'odeurs lors de la fermentation.

Suite aux essais de couchage, les recommandations pour le développement des papiers bioactifs sont :

- Utiliser la pulvérisation comme procédé de couchage.
- Employer de la gélatine dans la sauce de couchage ou essayer d'autres additifs pouvant retenir l'humidité, comme l'amidon ou le CMC.
- Confirmer le rôle du « Center Wind » ou enroulement à faible tension dans la conservation de la bioactivité.

Pour améliorer la qualité de la production du papier bioactif, l'utilisation de vitesse supérieure est envisageable pour réduire le temps de résidence de papier en sécherie. De plus, des concentrations plus élevées de bactériophage seraient préférables pour assurer une qualité de production constante. Enfin, afin d'augmenter le spectre d'activité

du papier bioactif plusieurs phages devront être appliqués. Deux voies sont possibles, soit l'application unique d'une solution contenant l'ensemble des phages (cocktails) ou des applications successives de chaque solution de phages (plusieurs têtes de pulvérisation ou utilisation d'un procédé d'impression).

CHAPITRE V

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

5.1 Conclusion

Les papiers bioactifs sont un moyen pertinent de contrôle général des contaminations alimentaires à l'échelle mondiale. Ce type de produit a principalement été développé par les membres du réseau canadien SENTINEL. Au sein de ce regroupement, l'UQTR a choisi de développer les papiers bioactifs à base de bactériophages sur les dispositifs papetiers existants. Les expériences précédant nos travaux ont prouvé la validité du concept à l'échelle du laboratoire. Pour envisager la commercialisation, une étude de la mise à l'échelle était nécessaire. Ce qui est l'objectif principal de ce projet de recherche. Pour ce faire, les étapes menant à la production pilote des papiers bioactifs ont été déterminées et des essais de mise à l'échelle ont été effectués sur la production des bactériophages ainsi que sur leur couchage sur des papiers de base commerciaux.

Escherichia coli a été choisi comme cible ou bactérie test pour ces essais à cause de sa grande ubiquité en tant que contaminant alimentaire. Pour contrer les bactéries pathogènes, les bactériophages sont les agents les plus intéressants pour produire les papiers bioactifs. Ce sont des virus ciblant exclusivement les bactéries. Ils sont simples à produire, peu coûteux et disposent de mécanismes innés pour attaquer des populations bactériennes. En termes d'application dans les procédés papetiers, les procédés de couchage par pulvérisation et par rotogravure ont été sélectionnés pour les caractéristiques et avantages techniques. Ils possèdent tous deux un cisaillement faible permettant de préserver les bactériophages et ils permettent de plus une formulation de sauce simple, quasiment inerte en ce qui concerne les bactériophages.

Les bactériophages sont sensibles aux températures élevées existant dans les procédés papetiers. En effet, les études en laboratoire ont démontré que 30 minutes d'exposition à une température de 60 °C (et plus) sont suffisantes pour réduire la concentration de bactériophages de 96 %. À 70 °C, un temps d'exposition de 4 minutes suffit pour faire chuter la population de 98 %. Les bactériophages sont aussi sensibles aux environnements acides ou alcalins. Les données obtenues lors des expériences indiquent que la population chute de 96 % après 20 minutes d'exposition à des pH de 4,0. De plus, lorsque l'environnement des bactériophages est situé en dehors d'un pH neutre (entre 7,0 et 7,5) la population active chute rapidement. Malgré tout, de bonnes techniques de production évitant des temps d'exposition trop longs aux conditions nocives pour l'activité des bactériophages permettent d'éviter la perte d'efficacité.

Les productions de bactériophages en bioréacteur de 150 litres ont permis la création de 80 litres de solution de bactériophages à 1×10^5 UFP/ml. Des concentrations initiales de bactériophage moins élevé (MOI de 0,5) et leur ajout dans la phase exponentielle de croissance permettent d'obtenir de meilleurs résultats. De plus, les essais indiquent qu'un milieu aérobique est beaucoup plus facile à contrôler et que l'antimousse à base de silicone est plus efficace que le PPG.

Lors des essais pilotes de couchage, les sauces contenant de la gélatine sont les seules qui semblent maintenir une bioactivité à la fin des procédés. De plus, le procédé de couchage par pulvérisation s'est démarqué et semble le plus apte en fonction de sa vitesse, de sa simplicité et de son efficacité globale. Le procédé de couchage par rotogravure s'est avéré fonctionnel, et ce malgré le passage en sécherie. Cependant, le papier bioactif produit par rotogravure était gondolé parce que l'addition d'eau (solution de phages) y est trop importante. C'est un point possible à optimiser par des modifications aux conditions opératoires pouvant réduire le transfert d'eau au papier. Un problème majeur a été détecté au cours des essais de couchage : il s'agit de l'odeur de la solution de bactériophages. Ce problème pourrait être réglé dans un avenir proche grâce à de meilleurs procédés de purification des bactériophages. L'origine des odeurs n'a pas été précisément déterminée : elle peut provenir des débris de bactéries, d'une solution

pas assez purifiée ou des nutriments résiduels du milieu de culture. Cet effet se cumulerait à la lyse des phages lors de l'utilisation des papiers comme emballage : ce qui est inadéquat.

En conclusion, les travaux effectués lors de ce mémoire démontrent qu'il est possible de produire des papiers bioactifs à base de phages de manière massive, commerciale, à l'aide des connaissances et du matériel actuels. Il reste très peu de points ou de difficultés à régler pour obtenir un produit viable. Les industries papetières et biochimiques possèdent les capacités et les technologies nécessaires au déploiement de papiers bioactifs à base de bactériophages. D'ici quelques années les papiers bioactifs apporteront donc de nouvelles perspectives pour des emballages alimentaires novateurs.

5.2 Perspectives

Les papiers bioactifs ont un bel avenir dans le domaine de l'alimentation. Pour les amener sur le marché, deux points restent à considérer : l'odeur de la solution et la préparation de cocktails de phages. Une purification isolant les bactériophages des débris organiques et concentrant la solution permettrait de grandes avancées. Après avoir optimisé une méthode de purification efficace, il sera possible d'envisager des cocktails bioactifs et de créer des effets synergiques intéressants entre divers agents.

Une étape de purification efficace permettra d'éviter les problèmes d'odeur et de concentrer les bactériophages. Dans ce mémoire une préfiltration à 2,0 μm suivit d'une filtration à 0,2 μm a été utilisée. Cependant, elle ne semble pas suffisante pour éliminer les déchets organiques qui causent les odeurs et ne concentre pas suffisamment la solution. Pour y arriver, il est possible d'ajouter une autre étape qui retiendrait les phages et filtrerait le reste : c.-à-d. tout autre débris polluant la solution. Pour ce faire, il serait intéressant d'évaluer la possibilité d'utiliser l'ultrafiltration et/ou la lyophilisation. Ces procédés élimineraient une partie des déchets organiques et concentreraient les bactériophages. L'ultrafiltration se fait sur un équipement semblable et s'adapte bien aux procédés industriels. La lyophilisation est plus coûteuse, mais cette technique obtient de

très bons résultats avec les bactériophages [67] et permet d'éliminer presque totalement le liquide. Une voie parallèle serait de chercher des techniques permettant de précipiter ou d'emprisonner (par encapsulation) les bactériophages pour les récupérer.

Les phages concentrés seraient idéaux pour créer des cocktails. Ils permettraient la création de cocktails de phages et même de cocktails contenant divers agents bioactifs. En effet, les phages pourraient être couplés avec d'autres molécules antimicrobiennes comme la niacine pour augmenter la gamme bactérienne ciblée. De plus, le support papier permet d'imaginer des mélanges d'agents bioactifs produisant des effets synergiques. Par exemple, le code génétique des bactériophages pourrait inclure une séquence produisant un enzyme altérant la couleur d'une encre fixée sur le papier. L'enzyme serait alors produit dans le cytosol de la bactérie hôte et libéré lors de la lyse. Le papier bioactif permettrait ainsi la prévention de la contamination et signalerait son échec dans des cas de contaminations extrêmes.

L'introduction d'un tel papier dans le domaine alimentaire pourrait ouvrir les portes d'autres domaines. Par exemple, l'environnement médical pourrait bénéficier de papiers bioactifs à usage unique, comme des blouses, des surfaces, des bandages ou des emballages pour les outils chirurgicaux. Tous ces produits utiliseront des procédés presque identiques aux emballages alimentaires. En conclusion, les papiers bioactifs nous semblent avoir un avenir prometteur. Principalement pour l'industrie papetière, notamment des produits d'emballage, mais aussi pour d'autres industries (agriculture, par exemple), ils permettront de créer des produits novateurs, c.-à-d. des produits avec une nouvelle fonctionnalité : la bioactivité.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Public Health Agency of Canada. « Estimates of Food-borne Illness in Canada ». [s.l.] : [s.n.], 2013. Disponible sur : < <http://www.phac-aspc.gc.ca/efwd-emoaha/efbi-emoa-eng.php#a8> > (consulté le 17 décembre 2013)
- [2] Buzby J. C., Roberts T. « Economic costs and trade impacts of microbial foodborne illness ». *World Health Stat. Q.* 1997. Vol. 50, n°1-2, p. 57-66.
- [3] Scharlach M. *et al.* « Epidemiological analysis of a cluster within the outbreak of Shiga toxin-producing Escherichia coli serotype O104:H4 in Northern Germany, 2011 ». *Int. J. Hyg. Environ. Health* [En ligne]. juin 2013. Vol. 216, n°3, p. 341-345. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2012.10.001> > (consulté le 7 août 2013)
- [4] Public Health Agency of Canada. « Epidemiological information: E. coli O157:H7 illness related to the XL food safety investigation ». [s.l.] : [s.n.], 2012. Disponible sur : < <http://www.phac-aspc.gc.ca/fs-sa/phn-asp/ecoli-epi-info-eng.php> > (consulté le 26 novembre 2013)
- [5] Gaulin C., Ramsay D., Bekal S. « Widespread Listeriosis Outbreak Attributable to Pasteurized Cheese, Which Led to Extensive Cross-Contamination Affecting Cheese Retailers, Quebec, Canada, 2008 ». *J. Food Prot.* [En ligne]. 1^{er} janvier 2012. Vol. 75, n°1, p. 71-78. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-236> > (consulté le 7 août 2013)
- [6] Kozak G. K. *et al.* « Foodborne Outbreaks in Canada Linked to Produce: 2001 through 2009 ». *J. Food Prot.* [En ligne]. 1^{er} janvier 2013. Vol. 76, n°1, p. 173-183. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-126> > (consulté le 7 août 2013)
- [7] Mead P. *et al.* « Food-Related Illness and Death in the United States ». *Environ. Health.* mars 2000.
- [8] « SENTINEL : Bioactive Paper Network ». [s.l.] : [s.n.], [s.d.]. Disponible sur : < <http://www.bioactivepaper.com/> > (consulté le 7 août 2013)
- [9] Allen K. J. *et al.* « Microbiological survey of imported produce available at retail across Canada ». *Int. J. Food Microbiol.* [En ligne]. mars 2013. Vol. 162, n°2, p. 135-142. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.010> > (consulté le 16 août 2013)

- [10] Farber J. M., Peterkin P. I. « *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen ». *Microbiol. Rev.* septembre 1991. Vol. 55, n°3, p. 476-511.
- [11] Beveridge T. J. « Use of the gram stain in microbiology ». *Biotech. Histochem. Off. Publ. Biol. Stain Comm.* mai 2001. Vol. 76, n°3, p. 111-118.
- [12] Clark C. G., Farber J., Pagotto F. « Surveillance for *Listeria monocytogenes* and listeriosis, 1995-2004 ». *Epidemiol. Infectueuse* [En ligne]. 12 octobre 2009. Vol. 138, p. 559-572. Disponible sur :
< <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268809990914> >
- [13] Diepen A. Van. *Salmonella typhimurium and its host: host-pathogen cross-talk, immune evasion, and persistence*. [En ligne]. [s.l.] : Leiden University, Leiden University Medical Center, Dept. of Infectious Diseases, 2005. Disponible sur :
< <https://openaccess.leidenuniv.nl/handle/1887/4339> > (consulté le 17 août 2013)
- [14] Khan M. I. *et al.* « Epidemiology, clinical presentation, and patterns of drug resistance of *Salmonella Typhi* in Karachi, Pakistan ». *J. Infect. Dev. Ctries.* 2012. Vol. 6, n°10, p. 704-714.
- [15] Severi E. *et al.* « Large outbreak of *Salmonella* Enteritidis PT8 in Portsmouth, UK, associated with a restaurant ». *Epidemiol. Infect.* [En ligne]. 14 déc. 2011. Vol. 140, n°10, p. 1748-1756. Disponible sur :
< <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268811002615> > (consulté le 16 août 2013)
- [16] Scheutz F., Strockbine N. « Genus I. *Escherichia* Castellani and chalmers 1919 ». *Springer.* 2005. Vol. 2, n°B, p. 222.
- [17] Campbell N. A., Reece J. B. *Biologie*. 2^e éd.[s.l.] : [s.n.], 2004. 1363 p. ISBN : 2-7613-1379-8.
- [18] Tlaskalová-Hogenová H. *et al.* « Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases ». *Immunol. Lett.* [En ligne]. mai 2004. Vol. 93, n°2-3, p. 97-108. Disponible sur :
< <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2004.02.005> > (consulté le 24 septembre 2013)
- [19] Gonzalez R. *et al.* « A new model for the anaerobic fermentation of glycerol in enteric bacteria: Trunk and auxiliary pathways in *Escherichia coli* ». *Metab. Eng.* [En ligne]. septembre 2008. Vol. 10, n°5, p. 234-245. Disponible sur :
< <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2008.05.001> > (consulté le 24 sept. 2013)
- [20] Marr A. G. « Growth rate of *Escherichia coli*. » *Microbiol. Rev.* 1991. Vol. 55, n°2, p. 316-333.

- [21] Bollman J., Ismond A., Blank G. « Survival of Escherichia coli O157: H7 in frozen foods: impact of the cold shock response ». *Int. J. Food Microbiol.* 2001. Vol. 64, n°1, p. 127-138.
- [22] Doyle M. P., Schoeni J. L. « Survival and growth characteristics of Escherichia coli associated with hemorrhagic colitis. » *Appl. Environ. Microbiol.* 1984. Vol. 48, n°4, p. 855-856.
- [23] Lukjancenko O., Wassenaar T. M., Ussery D. W. « Comparison of 61 Sequenced Escherichia coli Genomes ». *Microb. Ecol.* [En ligne]. 11 juillet 2010. Vol. 60, n°4, p. 708-720. Disponible sur : <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-010-9717-3> (consulté le 23 septembre 2013)
- [24] Mead P. S., Griffin P. M. « Escherichia coli O157: H7 ». *The Lancet.* 1998. Vol. 352, n°9135, p. 1207-1212.
- [25] Gallagher L. *et al.* « Outbreak of Escherichia coli O157:H7 in a child care center in Cook County, Illinois, with prolonged shedding and household transmission ». *Am. J. Infect. Control* [En ligne]. juillet 2013. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2013.03.312> > (consulté le 7 août 2013)
- [26] Soon J. M., Seaman P., Baines R. N. « Escherichia coli O104:H4 outbreak from sprouted seeds ». *Int. J. Hyg. Environ. Health* [En ligne]. juin 2013. Vol. 216, n°3, p. 346-354. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2012.07.005> > (consulté le 7 août 2013)
- [27] Janeway C. *Immunobiology: the immune system in health and disease*. New York: Garland Pub., 2001. ISBN : 081533642X 9780815336426 0443070989 9780443070983 0443070997 9780443070990.
- [28] Li M. *et al.* « Paper-based device for rapid typing of secondary human blood groups ». *Anal. Bioanal. Chem.* [En ligne]. 28 novembre 2013. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-013-7494-9> > (consulté le 6 décembre 2013)
- [29] Credou J. *et al.* « A one-step and biocompatible cellulose functionalization for covalent antibody immobilization on immunoassay membranes ». *J. Mater. Chem. B* [En ligne]. 2013. Vol. 1, n°26, p. 3277. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1039/c3tb20380h> > (consulté le 6 décembre 2013)
- [30] Li L. *et al.* « A study of the transport and immobilisation mechanisms of human red blood cells in a paper-based blood typing device using confocal microscopy ». *The Analyst* [En ligne]. 2013. Vol. 138, n°17, p. 4933. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1039/c3an00810j> > (consulté le 6 décembre 2013)

- [31] Chu T. C. « Aptamer mediated siRNA delivery ». *Nucleic Acids Res.* [En ligne]. 31 mai 2006. Vol. 34, n°10, p. e73-e73. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkl388> > (consulté le 14 octobre 2013)
- [32] Fire A. Z. « Gene Silencing by Double-Stranded RNA (Nobel Lecture) ». *Angew. Chem. Int. Ed.* [En ligne]. 17 septembre 2007. Vol. 46, n°37, p. 6966-6984. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200701979> > (consulté le 3 décembre 2013)
- [33] Barton G. M., Medzhitov R. « Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells ». *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002. Vol. 99, n°23, p. 14943-14945.
- [34] Xiao Y. *et al.* « Label-Free Electronic Detection of Thrombin in Blood Serum by Using an Aptamer-Based Sensor ». *Angew. Chem. Int. Ed.* [En ligne]. 26 août 2005. Vol. 44, n°34, p. 5456-5459. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200500989> > (consulté le 14 octobre 2013)
- [35] Hamaguchi N., Ellington A., Stanton M. « Aptamer Beacons for the Direct Detection of Proteins ». *Anal. Biochem.* [En ligne]. juillet 2001. Vol. 294, n°2, p. 126-131. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1006/abio.2001.5169> > (consulté le 14 octobre 2013)
- [36] Page C. P., Cheymol G., Duteil J. *Pharmacologie intégrée*. Paris; Bruxelles : De Boeck Université, 1999. ISBN : 2744500151 9782744500152.
- [37] Anany H. *et al.* « Biocontrol of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in Meat by Using Phages Immobilized on Modified Cellulose Membranes ». *Appl. Environ. Microbiol.* [En ligne]. 29 juillet 2011. Vol. 77, n°18, p. 6379-6387. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.05493-11> > (consulté le 16 octobre 2013)
- [38] Ackermann H.-W. « Bacteriophage observations and evolution ». *Res. Microbiol.* [En ligne]. mai 2003. Vol. 154, n°4, p. 245-251. Disponible sur : < [http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00067-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00067-6) > (consulté le 17 juin 2013)
- [39] Mosig G. « The essential role of recombination in phage T4 growth ». *Annu. Rev. Genet.* 1987. Vol. 21, n°1, p. 347-371.
- [40] O'Reilly D. R. *Baculovirus expression vectors: a laboratory manual*. New York: Oxford University Press, 1994. 347 p. ISBN : 0195091310.
- [41] *Principles of virology: molecular biology, pathogenesis, and control of animal viruses*. 2nd ed. Washington, D.C: ASM Press, 2004. 918 p. ISBN : 1555812597.

- [42] Kasman L. M. *et al.* « Overcoming the Phage Replication Threshold: a Mathematical Model with Implications for Phage Therapy ». *J. Virol.* [En ligne]. 1 juin 2002. Vol. 76, n°11, p. 5557-5564. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.76.11.5557-5564.2002> > (consulté le 8 déc. 2013)
- [43] Leiman P. G. *et al.* « Structure and morphogenesis of bacteriophage T4 ». *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* [En ligne]. 1 novembre 2003. Vol. 60, n°11, p. 2356-2370. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-003-3072-1> > (consulté le 24 juillet 2013)
- [44] Pelton R. « Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics ». *TrAC Trends Anal. Chem.* [En ligne]. septembre 2009. Vol. 28, n°8, p. 925-942. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2009.05.005> > (consulté le 16 septembre 2013)
- [45] Bartual S. G. *et al.* « Structure of the bacteriophage T4 long tail fiber receptor-binding tip ». *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010. Vol. 107, n°47, p. 20287-20292.
- [46] Pouillot F., Blois H., Iris F. « Genetically engineered virulent phage banks in the detection and control of emergent pathogenic bacteria ». *Biosecurity Bioterrorism Biodefense Strategy Pract. Sci.* 2010. Vol. 8, n°2, p. 155-169.
- [47] Miller E. S. *et al.* « Bacteriophage T4 genome ». *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003. Vol. 67, n°1, p. 86-156.
- [48] Ouhammouch M. *et al.* « Bacteriophage T4 MotA and AsiA proteins suffice to direct Escherichia coli RNA polymerase to initiate transcription at T4 middle promoters. » *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995. Vol. 92, n°5, p. 1451-1455.
- [49] Niskanen K. *Paper Physics*. 1^{re} éd. Helsinki University of Technology: TAPPI press, 1998. 324 p. (Papermaking science and Technology, 19) ISBN : 952-5216-16-0.
- [50] Garret, Grisham. *Biochimie*. 2ème éd.[s.l.] : De Boeck Université, 2000. 1254 p. ISBN : 2-7445-0020-8.
- [51] Robert J. K. *Paper Coating Additives*. Atlanta, USA: TAPPI press, 1995. 140 p.
- [52] Jabrane T. *et al.* « Gravure printing of enzymes and phages ». *Adv Print Media Technol.* 2008. Vol. 35, p. 279-288.

- [53] Sicard C., Brennan J. D. « Bioactive paper: Biomolecule immobilization methods and applications in environmental monitoring ». *MRS Bull.* [En ligne]. 12 avril 2013. Vol. 38, n°04, p. 331-334. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1557/mrs.2013.61> > (consulté le 6 décembre 2013)
- [54] Ali M. M. *et al.* « Detection of DNA using bioactive paper strips ». *Chem. Commun.* [En ligne]. 2009. n°43, p. 6640. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1039/b911559e> > (consulté le 3 novembre 2013)
- [55] Su S. *et al.* « Microgel-Based Inks for Paper-Supported Biosensing Applications ». *Biomacromolecules* [En ligne]. mars 2008. Vol. 9, n°3, p. 935-941. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1021/bm7013608> > (consulté le 4 novembre 2013)
- [56] Li Z. *et al.* « Effect of unassembled phage protein complexes on the attachment to cellulose of genetically modified bacteriophages containing cellulose binding modules ». *Colloids Surf. B Biointerfaces* [En ligne]. 2010. Vol. 76, n°2, p. 529-534.
Disponible sur : <http://dx.doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.12.014>
- [57] Jabrane T. *et al.* « Printing and coating of T4 phage based bioactive paper ». In: *Advances in Printing and Media Technology*. [s.l.] : Iarigai, 2010.
- [58] Jabrane T. *et al.* « Towards a commercial production of phage-based bioactive paper ». *J--J. Sci. Technol. For. Prod. Process.* 2011. Vol. 1, n°1, p. 6-13.
- [59] Le Gratiet M. *Emballages alimentaires bioactifs: Influence de la profondeur d'insertion des bactériophages T4 dans le papier*. [s.l.] : UQTR, 2012.
- [60] Jabrane T., Dubé M., Mangin P. J. « Bacteriophage immobilization on paper surface: effect of cationic pre-coat layer ». In: *Proc. Can. PAPTAC 95th Annu. Meet.* [En ligne]. [s.l.] : [s.n.], 2009. p. 31-314. Disponible sur : < https://oraprdnt.uqtr.quebec.ca/pls/public/docs/GSC1523/F1817428748_Jabrane_PAPTAC_2009.pdf > (consulté le 16 octobre 2013)
- [61] Zimbro M. J., Power D. A. *Difco & BBL manual: manual of microbiological culture media*. Sparks, MD: Becton Dickinson and Co., 2009. ISBN : 9780972720717 0972720715.
- [62] Hurst P. L. *et al.* « Purification and properties of a cellulase from *Aspergillus niger*. » *Biochem J.* 1977. Vol. 165, p. 33-41.

- [63] Sohail M. *et al.* « Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH ». *New Biotechnol.* [En ligne]. septembre 2009. Vol. 25, n°6, p. 437-441. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2009.02.002> > (consulté le 5 décembre 2013)
- [64] Andreus J., Azevedo H., Cavaco-Paulo A. « Effects of temperature on the cellulose binding ability of cellulase enzymes ». *J. Mol. Catal. B Enzym.* 1999. Vol. 7, n°1, p. 233-239.
- [65] Bryant S. *et al.* « Effects Of Microwave Irradiation And Heat On T4 Bacteriophage Inactivation ». *J. Exp. Microbiol. Immunol. JEMI Vol.* 2007. Vol. 11, p. 66-72.
- [66] Monod J. « The growth of bacterial cultures ». *Annu. Rev. Microbiol.* 1949. Vol. 3, n°1, p. 371-394.
- [67] Puapermpoonsiri U., Ford S. J., Van der Walle C. F. « Stabilization of bacteriophage during freeze drying ». *Int. J. Pharm.* [En ligne]. avril 2010. Vol. 389, n°1-2, p. 168-175.
Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.01.034> > (consulté le 16 octobre 2013)

ANNEXE A

COLORATION DE GRAM (FISHER)

Thermo Scientific Richard-Allan Scientific Chromaview – Coloration Avancée

Coloration de Gram Tissu

Mode d'emploi

Discussion technique

Microtomie

Effectuer des coupes de 4 à 6 microns.

Fixation

Pas de prescriptions spéciales; la fixation au formol est adéquate.

Procédure technique

Protocole de coloration standard

1. Déparaffiner et hydrater les coupes à l'eau déminéralisée.
2. Colorer les coupes dans la solution violet cristal pendant 1 minute.
3. Rincer les coupes à l'eau courante pendant 1 minute.
4. Placer les coupes dans la solution iodée de Gram pendant 5 minutes.
5. Rincer les coupes à l'eau courante pendant 30 secondes.
6. Différencier les coupes dans la solution décolorante.
7. Rincer les coupes à l'eau courante pendant 30 secondes.
8. Colorer les coupes dans la solution de coloration Safranin O pendant 30 secondes.
9. Rincer les coupes à l'eau courante pendant 30 secondes.

10. Colorer les coupes dans la solution de coloration tartrazine pendant 20 secondes.
11. Déshydrater les coupes dans de l'alcool absolu changé deux fois en plongeant 10 fois les lames pour chaque bain.
12. Éclaircir les coupes dans un agent clarifiant pendant une minute puis les monter.

Résultats

- Fibres Élastiques – Noir
- Organismes à Gram-Positif – Bleu
- Organismes à Gram-Négatif – Rouge
- Fond – Jaune

Discussion

Tous les réactifs de coloration doivent être stockés à température ambiante. Les réactifs de coloration de Gram sont prévus seulement pour l'usage « In Vitro ». Faire référence à la Fiche de Données de Sécurité par rapport à l'Information de Santé et Sécurité. Tous les réactifs sont stables et ne doivent pas former des agents précipitants selon des paramètres d'entreposage ordinaires. Il est recommandé de jeter la solution iodée et la solution blanchissante de Gram après son usage. La Solution Violet Cristallisée, la Solution de Coloration Safranin O et la Solution de Coloration Tartrazine peuvent être filtrées et réutilisées au besoin. Les taches ne doivent pas être diluées et sont prêtes à l'usage. Tous les colorants utilisés dans ces formulations sont certifiés par la Commission de Coloration Biologique.

Commentaire technique

S'il y a des précipités dans la Solution Violet Crystal, placer dans un four chaud (environ 35 °C) et mélanger. La Solution Iodée de Gram peut indiquer une baisse du teneur au cours du temps.

Mode d'action probable

Les bactéries peuvent être classées en une ou deux familles selon l'épaisseur de la membrane cellulaire contenant des peptidoglycanes. Les bactéries à Gram positif ont une épaisse paroi cellulaire contenant des peptidoglycanes. Les bactéries à Gram négatif ont une fine paroi cellulaire contenant des peptidoglycanes. Les bactéries à Gram positif et à Gram négatif se colorent avec la laque créée par une coloration au cristal violet et le mordant pour fixer l'iode. Cependant, au cours du rinçage avec une solution de décoloration, le colorant laque est complètement éliminé de la bactérie fine à Gram négatif. Un contraste va être obtenu sur la paroi cellulaire grâce à la solution de coloration de safranine O. La courte durée de rinçage de la solution de décoloration permet au colorant laque de rester à l'intérieur des parois des bactéries à Gram positif plus épaisses. Rincez avec précaution la lame à l'aide de la solution de décoloration. Un rinçage plus long avec la solution de décoloration peut pousser le colorant laque de cristal violet à s'échapper de la couche épaisse de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif et des bactéries à Gram négatif. Les éléments tissulaires sont contrastés par la tartrazine, un colorant jaune.

ANNEXE B

PROTOCOLE DE CONGÉLATION DES BACTÉRIES

Matériels

Bec benzènes, Souche isolée, Épendorf 1,5 ml Stériles, Éprouvette avec 5 ml de TSB Stérile, Glycérole, fil bouclé

Méthode

- Travailler sous la flamme.
- Nettoyer votre zone de travail.
- Nettoyer vos mains et protégez-les avec des gants.
- Prendre une petite partie d'une colonie bactérienne isolée puis la déposer dans une éprouvette contenant 5 ml de TSB.
- Faire croître pendant 24 h.
- Remplir un Épendorf de 1,5 ml.
- Centrifuger le contenu à 4000 tours/minutes pendant 8 minutes.
- Retirez-le surnageant.
- Remplir le reste de l'Épendorf avec du glycérol.
- Bien agiter (utilisez un Vortex).
- Congeler à -20 °C ou, si possible, -80 °C.

Récupération des souches

Matériels

Bec benzène, Souche congelée, Pétris TSA, fil bouclé

Méthode

- **Ne pas décongeler.**
- Stériliser un fil bouclé.
- Frotter le dessus du contenu de l'Épendorf.
- Étaler sur une boîte de Pétri grâce à une technique d'épuisement.

Rapport-Gratuit.com

ANNEXE C

CODE DE LA SÉQUENCE D'ANALYSE (C++)

```
int Analyseur::analyse(){

//Structures pour l'analyse
Mat temp;
int count=0;

std::vector<vector<Point> > contours;
std::vector<Vec4i> hierarchy;

//Mettre l'image ton de gris
cvtColor(toAnalyse, temp, CV_RGB2GRAY);
blur(temp,toAnalyse,Size(10,10));

int largest = toAnalyse.size().width < toAnalyse.size().height ?
toAnalyse.size().height : toAnalyse.size().width;

//Threshold l'image
threshold(toAnalyse, toAnalyse, minThresh, maxThresh,0);
findContours( toAnalyse, contours, hierarchy,
CV_RETR_TREE,CV_CHAIN_APPROX_SIMPLE, Point(0,0));

int minSizeR =(minSize/100.00)*largest;
int maxSizeR = (maxSize/100.00)*largest;
minSizeR = minSize < 5 ? 5 : minSize;
printf("min:%i -> %i max: %i -> %i \n",minSize,minSizeR,maxSize,maxSizeR);
std::vector<RotatedRect> minEllipse( contours.size() );

for( int i = 0; i < contours.size(); i++ )
{
    Scalar color = Scalar( 255,255,255 );
    if( (contours[i].size() > minSizeR) && (contours[i].size() < maxSizeR) )
    {
        color = Scalar( 0, 0, 0);
        minEllipse[i] = fitEllipse( Mat(contours[i]) );
        ++count;
    }
    drawContours( temp, contours, i, color, 1, 8, vector<Vec4i>(), 0, Point()
);
    ellipse( temp, minEllipse[i], color, 2, 8 );
}
printf("Count:%i\n",count);
imwrite("tempanalysed.jpg",temp);
return count;
}
```

ANNEXE D

RÉSULTATS BRUTS DÉCOMPTE COURBE DE CROISSANCE

TEMPS (H)	DÉCOMPTE COUPLE 1 (U/L)						MOYENNE
	ERLEN 1			ERLEN 2			
	MESURE 1	MESURE 2	MESURE 3	MESURE 1	MESURE 2	MESURE 3	
1	31500000	34500000	25500000	30000000	27000000	34500000	30500000
2	0	0	0	0	0	0	0
3	3960000000	4635000000	4605000000	4380000000	4320000000	4320000000	4370000000
4	0	0	0	0	0	0	0
5	8,55E+14	9,6E+14	8,4E+14	1,71E+15	1,305E+15	1,32E+15	1,165E+15
6	0	0	0	0	0	0	0
7	1,095E+15	1,47E+15	1,515E+15	1,29E+15	1,305E+15	1,32E+15	1,3325E+15
8	0	0	0	0	0	0	0
TEMPS (H)	DÉCOMPTE COUPLE 2 (U/L)						MOYENNE
	ERLEN 3			ERLEN 4			
	MESURE 1	MESURE 2	MESURE 3	MESURE 1	MESURE 2	MESURE 3	
1	0	0	0	0	0	0	0
2	88500000	52500000	54000000	60000000	46500000	87000000	64750000
3	0	0	0	0	0	0	0
4	4,23E+15	1,8E+15	4,245E+15	1,59E+15	1,77E+15	1,605E+15	2,54E+15
5	0	0	0	0	0	0	0
6	1,08E+15	1,14E+15	7,8E+14	1,53E+15	1,245E+15	1,41E+15	1,1975E+15
7	0	0	0	0	0	0	0
8	1,38E+15	8,1E+14	7,95E+14	1,125E+15	1,29E+15	1,02E+15	1,07E+15