

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

ÉTUDE DE L'APPLICATION DE BACTÉRIOPHAGES SUR DES PAPIERS DE
SPÉCIALITÉ POUR LA FABRICATION D'UN EMBALLAGE ALIMENTAIRE
BIOACTIF CONTRE LISTERIA MONOCYTOGENES

THÈSE PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE DU
DOCTORAT EN SCIENCES ET GÉNIE DES MATÉRIAUX LIGNOCELLULO-
SIQUES

PAR
ZEINAB HAMZEH

AVRIL 2026

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire, de cette thèse ou de cet essai a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire, de sa thèse ou de son essai.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire, cette thèse ou cet essai. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire, de cette thèse et de son essai requiert son autorisation.

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES
DOCTORAT EN SCIENCES ET GÉNIE DES MATÉRIAUX LIGNOCELLULO-
SIQUES

Direction de recherche :

Simon Barnabé	Directeur de recherche
Tarik Jabrane	Codirecteur de recherche

Jury d'évaluation

Éric Loranger, Université du Québec à Trois-Rivières	Président
Thomas Auvray, Université du Québec à Trois-Rivières	Évaluateur interne
Benoît Barbeau, Université du Québec à Montréal	Évaluateur externe
Simon Barnabé, Université du Québec à Trois-Rivières	Directeur de recherche
Tarik Jabrane, Innofibre - Cégep de Trois-Rivières	Codirecteur de recherche

Thèse soutenue le 19 03 2026

Avant-propos

Cette thèse s'inscrit dans le cadre de la lutte contre *Listeria monocytogenes* en milieu alimentaire, en explorant le potentiel des phages de grade alimentaire comme agents antibactériens appliqués sur des matériaux d'emballage à base de papier. Le phage P100 a été sélectionné en raison de son efficacité, démontrée lors d'une évaluation comparative incluant des huiles essentielles et d'autres préparations à base de phages. L'étude a démontré qu'une quantité contrôlée de bactéries et de phages constitue une stratégie efficace pour prévenir l'apparition de bactéries résistantes, mettant en lumière les avantages d'un dosage optimisé dans la lutte contre les résistances. Divers types de papiers ont été étudiés, notamment des formettes standards et des papiers de base, modifiés avec des phages puis testés dans des conditions semi-solides et liquides. L'application des phages sur des surfaces hydrophobes a présenté des défis, surmontés grâce à l'utilisation de l'agent tensioactif Tween 80. L'humidité s'est révélée être un facteur crucial pour maintenir l'activité antibactérienne des phages. Enfin, des tests de pulvérisation par CLC ont été réalisés pour évaluer une méthode d'application compatible avec les procédés industriels.

Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de cette thèse.

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma sincère gratitude à mon directeur de thèse, Professeur Simon Barnabé, et à mon codirecteur, Docteur Tarik Jabrane, pour leur encadrement précieux et leur soutien tout au long de cette aventure scientifique. Leur disponibilité et leurs conseils éclairés ont été essentiels à la réalisation de ce travail. Je leur suis reconnaissante pour les nombreuses discussions enrichissantes qui ont guidé mes réflexions.

Je suis également reconnaissante envers, Dr. Thi Thanh Ha Pham pour son expertise, son soutien constant et ses retours constructifs, qui ont grandement enrichi ce projet. Sa capacité à transmettre sa passion pour la recherche, tout en offrant des encouragements dans les moments de doute, a été une source d'inspiration et de motivation. Ce travail n'aurait pas été possible sans son accompagnement attentif et sa confiance, qui m'ont permis de développer mes compétences et de mener à bien ce projet ambitieux.

Je tiens à remercier Dr. Thanh Tung Lai, pour les échanges enrichissants et son expertise tout au long de cette étude. Je remercie également mes collègues et les membres de l'équipe de Simon Barnabé ainsi que tout le personnel de l'I2E3 pour leur soutien et les échanges.

Je tiens à remercier Dr. Hany Anany de l'Université de Guelph et le professeur Sylvain Moineau de l'Université Laval pour leurs conseils.

Je tiens à adresser mes sincères remerciements à l'équipe d'Innofibre, le Centre d'Innovation des Produits cellulosiques du Cégep de Trois-Rivières pour m'avoir offert un accès privilégié à leurs équipements de pointe, essentiels à la fabrication et à la caractérisation des papiers dans le cadre de cette thèse. Ce partenariat a été une étape cruciale dans l'avancement de mes recherches.

Je remercie le partenaire Kruger et le Conseil de Recherche en Sciences naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) pour le financement, indispensable à l'aboutissement de cette recherche.

Enfin, je tiens à remercier tout particulièrement ma famille qui a été une source constante de force et de réconfort. À mon conjoint, Houssein Awada, pour sa patience, son soutien et ses encouragements tout au long de ce parcours. À mes trois enfants, Lana, Yasmine et Mohamad pour leur compréhension, leur encouragement et leur support au fil de ce cheminement.

Avril 2026

Résumé

Ce projet porte sur le développement d'un emballage alimentaire antibactérien et écoresponsable, capable de limiter la prolifération de la bactérie pathogène d'origine alimentaire, *L. monocytogenes*. Le mémoire de cette thèse explore l'application des phages sur des papiers comme un support pour le développement d'un papier bioactif contre *L. monocytogenes*. Les travaux de recherche comprennent 4 parties principales. Premièrement, l'étude de l'interaction entre les phages et *L. monocytogenes*, deuxièmement, le développement des papiers bioactifs en optimisant les paramètres d'application des phages, troisièmement, l'évaluation de l'impact des modifications des propriétés du papier et des additifs, et finalement, l'analyse de l'effet des conditions de séchage et d'entreposage sur leur activité antibactérienne. Tout d'abord, plusieurs agents antibactériens ont été testés, incluant deux produits commerciaux de bactériophages (ListShield et Listex P100), ainsi que des huiles essentielles. Parmi ces agents, le produit des phages Listex P100 a été sélectionné en raison de son efficacité démontrée. Subséquemment, plusieurs types de papiers ont été conçus et caractérisés, notamment des papiers standards de grammages variés, des papiers traités à l'Alkylcétène dimère, des papiers calandrés et des papiers issus d'une entreprise locale destinés à l'emballage alimentaire. Les résultats ont montré qu'un grammage élevé (90g/m^2 et 130g/m^2) a permis de conserver les propriétés antibactériennes d'un papier. Ensuite, les résultats ont montré qu'il est possible de réduire la quantité de phages appliqués sans compromettre leur efficacité antibactérienne ni favoriser l'émergence de résistance bactérienne. L'étude a mis en évidence les défis liés à l'application des phages sur des surfaces hydrophobes, mais l'ajout d'un agent tensioactif s'est avéré efficace pour améliorer l'application des phages. Finalement, l'influence des conditions de séchage et d'entreposage sur l'activité antibactérienne des papiers bioactifs a été analysée. Les résultats ont révélé que l'humidité joue un rôle crucial dans la préservation de l'activité des phages. Enfin, des essais de pulvérisation par coucheuse de laboratoire CLC-7000 ont été réalisés pour explorer une méthode d'application comparable à une application industrielle.

Mots-Clés : Agents antibactériens; Bactériophages; Emballage alimentaire; *Listeria monocytogenes*; Papier bioactif.

Table des Matières

Avant-propos.....	iii
Remerciements.....	iv
Résumé.....	vi
Table des Matières	vii
Liste des Figures	xiii
Liste des Tableaux.....	xxi
Liste des Équations	xxii
Liste des Abréviations.....	xxiii
Chapitre 1 - Introduction.....	1
1.1 Contexte et problématiques	1
1.2 Contexte industriel spécifique du partenaire	6
1.3 Projet de recherche.....	6
Chapitre 2 - Revue de la littérature	8
2.1 Les bactéries pathogènes alimentaires.....	8
2.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	9
2.2.1 Historique	9
2.2.2 Écologie de <i>L. monocytogenes</i>	9
2.2.3 Caractéristiques.....	10
2.2.4 Listériose.....	11
2.2.5 Rôle des emballages dans la protection des aliments	12
2.2.6 Références réglementaires et normes de réduction logarithmique en microbiologie alimentaire.....	12
2.3 Emballages alimentaires	13
2.3.1 Causes de détérioration des aliments.....	13
2.3.2 Matériaux utilisés pour les emballages alimentaires	14

2.3.3	Emballages actifs et bioactifs	14
2.3.5	Emballages antibactériens : intégration des agents antibactériens	16
2.4	Matériaux biosourcés pour les emballages alimentaires.....	16
2.5	Les agents antibactériens ciblant les bactéries d'intérêt alimentaire	18
2.5.1	Nanoparticules antibactériennes	18
2.5.2	Polymères antibactériens pour l'emballage actif.....	20
2.5.3	Huiles essentielles à activité antibactérienne.....	21
2.5.4	Agents biologiques antibactériens spécifiques	22
2.6	Les bactériophages.....	25
2.6.1	Définition.....	25
2.6.2	Sources.....	26
2.6.3	Historique	26
2.6.4	Classification et composition.....	27
2.6.5	Interaction phages – bactéries.....	28
2.6.6	Mécanisme d'infection des phages.....	29
2.6.7	Le cocktail de phages.....	31
2.7	Produits commerciaux de phages approuvés par FDA	32
2.8	Application directe des phages sur les aliments pour le contrôle de <i>L. monocytogenes</i> dans l'alimentation	33
2.9	Facteurs influençant l'efficacité des phages en milieu alimentaire	36
2.10	Les surfaces bioactives à base de phages.....	38
2.11	Travaux sur la fabrication de papiers bioactifs.....	41
2.12	Propriétés des papiers	43
2.12.1	Le grammage	44
2.12.2	La densité.....	44
2.12.3	L'indice Cobb	45
2.12.4	La perméabilité à l'air.....	45
2.13	Propriété de surface	46
2.13.1	Agents Tensioactifs	47
2.13.1.1	L'agent tensioactif Tween 80.....	48
2.14	Modification des propriétés du papier	49
2.14.1	Modification par calandrage	50

2.14.2	Modification par Alkylcétène dimère (AKD).....	50
2.15	Hypothèses de recherche	51
2.16	Les objectifs de recherche.....	52
Chapitre 3 - Matériels et méthodes		53
3.1	Matériel.....	53
3.1.1	Souche bactérienne	53
3.1.2	Milieu de culture.....	53
3.1.3	Bactériophages.....	53
3.1.4	Produits chimiques.....	54
3.1.5	Les papiers de base et les pâtes utilisées	54
3.1.5.1	Les papiers de base.....	55
3.1.5.2	La pâte à papier pour les formettes standards	55
3.2	Méthodes.....	55
3.2.1	Préparation et dénombrement de la souche bactérienne.....	57
3.2.1.1	Préparation des milieux de culture	57
3.2.1.2	Culture de la souche bactérienne.....	57
3.2.1.3	Dénombrement de la culture bactérienne.....	58
3.2.2	Formation d'un tapis bactérien (double couche Agar)	58
3.2.3	Détermination de la concentration de phages	58
3.2.4	Détermination de l'activité antibactérienne en milieu semi-solide et liquide.....	59
3.2.4.1	Test semi-solide	60
3.2.4.2	Test en milieu liquide – lecteur de plaques	61
3.2.4.3	Calcul de la réduction logarithmique	64
3.2.5	Préparation des papiers formettes standards.....	65
3.2.5.1	Mise en pâte et dilution des fibres.....	65
3.2.5.2	Fabrication des formettes standards	65
3.2.5.3	Propriétés des papiers fabriqués.....	67
3.2.6	Modifications des papiers	68
3.2.6.1	Calandrage des papiers.....	68
3.2.6.2	Modification du papier par l'ajout de l'AKD	69
3.2.7	Angle de contact	69

3.2.7.1	Angle de contact sans Tween 80	69
3.2.7.2	Angle de contact avec Tween 80	70
3.2.8	Observation de la morphologie de surface des papiers par microscopie électronique à balayage (MEB).....	70
3.2.9	Application des phages sur papier	71
3.2.9.1	Application à l'échelle laboratoire	71
3.2.9.2	Essai semi-pilote	72
Chapitre 4 - Résultats		75
4.1	Choix d'agent antibactérien	75
4.1.1	Activité antibactérienne des huiles essentielles	75
4.1.2	Validation de l'infectivité des phages	77
4.1.2.1	Test en milieu liquide.....	77
4.1.2.2	Test semi-solide	78
4.1.3	Activité antibactérienne d'une combinaison de phages et d'huile essentielle.....	79
4.2	Interactions entre les phages et les bactéries	81
4.2.1	Interaction entre les phages et <i>L. monocytogenes</i> par le test en milieu semi-solide.....	82
4.2.1.1	Interaction entre les phages Listshield et <i>L.</i> <i>monocytogenes</i>	82
4.2.1.2	Interaction entre les phages P100 et <i>L.</i> <i>monocytogenes</i>	82
4.2.2	Interaction des phages et <i>L. monocytogenes</i> en milieu liquide	86
4.2.2.1	Cinétique de l'interaction à 10^4 CFU/ml.....	89
4.2.2.2	Cinétique de l'interaction à 10^5 CFU/ml.....	90
4.2.2.3	Cinétique de l'interaction à 10^6 CFU/ml.....	91
4.2.2.4	Cinétique de l'interaction à 10^7 CFU/ml.....	95
4.2.2.5	Cinétique de l'interaction à 10^8 CFU/ml.....	96
4.3	Effet du support en papier sur les interactions entre les phages et les bactéries	99
4.3.1	Caractérisation des papiers	100
4.3.1.1	Caractérisation des papiers de base et standards	100
4.3.1.2	Caractérisation des papiers calandrés.....	102

4.3.1.3	Propriétés des papiers modifiés avec l'AKD	103
4.3.1.4	Propriétés de surface de papiers utilisés.....	105
4.3.2	Étude des effets combinés de la concentration bactéries-phages et du MOI sur les propriétés antibactériennes sur des supports en papier	111
4.3.2.1	Activité antibactérienne des papiers de base 50K traités avec des phages en milieu semi-solide.....	111
4.3.2.2	Influence des propriétés physiques des papiers sur leur activité antibactérienne à concentration phages-bactéries et MOI fixes.....	115
4.3.2.3	Activité antibactérienne des papiers de base traités avec des phages en milieu liquide.....	119
4.3.2.4	Effet de l'humidité et du temps d'entreposage sur la stabilité et l'activité antibactérienne des phages appliqués aux papiers de base	133
4.3.3	Ajustement de la quantité effective des phages selon les types de papiers utilisés	138
4.3.3.1	Influence du grammage selon le volume déterminé par l'indice Cobb.....	139
4.3.3.2	Influence du calandrage en milieu semi-solide.....	145
4.3.3.3	Influence de l'AKD en milieu semi-solide	149
4.3.3.4	Effet du séchage	154
4.3.3.5	Effet de l'humidité relative en milieu semi-solide....	158
4.4	Effets de l'agent tensioactif Tween 80	159
4.4.1	Effet de l'agent tensioactif Tween 80 sur la croissance bactérienne.....	159
4.4.2	Effet de Tween 80 sur l'infectivité des phages.....	160
4.4.3	Traitement des papiers avec une solution de phages contenant du Tween 80.....	161
4.4.4	Traitement des papiers contenant l'AKD avec une solution de phages contenant du Tween 80	164
4.5	Pulvérisation des phages sur papiers	165
4.5.1	Test à l'aide d'un flacon en plastique équipé d'une buse.....	165
4.5.2	Essais de pulvérisation à l'aide du CLC	166
Chapitre 5 - Discussion		170
Chapitre 6 - Conclusions et perspectives		174

6.1	Conclusions.....	174
6.2	Perspectives	175
	Bibliographie.....	177
	Annexe : Protocole de préparation de culture de <i>L. monocytogenes</i> et des phages	199

Liste des Figures

Figure 2.1 Morphologie de <i>L. monocytogenes</i> obtenue par un microscope électronique à balayage.....	10
Figure 2.2 Évolutions des nombres de documents scientifiques qui portent sur les « Phages » et le « Food » en fonction de l'année.....	27
Figure 2.3 Représentation schématique des phages à queue de la classe <i>Caudoviricetes</i> [102].	28
Figure 2.4 Cycle lytique d'un phage infectant une cellule bactérienne [105]. a) Adsorption du phage et injection de l'ADN viral; b) Transcription des gènes précoces; c) Réplication du génome viral; d) Transcription des gènes tardifs et synthèse des protéines structurales; e) Assemblage des nouveaux virions; f) Lyse de la cellule bactérienne et libération des phages. ADN viral représenté en rouge.	30
Figure 2.5 Schéma illustrant l'évolution de l'angle de contact θ d'une goutte d'eau sur une surface de papier. Un angle de contact élevé traduit un comportement hydrophobe, tandis qu'un angle faible traduit un comportement hydrophile.	46
Figure 2.6 Représentation schématique générale d'un tensioactif.....	47
Figure 3.1 Schéma récapitulatif des méthodes et approches méthodologiques utilisées dans cette étude.	56
Figure 3.2 Plaques ou zones de lyse après 24 heures d'incubation.	59
Figure 3.3 Représentation d'un test antibactérien en milieu semi-solide 1) formation d'un tapis bactérien, 2) application d'une solution de phages ou d'un papier traité avec du phage, 3) incubation (interaction phages-bactéries), 4) lyse des bactéries et apparition d'une zone de lyse.....	61
Figure 3.4 Un lecteur de plaques de BioTek Cytation 5 et une plaque de 96 échantillons.	63
Figure 3.5 Représentation des principales étapes de production des formettes standards : 1) Déchiquetage des papiers, 2) et 3) Trituration, 4) Pâte obtenue, 5) Dilution de la pâte, 6) et 7) Fabrication d'une formette standard, 8) Formette standard sèche.	66
Figure 3.6 Appareil utilisé pour l'indice Cobb.	67
Figure 3.7 Appareil utilisé pour mesurer la perméabilité à l'air.	68
Figure 3.8 Calandre Beloit Wheeler modèle 700 utilisé pour le calandrage.	68

Figure 3.9 Image du tensiomètre Thetaflex 300.	69
Figure 3.10 Appareil FTA-4000 (First Ten Ångstroms).....	70
Figure 3.11 Coucheuse de Laboratoire CLC-7000 avec la bande de papier.....	72
Figure 3.12 Les étapes de la pulvérisation des papiers avec la machine CLC.....	73
Figure 4.1 Zone de lyse observées sur un tapis bactérien suite à l'activité antibactérienne de différentes huiles essentielles : A) témoin de croissance bactérienne, B) épinette noire, C) menthe poivrée, D) huile de cèdre, E) clou de girofle et E) bouleau jaune.	76
Figure 4.2 Infectivité des phages P100 et du cocktail des phages ListShield sur <i>L.</i> <i>monocytogenes</i> . TB : bouillon Trypticase.....	77
Figure 4.3 Zones de lyse observées sur la culture de <i>L. monocytogenes</i> après exposition aux phages A) P100 et B) ListShield.	78
Figure 4.4 A) Boîte de Pétri contenant un milieu de culture TA sans <i>L. monocytogenes</i> ; B) Boîte de Pétri contenant <i>L. monocytogenes</i>	79
Figure 4.5 Zones de lyse observée après application de 20 µl d'un mélange de phages P100 avec les huiles essentielles A) témoin de croissance bactérienne, B) épinette noire, C) menthe poivrée, D) huile de cèdre, E) clou de girofle et E) bouleau jaune.	80
Figure 4.6 Zone de lyse obtenue après application de 20 µl de la solution de phages P100 (10^{11} PFU/ml) sur <i>L. monocytogenes</i> à différentes concentrations (10^4 à 10^9 CFU/ml), après 24 heures d'incubation à 30°C.....	83
Figure 4.7 Zone de lyse en fonction du temps avec une concentration de phage fixe (10^{11} PFU/ml) et pour les concentrations bactériennes variant entre 10^4 CFU/ml et 10^9 CFU/ml. Les valeurs représentent la moyenne de trois mesures (n = 3) et les barres d'erreur indiquent l'écart-type.	84
Figure 4.8 Plan de disposition des puits de la plaque expérimentale (lignes A-H et colonnes 1-12) indiquant les concentrations initiales en <i>L. monocytogenes</i> (CFU/ml, dénominateur) et en phages P100 (PFU/ml, numérateur).....	87
Figure 4.9 Courbes de croissance bactérienne obtenues à partir d'expérience d'interaction phages P100-bactéries <i>L. monocytogenes</i> dans un lecteur de plaques.....	87

Figure 4.10 Croissance bactérienne de <i>L. monocytogenes</i> (concentration initiale 10^4 CFU/ml) sans et en présence des phages à plusieurs concentrations (10^4 - 10^7 PFU/ml).....	89
Figure 4.11 Croissance bactérienne de <i>L. monocytogenes</i> (concentration initiale 10^5 CFU/ml) sans et en présence des phages à plusieurs concentrations (10^4 - 10^8 PFU/ml).....	90
Figure 4.12 Croissance bactérienne de <i>L. monocytogenes</i> (concentration initiale 10^6 CFU/ml) sans et en présence des phages à plusieurs concentrations (10^4 - 10^8 PFU/ml).....	92
Figure 4.13 Croissance des bactéries isolées sur A) le milieu de culture TA, B) et C) sur le milieu sélectif Oxford.....	93
Figure 4.14 Tapis bactérien après 24 heures d'interaction avec les phages P100 (incubation à 30°C).	94
Figure 4.15 Croissance bactérienne de <i>L. monocytogenes</i> (concentration initiale 10^7 CFU/ml) sans et en présence des phages à plusieurs concentrations (10^4 - 10^8 PFU/ml).....	95
Figure 4.16 Croissance bactérienne de <i>L. monocytogenes</i> (concentration initiale 10^8 CFU/ml) sans et en présence des phages à plusieurs concentrations (10^4 - 10^8 PFU/ml).....	97
Figure 4.17 Images obtenues par microscopie électronique à balayage (MEB, 10.0 kV, x250) illustrant la morphologie de surface des différents papiers : (A) 30K, (B) 50K et (C) 50F.	101
Figure 4.18 Images obtenues par microscopie électronique à balayage (MEB, 10.0 kV, x250) illustrant la morphologie des différents papiers : (E) 50KCal, (F) 50FCal.	103
Figure 4.19 Gouttes d'eau sur différents papiers ; le type, le temps de capture (t) et l'angle de contact (θ) sont indiqués sous chaque image.	105
Figure 4.20 Variation de l'angle de contact en fonction du temps d'une goutte d'eau déposée sur des papiers de grammage 30 g/m ² (K, K Cal, F, F Cal et F 2% AKD).	106
Figure 4.21 Valeurs des angles de contact des différents types de papier utilisés.....	107

Figure 4.22 Gouttes d'eau déposées sur un papier 50K : A) goutte d'eau (angle de contact $\theta = 98^\circ$) ; B) goutte d'eau contenant 0,5 % de Tween 80 (angle de contact $\theta \approx 0^\circ$ après 70 secondes).....	108
Figure 4.23 Variation de l'angle de contact en fonction de temps pour une goutte d'eau contenant 0,5 % du tensioactif Tween 80 déposée sur le papier 50K.....	109
Figure 4.24 Valeurs moyennes des angles de contact mesurés 4 secondes après le dépôt d'une goutte de solution aqueuse contenant 0,5 % de l'agent tensioactif Tween 80 sur différents papiers.	110
Figure 4.25 Zones de lyse observées sur les papiers 50K traités avec la solution de phage P100 (10^{11} PFU/ml), appliquée sur des tapis bactériens de différentes concentrations après 24 heures d'incubation à 30°C	112
Figure 4.26 Zone de lyse en fonction du temps (incubation à 30°C) pour une concentration bactérienne 10^9 CFU/ml.	113
Figure 4.27 Zone de lyse en fonction du temps pour les concentrations bactériennes variant entre 10^5 CFU/ml et 10^9 CFU/ml.....	114
Figure 4.28 Zone de lyse des papiers 50K traités avec des concentrations de phages (10^{11} , 10^{10} , 10^9 , 10^8 et 10^7 PFU/ml) après 24 heures d'incubation.....	115
Figure 4.29 Images obtenues par microscopie électronique à balayage (MEB, 10,0 kV, $\times 250$) illustrant la morphologie des papiers de base après dépôt de phages : (A) 30K + phages et (B) 50K + phages.	116
Figure 4.30 Zone de lyse de différents types de papiers. T = témoin (papier non traité). Les autres disques sont traités. Dépôt central : phages seuls.	117
Figure 4.31 Zone de lyse des différents types de papier après une période d'incubation de 24 heures en présence d'une concentration bactérienne de 10^9 CFU/ml.....	118
Figure 4.32. Concentration logarithmique des phages libérés par les papiers en fonction du temps d'immersion dans la solution SM.....	120
Figure 4.33 Croissance bactérienne de <i>L. monocytogenes</i> (concentration initiale 10^4 CFU/ml) sans et en présence de papiers (30K) traités avec différentes concentrations des phages (10^8 - 10^{11} PFU/ml).....	122

Figure 4.34 Croissance bactérienne de <i>L. monocytogenes</i> (concentration initiale 10^5 CFU/ml) sans et en présence des papiers (30K) traités avec différentes concentrations de phages (10^8 - 10^{11} PFU/ml).	123
Figure 4.35 Croissance bactérienne de <i>L. monocytogenes</i> (concentration initiale 10^6 CFU/ml) sans et en présence des papiers (30K) modifiés à plusieurs concentrations de phages (10^8 - 10^{11} PFU/ml).	125
Figure 4.36 Croissance bactérienne de <i>L. monocytogenes</i> (concentration initiale 10^4 CFU/ml) sans et en présence des papiers (50K) modifiés à plusieurs concentrations de phages (10^8 - 10^{11} PFU/ml).	126
Figure 4.37 Croissance bactérienne de <i>L. monocytogenes</i> (concentration initiale 10^5 CFU/ml) sans et en présence des papiers (50K) modifiés à plusieurs concentrations de phages (10^8 - 10^{11} PFU/ml).	127
Figure 4.38 Croissance bactérienne de <i>L. monocytogenes</i> (concentration initiale 10^6 CFU/ml) sans et en présence des papiers (50K) modifiés à plusieurs concentrations de phages (10^8 - 10^{11} PFU/ml).	128
Figure 4.39 Croissance bactérienne de <i>L. monocytogenes</i> (10^8 CFU/ml) sur une période de 72 heures pour les papiers après des temps de séchage variés (2 heures, 6 heures, 24 heures, 1 et 2 semaines).	130
Figure 4.40 Croissance bactérienne de <i>L. monocytogenes</i> (10^8 CFU/ml) sur une période de 72 heures pour les deux papiers 30K et 50K après un temps de séchage de 2 heures et 6 heures.	132
Figure 4.41 Évolution de la concentration logarithmique des phages sur un support en papier de type 30K, en fonction de l'humidité et du temps d'entreposage.	134
Figure 4.42 Évolution de la concentration logarithmique des phages sur un support en papier de base 50K, en fonction de l'humidité et du temps d'entreposage.	134
Figure 4.43 Aire de la zone de lyse de papiers de type 30K traités avec des phages en fonction de l'humidité et du temps.	136
Figure 4.44 Aire de la zone de lyse de papiers de type 50K traités avec des phages en fonction de l'humidité et du temps.	137
Figure 4.45 Activité antibactérienne pour différents types de papiers traités selon le volume de l'indice Cobb après 24 heures et 48 heures d'incubation (30°C).	

Concentrations appliquées (PFU/cm ²) : 30K = 3,08×10 ⁸ ; 50K = 1,98×10 ⁸ ; 30F = 4,63×10 ⁸ ; 50F = 7,78×10 ⁸ ; 90F = 1,38×10 ⁹ ; 130F = 1,64×10 ⁹	140
Figure 4.46 Zone de lyse, après 24 heures d'incubation, pour les formettes standards et les papiers de base traités avec des phages, ajustée en fonction du volume de l'indice Cobb.	141
Figure 4.47 Croissance bactérienne de <i>L. monocytogenes</i> (concentration initiale 10 ⁴ CFU/ml) en présence des papiers traités avec une quantité de phages selon le volume de l'indice Cobb.	142
Figure 4.48 Activité antibactérienne pour différents types de papiers traités en fonction de la moitié du volume de l'indice Cobb après 24 heures et 48 heures d'incubation.	144
Figure 4.49 Zone de lyse, après 24 heures d'incubation, pour les formettes standards et les papiers de base traités avec des phages, ajustée en fonction du volume correspondant à la moitié de l'indice Cobb.	145
Figure 4.50 Image obtenue par microscopie électronique à balayage (MEB, 10,0 kV, ×250) illustrant la morphologie du papier 50KCal après dépôt de phages.	146
Figure 4.51 Activité antibactérienne des papiers calandrés traités avec des phages selon le volume déterminé par l'indice Cobb après 24 heures et 48 heures d'incubation.	147
Figure 4.52 Activité antibactérienne pour les différents types de papier calandré traités avec des phages selon un volume de la moitié de l'indice Cobb après 24 heures et 48 heures d'incubation.	147
Figure 4.53 Zone de lyse, après 24 heures d'incubation, pour les formettes standards calandrées et les papiers de base calandrés traités avec des phages ajustés en fonction de volumes de l'indice Cobb.	148
Figure 4.54 Zone de lyse, après 24 heures d'incubation, pour les formettes standards calandrées et les papiers de base calandrés traités avec des phages, ajustée en fonction de la moitié de l'indice Cobb.	148
Figure 4.55 Activité antibactérienne pour les formettes standards contenant 0,5 % d'AKD et modifiées selon le volume de l'indice Cobb après 24 heures et 48 heures d'incubation.	150

Figure 4.56 Activité antibactérienne pour les formettes standards contenant 1 % d'AKD et modifiées selon le volume de l'indice Cobb après 24 heures et 48 heures d'incubation.	150
Figure 4.57 Activité antibactérienne pour les formettes standards contenant 2 % d'AKD et traitées selon le volume de l'indice Cobb après 24 heures et 48 heures d'incubation.	151
Figure 4.58 Zone de lyse mesurée après 24 heures d'incubation, pour les formettes standards contenant de l'AKD et traitées avec des phages, ajustée en fonction du volume de l'indice Cobb.....	152
Figure 4.59 Activité antibactérienne pour les formettes standards contenant 0,5 % d'AKD et traitées selon le volume de la moitié de l'indice Cobb après 24 heures et 48 heures d'incubation.	153
Figure 4.60 Zone de lyse, mesurée après 24 heures d'incubation pour les formettes standards contenant de l'AKD, traités avec des phages selon un volume correspondant à la moitié de l'indice Cobb.	154
Figure 4.61 Activité antibactérienne pour les papiers de base et les formettes standards, traités selon le volume de l'indice Cobb et soumis à différents temps de séchage, évalués après 24 heures d'incubation.	155
Figure 4.62 Croissance bactérienne de <i>L. monocytogenes</i> (concentration initiale 10^4 CFU/ml) en présence des papiers traités avec une quantité de phages selon le volume de l'indice Cobb et séchés pendant 2 heures.	157
Figure 4.63 Activité antibactérienne pour les formettes standards, traités selon le volume de l'indice Cobb et soumis à une humidité de 80% pendant 24 heures à température ambiante avant évaluation antibactérienne après 24 heures d'incubation.....	158
Figure 4.64 Croissance bactérienne de <i>L. monocytogenes</i> (concentration initiale de 10^4 CFU/ml) en absence et en présence de Tween 80 à une concentration de 0,5 %. .	160
Figure 4.65 Activité antibactérienne de la solution de phages sans et avec Tween 80 après 24 heures d'incubation à 30°C.	160
Figure 4.66 Activité antibactérienne pour les papiers de base et les formettes standards, traités selon le volume de l'indice Cobb avec une solution de phage contenant 0,5% de la solution Tween 80, évalués après 24 heures d'incubation.....	161

Figure 4.67 Croissance de <i>L. monocytogenes</i> (concentration initiale 10^4 CFU/ml) en présence des papiers traités avec une quantité des phages selon le volume de l'indice Cobb en présence de Tween 80.....	162
Figure 4.68 Activité antibactérienne pour les formettes standards (2% AKD), traités selon le volume de l'indice Cobb avec une solution de phages contenant 0,5% de la solution Tween 80, évalués après 24 heures d'incubation.	164
Figure 4.69 Activité antibactérienne pour les papiers 50K traités avec une solution de phages par pulvérisation manuelle.	166
Figure 4.70 Activité antibactérienne de la solution de phages émise par la buse et de la solution initiale de phages.	167
Figure 4.71 Activité antibactérienne pour les papiers 50F et 50K traités avec une solution de phages pulvérisée à l'aide du CLC, sans séchage et après séchage.	168

Liste des Tableaux

Tableau 1.1 Éclosions marquantes, attribuées au <i>L. monocytogenes</i> , au Canada et aux États-Unis au cours des dernières années.	2
Tableau 2.1 Les bactéries pathogènes le plus répandues dans le domaine alimentaire.	9
Tableau 2.2 Principales classes d'agents antibactériens biologiques utilisés en emballage alimentaire actif, avec leurs mécanismes d'action, avantages et limites.	23
Tableau 2.3 Efficacité des phages sur des produits alimentaires.	34
Tableau 4.1 Propriétés physiques des papiers de base et des papiers formettes standards.	100
Tableau 4.2 Propriétés physiques des papiers de base (K) et formettes standards (F) calandrés.	102
Tableau 4.3 Propriétés physiques des papiers formettes standards avec AKD.	104
Tableau 4.4 Volume de phages utilisé et concentration de phages par cm ² pour chaque type de papier (en fonction de la valeur Cobb).	139

Liste des Équations

Équation 3.1 : concentration de phages.....	59
Équation 3.2 Calcul de la multiplicité d'infection (MOI).....	62
Équation 3.3 Calcul de la réduction logarithmique ($\log_{10}$) de la population bactérienne, définie comme le logarithme du rapport entre la concentration bactérienne dans le témoin et celle de l'échantillon traité au temps t.....	64

Liste des Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AKD	Alkylcétène dimère
CMC	Concentration Micellaire Critique
dil	Dilution
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Innofibre	Centre d'innovation des produits celluloseux
KSP	<i>Kruger Specialty Papers</i>
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
MOI	Multiplicité d'Infection
PNB	Produits nationaux bruts
rpm	Tour par minute
TA	Trypticase Agar
T	Température
TB	Bouillon Trypticase
CFU	<i>Colony-Forming Units</i>
PFU	<i>Plaque-Forming Units</i>
UQTR	Université du Québec à Trois-Rivières
V	Volume

Chapitre 1 - Introduction

1.1 Contexte et problématiques

Aujourd'hui, l'importance de la sécurité alimentaire pour l'industrie et la société civile est sans précédent. Les produits dits « prêts à manger » occupent une place de plus en plus importante dans les habitudes alimentaires contemporaines. Ils se définissent comme des aliments destinés à être consommés sans autre traitement thermique ou transformation supplémentaire, à l'exception, lorsque cela est nécessaire, de manipulations mineures comme le lavage ou la découpe. Cette catégorie inclut, entre autres, les viandes et charcuteries tranchées, les fromages fins, les salades préparées, les fruits et légumes prélavés ainsi que divers plats transformés et emballés. Si ces produits répondent à la demande croissante de commodité, ils présentent en contrepartie un risque accru de contamination microbiologique, car l'absence de traitement thermique final ne permet pas d'éliminer d'éventuels pathogènes [1, 2]. Bien que les industries agroalimentaires aient renforcé leurs mesures de sécurité, les statistiques montrent une augmentation globale des incidents d'intoxication alimentaire. Cette tendance est attribuée en partie à la préférence croissante des consommateurs pour les produits alimentaires préparés et prêts à manger, lesquels présentent un risque accru de contamination. Les produits associés à ces risques incluent notamment les viandes, les produits laitiers et les charcuteries. La situation souligne le besoin d'améliorer les protocoles de traitement, de conservation et de manipulation des aliments dans le but de garantir la sécurité alimentaire à tous les niveaux de la chaîne de production et de distribution [3].

Les incidents d'intoxication alimentaire provoquent des rappels de produits alimentaires contaminés par des bactéries pathogènes comme *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) et *Escherichia coli* (*E. coli*). Par exemple au Canada, une éclosion de *L. monocytogenes* en 2024 liée à une boisson végétale a entraîné plusieurs hospitalisations et décès [4], tandis qu'une éclosion d'*E. coli* survenue en 2023 dans des garderies en Alberta [5]. Ces bactéries demeurent donc une menace majeure pour la santé publique. En plus d'être une cause importante de mortalité, ces pathogènes alimentaires ont un impact économique considérable à l'échelle mondiale. Chaque année, environ 4 millions de Canadiens (1 sur

8) sont touchés par une maladie d'origine alimentaire. Parmi ces cas, il y a environ 11 600 hospitalisations et 238 décès [6]. Les conséquences économiques de ces contaminations sont non négligeables, avec un coût moyen de traitement des maladies gastro-intestinales graves au Canada estimé à environ 91 dollars canadiens par cas. Ce coût annuel estimé par cas varie de 23 à 1 294 dollars canadiens [7].

L. monocytogenes est parmi les principales causes d'intoxication alimentaire et se distingue des autres pathogènes alimentaires par le nombre de décès qu'elle cause. Chaque année, environ 178 cas d'infection invasive à *L. monocytogenes* sont déclarés au Canada, causant environ 35 décès [8]. Aux États-Unis, cette bactérie est responsable de 1 600 cas par an avec un taux de mortalité de 16 % [9]. Un fait marquant au Canada en 2008 a été l'infection rare et grave causée par *L. monocytogenes* ayant contaminé la viande provenant de la marque Maple Leaf [10]. Dans la même année, cette bactérie a causé la perte de plusieurs millions de dollars au Québec à la suite d'une contamination de fromage fins artisanaux, principalement des fromages à pâte molle et à croûte lavée, mais aussi certains fromages à pâte semi-ferme et ferme, à travers la province [11]. Des éclosions marquantes, au Canada et aux États-Unis, attribuées à *L. monocytogenes*, ont été apportées dans la littérature et sont répertoriées dans le Tableau 1.1 [12].

Tableau 1.1 Éclosions marquantes, attribuées à *L. monocytogenes*, au Canada et aux États-Unis au cours des dernières années.

Année	Aliments contaminés	Cas	Hospitalisations	Décès
2024	Charcuterie	59	59	10
2023 - 2024	Boissons végétales réfrigérées	20	15	3
2014 - 2023	Queso fresco et fromage cotija	26	23	2
2023	Pêches, nectarines et prunes entières	11	10	1
2023	Légumes feuilles	19	18	0
2022	Charcuterie et fromages	16	13	1
2022	Crème glacée	28	27	1
2019	Poulet en dés cuit	7	6	0
2016	Salades emballées	14	14	3
2008	Charcuterie	57	47	22

Les contaminations alimentaires surviennent entre autres lors du processus de transformation des aliments. Il est fréquent que les surfaces alimentaires soient exposées à des

contaminations microbiennes. Ces contaminations peuvent survenir à n'importe quelle étape de la chaîne de production, souvent en raison de l'utilisation d'équipements contaminés, par exemple des ustensiles de coupe de viande. Ces instruments peuvent transmettre des quantités importantes de bactéries pathogènes à des produits destinés à la consommation, souvent sans modification visible (ex. : altérations de l'aspect ou de l'odeur). Toutefois, la consommation de ces produits contaminés peut provoquer des maladies. Le contrôle et la surveillance de ces agents pathogènes représentent des défis majeurs sur les plans technique et économique. Des mesures préventives sont ainsi mises en place pour minimiser les risques pour la santé associés à ces bactéries pathogènes, y compris les infections et autres troubles liés.

Pour prévenir les contaminations alimentaires, les emballages ont aussi un rôle à jouer. Outre leur rôle d'information au consommateur, qui inclut la fourniture d'informations sur le produit telles que la marque, les ingrédients, et la date de péremption, l'objectif principal de ces emballages est d'isoler les aliments de l'environnement extérieur. Cette isolation aide à minimiser l'exposition aux agents contaminants et dégradants, tels que les microorganismes, l'humidité, l'oxygène, et les odeurs indésirables, tout en préservant des propriétés bénéfiques comme les arômes. Un emballage efficace permet donc de prolonger la durée de vie des produits alimentaires au cours de leur stockage et de leur transport et de réduire le gaspillage alimentaire. Un emballage peut aussi être conçu de façon à lui conférer des propriétés antibactériennes pour réduire davantage les risques de contamination.

Le secteur de l'emballage constitue une part importante de l'industrie mondiale. Dans les pays développés, il représente environ 2 % du produit national brut, et l'emballage alimentaire n'en constitue qu'un segment spécifique, aux côtés des emballages secondaires et tertiaires utilisés pour la logistique et la distribution de biens de consommation (Robertson 2006 cité par Topuz) [13], dont près de la moitié de cette production est attribuable à l'emballage alimentaire (Robertson, 2013, cité par Poças) [14]. À titre d'exemple, le marché canadien de l'emballage alimentaire a généré environ 10,9 milliards de dollars américains en 2024 et devrait atteindre environ 14,6 milliards de dollars américains d'ici 2030 [15]. Cette importance économique du secteur de l'emballage, combinée à la nécessité de solutions durables et sécuritaires pour l'alimentation, justifie

l'intérêt de développer de nouveaux matériaux biosourcés et fonctionnels, tels que ceux ciblés par ce projet. Soulignons que l'industrie des pâtes et papiers comme Kruger Inc. et Cascades ainsi que des multinationales, comme Nestlé, sont plus actives dans le secteur de l'emballage et misent sur ce secteur pour se démarquer de leurs concurrents et augmenter le nombre de clients dans le vaste domaine agro-alimentaire.

La majorité des emballages alimentaires sont constitués de polymères synthétiques issus de sources non renouvelables, tels que le polyéthylène (PE), le polypropylène (PP), le polystyrène (PS), le polyéthylène téréphtalate (PET) et le polychlorure de vinyle (PVC). Ces matériaux ont un coût relativement faible et procurent des propriétés physiques avantageuses. Cependant, ces matériaux posent de sérieux problèmes environnementaux en fin de vie. Par exemple, en 2018, seulement 9 % des plastiques produits dans le monde ont été recyclés, tandis que 12 % ont été incinérés et environ 79 % se sont accumulés dans des sites d'enfouissement ou dans l'environnement naturel [16]. Souvent, ces polymères ne sont pas recyclables en raison de leur faible valeur sur le marché, et leur disposition finale entraîne des conséquences environnementales importantes, notamment la pollution des sols, la contamination des eaux et l'accumulation de microplastiques dans les écosystèmes [17, 18]. Cette réalité environnementale, conjuguée aux préoccupations croissantes des consommateurs et aux contraintes réglementaires, souligne l'importance d'explorer des alternatives plus durables, telles que les emballages biosourcés et biodégradables étudiés dans ce projet. Dans ce contexte, de nombreuses législations internationales sont mises en place pour encourager l'utilisation de matériaux plus durables. Parallèlement, une conscience écologique accrue parmi les consommateurs les incite à privilégier des solutions d'emballage ayant un moindre effet nuisible sur l'environnement. Ce mouvement reflète une exigence croissante pour des pratiques de consommation durables et responsables [19].

Pour répondre aux enjeux associés aux intoxications alimentaires tout en réduisant l'impact environnemental des emballages à base de polymères synthétiques, une solution prometteuse réside dans le développement d'emballages fabriqués à partir de matériaux biosourcés et compostables. Ces nouveaux types d'emballages intégreraient des agents

antibactériens capables de réduire ou de limiter la prolifération des bactéries pathogènes [20]. Rappelons que l'utilisation de matériaux biosourcés contribue à réduire la dépendance aux ressources fossiles et favorise une meilleure intégration des produits dans les cycles biologiques, assurant ainsi une décomposition naturelle sans résidus nocifs.

Dans cette optique, il est essentiel que les agents antibactériens employés soient non seulement efficaces contre les pathogènes spécifiques mais aussi sûres lors de leur contact avec les aliments. Les agents antibactériens sont nombreux tel que les huiles naturelles, des nanoparticules d'argent, la nisine, les peptides antibactériens, des bactériophages, etc. Ceci implique un choix rigoureux d'agents antibactériens et de composés pour leur formulation, qui doivent être certifiés de grade alimentaire, afin d'assurer la sécurité des consommateurs et de minimiser les risques pour la santé. En parallèle, du point de vue économique, l'adoption de ces technologies doit être viable, ce qui nécessite une évaluation approfondie des coûts de production et de mise en œuvre.

Parmi les agents antibactériens dans le secteur de l'emballage, les bactériophages sont prometteurs, principalement en raison de leur spécificité. Ils n'altèrent pas la flore microbienne non ciblée présente dans les aliments, ni la qualité des aliments, mais leur mise en œuvre nécessite une connaissance fine des pathogènes ciblés et une maîtrise des conditions de conservation, sans oublier les aspects techniques concernant leur incorporation ou leur application à la surface d'un emballage. Des compagnies comme Intralytix (États-Unis) et Micros (Pays-Bas) produisent et commercialisent plusieurs phages commerciaux pour l'industrie alimentaire, mais ils sont utilisés pour la désinfection avant ou pendant le processus d'emballage et ils ne sont pas incorporés à l'emballage ou appliqués à sa surface. Des recherches systématiques sont requises pour intégrer ces bactériophages dans les emballages et les avancées scientifiques sont prometteuses.

Une approche à explorer serait d'incorporer ces agents en surface des emballages afin de limiter la prolifération bactérienne, contribuant ainsi à prolonger la durée de conservation des aliments, à réduire le gaspillage et à limiter les risques d'intoxication. Cette stratégie aligne sécurité alimentaire, durabilité environnementale et responsabilité économique, et constituerait une avancée majeure vers la mise en place d'un système de production durable et respectueux de l'environnement.

1.2 Contexte industriel spécifique du partenaire

Avec l'avancée technologique en matière d'appareils électroniques, une diminution significative de la demande en journaux imprimés est observée. En réponse à cette tendance, l'industrie des pâtes et papiers est confrontée à la nécessité de diversifier leur offre. Pour rester compétitives, elles explorent des avenues de produits novateurs tout en maximisant l'utilisation de leurs infrastructures existantes.

Dans ce contexte, Kruger avait annoncé un investissement de 120 M\$ pour diversifier ses usines de Bromptonville et Wayagamack afin de mettre sur le marché des produits spécialisés à base des celluloses, dont des produits de grade alimentaire. Une nouvelle entité appelée Kruger Specialty Papers (KSP) avait alors été créée pour porter cette diversification. Les emballages alimentaires fonctionnels contenant des agents antibactériens comme les bactériophages font partie de ces produits. Des recherches sont nécessaires pour développer et appliquer des formulations antibactériennes à base des bactériophages. Par la suite, des essais d'application à l'échelle pilote permettrait de valider la faisabilité de fabriquer ce type de produit dans les installations de la compagnie au Québec. Parmi les nouvelles connaissances à développer, il serait essentiel de vérifier si les conditions spécifiques des procédés de fabrication du papier, telles que la température lors du séchage du papier, l'humidité finale ou l'impact mécanique subi par les phages, affectent leur activité antibactérienne.

1.3 Projet de recherche

Ce projet de doctorat s'inscrit donc dans un projet global réalisé en collaboration avec Innofibre du Cégep de Trois-Rivières (QC, Canada) et l'entreprise Kruger et a pour objectif général de développer un emballage alimentaire antibactérien à base de fibres celluliques intégrant des bactériophages actifs contre un pathogène alimentaire causant le plus de décès lors de contamination alimentaire, soit *Listeria monocytogenes*. Les résultats de ce projet de recherche permettront de proposer une solution innovante permettant de réduire le risque de contamination des aliments prêts à manger tout en assurant la faisabilité industrielle du procédé et en favorisant l'utilisation de matériaux biosourcés et biodégradables.

La thèse est divisée en plusieurs chapitres. D'abord, une revue de littérature est présentée sur les emballages alimentaires bioactifs, les bactériophages et leur incorporation dans des matrices ou leur application à la surface. Ensuite, les hypothèses et les objectifs de recherche sont présentés, suivis de la méthodologie retenue. Les résultats sont finalement présentés et discutés. Les conclusions et les perspectives de recherche terminent cette thèse.

Chapitre 2 - Revue de la littérature

Ce chapitre est divisé en plusieurs sections. La première section traite brièvement des principales bactéries pathogènes d'origine alimentaire impliquées dans les toxico-infections, puis introduit plus spécifiquement *L. monocytogenes*, une bactérie particulièrement préoccupante en raison de sa capacité d'adaptation et de la sévérité des infections qu'elle provoque. La deuxième section porte sur les emballages alimentaires et plus particulièrement les emballages antibactériens pour la sécurité alimentaire. La troisième partie explore les agents antibactériens, notamment les bactériophages et leurs applications. La quatrième section est dédiée à l'état de l'art sur le développement des papiers bioactifs, en mettant en avant l'utilisation des phages comme agents antibactériens. De plus, cette section fait l'état des connaissances actuelles sur les propriétés des papiers et de leurs surfaces, qui influencent leur efficacité antibactérienne. Enfin, le chapitre se conclut par les hypothèses et les objectifs spécifiques du projet.

2.1 Les bactéries pathogènes alimentaires

Les bactéries sont omniprésentes dans l'environnement et la vie quotidienne [21]. La réduction de l'exposition humaine à ces agents pathogènes a d'importantes répercussions sur la santé publique et sur l'économie. C'est particulièrement le cas des bactéries pathogènes d'origine alimentaire. Les trois espèces de bactéries pathogènes les plus répandues dans le domaine alimentaire, les maladies qui y sont associées, les symptômes et les sources sont résumées dans le Tableau 2.1. *L. monocytogenes* est la bactérie pathogène alimentaire qui fait l'objet du présent projet, car, par rapport aux autres, elle est responsable de nombreux décès dans ses nombreux cas recensés de contaminations alimentaires.

Tableau 2.1 Les bactéries pathogènes le plus répandues dans le domaine alimentaire.

Bactéries	Maladies	Symptômes	Sources	Réf.
<i>L. monocytogenes</i>	Listériose	Fièvres, Douleurs musculaires, Pertes d'équilibres	Les produits : laitiers, viandes, marins, végétaux (fruits et légumes)	22
<i>Salmonella</i> sp.	Gastroentérites, Fièvre typhoïde	Fièvres, Diarrhées, Vomissements	Fruits et légumes non lavés, Viandes non cuites, Œufs	23
<i>E. coli</i>	Gastroentérites	Nausées, Vomissements, Pertes de sang, Crampes d'estomac, Peu ou pas de fièvre	Viande non cuite, Lait (cru) et fromages non pasteurisés, Jus	24

2.2 *Listeria monocytogenes*

2.2.1 Historique

L. monocytogenes est une bactérie Gram positive et ubiquitaire, isolée pour la première fois en juillet 1924 en Angleterre lors d'une épidémie touchant des lapins et des cobayes de laboratoire. Elle a été identifiée comme l'agent responsable d'une élévation anormale du taux de monocytes chez les animaux malades [25].

2.2.2 Écologie de *L. monocytogenes*

L. monocytogenes se retrouve fréquemment dans l'environnement, notamment sur les mains, dans les réfrigérateurs et sur diverses surfaces en contact avec les aliments [22]. C'est une bactérie mésophile capable de proliférer dans différents biotopes comprenant les écosystèmes naturels (terre et eau), les denrées alimentaires, le tractus intestinal des animaux et les surfaces inertes. Elle peut survivre jusqu'à deux ans dans les sols humides. Ses cellules peuvent résister aux traitements de nettoyage-désinfection et ainsi persister, entre autres, dans les ateliers de production de l'industrie agroalimentaire [26]. Par ailleurs, *L. monocytogenes* tolère le froid. Contrairement à la plupart des bactéries, elles continuent à se multiplier à basse température, mais à un rythme plus lent. Il s'agit donc d'une

bactérie psychotrophe. Elle supporte également de fortes doses de sel, plus de 10 g/L. Elle peut coloniser les saumures. Les souches de *L. monocytogenes* sont détruites par la pasteurisation (15 secondes à 72°C), par les désinfectants usuels et par une acidité assez forte ($\text{pH} < 4$) [27]. Dans de rares cas, cette bactérie environnementale peut contaminer un produit lors de son emballage, de sa distribution ou de sa manutention par le consommateur.

2.2.3 Caractéristiques

L. monocytogenes se présente sous la forme de petits bacilles droits, mesurant 0,4 à 0,5 μm de diamètre et 0,5 à 2 μm de longueur, aux extrémités arrondies. Elle peut apparaître de manière isolée ou groupée en V ou en L ou en palissades ou, parfois, en courtes chaînes ou petits amas [28]. La Figure 2.1 représente une image obtenue par un microscope électronique à balayage de *L. monocytogenes* [29].

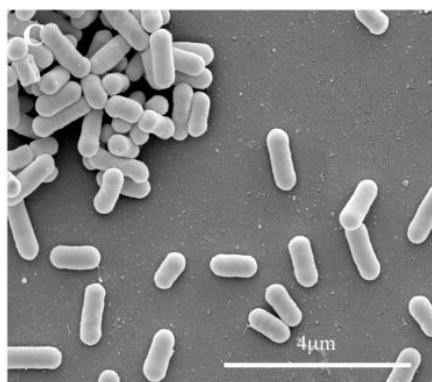


Figure 2.1 Morphologie de *L. monocytogenes* obtenue par un microscope électronique à balayage.

Ce sont des bactéries, non acidorésistantes, non capsulées, non sporulées aéro-anaérobies facultatives et mobiles (lorsqu'elles sont cultivées à 20°C). Elles peuvent être cultivées sur des milieux classiques, tels qu'une gélose nutritive ou une gélose au sang [26].

Les scientifiques s'entendent généralement sur le fait que de faibles concentrations de *L. monocytogenes* ne sont pas inhabituelles dans l'environnement du secteur de l'alimentation et que ces faibles concentrations sont généralement consommées par des gens en santé sans danger apparent. La plupart des gens sont exposés de façon routinière à

L. monocytogenes sans avoir de problèmes de santé. Bien que la dose infectieuse soit évaluée à 10^4 à 10^6 CFU *L. monocytogenes*/gramme de produit ingéré [30, 31], certains pays considèrent la présence de la bactérie à une concentration de 10^2 à 10^3 CFU/g dans l'aliment comme un risque faible pour la plupart des consommateurs [32].

2.2.4 Listériose

La listériose est une maladie d'origine alimentaire causée par *L. monocytogenes* [33]. Elle touche le plus souvent les nouveau-nés, les personnes immunodéprimées, les aînés et les femmes enceintes [34]. En général, les symptômes des formes bénignes apparaîtront beaucoup plus tôt que ceux des formes sévères. Parmi les symptômes de listériose, citons les crampes, la diarrhée, les maux de tête, les frissons, la fatigue, des douleurs musculaires et articulaires, la nausée, la fièvre persistante et les vomissements. Les symptômes apparaissent le plus souvent entre 3 et 30 jours après la consommation d'aliments contaminés, mais parfois même jusqu'à 70 jours plus tard [35]. L'infection évolue rarement vers une méningo-encéphalite (infection du cerveau et des tissus avoisinants) ou une septicémie (infection généralisée due à la présence de bactéries dans le sang) dont certaines sont mortelles. Au total, 20 à 30 % des personnes atteintes de formes graves décèdent. Chaque année, une soixantaine de cas sont déclarés au Canada [36]. Le 11 octobre 2024, Santé Canada a publié les résultats d'une enquête épidémiologique révélant 20 cas de listériose d'origine alimentaire liés à la consommation de boissons réfrigérées entre août 2023 et mi-juillet 2024. Parmi ces cas, 15 personnes ont été hospitalisées et trois décès ont été confirmés [37]. Ces incidents soulignent la gravité d'une contamination par *L. monocytogenes* dans des produits pourtant considérés comme à faible risque, mettant en évidence la nécessité de renforcer les mesures de contrôle, de détection et d'élimination de cette bactérie pour assurer la sécurité des aliments et en particulier les aliments prêts à manger.

La listériose se traite généralement par l'administration rapide d'antibiotiques à large spectre, en particulier la pénicilline ou l'ampicilline, seules ou en association avec la gentamicine, selon la gravité de l'infection et le statut immunitaire du patient. Chez les patients allergiques à la pénicilline, des alternatives comme le triméthoprim-sulfaméthoxazole peuvent être envisagées [38]. Toutefois, l'utilisation des antibiotiques peut parfois être limitée par l'émergence de souches bactériennes résistantes, ce qui complique la

prise en charge des infections. Le diagnostic précoce est essentiel pour limiter la gravité de l'infection, en particulier chez les populations à risque. Cependant, la prévention reste la stratégie la plus efficace, en particulier par le contrôle des sources de contamination tout au long de la chaîne alimentaire. À ce titre, les emballages alimentaires représentent une solution complémentaire essentielle pour améliorer la sécurité des aliments, notamment ceux prêts à manger.

Compte tenu des risques sanitaires élevés associés à *L. monocytogenes* et de sa présence potentielle dans divers aliments prêts à manger, plusieurs autorités réglementaires ont établi des seuils stricts de réduction bactérienne afin d'assurer la sécurité alimentaire. La section suivante présente les principales références réglementaires et normes de réduction logarithmique utilisées dans l'industrie alimentaire pour contrôler ce pathogène.

2.2.5 Rôle des emballages dans la protection des aliments

L'emballage alimentaire ne se limite pas à contenir un produit, il participe ainsi activement à la préservation de la qualité, de la fraîcheur, et à la sécurité des aliments tout au long de leur cycle de vie [39, 40, 41]. Cette fonction repose sur les propriétés barrières de l'emballage, définies comme sa capacité à limiter ou empêcher le transfert de gaz, d'humidité, de lumière ou de micro-organismes. Ces propriétés sont fondamentales pour préserver la qualité microbiologique, chimique et sensorielle des aliments jusqu'à leur consommation [40].

2.2.6 Références réglementaires et normes de réduction logarithmique en microbiologie alimentaire.

La réduction logarithmique est un outil utilisé en microbiologie alimentaire pour exprimer l'efficacité d'un traitement antibactérien. En pratique, elle permet de quantifier la diminution de la charge bactérienne après l'application d'un procédé de contrôle. Les normes de réduction logarithmique, dans l'industrie alimentaire, varient selon le type d'aliment, le procédé de fabrication, les réglementations locales et les exigences spécifiques de chaque entreprise. Aux États-Unis, la *Food and Drug Administration* (FDA) recommande, pour les aliments prêts à manger, une réduction minimale de 5 logs (soit une diminution d'un

facteur de 100 000) de *L. monocytogenes* avec une concentration résiduelle inférieure à 100 CFU/g [42]. Cette recommandation concerne notamment les produits laitiers, les viandes transformées et les plats préparés, qui présentent un risque particulier de contamination. Elle sert également de référence pour l'industrie, qui l'utilise pour orienter ses pratiques de fabrication et ses programmes de contrôle de la qualité. Au Canada, l'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA) applique des exigences similaires pour les aliments prêts à manger qui ne sont pas cuits avant d'être consommés [43].

Dans le contexte de cette thèse, ces normes constituent un point de comparaison pour évaluer l'efficacité des phages comme agents antibactériens, qu'ils soient appliqués directement ou immobilisés sur des papiers bioactifs. L'utilisation de la réduction logarithmique permet ainsi de mesurer de façon comparable l'effet inhibiteur du traitement sur la croissance de *L. monocytogenes* et de situer les résultats obtenus par rapport aux seuils réglementaires.

2.3 Emballages alimentaires

Cette section porte sur les différents aspects liés aux emballages alimentaires. Elle présente d'abord les principales causes de détérioration des aliments, puis décrit les rôles que jouent les emballages dans leur protection et leur conservation. Les matériaux couramment utilisés dans l'industrie alimentaire sont ensuite passés en revue, en mettant en lumière leurs propriétés et leurs limites. La section aborde également les avancées récentes en matière d'emballages actifs et bioactifs, conçus pour interagir avec les aliments ou leur environnement, ainsi que les emballages intelligents, capables de détecter des altérations. Enfin, un focus est fait sur les emballages antibactériens, qui intègrent des agents antibactériens pour limiter la prolifération bactérienne et améliorer la sécurité des aliments.

2.3.1 Causes de détérioration des aliments

Il existe plusieurs causes de détérioration des aliments, qu'ils soient d'origine microbiologique, biochimique, physique ou chimique. Ces causes peuvent être intrinsèques aux aliments ou induites au cours des étapes de transformation, de manipulation ou de conservation. Parmi elles, la dégradation microbiologique, notamment celle provoquée par les

bactéries, est généralement la plus dominante [44]. Toutefois, d'autres mécanismes, tels que l'oxydation des lipides ou un excès d'humidité favorisent la croissance de moisissures, contribuent également à une détérioration accélérée. Afin de limiter ces altérations, divers traitements sont traditionnellement utilisés, tels que le traitement thermique, la haute pression, l'irradiation, la déshydratation et les traitements chimiques. Néanmoins, malgré leur efficacité, ces procédés n'éliminent pas totalement le risque de recontamination au cours des étapes de manipulation de stockage, de transport et de distribution. C'est pourquoi il faut avoir recours à des emballages.

2.3.2 Matériaux utilisés pour les emballages alimentaires

Comme mentionné dans l'introduction, les plastiques issus de ressources non renouvelables dominent actuellement le marché des emballages alimentaires en raison de leurs propriétés techniques et de leur faible coût de production. Dans cette section, un aperçu plus large des matériaux utilisés dans l'industrie alimentaire est présenté. Outre les plastiques, les matériaux d'emballage les plus couramment utilisés sont les papiers et cartons, le verre et les métaux [45]. Les plastiques offrent une grande flexibilité et une variété d'options de forme et de taille, mais peuvent poser des défis en termes de recyclabilité et de durabilité environnementale. Les papiers et cartons offrent une bonne protection et une capacité d'impression pour la communication auprès des consommateurs. Le verre, bien que fragile, est apprécié pour son inertie chimique, sa transparence et sa recyclabilité. Enfin, les métaux tels que l'aluminium et l'acier sont souvent utilisés pour les produits à longue durée de conservation, car ils offrent une barrière efficace contre l'oxygène, la lumière et les micro-organismes [46, 47].

Chaque matériau présente des avantages et des limites. Le choix du matériau approprié dépend des besoins du produit alimentaire, des contraintes logistiques, des considérations de sécurité et des préoccupations environnementales.

2.3.3 Emballages actifs et bioactifs

En plus de son rôle principal, certains emballages peuvent être conçus pour interagir avec le produit ou son environnement. Lorsqu'ils intègrent des composés ayant une activité

biologique ciblée, on parle alors d’emballages bioactifs. Ces types d’emballage interagissent avec les aliments dans le but de prolonger leur durée de conservation, de limiter la croissance microbienne ou de préserver leurs caractères organoleptiques, telles que la couleur et les arômes [48]. En fonction de l’agent intégré, celui-ci se libère, pour offrir son activité intrinsèque telle qu’une protection antibactérienne, antioxydante et antifongique aux aliments emballés [13]. La présence des agents antibactériens permet de limiter la détérioration des aliments par des bactéries et par conséquent de prolonger sa durée de vie tout en garantissant leur sécurité alimentaire [44]. Plusieurs emballages actifs sont commercialisés, tels que des emballages antibactériens, antioxydants et des emballages émettant/généralant du dioxyde de carbone.

Les emballages actifs sont généralement classés selon leurs fonctionnalités [48] :

- Les absorbeurs : ces emballages ont la capacité d’absorber certains composés indésirables qui modifient la qualité des aliments, tels que l’oxygène, l’humidité ou les composés volatils. Leur rôle principal est de prolonger la durée de conservation en réduisant les réactions de dégradation (exemple : absorbeurs d’oxygène pour ralentir les risques d’oxydation et par conséquent la dégradation).
- Les émetteurs : ces emballages libèrent des substances actives dans l’environnement des aliments pour prévenir leur détérioration ou les protéger contre les microorganismes. Cela peut inclure des agents antibactériens, des antioxydants ou des gaz de conservation.
- Les régulateurs : ces emballages régulent les conditions environnementales à l’intérieur de l’emballage, telles que l’humidité ou la composition de l’atmosphère, pour optimiser la conservation et maintenir la qualité des aliments.

Chacune de ces fonctionnalités peut être utilisée seule ou en combinaison dans un emballage alimentaire actif, selon les besoins spécifiques du produit et les conditions de stockage.

2.3.4 Distinction avec les emballages intelligents

Il convient de distinguer les emballages actifs de certains dispositifs dits intelligents, comme les papiers indicateurs ou les capteurs, qui ne modifient pas les propriétés de

l'environnement, mais permettent de détecter un changement (présence de bactéries, d'oxygène ou d'humidité) et d'en informer visuellement le consommateur ou l'industriel, souvent par un changement de couleur [49]. De telles technologies sont de plus en plus étudiées pour leur rôle dans l'amélioration de la traçabilité, la sécurité des denrées périssables et la lutte contre le gaspillage alimentaire [50].

2.3.5 Emballages antibactériens : intégration des agents antibactériens

Parmi les différentes applications d'emballages actifs, ceux incorporant des agents antibactériens suscitent un intérêt croissant, notamment en réponse aux préoccupations liées à la sécurité microbiologique des aliments.

L'agent antibactérien peut être introduit selon plusieurs façons : 1) introduction de l'agent dans un sachet (cas des agents volatils : huiles essentielles, éthanol), 2) ajout de l'agent dans la composition de l'emballage (en mélangeant avec les polymères), 3) application d'un film contenant l'agent, 4) greffage ionique ou covalent de l'agent en surface, 5) utilisation d'un polymère qui a des propriétés antibactériennes (ex. : chitosane) [13, 41].

2.4 Matériaux biosourcés pour les emballages alimentaires

Même si les emballages actifs et intelligents permettent d'améliorer la conservation des aliments, le choix du matériau utilisé reste un facteur déterminant dans la réduction de l'impact environnemental [51]. Les matériaux d'emballage conventionnels, majoritairement issus de ressources fossiles, présentent des limites importantes, notamment leur non-biodégradabilité et leur recyclabilité restreinte en cas des contaminations alimentaires, ce qui pose de sérieux problèmes écologiques [52, 53].

Dans ce contexte, les emballages biosourcés, élaborés à partir de matières premières renouvelables, suscitent un intérêt croissant en tant qu'alternative plus respectueuse de l'environnement. Plusieurs matériaux biosourcés et biodégradables émergent comme alternatives prometteuses [53, 54]. Le polylactide (PLA), issu de la fermentation de ressources renouvelables comme le maïs ou la canne à sucre, est aujourd'hui largement utilisé dans des produits à courte durée de vie (barquettes, gobelets, films), notamment sous la marque

commerciale NatureWorks® PLA. Bien qu'il soit compostable en conditions industrielles, il reste sensible à l'humidité et nécessite des installations spécialisées pour sa dégradation [55, 56]. De leur côté, les polyhydroxyalcanoates (PHA), produits par fermentation bactérienne de sucres ou de lipides, comme le polyhydroxybutyrate (PHB) et le poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) (PHBV), offrent une biodégradabilité complète dans l'environnement naturel, mais leur coût élevé reste un frein à leur adoption à grande échelle. Parmi les biopolymères naturels les plus étudiés pour les applications d'emballage alimentaire figurent l'amidon, les protéines (telles que la caséine, la gélatine et le gluten), la cellulose, le chitosane et les polysaccharides marins comme l'alginate. Tous présentent un fort potentiel en raison de leur biodégradabilité, de leur aptitude à former des films, ainsi que de leur compatibilité avec des agents antibactériens. Le chitosane, en particulier, se distingue par ses propriétés antibactériennes intrinsèques liées à ses groupes amino chargés positivement, bien que sa sensibilité à l'humidité et sa faible diffusion industrielle limitent encore son usage à grande échelle [53].

Parmi les matériaux biosourcés, la cellulose représente une solution particulièrement prometteuse pour la conception d'emballages actifs antibactériens. Polymère naturel le plus abondant sur Terre, la cellulose est biodégradable, renouvelable, peu coûteuse, non toxique, et facilement modifiable chimiquement, ce qui en fait une matrice de choix pour l'immobilisation d'agents antibactériens [57]. Ce polymère présente des propriétés techniques intéressantes pour certaines applications de conservation des aliments, notamment en termes de flexibilité, transformabilité et compatibilité alimentaire. Bien que ses propriétés barrières naturelles soient limitées, elles peuvent être améliorées par des modifications chimiques ou des traitements de surface, rendant la cellulose adaptée à des fonctions actives. Sa biodégradabilité naturelle en fait un matériau respectueux de l'environnement, répondant aux préoccupations croissantes en matière de durabilité, tant du côté des consommateurs que des politiques publiques. De plus, grâce à sa richesse en groupes hydroxyles, la cellulose offre une excellente aptitude à l'incorporation d'agents antibactériens, tels que les bactériophages, sans compromettre la sécurité ni l'intégrité des aliments [58]. Enfin, un avantage stratégique majeur réside dans l'existence d'installations industrielles déjà en place pour la production et la transformation des papiers à base de fibres

cellulosiques, ce qui facilite l'adoption de ce matériau dans une optique de transfert technologique et de mise en œuvre à l'échelle industrielle.

Dans cette optique de durabilité, les emballages alimentaires modernes tendent également à intégrer des fonctions actives ou bioactives. Il ne s'agit plus uniquement de protéger physiquement les aliments, mais aussi d'interagir avec eux ou leur environnement pour prolonger leur durée de vie ou améliorer leur qualité sensorielle. Les agents antibactériens feront l'objet de la section suivante.

2.5 Les agents antibactériens ciblant les bactéries d'intérêt alimentaire

Les agents antibactériens sont des substances capables d'inhiber la croissance des bactéries ou de les éliminer. Dans le cadre du développement d'emballages alimentaires actifs, leur rôle est de contribuer à la sécurité microbiologique des aliments, notamment en ciblant *L. monocytogenes*.

Plusieurs catégories d'agents antibactériens ont été explorées dans la littérature, telles que les nanoparticules, les polymères actifs, les huiles essentielles et les agents biologiques ciblés. Cette section présente une revue de principaux agents antibactériens étudiés dans le contexte de l'emballage alimentaire. L'accent est mis sur leurs mécanismes d'action, leur efficacité contre *L. monocytogenes* et leur potentiel d'intégration dans un matériau d'emballage actif à base de fibres cellulosiques.

2.5.1 Nanoparticules antibactériennes

L'intégration de nanoparticules dans des matériaux d'emballage actifs constitue l'un des axes de recherche les plus explorés pour la lutte contre les bactéries pathogènes en agroalimentaire, dont *L. monocytogenes*. Plusieurs types de nanoparticules métalliques ou d'oxydes métalliques ont démontré une activité antibactérienne notable contre un large éventail de souches [59, 60]. Les plus étudiées dans le contexte alimentaire sont les nanoparticules d'argent (AgNPs), de zinc (ZnO), de cuivre (CuO), de dioxyde de titane (TiO₂) et de magnésium (MgO) [60]. Leur efficacité repose sur des mécanismes d'action multiples, souvent synergiques :

- Libération d'ions métalliques : Ce mécanisme est central pour les AgNPs, ZnO, CuO, et MgO. Les ions libérés interagissent avec les membranes bactériennes, les protéines essentielles, l'ADN et les enzymes métaboliques, perturbant ainsi l'équilibre cellulaire et conduisant à la mort bactérienne [59, 61].
- Génération d'espèces réactives de l'oxygène: Les nanoparticules, en particulier de ZnO et TiO₂, favorisent la formation de radicaux libres, qui provoquent un stress oxydatif destructeur pour l'ADN, les membranes lipidiques et les protéines bactériennes. Ce mécanisme est renforcé sous lumière UV pour TiO₂, bien que son efficacité diminue en absence d'activation lumineuse [59, 60].
- Altération de la membrane cellulaire : Par contact direct, les nanoparticules perturbent la membrane plasmique bactérienne, induisent une fuite de contenu intracellulaire et provoquent la perte du potentiel membranaire. Cela a été démontré pour des AgNPs, CuO et ZnO sur des bactéries Gram positives et Gram négatives [59, 61].
- Inhibition des processus vitaux : Certaines études rapportent l'interférence des nanoparticules avec la réplication de l'ADN, la respiration cellulaire ou la synthèse protéique, selon la nature de la nanoparticule et la souche bactérienne concernée [59, 61].

La taille, la forme, la surface spécifique et la charge des nanoparticules influencent fortement leur activité. Les particules de petite taille (souvent < 20 nm) présentent une surface de contact accrue et une réactivité chimique plus élevée, ce qui améliore leur efficacité antibactérienne [61].

Plusieurs études ont montré que des nanoparticules peuvent être incorporées dans des matrices polymériques biosourcées, telles que le PLA, l'amidon ou certains dérivés de la cellulose, pour améliorer les propriétés barrières et antibactériennes des emballages [62].

Malgré leur potentiel, l'utilisation des nanoparticules soulève des préoccupations toxicologiques. Les études disponibles montrent qu'en plus d'agir sur les bactéries, ces particules peuvent également affecter des cellules eucaryotes (hépatocytes, cellules pulmonaires, cellules intestinales) et perturber certains équilibres écologiques lorsqu'elles sont relâchées dans l'environnement [59, 61]. Les voies d'exposition les plus critiques sont la

migration vers les aliments, l'inhalation lors de la fabrication, et la bioaccumulation dans les systèmes aquatiques [61, 63]. Par ailleurs, leur production et leur intégration dans des matériaux d'emballage restent coûteuses, limitant leur rentabilité industrielle. Pour ces raisons, malgré l'efficacité démontrée de nombreuses nanoparticules contre *L. monocytogenes* dans des contextes *in vitro*, leur usage demeure limité dans les emballages alimentaires commercialisés. Les recherches se sont donc orientées vers d'autres approches antibactériennes plus compatibles avec les exigences de sécurité alimentaire, telles que l'utilisation de polymères antibactériens, présentés dans la section suivante.

2.5.2 Polymères antibactériens pour l'emballage actif

Certains polymères, naturels ou synthétiques, ont démontré une activité antibactérienne qui suscite un intérêt croissant pour des applications en emballage alimentaire actif. Parmi les plus étudiés, on retrouve le chitosane, les polyéthylèneimines quaternisés (QPEI), les polymères à groupes ammonium quaternaires comme le poly(4-vinylpyridine) quaternisé, ou encore les copolymères mimant les peptides antibactériens tels que les poly (phénylène ethynylene) [64].

Le mécanisme d'action de ces polymères repose généralement sur une interaction électrostatique entre les charges cationiques du polymère et les membranes bactériennes chargées négativement. Cette interaction perturbe l'intégrité membranaire, provoque une fuite du contenu intracellulaire, et peut mener à la lyse cellulaire. Dans le cas des copolymères amphiphiles, les segments hydrophobes favorisent également l'insertion dans la bicouche lipidique, accentuant la désorganisation membranaire [64].

Parmi les polymères naturels, le chitosane est particulièrement promoteur. Il agit non seulement par désorganisation membranaire, mais également par chélation des ions métalliques, perturbation de la synthèse d'ADN/ARN, et activité antioxydante, ce qui en fait un candidat de choix pour des emballages actifs multifonctionnels [65]. Son incorporation dans des films composites avec de la cellulose a démontré une efficacité antibactérienne marquée contre des bactéries telles que *L. monocytogenes*, ainsi qu'une amélioration des propriétés mécaniques et barrières des films [66].

Malgré ses nombreuses propriétés fonctionnelles, l'utilisation industrielle du chitosane dans les emballages alimentaires reste limitée en raison de certaines contraintes techniques. La nature hydrophile du chitosane entraîne une faible résistance à l'humidité, tandis que l'incorporation d'agents antibactériens peut perturber la structure physique du film et dégrader ses propriétés mécaniques et barrières [65]. À cela s'ajoute son coût de production et de purification, souvent élevé pour les grades alimentaires, ce qui représente un frein important à sa mise en œuvre industrielle [67].

2.5.3 Huiles essentielles à activité antibactérienne

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de composés volatils produits naturellement par les plantes. Elles sont obtenues par distillation ou par expression mécanique à partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs, de brindilles, d'herbes, d'écorces, de bois, de racines ou de fruits, mais également à partir des gommés qui s'écoulent du tronc des arbres [68]. Elles présentent une activité antibactérienne, notamment contre les bactéries d'intérêt alimentaire comme *L. monocytogenes* [69, 70]. Cette activité repose principalement sur la nature lipophile de leurs constituants, qui leur permet d'interagir avec les membranes bactériennes. Ces interactions entraînent une déstabilisation membranaire, une augmentation de la perméabilité, une fuite d'ions et de composés intracellulaires, et une inhibition de la respiration cellulaire. Selon la concentration et la composition, cela peut provoquer la lyse cellulaire et la mort de la bactérie [71].

Les huiles essentielles sont largement reconnues pour leurs propriétés antibactériennes, attribuées à la présence de composés bioactifs tels que les terpènes et les phénols [72, 73]. Parmi les huiles essentielles étudiées, l'huile d'épinette noire contient des composés majeurs tels que l' α -pinène et le β -pinène, qui agissent en perturbant l'intégrité de la membrane cellulaire bactérienne, provoquant la fuite d'éléments essentiels à la survie cellulaire [74, 75]. L'huile essentielle de menthe poivrée, riche en menthol et menthone, présente des effets antibactériens en interagissant directement avec la membrane lipidique des bactéries, entraînant une perte de fonction membranaire et la mort cellulaire [76].

De manière similaire, l'huile de cèdre contient du cédrol et du thuyopsène, connus pour leur capacité à inhiber la croissance bactérienne en modifiant la perméabilité de la

membrane et en perturbant la synthèse des protéines bactériennes [77]. L'eugénol, composant principal de l'huile de clou de girofle, est un puissant agent antibactérien qui agit à la fois sur la membrane cellulaire et les enzymes intracellulaires des bactéries [78]. Enfin, l'huile de bouleau jaune, riche en salicylate de méthyle, possède des propriétés antibactériennes en inhibant la formation de biofilms et en affectant les voies enzymatiques des bactéries [79]. Dans le cadre de cette étude, les huiles essentielles ont été évaluées principalement pour leur activité antibactérienne individuelle contre *L. monocytogenes*, afin d'identifier leur potentiel d'intégration dans des systèmes d'emballage actifs. Leur éventuelle combinaison avec d'autres agents antibactériens sera abordée ultérieurement dans ce chapitre.

2.5.4 Agents biologiques antibactériens spécifiques

Une stratégie émergente pour lutter contre les bactéries d'intérêt alimentaire consiste à utiliser des agents antibactériens biologiques ciblés [80]. Ils ont l'avantage de viser spécifiquement certains pathogènes sans affecter les bactéries utiles telles que celles intervenant dans la fermentation. Ces agents incluent notamment les anticorps, les enzymes antibactériennes, les bactériocines, les aptamères et les bactériophages. Ceci permet de conserver la qualité organoleptique, de préserver la valeur nutritive de l'aliment, surtout dans le cas d'un produit fermenté.

Le Tableau 2.2 résume les principales classes d'agents antibactériens biologiques étudiés dans le contexte de l'emballage alimentaire actif. Pour chaque catégorie, on précise la nature du mécanisme d'action, les avantages liés à leur spécificité, ainsi que les limites techniques ou économiques rencontrées dans leur mise en œuvre. Des exemples concrets d'application sont également présentés pour illustrer leur potentiel.

Tableau 2.2 Principales classes d'agents antibactériens biologiques utilisés en emballage alimentaire actif, avec leurs mécanismes d'action, avantages et limites.

Agent anti-bactérien	Description	Mécanisme d'action	Avantage et inconvénients	Exemples
Anticorps	Protéines complexes	Liaison spécifique à des antigènes bactériens (surface cellulaire, toxines) pour détection ou neutralisation	+ Spécifiques, compatibles avec diverses plateformes - Coûteux à produire, sensibles aux conditions (pH, T°)	Anti- <i>L. monocytogenes</i> (P66) utilisés comme capteur dans un bio-senseur à fibre optique pour détecter la bactérie dans des viandes prêtes à consommer [81]
Enzymes	Protéines catalytiques	Hydrolyse ciblée de la paroi bactérienne (ex. lysozyme), ou inhibition métabolique	+ Rapides - Dispendieux, ne peuvent pas directement désactiver des bactéries	Lysozyme actif sur Gram+, utilisé dans des revêtements actifs [82]
Bactériocines	Peptides de faible poids moléculaire	Insertion dans la membrane → formation de pores → fuite des ions et mort cellulaire	+ Spécifiques aux Gram+ - Spectre étroit, stabilité variable, Dispendieux	Nisine, Divergicine M35 utilisées contre <i>L. monocytogenes</i> [83, 84]
Aptamères	Oligonucléotide (fragment d'acide nucléique) spécifiques à une cible bactérienne	Liaison moléculaire à des cibles spécifiques bactériennes (protéines, toxines) → détection, inhibition	+ Rapides, bonne stabilité - Dispendieux et peu disponible	Détecter <i>Vibrio alginolyticus</i> dans des matrices [85] ; Inhiber la prolifération bactérienne et perturber des biofilms résistants (ex. <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>) [86]

Agent anti-bactérien	Description	Mécanisme d'action	Avantage et inconvénients	Exemples
Bactériophages	Virus infectant spécifiquement des bactéries	Adsorption spécifique à la surface bactérienne → injection de matériel génétique → réplication → lyse cellulaire	+ Auto-amplifiés, peu coûteux, Haute spécificité, Peut être appliqué en spray, en solution ou sur surfaces - Risque de résistance, délai d'action initial, Sensibles aux conditions (pH, température, matrice)	Phage P100 (Listex™) pour réduire <i>L. monocytogenes</i> dans le fromage, les viandes tranchées, le poisson cru et les salades [87]

Plusieurs éléments justifient le choix des bactériophages comme agents antibactériens dans le cadre de cette recherche. Contrairement aux anticorps, enzymes ou bactériocines, les bactériophages présentent une très haute spécificité d'action, un coût de production relativement faible, et une capacité d'auto-amplification en présence de leur hôte, prolongeant ainsi leur efficacité sans intervention externe. Leur mécanisme d'action ciblé, fondé sur la lyse cellulaire après infection, permet une élimination efficace de pathogènes comme *L. monocytogenes* tout en préservant la flore microbienne bénéfique des aliments. Par ailleurs, les bactériophages sont déjà reconnus réglementairement dans certaines applications commerciales (par exemple Listex™) [88] et peuvent être intégrés dans des matrices d'emballage alimentaire telles que l'alginate ou la cellulose. Ces caractéristiques en font une solution à la fois scientifiquement fondée, technologiquement applicable et adaptée aux exigences de sécurité alimentaire. C'est donc sur cette base que cette thèse explore l'intégration des bactériophages dans un emballage cellulosique antibactérien ciblant *L. monocytogenes*.

Les bactériophages représentent une voie prometteuse pour lutter contre les bactéries [89]. Ils gagnent du terrain en tant qu'agent antibactérien pour limiter les épidémies d'origine alimentaire [90]. Plusieurs études ont confirmé leur efficacité dans l'élimination des

bactéries impliquées dans des contaminations alimentaires. Dans ce contexte, et par la suite, cette thèse cible l'utilisation de bactériophages comme agents antibactériens.

2.6 Les bactériophages

2.6.1 Définition

Les bactériophages (ci-après phages) sont des virus qui infectent spécifiquement des bactéries, grâce à des structures spécialisées leur permettant de reconnaître des récepteurs bactériens [91]. Ils ont la particularité d'avoir une étroite spécificité, n'attaquant qu'une espèce ou une souche bactérienne précise. Contrairement aux antibiotiques, qui ciblent un large spectre de bactéries, les phages n'ont aucun impact sur les cellules humaines. Les phages mesurent généralement entre 20 et 300 nm, bien que certains phages puissent atteindre des tailles supérieures. Ils se caractérisent par la possession d'un seul type d'acide nucléique et par un parasitisme intracellulaire obligatoire. Une caractéristique unique qui appartient aux phages consiste dans leur croissance par cascade après leurs interactions avec les bactéries. En théorie, après l'infection de la bactérie, un phage est capable de se reproduire pour attaquer d'autres bactéries une fois la cellule bactérienne lysée [92].

Les phages ont un large spectre d'activité vis-à-vis des bactéries : Gram positives ou Gram négatives, acidorésistantes, sporulées ou non sporulées, aérobies ou anaérobies, saprophytes ou pathogènes. Bien que les phages nécessitent la présence de bactéries pour se multiplier, ils peuvent rester viables sur un support d'emballage alimentaire en l'absence immédiate d'hôte bactérien, notamment s'ils sont protégés par un film ou un revêtement adapté [93]. Leur viabilité peut être préservée grâce à des matrices protectrices qui limitent leur exposition aux facteurs environnementaux défavorables. Des études récentes ont également montré que les phages peuvent être stabilisés dans des poudres séchées par pulvérisation au sein d'une matrice de sucre vitreuse, ce qui permet de conserver leur activité biologique même en l'absence d'hôte.

2.6.2 Sources

Les phages sont considérés comme étant plus nombreux dans la biosphère que n'importe quel autre groupe d'organismes, procaryotes inclus. Ils se trouvent fréquemment dans le tractus gastro-intestinal, sur la peau, dans l'urine et la bouche, dans le sol, les eaux (rivières, mer, égout), etc. Ils sont présents chez la plupart des végétaux, dans le tube digestif et les excréments des animaux. Il est estimé qu'il y a environ 10^{30} à 10^{32} particules de phages sur la terre [91]. Pour les humains, cela signifie qu'ils sont constamment exposés aux phages, qui jouent un rôle essentiel dans la régulation des populations bactériennes et le maintien de l'équilibre des écosystèmes microbiens. Ils ne causent généralement pas d'infection puisqu'ils ciblent spécifiquement les bactéries; toutefois, en modulant les populations bactériennes, ils pourraient influencer l'équilibre du microbiote.

2.6.3 Historique

Twort [94] en 1915 et D'Hérelle [95] en 1917 ont découvert indépendamment les phages. En 1921 les phages ont été utilisés pour traiter des maladies de peau infectieuses dues au *Staphylococcus* sp par Bruynogoe et Maisin. Plusieurs pays ont utilisé les phages pour traiter de maladies d'origine bactériennes dans les années 1930 [96].

Néanmoins, l'usage inapproprié des phages, la mort de quelques patients traités, le manque de connaissances sur la nature des phages, l'inefficacité de certaines préparations commerciales de phages et la découverte de l'antibiotique ont contribué à l'abandon de l'utilisation des phages dans les pays occidentaux [97, 98]. Toutefois, les pays de l'Europe de l'Est et l'ex-Union soviétique ont continué à utiliser les phages comme agent thérapeutiques [99].

Récemment les phages ont gagné du terrain en tant qu'agent antibactérien pour lutter contre les contaminations des produits alimentaires [100]. La Figure 2.2 représente l'évolution du nombre de documents publiés en fonction des années¹.

¹ Documents obtenus à partir de moteur de recherche Scopus en date du 24 juin 2025, lorsque les mots-clés « Bacteriophage » et « Food » sont utilisés.

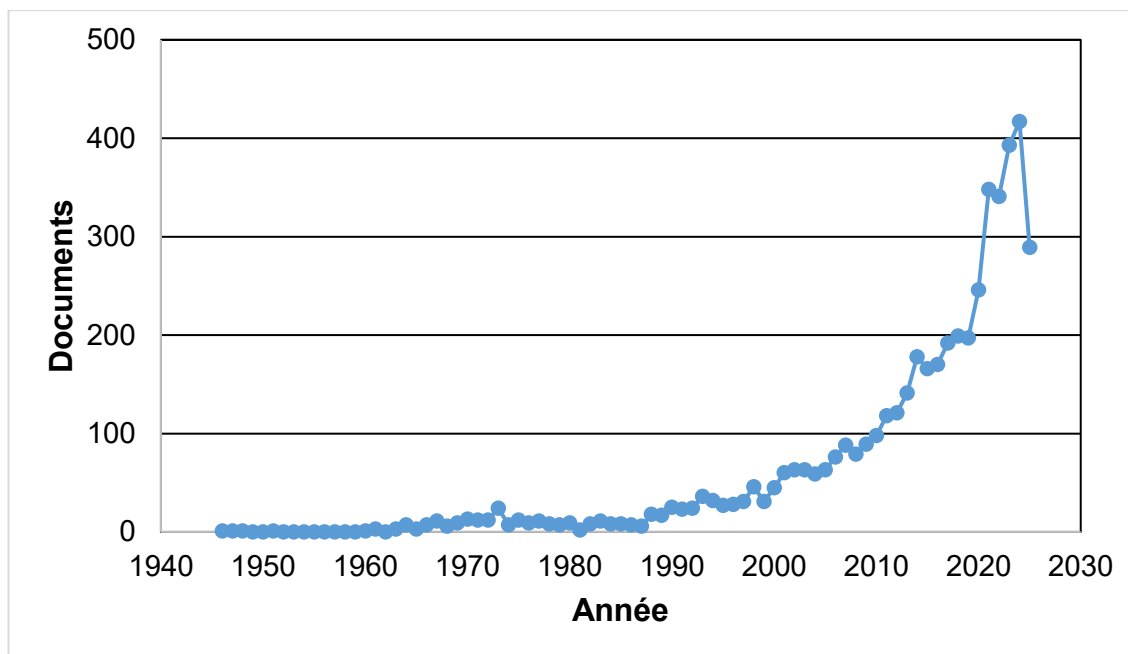


Figure 2.2 Évolutions des nombres de documents scientifiques qui portent sur les « Phages » et le « Food » en fonction de l'année.

L'augmentation de nombre de documents publiés au fil des années montre l'intérêt et le potentiel d'utilisation de phages pour protéger les aliments contre les infections bactériennes.

2.6.4 Classification et composition

Les phages sont classés en fonction de la nature de leur acide nucléique ainsi que de leur structure, notamment leur type de symétrie et la présence ou l'absence d'une enveloppe. Ceux infectant *L. monocytogenes* appartiennent à la classe *Caudoviricetes*. Ils possèdent une capsid à symétrie icosaédrique. Ils sont composés de 3 parties principales : la capsid (renfermant le matériel génétique), la queue (cylindre creux) et les fibres caudales. La classe *Caudoviricetes* inclut des phages à queue historiquement classés comme *Myoviridae*, *Siphoviridae* et *Podoviridae* ; ces termes sont aujourd'hui descriptifs et non taxonomiques, mais la structure de la queue influence toujours leur mécanisme d'infection. [101]

Les *Myoviridae*, à queue contractile, injectent rapidement leur matériel génétique, ce qui les rend très efficaces contre des bactéries à paroi épaisse. Les *Siphoviridae*, à queue

longue non contractile, présentent une infection plus lente. Enfin, les *Podoviridae*, à queue courte non contractile, utilisent des mécanismes enzymatiques pour injecter leur génome, et sont adaptés à des hôtes à paroi fine (Figure 2.3) [102].

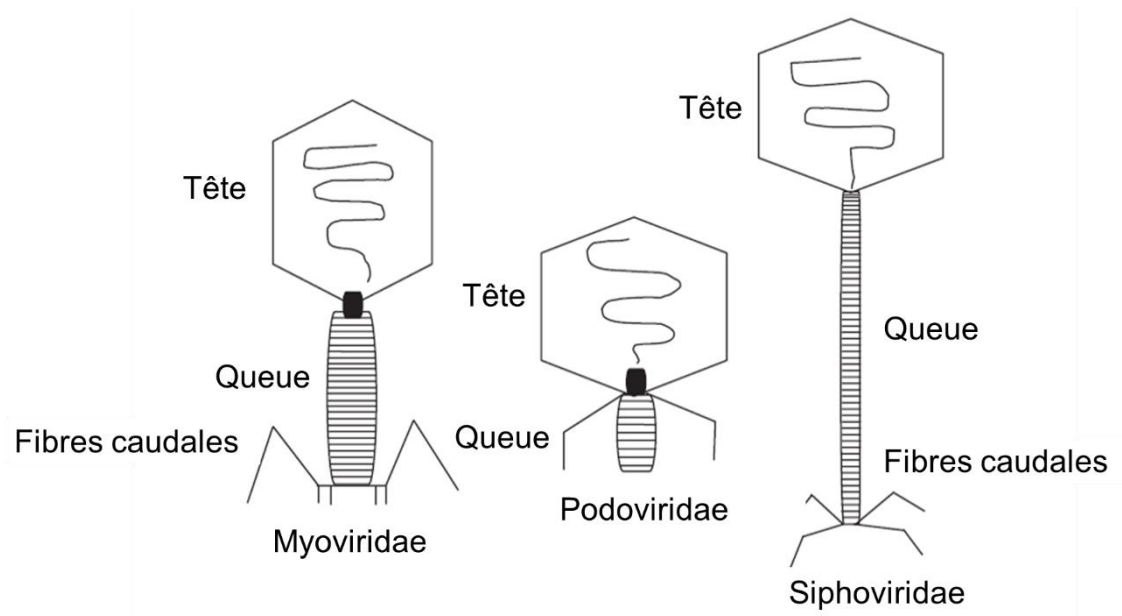


Figure 2.3 Représentation schématique des phages à queue de la classe *Caudoviricetes* [102].

2.6.5 Interaction phages – bactéries

Un contact entre un phage et une bactérie peut aboutir à trois situations [103] :

- La bactérie résiste à l'infection. Cette résistance peut être due à l'absence de récepteurs nécessaires à la fixation du phage ou à la présence d'enzymes de restriction capables de dégrader l'acide nucléique phagique.
- Le phage ou seulement son acide nucléique pénètre dans la bactérie et l'acide nucléique phagique s'intègre dans le génome bactérien, où il persiste à l'état latent sous forme de prophage. Ce cycle est appelé lysogénique, et le phage est alors un phage tempéré.
- Le phage ou uniquement son acide nucléique pénètre, dans la bactérie et le phage se multiplie à l'intérieur de la cellule bactérienne. Ce cycle est productif et le phage

est qualifié de virulent. Selon les phages, le cycle productif peut ou non aboutir à la lyse de la bactérie.

2.6.6 Mécanisme d'infection des phages

Une bactérie infectée par un phage lytique ne pourra plus se reproduire et sera inévitablement détruite. L'infectivité d'un phage correspond à sa capacité d'infecter et de se multiplier dans une cellule bactérienne hôte, entraînant la production de nouveaux virions. En laboratoire, cette infectivité est généralement mesurée par le comptage des unités formant des plaques (PFU, Plaque-Forming Units) à l'aide de la méthode de double couche d'Agar [104]. Le cycle infectieux des phages se déroule en six étapes successives (Figure 2.4) [105].

- a) **Infection de la bactérie** : Le cycle commence par l'attachement du phage à la surface de la bactérie hôte. Le phage reconnaît des récepteurs spécifiques sur la paroi cellulaire bactérienne. Il injecte ensuite son matériel génétique à l'intérieur de la cellule bactérienne.
- b) **Transcription des gènes précoces et détournement du métabolisme cellulaire** : Après l'injection, le phage initie la transcription des gènes dits "précoces". Ces gènes codent pour des enzymes permettant la dégradation de l'ADN bactérien et la prise de contrôle de la machinerie cellulaire. La cellule commence alors à produire les premiers composants viraux.
- c) **Réplication du génome viral** : Le génome du phage est copié de nombreuses fois à l'aide des enzymes de la cellule hôte ou de celles codées par le phage lui-même. Cette étape permet de constituer une réserve suffisante de matériel génétique pour les futurs phages.
- d) **Transcription tardive et traduction des protéines virales** : Le génome viral est transcrit en ARN messager, ensuite traduit en protéines virales. Cette phase tardive produit les protéines de structure (capside, queue, etc.) et les enzymes nécessaires à l'assemblage des virions et à la lyse finale de la cellule hôte.

- e) **Assemblage des nouveaux phages** : Une fois les composants viraux produits (capsides, queues, génome, etc.), ceux-ci sont assemblés dans le cytoplasme bactérien pour former des phages complets et fonctionnels.
- f) **Lyse cellulaire et libération des phages** : En fin de cycle, des enzymes produites par le phage (telles que des endolysines) dégradent la paroi bactérienne, provoquant la lyse de la cellule. Cette rupture libère les nouveaux phages dans l'environnement, prêts à infecter d'autres cellules bactériennes.

Ce cycle ne peut toutefois se maintenir que si des bactéries hôtes sont présentes : les phages ne se multiplient pas de manière autonome. Lorsqu'il n'y a plus de bactéries sensibles à infecter, la réplication s'arrête naturellement, sans auto-dégradation ni interaction entre phages. En l'absence d'hôte, ils demeurent inactifs et leur infectivité diminue progressivement avec le temps, les particules virales présentant une demi-vie variable selon les conditions environnementales.

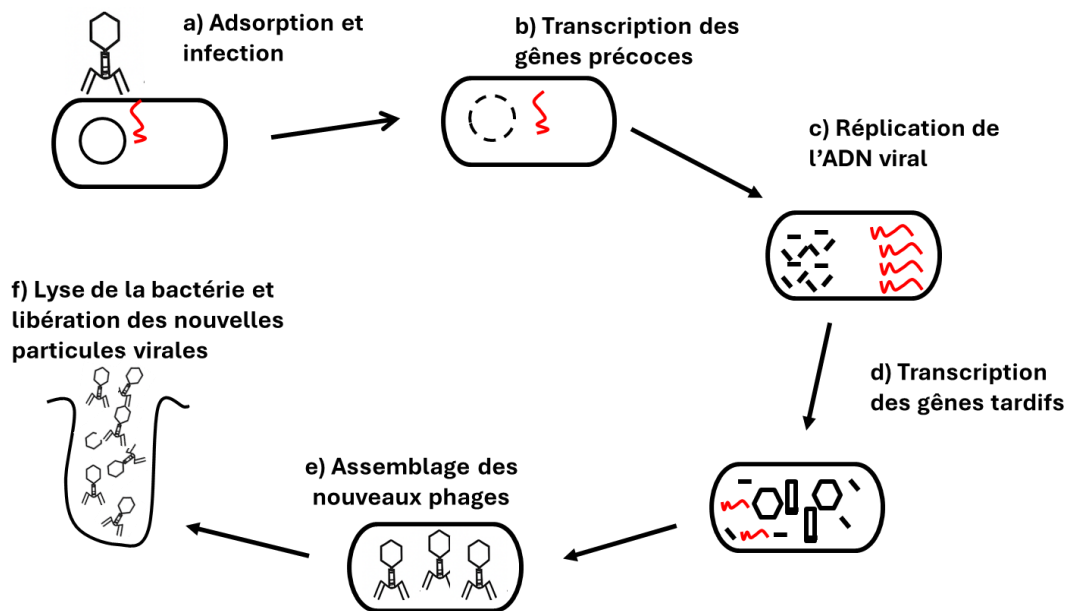


Figure 2.4 Cycle lytique d'un phage infectant une cellule bactérienne [105]. a) Adsorption du phage et injection de l'ADN viral; b) Transcription des gènes précoces; c) Réplication du génome viral; d) Transcription des gènes tardifs et synthèse des protéines structurales; e) Assemblage des nouveaux virions; f) Lyse de la cellule bactérienne et libération des phages. ADN viral représenté en rouge.

L'activité d'un phage sur les bactéries sensibles entraîne la lyse de ces dernières. Cette activité se manifeste par l'éclaircissement des cultures bactériennes en milieu liquide ou, dans le cas de cultures sur milieu semi-solide, par l'apparition des "plages de lyse". Ces plages sont de petites zones circulaires et claires ou voilées, indiquant la formation d'un clone de phages résultant de la multiplication d'un virion aux dépens de la culture bactérienne. La numération des plages constitue la principale méthode de titrage des suspensions de phages.

2.6.7 Le cocktail de phages

Les bactéries mutent rapidement et, au fil du temps, peuvent développer une résistance contre les phages [106]. Cependant, par rapport aux antibiotiques, cette résistance est environ dix fois moins fréquente [96]. Une conséquence directe de cette résistance bactérienne est la coexistence de phages et de bactéries, comme démontré par Mizoguchi et al. [107] et par Bohannon et al. (T4 et *E. coli*) [108].

Pour limiter l'émergence de bactéries résistantes, l'approche privilégiée consiste à utiliser des cocktails de phages, c'est-à-dire des mélanges de phages ayant des spécificités différentes et reconnaissant des récepteurs distincts sur la surface bactérienne [109, 110].

La conception d'un cocktail repose sur plusieurs étapes clés :

- D'abord, des phages actifs contre la souche cible sont isolés et sélectionnés selon leur spectre d'infectivité.
- Ensuite, leur profil de liaison est analysé pour s'assurer qu'ils utilisent des récepteurs bactériens non redondants, évitant ainsi qu'une mutation unique chez la bactérie ne les rende tous inefficaces.
- Des tests de combinaison sont réalisés pour vérifier l'absence d'interférence négative (exclusion compétitive entre phages) et, idéalement, une synergie d'action.

Certaines études ont également exploré des approches combinées visant à renforcer l'efficacité des phages, notamment leur association avec des huiles essentielles. Par exemple, l'utilisation conjointe d'huile essentielle de cannelle et d'un cocktail de phages a montré une action synergique contre *E. coli* et *Salmonella Enteritidis*, augmentant

significativement la réduction bactérienne [111]. Ce type de combinaison illustre le potentiel des stratégies hybrides pour améliorer l'efficacité des phages en contexte alimentaire.

En cas de contamination multi-espèces, le cocktail peut également inclure des phages ciblant plusieurs bactéries.

Cette approche permet non seulement de maintenir une activité antibactérienne stable, mais aussi de retarder ou contourner les phénomènes de résistance. Certains cocktails de phages ont été développés spécifiquement pour des applications en emballage actif, afin de cibler des pathogènes d'intérêt alimentaire comme *E. coli* et *Salmonella*. Par exemple, Alves et al. [111] ont démontré l'efficacité d'un cocktail combinant deux phages (EC4 et ϕ 135), encapsulés dans un film à base d'alginate, pour inhiber la croissance d'*E. coli* et *Salmonella* sur des surfaces alimentaires.

Bien que ces travaux de recherche visent à optimiser les formulations et la stabilité des phages pour des applications alimentaires ciblées, l'utilisation de bactériophages à des fins de biocontrôle est déjà une réalité industrielle. En effet, plusieurs produits commerciaux à base de phages ont été approuvés par la « Food and Drug Administration » (FDA ou Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux) pour une application directe sur des aliments prêts à manger. Ces produits et leurs spécificités sont présentés dans la section suivante.

2.7 Produits commerciaux de phages approuvés par FDA

L'intérêt croissant pour l'utilisation des phages dans la lutte contre les intoxications alimentaires a conduit au développement et à la commercialisation de produits contenant des phages. Par exemple, en 2006, le cocktail de phage ListShield™ a été reconnu par la FDA, comme un additif alimentaire. Ce produit cible spécifiquement *L. monocytogenes*. Depuis, des produits à base de phages, approuvés par la FDA, destinés à être appliqués sur les aliments ont augmenté [112]. Pour lutter contre *L. monocytogenes*, citons, les produits commerciaux suivants : « ListShield™ », « Listex P100 », « A511 » et « FWLLm1 ». Les

fabricants affirment que ces produits peuvent être appliqués par pulvérisation sur des produits prêts à être emballés et vaporisés sur les lames de la trancheuse/lames [113].

Plusieurs études ont confirmé l'efficacité des phages dans l'élimination des bactéries responsables des contaminations alimentaires. Par exemple, des éliminations des bactéries ou des réductions significatives, selon les concentrations des phages, ont été observées pour *L. monocytogenes* sur le melon miel et la pomme [114], pour *E. coli* O157:H7 sur la viande de bœuf [115] ainsi que pour *Salmonella enterica* sur le porc, le poulet et la laitue [116].

L'utilisation de ces produits commerciaux repose sur une approche ciblée, sécuritaire et compatible avec les pratiques de l'industrie agroalimentaire. Leur efficacité contre *L. monocytogenes* est présentée en détail dans la section suivante.

2.8 Application directe des phages sur les aliments pour le contrôle de *L. monocytogenes* dans l'alimentation

Cette section se concentre sur l'application des phages spécifiquement contre *L. monocytogenes*. De nombreux travaux ont démontré l'efficacité de phages pour réduire la contamination par *L. monocytogenes*. Par exemple, Perera et al. [117] ont utilisé la formulation commerciale ListShield™, un cocktail de six phages, pour contrôler la contamination par *L. monocytogenes* sur divers aliments, tels que des pommes en tranches, de la salade, du fromage, du saumon fumé et des plats surgelés. Ils ont montré que l'application directe des phages sur la surface des aliments a significativement réduit la contamination par cette souche bactérienne. De plus, ils ont observé une diminution de la quantité de bactéries dans tous les cas étudiés avec l'augmentation de la quantité de phages appliquée. Cette étude a également montré que l'utilisation de la formulation ListShield™ n'a pas eu d'impact sur les propriétés organoleptiques des aliments testés.

Cooper [113] rapporte plusieurs études sur le traitement de *L. monocytogenes* par des phages. Il conclut que la modification chimique de l'aliment joue un rôle sur l'activité antibactérienne des phages. Listex P100 a été utilisé par Pahu et al. [118] pour contrôler la croissance des *L. monocytogenes* sur le jambon, la dinde et la viande de bœuf. Dans ces trois cas, l'application de phages par pulvérisation a montré une efficacité significative

pour limiter la croissance de la souche bactérienne. Cependant, l'augmentation de la quantité de phages n'a eu qu'un effet marginal sur le contrôle des bactéries. Dans une étude menée par Lone et al. [119], l'efficacité d'un cocktail de phages spécifiques contre *L. monocytogenes* a été évaluée sur des matrices alimentaires, telles que le melon cantaloup et la viande cuite prête-à-manger. Les résultats ont montré une réduction significative de la population bactérienne, en particulier lorsque les phages étaient appliqués sous forme libre comparativement à leur immobilisation dans des matériaux d'emballage. À 25 °C, les comptages de *L. monocytogenes* sont tombés sous le seuil de détection dès 3 à 6 heures après l'application de phages libres. L'étude compare également l'efficacité de phages libres et immobilisés, et souligne que même si les phages immobilisés ont montré une activité réduite (~ 1 log), ils restent efficaces, notamment en conditions de réfrigération.

Guenther et al. [120] ont également évalué l'efficacité des phages A511 et P100 appliqués directement sur une variété d'aliments prêts-à-manger, incluant des produits d'origine animale (saucisses, dinde, saumon fumé, fruits de mer, lait chocolaté, mozzarella) et végétale (chou, laitue). Leurs résultats, également synthétisés dans le Tableau 2.3, montrent une réduction significative de *L. monocytogenes*, avec une efficacité variable selon la matrice alimentaire. Cette étude est particulièrement intéressante en raison de la diversité des aliments testés et de la comparaison entre plusieurs concentrations de phages. Le Tableau 2.3 présente la synthèse des réductions de *L. monocytogenes* sur divers produits alimentaires, basée sur plusieurs résultats issus de la littérature scientifique.

Tableau 2.3 Efficacité des phages sur des produits alimentaires.

Phages	Aliments	Paramètres	Quantité de phages	Réduction de <i>L. monocytogenes</i>	Réf.
ListShield™	Salade Laitue	2x10 ³ CFU/g T° : ambiante t : 5 min	1x10 ⁷ PFU/g	Réduction de 68 %	117
		2x10 ³ CFU/g T° : ambiante t : 5 min	1x10 ⁸ PFU/g	Réduction de 91 %	
	Fromage	1x10 ⁴ CFU/g T° : ambiante t : 5 min	1x10 ⁸ PFU/g	Réduction de 82 %	
	Saumon fumé	1x10 ³ CFU/g	9x10 ⁵ PFU/g	Réduction de 65 %	

Phages	Aliments	Paramètres	Quantité de phages	Réduction de <i>L. monocytogenes</i>	Réf.
		T° :4°C t = 24 heures	2x10 ⁶ PFU/g	Réduction de 90 %	
	Pommes en tranches	10 ⁴ CFU/g T° : 4°C t : 24, 48,72 heures	1.1x10 ⁶ PFU/g	Réduction 89 % (24 h), 89 % (48 h) et 79 % (72 h)	
	Plats surgelés	5x10 ³ CFU/g • Décongélation, contamination + phages 30 min (T° ambiante) • Congélation • Décongélation 24 heures • Comptage des bactéries	1x10 ⁷ PFU/g	Réduction de 99 %	
Listex P100	Jambon en tranche (10 cm ²)	1x10 ⁵ CFU/tranche T° : 4°C t : 6 et 24 heures	5 µl/cm ² (10 ⁹ PFU)	Réduction de <i>plus de 95 %</i>	118
	Dinde non traitée (10 cm ²)	1x10 ⁵ CFU/tranche T° : 4°C t : 6 et 24 heures	5 µl/cm ² (10 ⁹ PFU)	Réduction de <i>plus de 95 %</i>	
	Bœuf salé (10 cm ²)	1x10 ⁵ CFU/tranche T° : 4°C t : 6 et 24 heures	5 µl/cm ² (10 ⁹ PFU)	Réduction de <i>plus de 95 %</i>	
A511et Listex P100	Saucisse (Hot-dog)	1x10 ³ CFU/g ou ml.	3x10 ⁸ PFU/g ou ml	En bas de la limite de détection	120
	Saumon fumé			Réduction de 93 %	
	Poitrine de dinde			Réduction de 97 %	
	Fruits de mer	Réduction de 99 %			
	Lait au chocolat	Ajout des phages Incubation T° : 6°C t : variable		Élimination importante de <i>L. monocytogenes</i> (réduction entre 99,8 % et 99,98 %)	
	Fromage mozzarella				
	Laitue iceberg				
	Feuilles de chou				

Il est crucial que les phages conservent leur capacité à tuer les bactéries pendant le stockage afin de réduire la contamination. De plus, leur ajout ne devrait pas altérer de manière significative la valeur nutritionnelle des produits ni compromettre leur attractivité pour les consommateurs au point de vente au détail. Plusieurs facteurs peuvent cependant influencer l'efficacité des phages lors de leur application en agroalimentaire, que ce soit en termes de survie des phages, de conditions environnementales ou d'interactions avec la matrice alimentaire et les bactéries cibles.

2.9 Facteurs influençant l'efficacité des phages en milieu alimentaire

L'interaction entre les phages et les bactéries est influencée par plusieurs facteurs, ce qui peut affecter leur efficacité lors de l'application en agroalimentaire. Selon Cooper [113], la concentration des phages, la température de stockage et le pH de l'aliment ont un impact sur leur infectivité. Par exemple, à faible température, les phages présentent une infectivité réduite. De plus, en présence d'acétate et du lactate de sodium (additif alimentaire) à un pH non contrôlé, les phages ont perdu leur efficacité après une minute d'incubation. Cependant, pour un pH de 4,5, la présence du lactate et de l'acide acétique n'a pas affecté l'activité des phages. Nabergoj et al. [121] ont démontré que l'augmentation de la vitesse de croissance des bactéries augmentera celle des phages et vice versa. De plus, l'adsorption des phages à la surface d'une bactérie dépend de sa physiologie, des conditions de culture, de la température, du pH et des forces ioniques du milieu. Fister et al. [122] ont étudié l'interaction entre le phage Listex P100 et 486 souches des bactéries collectées en Australie entre 1987 et 2012. Ils ont observé la présence de résistance chez certaines souches vis-à-vis du P100. Ils recommandent l'utilisation du phage Listex P100 au besoin plutôt que de manière continue pour contrôler *L. monocytogenes*. Selon les auteurs, la résistance résultant de la modification de la paroi cellulaire et des récepteurs semble être courante. Oechslin [123] a également signalé le développement de résistance chez plusieurs souches bactériennes aux phages. Une conséquence directe de la résistance bactérienne est la coexistence des phages et des bactéries. Cette coexistence a été rapportée dans la littérature par d'autres chercheurs [107, 124]. Selon Oechslin, la mutation spontanée des bactéries est la principale cause de cette résistance et de cette coexistence.

Principi [125] rapporte que l'apparition de la résistance bactérienne aux phages est potentiellement possible, car les bactéries possèdent ou peuvent développer plusieurs mécanismes pour prévenir les infections virales, notamment le changement ou la perte d'un récepteur, la sécrétion de substances inhibitrices de l'adhérence des phages, l'activation de mécanismes bloquant l'injection de l'ADN viral dans la cellule hôte, ainsi que l'inhibition de la réplication et de la libération des phages. L'auteur mentionne également l'utilisation d'un cocktail de phages comme stratégie pour contourner la résistance bactérienne. Lone [119] a également signalé que l'utilisation d'un cocktail de phages pourrait réduire la résistance bactérienne de *L. monocytogenes*.

Comme présenté en 2.8, Guenther et al. [120] ont obtenu des réductions significatives de *L. monocytogenes* grâce aux phages A511 et Listex P100 appliqués sur divers aliments, prêts-à-manger. Leur étude approfondie a permis d'explorer les facteurs influençant cette efficacité, notamment la température (6°C et 20°C), la concentration en phages (3×10^6 , à 3×10^8 PFU/g ou ml), et la durée d'incubation (6 à 13 jours) pour chaque formulation de phages. Les deux phages ont montré une efficacité comparable, mais leur activité variait selon la nature de l'aliment : les matrices animales favorisaient leur stabilité, tandis que les matrices végétales réduisaient leur action au fil du temps. Aucune résistance bactérienne n'a été observée, et les auteurs soulignent que l'efficacité des phages dépend également de leur capacité à diffuser dans la matrice, ce qui est facilité dans les aliments liquides, mais limité dans les solides. Les auteurs ont attribué ce phénomène aux substances contenues dans les plantes et qui pourraient désactiver les activités des phages. Ils ont observé que, dans les aliments liquides, la concentration en phages n'influence pas significativement leur activité antibactérienne, tandis que dans les aliments solides, une concentration plus élevée améliore leur action, probablement en raison de la faible mobilité des phages dans les matrices solides. Aucune bactérie résistante n'a été détectée, et la faible concentration bactérienne ne semble pas favoriser l'apparition de résistances. Enfin, la structure et la matrice de l'aliment influencent l'efficacité des phages, car elles peuvent protéger les bactéries. Les auteurs concluent qu'il est nécessaire d'optimiser la formulation des phages en fonction de chaque type d'aliment.

En somme, si l'optimisation de la formulation des phages selon la matrice alimentaire permet de maximiser leur efficacité, cette exigence représente également une contrainte pour l'industrialisation de ces agents. La nécessité d'adapter les conditions d'application à chaque type d'aliment complexifie les protocoles de production, de validation et de logistique. Pour favoriser une adoption à plus grande échelle, des approches intermédiaires, telles que le développement de cocktails de phages à large spectre ou la standardisation par catégories d'aliments, pourraient offrir un compromis viable entre performance ciblée et faisabilité industrielle.

2.10 Les surfaces bioactives à base de phages

En complément de leur application directe sur les aliments, l'intégration des phages dans des surfaces bioactives représente une stratégie émergente et prometteuse pour la sécurité alimentaire. Cette approche présente plusieurs avantages : réduction de la quantité de phages nécessaires, meilleure acceptabilité sociale, car elle atténue les préoccupations des consommateurs concernant l'ajout excessif de phages à la surface des aliments et diminution du risque de développement de bactéries résistantes aux phages [112].

Plusieurs approches ont été développées pour immobiliser des phages sur des supports. Cui et al. [126] ont publié une étude portant sur l'utilisation d'un film de chitosane incorporant des phages encapsulés dans des liposomes, permettant une libération contrôlée et préservant l'activité antibactérienne contre *E. coli* O157:H7 dans la viande. Cademartiri et al. [127] ont procédé à l'adsorption physique de phages sur des nanoparticules de silice modifiées chimiquement. Leur étude a démontré que les phages ne se détachent pas facilement par rinçage et restent actifs après adsorption.

L'orientation des phages à la surface joue également un rôle crucial dans leur efficacité. Bennet et al. [128] ont observé qu'une orientation inadéquate des phages immobilisés réduisait significativement leur capacité à capturer *Salmonella* soulignant l'importance de prendre en compte l'orientation des phages sur la surface. Une étude approfondie menée par Hosseinidoust et al. [129] a confirmé ce phénomène, en comparant cinq types de phages immobilisés sur des surfaces modèles. Les auteurs montrent que la symétrie du phage (ex. : PRD1) facilite sa capacité de capture et de lyse bactérienne, contrairement

aux phages asymétriques comme T4, dont l'efficacité est limitée par une orientation défavorable. Cette étude met en évidence les défis liés à l'immobilisation, tout en démontrant clairement le potentiel des surfaces bioactives à base de phages pour capturer les bactéries et provoquer la perturbation de leur membrane cellulaire menant à leur lyse, notamment chez *Salmonella* et *E. coli*. Dans le même esprit, Alves et al. [111] ont développé un film à base d'alginate incorporant un cocktail de phages actifs contre *E. coli* et *Salmonella*, démontrant que l'intégration dans la matrice ne compromettrait ni leur viabilité ni leur efficacité. L'étude met aussi en évidence l'influence des composants du film (comme la cinnamaldéhyde) sur les propriétés mécaniques et antibactériennes de l'ensemble, ce qui constitue une contribution précieuse pour la conception de surfaces bioactives comestibles. La méthode d'encapsulation dans une matrice biopolymère est transposable à la surface des papiers fonctionnels.

De nouvelles avancées confirment l'intérêt croissant pour les surfaces bioactives intégrant des phages dans le domaine de l'emballage alimentaire. Une étude expérimentale menée par Kamali et al. [130] a évalué des films comestibles composites à base de concentré de protéines de lactosérum (WPC) et de pullulan, enrichis en phage A511, ciblant *L. monocytogenes*. Les films ont montré une efficacité antibactérienne marquée, avec une réduction de 4 à 5 log CFU de *L. monocytogenes* sur géloses contaminées. L'étude met également en évidence une bonne stabilité du phage pendant 20 jours à 25 °C, confirmant la faisabilité de ces systèmes bioactifs à base de phages pour une utilisation dans des applications réelles. Dans une revue récente, Wagh et al. [131] soulignent que les agents antibactériens à base de phages représentent une alternative naturelle et hautement spécifique aux agents chimiques classiques. Ces systèmes permettent d'éviter la destruction des bactéries bénéfiques tout en ciblant spécifiquement les pathogènes. Une application concrète de cette approche a été démontrée par Radford et al. [132], qui ont conçu un film à base de PLA recouvert de gomme xanthane incorporant les phages Felix O1 et A511, ciblant respectivement *Salmonella* et *L. monocytogenes*. L'étude a montré une réduction de 6,31 log à 4°C et de 1,52 log à 10°C pour *L. monocytogenes*, ainsi que de 0,832 log à 4°C et de 1,30 log pour *Salmonella* à 10°C sur des tranches de dinde précuite emballées sous vide, démontrant l'efficacité du système dans un contexte réaliste. Les phages étaient libérés à 99,99 % dans les 30 premières minutes et restaient actifs pendant 30 jours, confirmant la

stabilité du revêtement. Ce travail souligne le potentiel du PLA comme support biodégradable dans la fabrication de surfaces bioactives efficaces, adaptées aux contraintes de l'industrie alimentaire. Leur spécificité, leur multiplication dans les bactéries cibles et leur sécurité vis-à-vis des humains en font des outils prometteurs pour l'emballage alimentaire actif.

Enfin, une analyse publiée en 2025 [133] insiste sur les défis de la mise en œuvre de ces technologies en contexte commercial. Elle met en évidence les obstacles liés à la stabilité des phages, à leur intégration dans les polymères, ainsi qu'aux considérations réglementaires. Toutefois, les auteurs concluent que les phages sont des agents antibactériens écologiques capables de répondre à la montée des résistances aux antibiotiques dans les chaînes alimentaires.

En plus des supports polymériques classiques comme les films à base d'alginate, de chitosane ou de plastiques fonctionnalisés, d'autres substrats tels que les nanofibres électrofilées, les hydrogels et certaines nanoparticules polymériques ont également été explorés pour l'immobilisation de phages. La revue de O'Connell et al. [134] propose un panorama complet des stratégies d'immobilisation, qu'elles reposent sur l'adsorption, la réticulation chimique ou les interactions électrostatiques, sur une grande diversité de surfaces, en mettant en lumière les enjeux liés à l'orientation, la densité de phages et la nature du substrat. À ce titre, Rindhe et al. [135] présentent une revue complète des films d'emballage fonctionnels intégrant des phages dans des matrices biopolymères, notamment à base d'alginate, de chitosane ou de pullulan. Ils mettent en évidence les facteurs critiques influençant la bioactivité des phages, tels que la nature du polymère, les techniques d'encapsulation, les conditions de séchage, la température de stockage ou encore les interactions entre la matrice et le phage. Bien que ces travaux portent principalement sur des supports autres que le papier, les enseignements qu'ils livrent sont directement transposables à la conception de surfaces bioactives cellulosiques.

Toutefois, l'utilisation du papier comme matrice bioactive présente un intérêt particulier en raison de sa biodégradabilité, de son faible coût et de sa compatibilité avec les procédés industriels existants dans le domaine de l'emballage. Toutefois, plusieurs défis techniques doivent être relevés, notamment la chimie de surface des fibres cellulosiques, leur charge

électrique, leur perméabilité à l'air et leur comportement en conditions d'humidité. La section suivante présente un état des connaissances sur la fabrication de papiers bioactifs intégrant des bactériophages, en mettant en lumière les stratégies d'immobilisation, les performances antibactériennes obtenues, ainsi que les contraintes liées à l'industrialisation de ces solutions.

2.11 Travaux sur la fabrication de papiers bioactifs

L'intégration de phages dans des matériaux d'emballage à base de papier suscite un intérêt croissant dans le domaine de la sécurité alimentaire. Toutefois, son utilisation comme support bioactif soulève plusieurs défis techniques. En effet, les propriétés physico-chimiques du papier, notamment sa rugosité, sa charge de surface, sa perméabilité à l'air, ainsi que la nature des fibres issues du procédé de mise en pâte (kraft, TMP ou recyclé), sont susceptibles d'influencer l'adsorption des phages à la surface du matériau et de jouer un rôle dans le maintien de leur activité au cours du temps. La maîtrise de ces paramètres est essentielle pour concevoir des papiers bioactifs efficaces, stables et compatibles avec les conditions réelles d'utilisation.

En l'absence d'agents antibactériens fonctionnels, le papier peut au contraire favoriser la persistance des pathogènes à sa surface. Une étude récente menée par Zwilling et al. [136] a montré que des papiers non blanchis, composés de fibres lignocellulosiques contenant environ 13 % de lignine, favorisaient la prolifération et la survie de *L. innocua* et *Salmonella Typhimurium* jusqu'à 40 jours, en conditions humides et nutritives. Ces résultats soulignent l'importance de fonctionnaliser activement les surfaces cellulosiques, par l'ajout de bactériophages ou d'autres agents antibactériens, afin de conférer une efficacité antibactérienne aux matériaux d'emballage à base de papier.

Plusieurs équipes de recherche ont développé des approches expérimentales concrètes pour surmonter les défis liés à l'utilisation de papier comme support. Anany et al. [58, 119] ont immobilisé un cocktail de phages sur des membranes cellulosiques modifiées. L'auteur souligne que la tête des phages porte généralement une charge négative, et que l'orientation des phages sur la surface peut influencer leur bioactivité. Pour modifier

la charge de surface, l'auteur a utilisé un polymère cationique (polyvinylamine). L'activité antibactérienne a été évaluée sur la viande crue et la viande prête à manger. Les effets de la concentration des phages, de la température de stockage (25°C, 10°C et 4°C) et des conditions d'emballage (aérobie, atmosphère modifiée et sous vide) ont été étudiés. La modification de la charge de surface des fibres celluloseuses a considérablement amélioré la bioactivité contre *L. monocytogenes* et *E. coli* des membranes utilisées. Dans l'ensemble des conditions, la croissance des bactéries a été contrôlée. La réduction des nombres de bactéries la plus intéressante était pour la température la plus basse. Il a été démontré que l'utilisation d'un cocktail de phages (LinM-AG8, LmoMAG13 et LmoM-AG20) ou Listex™ P100 entraîne une réduction significative de la croissance de *L. monocytogenes*. Cette étude a été réalisée à petite échelle et la solution de phage a été appliquée en faible volume (5 ml) sur des petites surfaces de papiers (rond de 5 cm de diamètre).

Jabrane et al. [137, 138] ont démontré la faisabilité de produire des papiers bioactifs à base de phages T4 en utilisant des procédés industriels standards tels que l'impression, le couchage à lame et la pulvérisation. Les phages ont été appliqués sur différents papiers, puis séchés par infrarouge à 36kW pendant 30 secondes, sans perte significative d'activité, à condition de maîtriser les paramètres du procédé. Les papiers à structure fermée (faible perméabilité à l'air) ont montré une meilleure bioactivité, car ils favorisent la rétention des phages en surface. Une force d'impression (300 N - 600 N) réduit la bioactivité du papier. La formulation d'une bioencre à base d'eau, de carboxyméthylcellulose et de gélatine a permis d'augmenter la stabilité thermique des phages et de préserver leur efficacité après plusieurs cycles de séchage/réhumidification. Ces travaux confirment que la réussite du papier bioactif repose sur l'adaptation conjointe de la formulation, de la structure du papier et des paramètres de production.

Les travaux de Hamzeh [139] ont montré que le calandrage d'un papier a significativement renforcé les propriétés antibactériennes d'un papier bioactif à base d'un cocktail de phages (T4 et EcomAg10) pour lutter contre *E. coli*.

Lone et al. [119] ont quant à eux testé différentes méthodes d'application de phages sur papier, incluant l'imprégnation directe, l'encapsulation dans des billes d'alginate déposées

sur la surface, et l'immobilisation sur membranes modifiées, démontrant leur efficacité contre *E. coli* O104:H4 sur graines germées et contre *L.monocytogenes*. Leur étude a mis en évidence que l'efficacité bactéricide dépend fortement du type de phage utilisé et de son orientation, le support n'étant pas du papier commercial, mais une membrane cellulosique.

Lai et al. [119] ont développé un revêtement antibactérien sur papier combinant alginate, nanoparticules d'argent et phages. Ce revêtement, appliqué sur du papier alimentaire et séché par infrarouge, a permis une réduction de 5 log de *L. monocytogenes*. Leur approche montre que l'alginate agit non seulement comme support de dispersion, mais aussi comme protecteur des phages, en préservant leur activité malgré les contraintes thermiques du procédé industriel.

L'ensemble de ces travaux montre que la fabrication de papiers bioactifs intégrant des phages est techniquement réalisable, mais nécessite une maîtrise rigoureuse de multiples paramètres physicochimiques, physiques et microbiologiques. La structure du papier, la charge de surface des fibres, la méthode d'application et les conditions de séchage sont autant de variables critiques qui interagissent entre elles et influencent directement la rétention, l'orientation, et l'efficacité antibactériennes des phages. Il apparaît également que l'usage de cocktails de phages, associé à des revêtements protecteurs et des procédés adaptés au contexte industriel, constitue une stratégie prometteuse pour surmonter les limites de stabilité et de performance.

2.12 Propriétés des papiers

Dans ce qui suit, les propriétés du papier, telles que le grammage, la perméabilité à l'air, l'indice Cobb et la densité, sont décrites, chacune étant abordée séparément afin de mieux comprendre leur influence sur l'adsorption des phages et l'efficacité antibactérienne des emballages.

2.12.1 Le grammage

Le grammage est une grandeur caractérisant un papier ou un carton, correspondant à sa masse surfacique, c'est-à-dire sa masse par unité de surface. L'unité utilisée est typiquement le gramme par mètre carré (g/m^2). Selon les normes ISO 536 [140] et 4046 [141], un papier est d'autant plus souple que son grammage est faible, il est d'autant plus rigide que son grammage est élevé. Dans le cadre du développement de papiers bioactifs, il ne constitue pas seulement une propriété mécanique. Le grammage influe directement sur le comportement fonctionnel du matériau, notamment en ce qui concerne la rétention d'humidité, la perméabilité à l'air, et la protection des phages.

Un papier à grammage plus élevé peut présenter une structure plus épaisse, capable de retenir l'eau plus longtemps et de limiter le dessèchement rapide des phages immobilisés, ce qui peut prolonger leur viabilité. L'augmentation de l'épaisseur pourrait également permettre une immobilisation partielle des phages dans la structure interne, les protégeant contre certaines contraintes mécaniques ou thermiques. En revanche, un grammage trop élevé pourrait réduire l'accessibilité des phages en surface, là où leur interaction avec les bactéries pathogènes est nécessaire pour assurer une activité antibactérienne efficace.

Ainsi, le grammage agit comme un paramètre d'équilibre : il doit être optimisé pour assurer à la fois la stabilité des phages, leur disponibilité en surface, et la compatibilité avec les exigences de l'emballage alimentaire (souplesse, imprimabilité, propriétés barrières). Enfin, le grammage a également un impact économique : un papier plus épais consomme davantage de matière première et augmente les coûts de transport, ce qui peut affecter la viabilité commerciale du produit. Son choix optimal doit donc prendre en compte l'ensemble de ces facteurs, tant fonctionnels qu'industriels.

2.12.2 La densité

La densité du papier correspond à la masse de la feuille par unité de volume. Elle est généralement exprimée en grammes par centimètre cube (g/cm^3) ou en kilogrammes par mètre cube (kg/m^3). Cette propriété est liée à l'épaisseur et le grammage. Elle peut affecter la capacité d'absorption d'eau. Dans le cadre des papiers bioactifs, une densité élevée

indique une structure plus fermée, limitant l'absorption des phages en réduisant le nombre de pores disponibles. À l'inverse, une faible densité accroît la perméabilité à l'air et favorise une meilleure pénétration des phages dans la matrice cellulosique.

2.12.3 L'indice Cobb

L'indice Cobb mesure la quantité d'eau qu'un papier ou carton peut absorber en conditions normalisées conformément à la norme ISO 535:2014 [142]. Il est couramment utilisé dans l'industrie papetière pour évaluer l'absorption d'eau par le papier. Il correspond à la masse d'eau absorbée par unité de surface dans des conditions normalisées. Il est exprimé en grammes d'eau absorbés par une feuille de papier de taille spécifique en un certain temps. Ce paramètre sera utilisé pour définir la quantité de la solution de phages appliquée sur chaque type de papier.

Dans le contexte des papiers bioactifs, l'indice Cobb est un paramètre déterminant pour contrôler la quantité de solution de phages appliquée sur le support. Un papier trop absorbant pourrait entraîner une pénétration excessive de la solution dans la matrice, limitant la présence de phages en surface, là où leur action antibactérienne est requise. À l'inverse, un indice trop faible peut réduire l'absorption, limitant la charge effective en phages. L'indice Cobb permet donc d'ajuster les conditions d'application des phages en fonction du type de papier, et de garantir un compromis entre rétention efficace, accessibilité des phages, et stabilité à l'humidité.

2.12.4 La perméabilité à l'air

La perméabilité à l'air du papier se réfère à la mesure de la quantité d'air qui peut traverser le papier. Elle est exprimée en ml/min. Dans le cadre des papiers bioactifs, une perméabilité élevée indique une structure plus ouverte, ce qui peut faciliter la diffusion de l'humidité et accélérer le dessèchement des phages, réduisant potentiellement leur viabilité. À l'inverse, une perméabilité plus faible peut favoriser le maintien d'un microenvironnement humide propice à la stabilité des agents antibactériens. Cette propriété est donc à considérer dans l'optimisation du support pour assurer à la fois efficacité fonctionnelle.

2.13 Propriété de surface

Dans le cas d'un papier utilisé comme emballage, un traitement de surface est souvent appliqué pour éviter que le papier n'absorbe pas l'eau et les graisses. Ce type de traitement rend généralement la surface hydrophobe [143]. Il consiste en l'application de résines hydrophobes telles que les cires ou le polyéthylène. Ces traitements améliorent la résistance du papier en conditions humides et contribuent à prolonger la durée de conservation du produit emballé. Cependant, dans le cadre des papiers bioactifs, cette hydrophobie peut constituer un défi important : la solution de phages étant une suspension aqueuse polaire, elle présente une mauvaise mouillabilité sur une surface hydrophobe. Cela peut limiter l'uniformité de l'application, réduire l'adsorption des phages sur les fibres et nuire à leur efficacité antibactérienne. La mouillabilité constitue donc un moyen simple, rapide et pertinent pour déterminer les propriétés de surface de papier. C'est un indicateur de son aptitude à recevoir une solution de phages. Lorsqu'une goutte d'eau se dépose sur une surface, un équilibre entre les tensions superficielles de trois phases (solide, liquide et gaz) se forme : la goutte prend la forme d'une calotte sphérique. Un angle de contact θ , formé entre la surface du solide et la tangente au point de contact, peut alors être mesuré. Cette méthode permet de caractériser l'interaction entre un liquide et un solide, et donc de déterminer l'hydrophilicité et l'hydrophobicité d'un matériau [144](Figure 2.5).

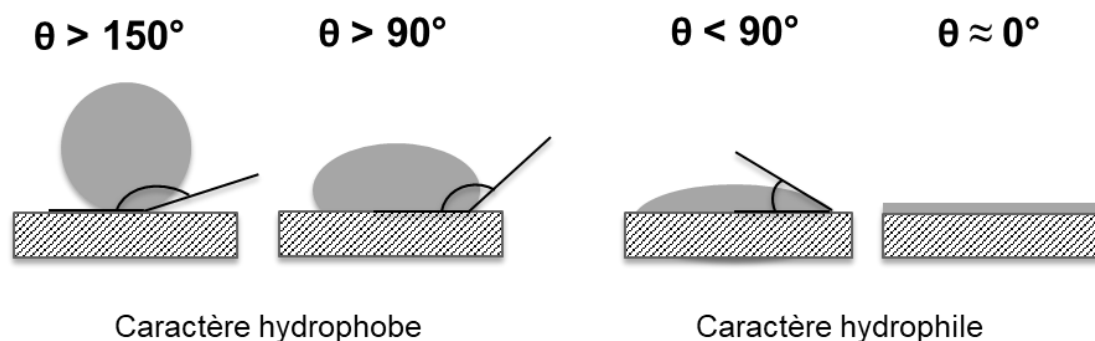


Figure 2.5 Schéma illustrant l'évolution de l'angle de contact θ d'une goutte d'eau sur une surface de papier. Un angle de contact élevé traduit un comportement hydrophobe, tandis qu'un angle faible traduit un comportement hydrophile.

Une surface hydrophobe présente une faible affinité avec l'eau, tandis qu'une surface hydrophile présente une forte affinité avec l'eau, entraînant un étalement de la goutte. La

la mouillabilité totale est définie lorsque l'angle de contact à la surface du solide approche zéro. La nature hydrophile ou hydrophobe de la surface d'un emballage en papier influence ainsi sa mouillabilité par une suspension de phages, qui est une solution aqueuse polaire. Dans ce contexte, il est nécessaire de documenter le caractère hydrophobe ou hydrophile de différents papiers afin d'analyser son influence sur l'application des phages et sur leur activité antibactérienne. Par ailleurs, l'ajout d'un agent tensioactif peut abaisser la tension de surface de la solution des phages, améliorant ainsi sa capacité à mouiller la surface du papier, ce qui se traduit par une diminution de l'angle de contact.

2.13.1 Agents Tensioactifs

Les agents tensioactifs sont des molécules organiques constituées de deux parties distinctes : une partie hydrophobe (qui n'aime pas l'eau, « queue hydrophobe ») et une partie hydrophile (qui aime l'eau, « tête polaire ») (Figure 2.6) [145].

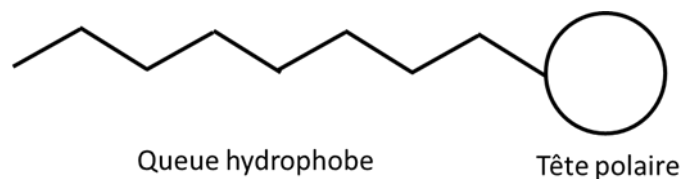


Figure 2.6 Représentation schématique générale d'un tensioactif.

En raison de cette dualité, les tensioactifs peuvent se rassembler à la surface d'un liquide pour former une couche mince appelée film de surface. Cette couche peut réduire la tension superficielle entre deux liquides ou entre un liquide et un solide, ce qui facilite les processus de mélange, de dispersion et d'émulsion. Ils sont largement utilisés dans l'industrie pour des applications telles que la fabrication, de détergents, de cosmétiques, de produits alimentaires, de produits pharmaceutiques, de peintures, d'encres, de pesticides, de produits pétroliers, etc. [146].

À faible concentration, les têtes polaires s'orientent vers le liquide tandis que les queues hydrophobes se dirigent vers l'air ou le substrat, améliorant ainsi l'adhésion d'une solution aqueuse. Toutefois, si la concentration dépasse un certain seuil, les molécules

supplémentaires ne s'adsorbent plus aux interfaces, mais forment des agrégats appelés micelles en solution. Ce seuil est appelé la Concentration Micellaire Critique (CMC) [147].

La CMC constitue un repère important pour le dosage des tensioactifs : en travaillant autour de cette concentration, on maximise la réduction de la tension de surface sans induire de formation excessive de micelles. Une concentration trop élevée peut, en théorie, conduire à des effets répulsifs entre micelles. Cependant, dans certaines situations, notamment en présence de surfaces très hydrophobes, des concentrations supérieures à la CMC sont nécessaires pour assurer une mouillabilité et un étalement adéquats du film liquide. Dans notre étude, une concentration de 0,5 % a été choisie, sur la base des seuils d'usage en formulation alimentaire.

2.13.1.1 L'agent tensioactif Tween 80

Parmi les différents agents tensioactifs disponibles, le Tween 80 (Monooélate de polyoxyéthylène sorbitane), est largement utilisé dans les formulations biologiques en raison de ses propriétés tensioactives douces, sa biocompatibilité et sa faible toxicité. Il est composé d'une tête hydrophile de sorbitane et de plusieurs groupes d'oxyde d'éthylène en chaîne, lesquels confèrent une structure à queue hydrophobe [148]. L'agent tensioactif Tween 80 est non ionique, c'est-à-dire qu'il ne porte pas de charge électrique, contrairement aux tensioactifs anioniques ou cationiques. Cette propriété est essentielle dans un contexte bioactif, car elle limite les interactions électrostatiques non spécifiques avec les phages et contribue à préserver leur intégrité et leur infectivité. Les tensioactifs non ioniques sont ainsi souvent privilégiés pour les formulations contenant des virus, des protéines ou des cellules. Il est de grade alimentaire, approuvé par le FDA, soluble dans l'eau et compatible avec de nombreux solvants organiques. De plus, il est reconnu par la FDA comme un agent sûr lorsqu'il est présent à des concentrations inférieures à 1% [149]. De même, Santé Canada a établi que des concentrations de l'agent tensioactif Tween 80 (ci-après Tween 80) inférieures à 0,5% sont acceptables [150]. Il peut également être utilisé comme agent mouillant, car il permet de répartir la goutte de phages sur la surface du papier. Il sert aussi d'agent moussant et de tensioactif pour la culture cellulaire. Sa concentration micellaire critique (CMC) est d'environ 14 mg/L [151]. En deçà de cette valeur,

les molécules de Tween 80 s'alignent à l'interface liquide-solide, réduisant efficacement la tension de surface.

En plus de son rôle de mouillant, le Tween 80 a fait l'objet d'une étude pour son potentiel à perturber les biofilms bactériens, notamment ceux impliquant *E. coli* O104:H4 [152]. Ses mécanismes d'action impliquent une capacité à déstabiliser les biofilms en interférant avec leur cohésion et leur structure, altérant ainsi la matrice extracellulaire. Les résultats de ces travaux ont montré que le Tween 80 est un tensioactif particulièrement efficace pour perturber les biofilms, tout en étant non toxique. Ces découvertes soulignent le potentiel du Tween 80 à améliorer l'efficacité des agents antibactériens en favorisant la pénétration et l'interaction avec les micro-organismes. Par conséquent, l'utilisation du Tween 80 pourrait faciliter la rencontre entre les phages et les bactéries ciblées. Son utilisation s'est principalement concentrée sur la réduction de la tension superficielle des solutions de phages, favorisant ainsi l'humidification des surfaces hydrophobes des supports utilisés.

Toutefois, il est essentiel de s'assurer que le Tween 80 n'altère pas la viabilité ou l'efficacité des phages eux-mêmes. Des tests de lyse doivent être menés pour confirmer que le tensioactif est compatible avec les préparations phagiques à la concentration utilisée.

2.14 Modification des propriétés du papier

Bien que la littérature souligne le potentiel des papiers bioactifs comme supports pour l'immobilisation de bactériophages, plusieurs limitations structurelles et physico-chimiques ont été identifiées. Des propriétés telles que la perméabilité à l'air ainsi que le caractère hydrophile ou hydrophobe de la surface influencent directement la rétention des phages, leur stabilité dans le temps et leur efficacité antibactérienne.

Dans ce contexte, il devient nécessaire d'ajuster ou de modifier certaines caractéristiques du papier afin d'optimiser son comportement en tant que matrice bioactive. Les sections suivantes présentent différentes stratégies de modification physique et chimique visant à améliorer l'adsorption des phages, leur distribution homogène à la surface et leur

efficacité fonctionnelle, tout en maintenant la compatibilité avec les procédés industriels et les exigences des applications d'emballage.

2.14.1 Modification par calandrage

Le calandrage consiste à presser les papiers entre deux rouleaux métalliques chauffants, à une température de 190°F (environ 88°C). Cette température correspond à des conditions typiques utilisées dans l'industrie papetière pour réduire la perméabilité à l'air des papiers sans les dégrader. Cette opération compacte la structure et lisse la surface du papier comme démontré par Vernhes et al. [153]. Le calandrage diminue également la vitesse de pénétration des liquides, en raison de la fermeture partielle des pores. Cet effet a été démontré notamment par Nicasy et al. [154], qui rapportent une réduction de la vitesse de pénétration dans des papiers hydrophobisés calandrés. Par conséquent, il est raisonnable de penser que la quantité de phages restant à la surface devrait augmenter, car une structure moins poreuse limite leur pénétration dans la matrice fibreuse.

2.14.2 Modification par Alkylcétène dimère (AKD)

Parmi les agents d'hydrophobisation utilisés en papeterie, plusieurs composés sont employés pour conférer au papier une résistance accrue à l'eau tels que les Alkylcétène dimère (AKD), les Alkenylsuccinique Anhydrides (ASA), les copolymères de styrène tels que les copolymères Styrène-Maléique Anhydride (SMA) et les copolymères styrène-acrylique cationiques ainsi que les résines à base de colophane (rosin sizing). Ces agents, appliqués individuellement ou en combinaison, permettent d'adapter les propriétés de mouillabilité et de résistance du papier aux exigences spécifiques des applications d'emballage [155, 156].

L'AKD est largement reconnu pour son efficacité, sa stabilité chimique et sa compatibilité avec les procédés papetiers. Contrairement à d'autres agents comme l'ASA, qui présente une réactivité élevée, mais une forte sensibilité à l'hydrolyse, l'AKD est plus stable en milieu aqueux, ce qui facilite son utilisation dans des formulations industrielles et améliore la reproductibilité des performances du papier traité [155]. L'AKD agit par réaction avec les groupes hydroxyles des fibres de cellulose, formant des liaisons β -kétosters qui

rendent la surface du papier durablement hydrophobe. Cette liaison chimique permet une résistance prolongée à l'eau.

Il est principalement employé pour améliorer la résistance du papier à l'eau et à la graisse, ainsi que pour améliorer sa résistance à la traction et sa rigidité [157]. Lorsqu'il est ajouté dans la masse avec la pâte à papier, l'AKD se fixe sur les fibres de cellulose et forme des ponts réticulants entre elles et peut former des liaisons covalentes avec les groupes hydroxyles présents sur les fibres de cellulose [158]. Ce choix s'inspire des emballages à base de papier intégrant des couches barrières, dans lesquels une surface à faible mouillabilité est utilisée pour améliorer la résistance à l'humidité ou limiter la migration de substances. Dans cette étude, l'utilisation de l'AKD permet de reproduire cette fonction barrière par modification interne.

2.15 Hypothèses de recherche

Rappelons que le but du projet est de développer un emballage alimentaire antibactérien à base de fibres cellulosiques dans lequel seront intégrés des phages actifs ciblant *L. monocytogenes*.

Avec la revue de la littérature, quatre hypothèses ont été formulées pour établir les objectifs de recherche du projet :

1. L'application d'une formulation de bactériophages sur la surface d'un emballage alimentaire à base de fibres cellulosiques permettrait de lutter contre *L. monocytogenes*.
2. Les caractéristiques des papiers et les paramètres d'application des bactériophages sur les papiers peuvent influencer l'efficacité du papier bioactif ;
3. Les conditions de séchage et d'entreposage des papiers bioactifs influenceraient l'efficacité antibactérienne.
4. La modification de la tension de surface de la solution de phages pourrait améliorer la mouillabilité et minimiser la quantité de phages appliquée sur des surfaces hydrophobes.

2.16 Les objectifs de recherche

Pour valider ou informer, les hypothèses, les objectifs de recherche suivants sont proposés :

- 1- Étudier l'interaction entre les phages et les bactéries *L. monocytogenes* pour le criblage des paramètres expérimentaux significatifs sur l'activité antibactérienne ;
- 2- Analyser les paramètres d'application des bactériophages sur différents types de papier et leurs influences sur ses propriétés antibactériennes ;
- 3- Évaluer l'impact de la modification des différentes propriétés des papiers et de l'ajout d'additifs sur l'activité antibactérienne des papiers bioactifs ;
- 4- Étudier l'effet de diverses conditions de séchage et d'entreposage sur l'activité antibactérienne des papiers bioactifs.

L'originalité de ce projet réside dans les trois contributions scientifiques sur les papiers bioactifs à base de phages. Il présente d'abord l'utilisation de formulations de phages de grade alimentaire appliquées sur un papier de spécialité à usage industriel, destiné à la fabrication d'emballages alimentaires visant à limiter la contamination par *L. monocytogenes*. Ensuite, il évalue la stabilité et la résistance de ces formulations de phages dans différentes conditions de séchage et d'entreposage. Enfin, il examine l'effet de l'ajout d'un agent tensioactif destiné à améliorer la répartition des phages sur des surfaces hydrophobes. C'est un aspect qui demeure peu documenté dans la littérature scientifique.

Chapitre 3 - Matériels et méthodes

Ce chapitre se divise en deux sections. La première présente le matériel utilisé, tandis que la seconde est consacrée aux méthodes expérimentales employées.

3.1 Matériel

3.1.1 Souche bactérienne

La souche bactérienne utilisée dans cette étude est *Listeria monocytogenes* sérotype 4b (souche ATCC 19115), fournie par Cedarlane (Burlington, ON, Canada) [159].

3.1.2 Milieu de culture

Les milieux de culture liquide TB (Bouillon Trypticase - Sigma Aldrich), TA (Trypticase Agar – Becton, Dickinson and company), Agar (Fisher, bioreagents) et Oxford Agar (Sigma Aldrich), complété avec le supplément sélectif Oxford pour *Listeria* (Sigma Aldrich), milieu de culture sélectif pour *L. monocytogenes*, ont été utilisés dans cette étude. Ces milieux nutritifs favorisent la croissance de *L. monocytogenes*, chacun étant adapté à des étapes spécifiques de culture ou de dénombrement.

3.1.3 Bactériophages

Deux produits commerciaux de phages spécifiques de *L. monocytogenes* ont été utilisées dans cette étude :

- **Listex™ P100** (Microcos, Wageningen, Pays-Bas) : Ce produit contient exclusivement le phage P100, à une concentration d'environ 10^{11} PFU (Plaque-Forming Units) /ml. Il a été acquis auprès de Think Ingredients (Burlington, ON, Canada).

- **Listshield™** (Intralytix Inc., Baltimore, MD, USA) : Ce produit est un cocktail de six phages à une concentration d'environ 10^8 PFU, comprenant les phages LIST-36 (ATCC # PTA-5376), LMSP-25 (ATCC # PTA-8353), LMTA-34 (ATCC # PTA-8354), LMTA-57 (ATCC # PTA-8355), LMTA-94 (ATCC # PTA-8356), LMTA-148 (ATCC # PTA-8357) [117].

Les deux produits ont été conservés à 4°C selon les instructions des fournisseurs jusqu'à leur utilisation.

3.1.4 Produits chimiques

Dans cette étude, plusieurs produits chimiques ont été utilisés pour diverses fonctions spécifiques.

Le tampon saline-magnésium (SM) a été utilisé pour maintenir la stabilité et la viabilité des bactériophages lors de la dilution. Il s'agit d'une solution aqueuse qui contient du chlorure de sodium (NaCl, 100 mM, Fisher Scientific) et du sulfate de magnésium ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8 mM, Sigma Aldrich). Une solution tampon (UltraPure™ 1M Tris-HCl, pH 7,5 Thermo Fisher Scientific) a été utilisée pour ajuster le pH à 7,5.

Les huiles essentielles évaluées dans le cadre de cette étude comprennent une sélection diversifiée :

- Huile extraite de l'épinette noire : Black spruce de BoreA Canada (Chapais, QC)
- Huile extraite de feuilles de menthe : Menthe poivrée d'Aliksir (Québec, QC, Canada)
- Huile extraite du cèdre : Huile de cèdre de Cedar shack (Québec, QC, Canada)
- Huile extraite de clou de girofle de Kissan (Scarborough, ON, Canada)
- Huile extraite de bouleau jaune de BoreA Canada (Chapais, QC)

L'agent tensioactif utilisé est le Tween 80 (Fisher Scientific, États-Unis).

L'Alkylcétène dimère (AKD) (Kemira) a également été employé dans cette étude.

3.1.5 Les papiers de base et les pâtes utilisées

Dans cette étude, le papier a été choisi comme support principal pour la fabrication d'un emballage alimentaire présentant des propriétés antibactériennes. Deux catégories de papiers ont été utilisées : des papiers de base fournis par le partenaire Kruger, ainsi que des papiers formettes standards spécialement fabriqués en laboratoire pour assurer un meilleur contrôle des propriétés finales.

3.1.5.1 Les papiers de base

Les papiers de base présentent des propriétés physiques différentes adaptées à des applications d'emballage alimentaire spécifiques :

- **Papier 30K (Oil & grease resistant-OGR):** grammage de 30 g/m² constitué exclusivement de fibres longues raffinées de type *Northern Bleached Softwood Kraft* (NBSK). Ce papier est conçu pour résister à la migration des graisses grâce à un procédé d'encollage intégré lors de la fabrication des papiers.
- **Papier 50K (Release paper):** grammage de 50g/m² utilisé dans les applications nécessitant des propriétés antiadhésives, ce papier est fabriqué à partir d'un mélange de 40 % de fibres courtes de type *Bleached Hardwood Kraft* (BHK) et de 60 % de fibres longues de type *Bleached Softwood Kraft* (BSK). Comme le papier 30K, ce papier bénéficie d'un procédé d'encollage intégré lors de la fabrication.

Les deux papiers du partenaire ont fait l'objet d'une caractérisation, dont les résultats seront présentés au chapitre 4 et comparés à ceux des formettes standards.

3.1.5.2 La pâte à papier pour les formettes standards

La pâte à papier utilisée pour la fabrication des formettes standards a été obtenue par remise en pâte du papier de base Kruger 50g/m². Ce papier, initialement destiné aux applications alimentaires, a été choisi afin de conserver la même composition cellulosique tout en permettant un meilleur contrôle des conditions de préparation et, par conséquent, des propriétés physiques des formettes produites.

3.2 Méthodes

La démarche expérimentale mise en œuvre dans cette étude a été structurée en cinq étapes successives, visant à évaluer l'efficacité antibactérienne de formulations à base de phages appliquées sur des supports cellulosiques. L'étape 1 portait sur le choix des agents antibactériens, incluant deux formulations de phages et cinq huiles essentielles. L'étape 2 consistait à étudier les interactions entre l'agent sélectionné et les bactéries cibles. L'étape 3 visait la préparation et la caractérisation des papiers destinés à recevoir les

formulations. L'étape 4 correspondait à l'application de l'agent antibactérien en conditions de laboratoire, intégrant plusieurs variables telles que le type de support, la concentration de l'agent, les conditions de séchage, d'entreposage et d'humidité. Enfin, l'étape 5 comprenait des essais semi-pilotes réalisés à l'aide d'une technique de pulvérisation à grande échelle (CLC), dans des conditions plus proches d'un contexte industriel. Les méthodes expérimentales spécifiques associées à chaque étape sont représentées dans les encadrés du schéma (Figure 3.1) et seront décrites plus en détail dans les sections correspondantes. L'ensemble des essais décrits dans ce chapitre a été réalisé en triplicata, et chaque expérience a été répétée trois fois de manière indépendante.

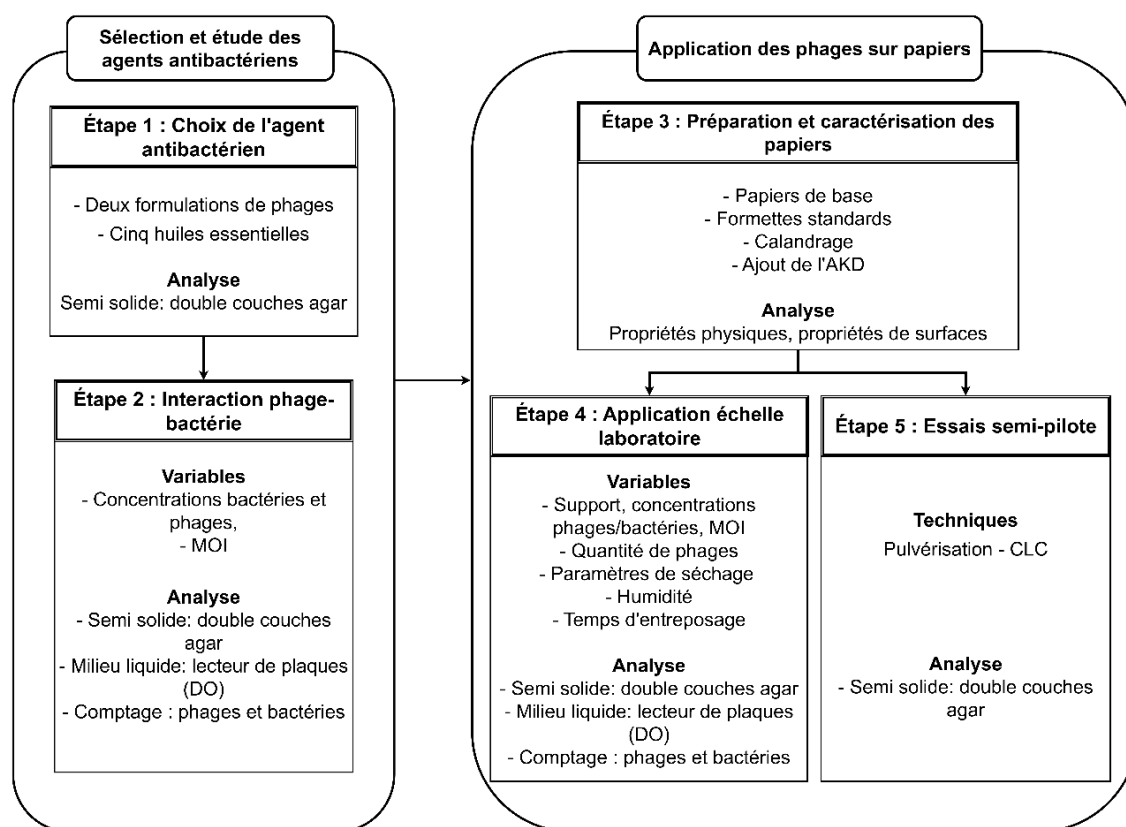


Figure 3.1 Schéma récapitulatif des méthodes et approches méthodologiques utilisées dans cette étude.

3.2.1 Préparation et dénombrement de la souche bactérienne

3.2.1.1 Préparation des milieux de culture

Le bouillon TB a été préparé conformément aux recommandations du fabricant, en dissolvant 26 g de poudre dans 1 L d'eau distillée. La solution a été chauffée jusqu'à ébullition pendant une minute sous agitation magnétique afin d'assurer la dissolution complète du soluté, puis stérilisée par autoclave à 121 °C pendant 15 minutes. Ce milieu liquide a été utilisé pour la croissance de la culture bactérienne.

Le milieu TA a été préparé de manière similaire, en dissolvant 41 g de poudre de Trypticase Agar dans 1 L d'eau distillée. Le mélange a été chauffé jusqu'à ébullition pendant une minute sous agitation magnétique pour assurer une dissolution complète, puis stérilisé à 121 °C pendant 15 minutes à l'autoclave. Le milieu a ensuite été versé dans des boîtes de Pétri stériles et laissé à solidifier à température ambiante.

Le milieu Oxford a été utilisé pour la validation de l'identité de la souche. Il a été préparé conformément aux recommandations du fabricant, en dissolvant 27,8 g de poudre dans 500 ml d'eau distillée et en portant à ébullition sous agitation afin d'assurer une dissolution complète. La solution a ensuite été stérilisée à 121 °C pendant 15 minutes à l'autoclave. Après refroidissement à 45-50 °C, le supplément stérile a été ajouté de façon aseptique, puis le milieu a été homogénéisé et distribué dans des boîtes de Pétri stériles pour solidification.

3.2.1.2 Culture de la souche bactérienne

La culture de *L. monocytogenes* a été préparée en transférant, à l'aide d'une boucle de microbiologiste stérile, une colonie bactérienne dans un tube contenant 5 ml de milieu de culture de TB. La solution a été incubée à 30°C pendant 18h avec une agitation de 120 rpm. Ces conditions résultent en une concentration cellulaire de 10^9 CFU/ml [160].

3.2.1.3 Dénombrement de la culture bactérienne

La concentration cellulaire a été déterminée par dénombrement sur gélose, selon la méthode décrite dans [58], et les résultats sont exprimés en CFU/ml (Colony Forming Units, CFU). La limite de détection associée au volume ensemencé (100 µl) est de 10 CFU/ml.

3.2.2 Formation d'un tapis bactérien (double couche Agar)

La technique de la double couche d'Agar a été utilisée pour réaliser le test antibactérien avec les phages. Cette méthode consiste à créer deux couches distinctes dans une boîte de Pétri [161].

La première couche est constituée de 20 ml de gélose TA, préparée selon la procédure décrite précédemment, coulée dans des boîtes de Pétri stériles et laissée à solidifier à température ambiante, sous la hotte. La nature solide de cette couche rend difficile la diffusion des phages. Pour la deuxième couche, un bouillon TB contenant 7,5 g/L d'Agar a été préparé comme indiqué précédemment, puis maintenu à environ 45-50 °C dans un bain-marie afin d'éviter sa solidification prématurée. Juste avant le coulage, 100 µl de la solution bactérienne ont été ajoutés au 3 ml de TB/Agar semi-solide, puis le mélange a été homogénéisé par agitation. Ce volume a ensuite été versé sur la première couche de TA solidifiée et reparti uniformément.

Les boîtes de Pétri ont été incubées à 30°C pendant 18h. La nature semi-solide de cette deuxième couche offre deux avantages :

- Elle assure une distribution homogène des bactéries.
- Elle permet aux phages de mieux diffuser afin d'interagir avec les bactéries présentes.

Les bactéries se multiplient sur le milieu de culture gélosé, formant un tapis bactérien uniforme.

3.2.3 Détermination de la concentration de phages

La concentration de phages commerciaux a été validée en mélangeant 100 µl des bactéries *L. monocytogenes* et 100 µl de phages de différentes dilutions dans un milieu nutritif

gélose semi-solide formée de TB (3 ml) et d'Agar (7,5 g/L) [161]. Le mélange, de chaque dilution, est versé sur une boîte de Pétri contenant le TA. La boîte est ensuite mise dans l'incubateur pendant 24 heures afin de permettre la lyse des bactéries par les phages et l'apparition des plaques ou zones de lyse. L'infection et la mort des bactéries se traduisent par l'apparition d'une zone claire, visible à l'œil nu, appelée zone de lyse (Figure 3.2).

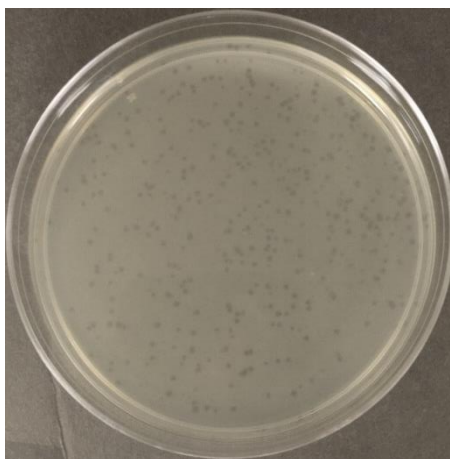


Figure 3.2 Plaques ou zones de lyse après 24 heures d'incubation.

Ces plaques ont été comptées pour chaque dilution afin de déterminer la concentration de phages. Pour pouvoir compter les phages, il faut que leur nombre soit compris entre 15 et 250 PFU/ml (PFU = Plaque Forming Units). La concentration initiale peut être calculée grâce à la formule suivante [162]:

$$\text{Concentration de phages } \left(\frac{\text{PFU}}{\text{ml}} \right) = \frac{x}{V_{\text{inoculum}} \times 10^{-\text{dil}}}$$

Équation 3.1 : concentration de phages.

Avec x : le nombre de plaques comptées, V_{inoculum} : le volume mis dans la boîte et dil : la dilution utilisée.

3.2.4 Détermination de l'activité antibactérienne en milieu semi-solide et liquide

Deux tests ont été utilisés pour évaluer l'activité antibactérienne : un test en milieu semi-solide et un test en milieu liquide. Ces méthodes ont permis d'analyser les interactions

entre les phages, les agents antibactériens (y compris les papiers bioactifs) et *L. monocytogenes*.

3.2.4.1 Test semi-solide

Le test antibactérien en milieu semi-solide permet d'analyser l'efficacité des agents antibactériens dans des conditions qui s'approchent de la réalité (ex. contamination de la viande) [161].

Deux méthodes ont été adoptées pour effectuer le test antibactérien.

- Un ajout direct des agents antibactériens sur le tapis bactérien.
- Adsorption des agents antibactériens sur des papiers (formation des papiers bioactifs) et ensuite mise des papiers en contact avec le tapis bactérien.

Dans le cas des phages, la première stratégie permet d'éliminer l'influence de leur orientation lors de l'adsorption sur une surface. En effet, lorsqu'ils sont fixés sur un support, les phages peuvent s'adsorber via la tête ou la queue, ce qui peut affecter leur activité. La deuxième permet d'évaluer l'effet des propriétés de surface du papier, par exemple, sa nature chimique (hydrophile ou hydrophobe), sur l'efficacité des phages.

Expérimentalement, un volume déterminé de la solution de phages est appliqué sur le tapis bactérien. Lorsqu'un papier est utilisé, une quantité déterminée de la solution est d'abord déposée sur celui-ci, puis le papier est placé en contact avec le tapis bactérien. Dans les deux cas, les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24 heures, afin de permettre la lyse des bactéries par les phages et l'apparition de zones de lyse (plaques) visibles à l'œil nu (Figure 3.3). Dans le cas où aucune zone de lyse n'apparaît, cela peut s'expliquer soit par la résistance des bactéries, soit par le fait que les phages ne sont pas spécifiques à cette souche.

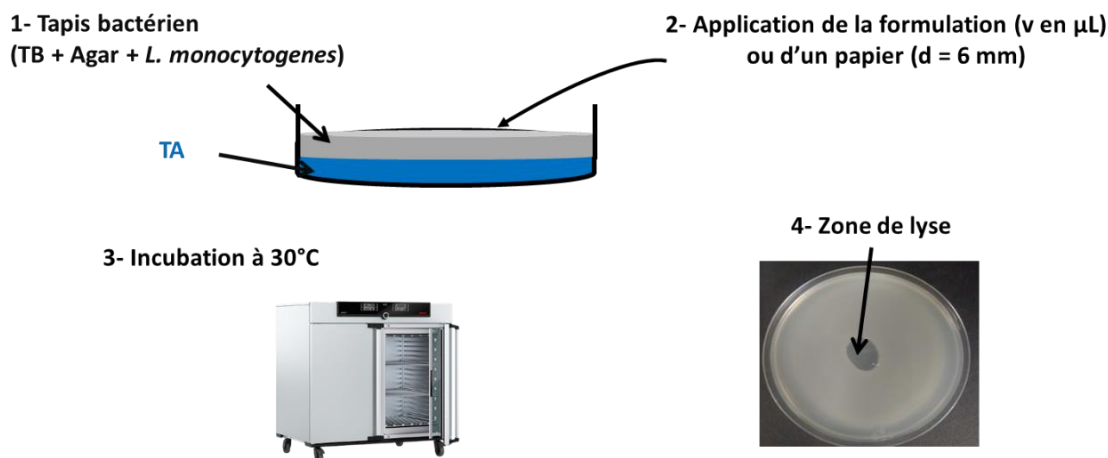


Figure 3.3 Représentation d'un test antibactérien en milieu semi-solide 1) formation d'un tapis bactérien, 2) application d'une solution de phages ou d'un papier traité avec du phage, 3) incubation (interaction phages-bactéries), 4) lyse des bactéries et apparition d'une zone de lyse.

La mesure de l'aire de cette zone permet de quantifier le développement de la zone de lyse en fonction du temps, en fonction de la quantité et de la nature de phages ajoutés. Dans les deux stratégies, des images de la zone de lyse ont été capturées à l'aide d'un appareil photo permettant le suivi de son développement en fonction du temps. Les images ont été analysées par un logiciel d'analyse d'image (*Adobe Photoshop CS3*). Pour la première stratégie, un disque de papier de 6 mm de diamètre est collé à l'extérieur de chaque boîte de Pétri, servant de repère pour le calcul de l'aire. Dans le cas de la deuxième stratégie, le papier utilisé comme support de phages a été utilisé directement comme référence pour cette mesure.

Dans les deux cas, un échantillon de matière a ensuite été prélevé dans la zone de lyse afin de vérifier la présence éventuelle de *L. monocytogenes* résiduelle. Le dénombrement sur gélose a ensuite été effectué.

3.2.4.2 Test en milieu liquide – lecteur de plaques

3.2.4.2.1 Multiplicité d'infection (MOI)

La multiplicité d'infection (Multiplicity of Infection, MOI) correspond au rapport entre le nombre de particules de phages infectieux (PFU) et le nombre de bactéries viables (CFU) présentes au moment de l'inoculation :

$$\text{MOI} = \frac{\text{Nombre de PFU}}{\text{Nombre de CFU}}$$

Équation 3.2 Calcul de la multiplicité d'infection (MOI).

Ce paramètre permet de standardiser les conditions d'infection et de faciliter la comparaison entre différentes conditions expérimentales. Un MOI élevé signifie qu'un plus grand nombre de phages est disponible par bactérie, tandis qu'un MOI faible indique une proportion moindre. Dans ce travail, le MOI a été calculé en divisant le nombre de phages ajoutés par le nombre de bactéries initialement présentes dans les puits. Par exemple, pour 10^7 CFU/ml et 10^9 PFU/ml, le MOI est de 100. Ce calcul a permis de sélectionner les MOI testés dans les expériences et d'adapter la quantité de phages aux densités bactériennes visées.

3.2.4.2.2 Description du test

Le test d'interaction phages-bactéries en milieu liquide vise à évaluer la dynamique d'infection dans des conditions homogènes, en réduisant certaines variables, comme la mobilité des phages ou l'orientation des phages, et de s'assurer que celles-ci entrent plus efficacement en contact avec les bactéries. Les essais ont été réalisés en microplaque 96 puits et suivis à l'aide d'un lecteur BioTek Cytation 5 (Figure 3.4). Cet appareil mesure la densité optique (DO, 600 nm), proportionnelle à la concentration bactérienne, ce qui permet de quantifier la croissance et son inhibition par les phages. Le dispositif, doté d'un contrôle de température et d'une agitation, rend possible des lectures rapides et reproductibles et l'évaluation en parallèle de multiples conditions expérimentales (différentes concentrations de phages et de bactéries), y compris à faible densité bactérienne, point d'intérêt de cette étude. Pour les analyses, des puits sont réservés pour le témoin négatif et pour le témoin de croissance afin de vérifier respectivement l'absence de contamination et la validité du test. Dans le cas des papiers, les échantillons sont immergés dans la solution pendant un temps optimisé de 45 minutes, correspondant à la durée permettant la

libération maximale des phages. Ce temps a été déterminé après avoir évalué plusieurs durées: 10, 20, 30, 45 et 60 minutes.



Figure 3.4 Un lecteur de plaques de BioTek Cytation 5 et une plaque de 96 échantillons.

3.2.4.2.3 Vérification de la pureté et isolement bactérien

Pour certains échantillons sélectionnés selon les critères expérimentaux, un prélèvement a été effectué afin de vérifier l'absence de contamination et de confirmer l'identité bactérienne. La vérification a été réalisée à l'aide du milieu sélectif Agar Oxford. Une étape d'isolement bactérien a été réalisée dans le milieu de culture Tryptose Agar (TA) afin de séparer les bactéries du reste de la suspension et d'obtenir des colonies distinctes. L'ensemencement a été effectué à l'aide d'une boucle stérile, en veillant à obtenir une répartition homogène, et cette opération a été répétée trois fois pour chaque échantillon [119]. Après isolement, une colonie représentative a été repiquée à la fois sur TA et sur le milieu sélectif Agar Oxford. Les boîtes ont été incubées pendant 24 h à 30 °C avant l'observation des colonies.

3.2.4.2.4 Procédure expérimentale

Chaque puits (200 µl) est rempli de 140 µl de TB, et de 20 µl de SM et de 20 µl de chaque solution bactérienne. Dans le cas des expériences avec phages libres (phage direct), l'inoculum bactérien est ajusté pour obtenir dans chaque puits l'une des cinq concentrations finales suivantes : 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 ou 10^8 CFU/ml. Par la suite, 20 µl de chaque solution

de phages sont ajoutés dans les puits selon le MOI souhaité. Des témoins négatifs de TB (milieu de culture seul) et des témoins de croissance (bactéries seules) ont été analysés.

Dans le cas des expériences avec des phages adsorbés sur papier, trois concentrations bactériennes finales ont été testées : 10^4 , 10^5 et 10^6 CFU/ml. Les concentrations des phages de 10^4 à 10^8 PFU/ml ont été préparées et utilisées. Les disques de papier, traités avec 20 μ l de solution de phages, sont déposés dans les puits contenant 160 μ l de TB, 20 μ l de SM et 20 μ l de la suspension bactérienne. Ceux-ci ont ensuite été immergés dans les puits pendant 45 minutes, afin de permettre la libération des phages, puis retirés. Ensuite, la plaque de 96 puits est placée dans le lecteur à plaque, qui est équipé d'un système de contrôle de la température et d'un agitateur pour favoriser l'interaction phage-bactérie et la croissance bactérienne. Les puits sont incubés à 30°C. La densité optique (DO) est enregistrée, à des intervalles de temps réguliers de 20 minutes, au fil du temps, pendant 72 heures à une longueur d'onde de 600 nm. Chaque échantillon et chaque témoin a été réalisé en triplicata. La densité optique est utilisée comme mesure indirecte de la croissance bactérienne. Si l'agent antibactérien est efficace, une diminution de la densité optique sera observée dans les puits.

3.2.4.3 Calcul de la réduction logarithmique

La diminution de la population bactérienne après un traitement est généralement exprimée en réduction logarithmique, ce qui permet de comparer quantitativement l'efficacité des interventions. La réduction logarithmique a été calculée à partir des concentrations mesurées dans les échantillons témoins et traités, selon l'équation suivante [163] :

$$\text{Réduction logarithmique} = \log_{10} \frac{N_{\text{témoin},t}}{N_{\text{traité},t}}$$

Équation 3.3 Calcul de la réduction logarithmique ($\log_{10}$) de la population bactérienne, définie comme le logarithme du rapport entre la concentration bactérienne dans le témoin et celle de l'échantillon traité au temps t .

$N_{\text{témoin},t}$ = concentration bactérienne (CFU) du témoin au temps t après incubation,

$N_{\text{traité},t}$ = concentration bactérienne (CFU) de l'échantillon traité au même temps t .

Ce calcul exprime la diminution du nombre de bactéries en puissance de 10. Par exemple, une réduction de 2 log correspond à une diminution d'un facteur 100, tandis qu'une réduction de 5 logs correspond à une diminution d'un facteur 100 000, et ainsi de suite. Conformément aux recommandations de la *Food and Drug Administration* (FDA) et de l'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA), une réduction ≥ 5 logs de *L. monocytogenes*, avec une concentration résiduelle inférieure à 100 CFU/g, est considérée comme significative pour les aliments prêts à manger.

Cette approche a été utilisée comme indicateur de référence afin d'évaluer l'efficacité des différents traitements appliqués sur *L. monocytogenes*.

3.2.5 Préparation des papiers formettes standards

3.2.5.1 Mise en pâte et dilution des fibres

Deux kilogrammes de papier sec ont été déchirés manuellement en petits morceaux, puis désintégrés dans 20 litres d'eau pendant 15 minutes, conformément à la norme TAPPI T 205 sp-95. Cette opération a permis d'obtenir une suspension de fibres à 10% de consistance. Ensuite, 1 000 g de pâte ont été dilués dans 33 litres d'eau pour obtenir une consistance de 0,3 %.

3.2.5.2 Fabrication des formettes standards

Les papiers ont été préparés et caractérisés avant leur utilisation dans les différentes étapes expérimentales. Des formettes standards, d'environ 16 cm de diamètre, de différents grammages (30 g/m², 50 g/m², 90g/m² et 130g/m²) ont été produites selon la norme adaptée de PAPTAC C.4 et TAPPI T 205 sp-95. La variation du grammage des papiers permet de modifier l'épaisseur pour une surface identique. Ceci permet de créer un support riche en eau, capable de conserver l'humidité plus longtemps, car un papier plus épais a besoin de plus de temps pour sécher en profondeur.

Plusieurs séries de formettes ont été préparées par l'équipement Formette semi-automatique Labtech modèle 300-0 qui permet de préparer des formettes avec un grammage contrôlé. La quantité nécessaire pour chaque grammage a été calculée et vérifiée pour chaque

série. Une fois la quantité préparée, elle est mélangée avec de l'eau dans une colonne spécialement conçue. La quantité d'eau ajoutée, tout comme les autres paramètres de formation, a été déterminée conformément aux normes TAPPI T 205 sp-95 et PAPTAC C.4. L'eau est ensuite drainée sur une toile métallique disposée au fond de la colonne jouant le rôle de filtre et une formette humide est obtenue. Chaque formette humide a été retirée du filtre à l'aide de deux papiers buvards et d'une plaque métallique circulaire. Une série de 10 formettes a été pressée entre deux papiers buvards, en deux temps (5 minutes et 2 minutes) à l'aide d'une presse automatique, afin d'éliminer l'excès d'eau. Deux papiers buvards sont ajoutés entre les formettes durant cette opération. Cette méthode de pressage en deux étapes est conforme aux recommandations de la norme TAPPI T 205 sp-95 permettant une extraction progressive de l'eau. Finalement, les formettes sont stockées dans une chambre à humidité et température contrôlées à 50 % HR (humidité relative) et une température de 23°C jusqu'à la caractérisation et utilisation. La Figure 3.5 représente des images des principales étapes de production des formettes standards.



Figure 3.5 Représentation des principales étapes de production des formettes standards : 1) Déchiquetage des papiers, 2) et 3) Trituration, 4) Pâte obtenue, 5) Dilution de la pâte, 6) et 7) Fabrication d'une formette standard, 8) Formette standard sèche.

3.2.5.3 Propriétés des papiers fabriqués

3.2.5.3.1 Le grammage

Le grammage des papiers représente la masse par unité de surface (g/m^2) et a été mesuré pour chaque formette standard à l'aide d'une balance.

3.2.5.3.2 L'indice Cobb

L'indice Cobb est une mesure de la capacité d'un matériau à absorber l'eau. Il a été mesuré avec l'instrument *GENUINE GURLEY Cobb Sizing Testers* (Figure 3.6), fabriqué par Gurley selon la norme [ISO 535:2014] [142].



Figure 3.6 Appareil utilisé pour l'indice Cobb.

3.2.5.3.3 La perméabilité à l'air

La méthode Parker Print-Surf, selon la norme ISO 5636-3 [164] (Figure 3.7) mesure la perméabilité à l'air d'un matériau en quantifiant le volume d'air qui passe à travers un échantillon de papier sous pression, ce qui indique la quantité d'espaces vides dans le matériau.



Figure 3.7 Appareil utilisé pour mesurer la perméabilité à l'air.

3.2.6 Modifications des papiers

3.2.6.1 Calandrage des papiers

Le calandrage a été réalisé avec une calandre Beloit Wheeler modèle 700 (Figure 3.8) pour réduire la perméabilité à l'air des papiers. Le papier a été passé entre deux rouleaux chauffés à une température de 190°F (environ 88°C) et appliquant une pression de 1 000 PSI. Ce traitement permet de compacter les fibres et diminue les espaces vides.



Figure 3.8 Calandre Beloit Wheeler modèle 700 utilisé pour le calandrage.

3.2.6.2 Modification du papier par l'ajout de l'AKD

Une solution d'AKD commerciale fournie par Kemira, contenant 23,5% de matière sèche, a été ajoutée à la pâte diluée à 10% de consistance (soit 10% de fibres en masse dans l'eau), avant la formation des papiers. Trois pourcentages d'AKD ont été utilisés : 0,5, 1 et 2%, exprimés en pourcentage massique d'AKD solide par rapport à la masse sèche de papier. Des formettes standards (30 g/m², 50 g/m², 90g/m² et 130g/m²) ont été fabriquées selon la procédure mentionnée auparavant.

3.2.7 Angle de contact

3.2.7.1 Angle de contact sans Tween 80

L'angle de contact statique a été mesuré à l'aide d'un Tensiomètre optique (Modèle : Thetaflex 300, compagnie Biolin), un instrument spécialement conçu à cet effet (Figure 3.9). Cette mesure révèle si la surface est hydrophobe ou hydrophile, ce qui est essentiel pour des applications où la résistance à l'eau est requise.

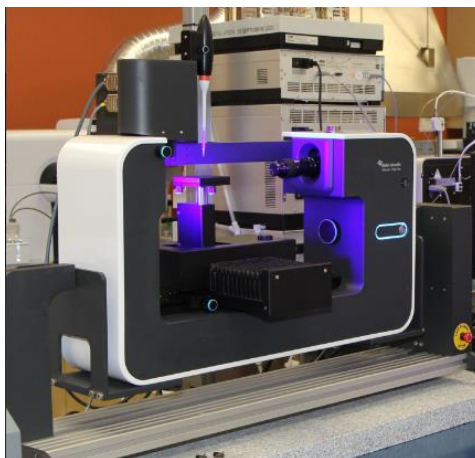


Figure 3.9 Image du tensiomètre Thetaflex 300.

Une goutte d'eau (volume déposé 3μL) est déposée sur le papier à l'aide d'une seringue. La machine est reliée à un ordinateur et d'un logiciel de traitement d'image (OneAttention) qui permet de mesurer l'angle de contact de la goutte. Une capture vidéo de 25 secondes est enregistrée pour chaque goutte.

3.2.7.2 Angle de contact avec Tween 80

En complément, l'angle de contact statique a été mesuré à l'aide d'un appareil goniomètre FTA-4000 (First Ten Ångströms, USA), équipé d'une caméra haute résolution et d'un logiciel d'analyse intégré (FTA32) (Figure 3.10).

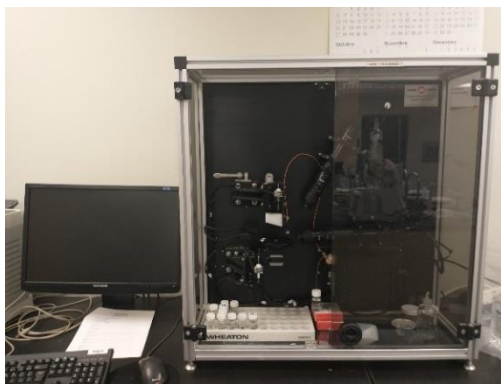


Figure 3.10 Appareil FTA-4000 (First Ten Ångströms).

Cette série de mesures vise à évaluer l'effet du Tween 80 (0,5 %) sur la mouillabilité des papiers (30K, 50K, 50F0,5%AKD, et 50F2%AKD). Une goutte de la solution aqueuse contenant le Tween 80, d'un volume variant entre 10 et 20 μL , a été déposée sur la surface du papier à l'aide d'une seringue automatique. L'appareil a permis d'enregistrer en temps réel la forme de la goutte et de calculer automatiquement l'angle de contact à partir des images obtenues. Chaque mesure a été réalisée en triplicata.

3.2.8 Observation de la morphologie de surface des papiers par microscopie électronique à balayage (MEB)

En complément des mesures d'angle de contact, l'étude de la morphologie des papiers a été réalisée afin de mieux comprendre l'influence des traitements sur la structure fibreuse. Les échantillons ont été observés par microscopie électronique à balayage (MEB) afin de caractériser la topographie de leur surface. Les échantillons étudiés comprenaient : les deux papiers de base 30K et 50K, leurs équivalents en présence de phages, le papier formette standard 50F, le papier modifié avec de l'AKD 50F0,5%AKD, ainsi que les papiers calandrés (50FCal, 50KCal). Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope HITACHI SU1510 (Hitachi, Mississauga, Canada). Les observations ont été réalisées en mode électrons secondaires avec une tension d'accélération de 10 kV, et à différents

grossissements ($\times 100$, $\times 250$ et $\times 1000$), afin d'obtenir une résolution élevée et une visualisation détaillée de la texture et de la topographie des surfaces.

3.2.9 Application des phages sur papier

Les phages retenus ont été appliqués sur papier afin d'en évaluer l'efficacité selon deux étapes complémentaires : des essais à l'échelle laboratoire, réalisés par goutte et par pulvérisation manuelle, puis des essais semi-pilote, effectués par pulvérisation à l'aide de la machine CLC, plus proches des conditions industrielles.

3.2.9.1 Application à l'échelle laboratoire

L'application en conditions de laboratoire permet de travailler sur de petits échantillons dans un environnement contrôlé. Cette approche offre un contrôle précis de la quantité de phages appliquée et assure le respect de conditions stériles, ce qui en fait une étape essentielle pour valider la reproductibilité et la fiabilité des résultats expérimentaux.

3.2.9.1.1 Application par goutte

Cette méthode consiste à appliquer, à l'aide d'une micropipette, une goutte de 20 μl de phages sur des disques de papier de 6 mm de diamètre. Les disques sont ensuite laissés à l'air libre pendant 15 minutes. Afin d'assurer la reproductibilité des résultats, chaque condition expérimentale a été réalisée en triplicata. Cette approche permet une distribution précise contrôlée des phages sur la surface, tout en minimisant le gaspillage. Utilisée à l'échelle de laboratoire, elle a permis d'étudier divers paramètres, notamment la quantité de phages, l'influence des traitements de surface, l'humidité, le grammage, la nature du papier et le temps de séchage. Toutefois, cette méthode reste adaptée aux tests de laboratoire sur des échantillons de papier.

3.2.9.1.2 Test à l'aide d'un flacon en plastique équipé d'une buse

Un flacon en plastique, muni d'une buse de pulvérisation manuelle, a été utilisé pour appliquer la solution de phages sur les disques de papier de 6 mm. Le flacon ainsi que la buse ont été préalablement stérilisés, et l'application s'est déroulée sous la hotte biologique. Une solution de phages de concentration 10^{11} PFU/ml et un type de papier (50K)

ont été utilisés pour ces expériences. Dans le but de réguler la quantité de phages, le nombre d'applications a été modifié.

3.2.9.2 Essai semi-pilote

L'application par pulvérisation permet d'appliquer la solution de phages sur de grandes surfaces de manière efficace. Cette méthode permet de valider les meilleures conditions obtenues lors de l'application par goutte dans des conditions proches de celles de l'industrie.

3.2.9.2.1 La machine CLC

La pulvérisation de la solution de phages a été effectuée avec une coucheuse de laboratoire CLC-7000 (Cylindrical Laboratory Coater) d'Innofibre (Cégep de Trois-Rivières) (Figure 3.11). La machine CLC permet un contrôle de la quantité de phages appliquée sur le papier.



Figure 3.11 Coucheuse de Laboratoire CLC-7000 avec la bande de papier.

3.2.9.2.2 Procédure d'application avec la machine CLC

Une solution de phages de concentration 10^8 PFU/ml et deux types de papiers (50K et 50F) ont été utilisés pour ces expériences. Les papiers ont été stérilisés sous la lumière UV pendant 20 minutes dans une hotte biologique. Pour éviter les contaminations lors du transport, les papiers traités ont été placés dans des sacs en plastique stériles. Chaque expérience a été effectuée en triplicata.

Les papiers ont été collés sur le rouleau de la machine de CLC à l'aide de ruban adhésif (un rouleau de papier a été collé sur le rouleau métallique de la machine pour faciliter le collage de la bande de papier) (Figure 3.12).

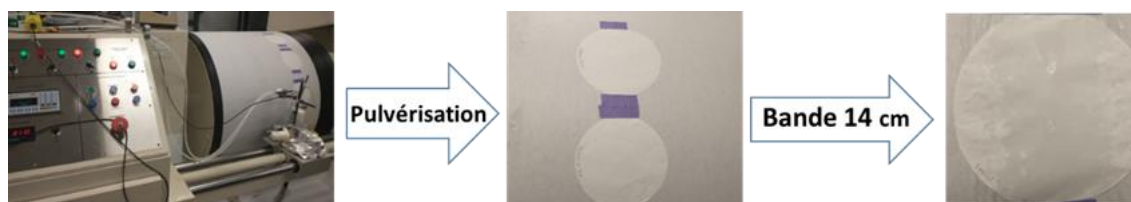


Figure 3.12 Les étapes de la pulvérisation des papiers avec la machine CLC.

Lors du processus de décontamination thermique, le papier est chauffé sur le rouleau jusqu'à atteindre 29°C. Un traitement par infrarouge est ensuite appliqué pour éliminer toute contamination potentielle, portant la température du papier à 54°C en 30 secondes. Après ce traitement, un refroidissement de 5 minutes est nécessaire pour ramener les échantillons à 23°C, afin de les préparer pour le processus de pulvérisation. Cette étape préliminaire est essentielle pour garantir la stérilité des échantillons avant toute manipulation ultérieure.

Plusieurs essais préliminaires avec de l'eau ont été réalisés pour déterminer les conditions opérationnelles optimales d'application des phages, en assurant une couverture homogène des échantillons. Les paramètres retenus sont : une pression de 90 PSI, une vitesse de rotation du cylindre de 110 m/min, et une distance de 10 cm entre la buse et la surface. La buse utilisée permet une dispersion uniforme de la solution sur une largeur de 14 cm. Après l'application de la solution de phages, deux types d'échantillons de papier ont été testés:

- 1- **Les échantillons non séchés** : L'activité antibactérienne de ces échantillons a été testée immédiatement après l'application, sans séchage préalable, permettant ainsi d'évaluer leur efficacité juste après le traitement.
- 2- **Les échantillons séchés** : Un séchage contrôlé a été effectué après l'application de la solution aqueuse de phages pour évaluer son impact sur l'activité antibactérienne. Les échantillons ont d'abord été soumis à un séchage à 32°C pendant 10 secondes, puis laissés à l'air libre pendant 15 minutes dans la machine, avec une

rotation continue du cylindre pour assurer un séchage uniforme. Pendant cette période, la température des échantillons a progressivement diminué pour atteindre 23°C. Le séchage visait essentiellement à réduire la teneur en eau résiduelle sur le papier, sans toutefois la mesurer précisément. Cette méthode permet d'analyser l'effet du séchage sur l'efficacité antibactérienne des papiers traités.

Dans un contexte industriel, cette étape pourrait représenter une contrainte, notamment en ce qui concerne le temps et les conditions de séchage à grande échelle. Le procédé réel devrait garantir un séchage complet pour éviter toute humidité résiduelle susceptible d'altérer la conservation du produit ou de favoriser la croissance microbienne. Il serait alors nécessaire de déterminer la teneur en humidité optimale pour maintenir l'activité des phages tout en assurant la stabilité et la sécurité de l'emballage.

Chapitre 4 - Résultats

Ce chapitre présente les principaux résultats obtenus au cours de cette étude, en détaillant les observations et les analyses réalisées. Il traite du choix de l'agent antibactérien, de l'exploration des interactions entre les bactéries et les phages, avec et sans support papier, ainsi que de l'évaluation de l'influence de diverses conditions de séchage et de stockage sur l'activité antibactérienne des papiers fonctionnalisés. De plus, l'optimisation de la quantité de phages appliqués est abordée, ainsi que l'impact d'un agent tensioactif sur la mouillabilité de la solution de phages. Ce chapitre est structuré en plusieurs sections correspondant aux objectifs spécifiques définis précédemment.

4.1 Choix d'agent antibactérien

Afin d'étudier l'interaction entre les phages et les bactéries *L. monocytogenes* (objectif 1 de la thèse) et de déterminer les paramètres expérimentaux influençant l'activité antibactérienne, il est d'abord nécessaire de sélectionner l'agent antibactérien le plus efficace contre *L. monocytogenes* avant de le tester en milieu liquide et semi-solide. Cette section a donc pour objectif d'évaluer l'activité antibactérienne de cinq huiles essentielles, ainsi que de deux produits commerciaux, P100 et ListShield, contre la souche *L. monocytogenes* sérotype 4b. Les expériences menées visent à valider leur efficacité en termes de réduction de la croissance bactérienne et à identifier leur potentiel dans la lutte contre cette bactérie pathogène.

4.1.1 Activité antibactérienne des huiles essentielles

L'activité antibactérienne des cinq huiles essentielles, soit l'épinette noire, la menthe poivrée, l'huile de cèdre, le clou de girofle et le bouleau jaune a été testée en déposant 20 μ l sur un tapis bactérien de *L. monocytogenes* (concentration 10^9 CFU/ml). La Figure 4.1 présente les images des zones de lyse observées pour les cinq produits après 24 heures d'incubation à 30°C.

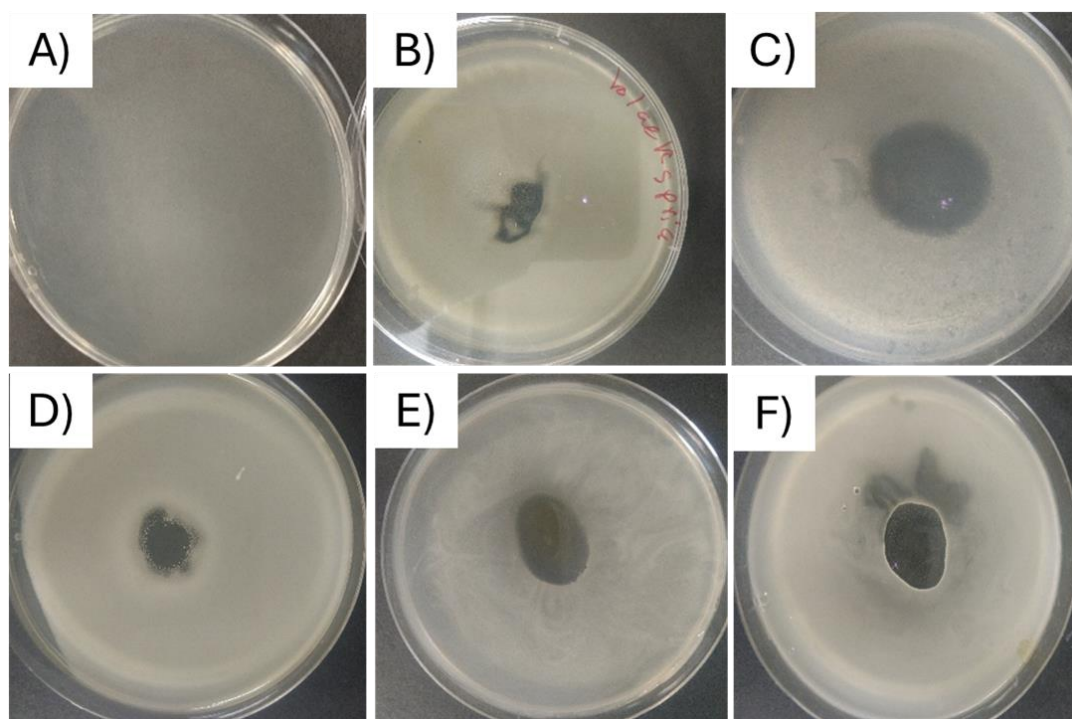


Figure 4.1 Zone de lyse observées sur un tapis bactérien suite à l'activité antibactérienne de différentes huiles essentielles : A) témoin de croissance bactérienne, B) épinette noire, C) menthe poivrée, D) huile de cèdre, E) clou de girofle et E) bouleau jaune.

Les résultats montrent que, pour chacune des cinq huiles essentielles testées, une zone de lyse est apparue autour du point d'application, indiquant une activité antibactérienne envers *L. monocytogenes*. L'importance visuelle de cette zone variait selon l'huile : la menthe poivrée présentait la plus grande zone de lyse, tandis que l'épinette noire montrait la plus faible. L'évaluation a été réalisée de façon qualitative, sans mesure précise du diamètre ou de la surface des zones d'inhibition.

Ainsi, bien que l'évaluation ici soit uniquement qualitative, les résultats expérimentaux confirment le potentiel antibactérien de ces huiles essentielles. Selon la littérature, cette activité est généralement attribuée à la présence de terpènes, comme l' α -pinène et le β -pinène présents dans l'épinette noire [74, 75], le menthol et la menthone dans la menthe poivrée [76], le cédrol et le thuyopsène dans l'huile de cèdre [77], ainsi qu'à des composés phénoliques tels que l'eugénol dans le clou de girofle [78] et le salicylate de méthyle dans le bouleau jaune [79].

4.1.2 Validation de l'infectivité des phages

Deux tests qualitatifs ont été réalisés pour valider l'infectivité des phages : un test en milieu liquide et un test en milieu semi-solide.

4.1.2.1 Test en milieu liquide

Une quantité de 30 μ l de chaque produit de phages (P100 ou ListShield) a été ajoutée séparément à une solution de 6 ml de *L. monocytogenes* à une concentration de 10^7 CFU/ml. Les concentrations initiales des suspensions de phages étaient de 10^{11} PFU/ml pour P100 et de 10^8 PFU/ml pour ListShield, ce qui correspond respectivement à environ 3×10^9 PFU et 3×10^6 PFU ajoutés dans chaque culture. Le mélange a ensuite été incubé à 30°C pendant 24 heures sous agitation à 120 rpm. L'évolution de la limpidité des cultures a été évaluée visuellement et est présentée à la Figure 4.2.

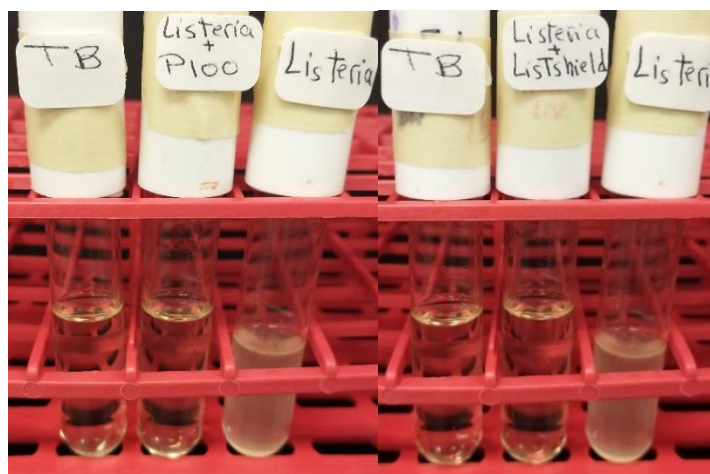


Figure 4.2 Infectivité des phages P100 et du cocktail des phages ListShield sur *L. monocytogenes*. TB : bouillon Trypticase.

Après incubation, les cultures témoins de croissance présentaient une opacité marquée, signe d'une forte croissance de *L. monocytogenes*. À l'inverse, les cultures traitées avec les phages P100 et ListShield montraient une clarification notable, traduisant une inhibition significative de la croissance bactérienne. Le comptage sur gélose a confirmé ces observations : aucune colonie n'a été détectée dans les échantillons traités, indiquant que la concentration bactérienne était inférieure à la limite de détection de la méthode

(10 CFU/ml). En comparaison, la concentration dans le témoin de croissance atteignait 10^9 CFU/ml après 24 heures.

Ces résultats correspondent à une réduction d'au moins 8 logs par rapport au témoin de croissance, et confirment l'action lytique des phages, qui ont induit une diminution marquée du nombre de bactéries viables dans les échantillons traités. Les données obtenues mettent en évidence l'efficacité des phages P100 et ListShield dans l'inhibition de la croissance de *L. monocytogenes*, renforçant ainsi leur potentiel en tant qu'agents antibactériens efficaces pour le contrôle de cette bactérie pathogène [165].

4.1.2.2 Test semi-solide

Expérimentalement, un volume de 20 μ l de chaque produit a été déposé sur un tapis bactérien présentant une concentration de 10^9 CFU/ml. Les concentrations de phages pour P100 et ListShield étaient respectivement de 10^{11} PFU/ml et 10^8 PFU/ml. L'apparition d'une zone de lyse est un indicateur de l'infectivité des phages. La Figure 4.3 présente les images capturées après 24 heures d'incubation, montrant l'interaction entre les deux phages et le tapis bactérien.

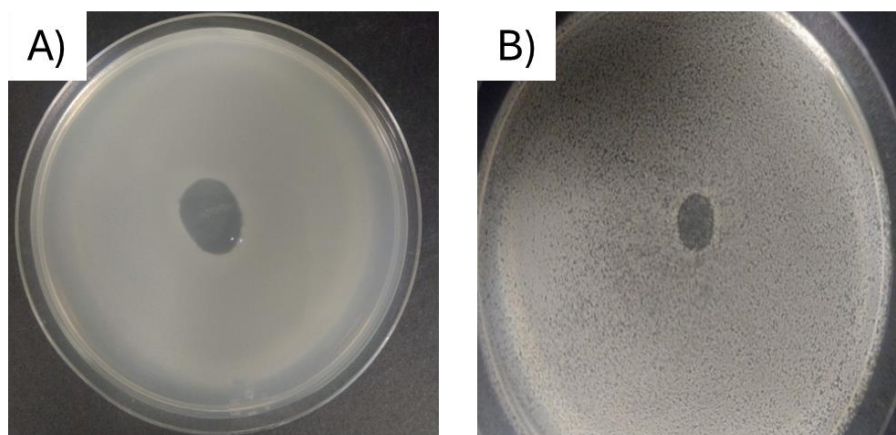


Figure 4.3 Zones de lyse observées sur la culture de *L. monocytogenes* après exposition aux phages A) P100 et B) ListShield.

Les résultats expérimentaux indiquent, dans les deux cas, l'apparition d'une zone foncée au centre, suggérant la lyse des *L. monocytogenes* dans cette région. La Figure 4.4 représente le résultat d'un test de vérification de la présence de *L. monocytogenes*.

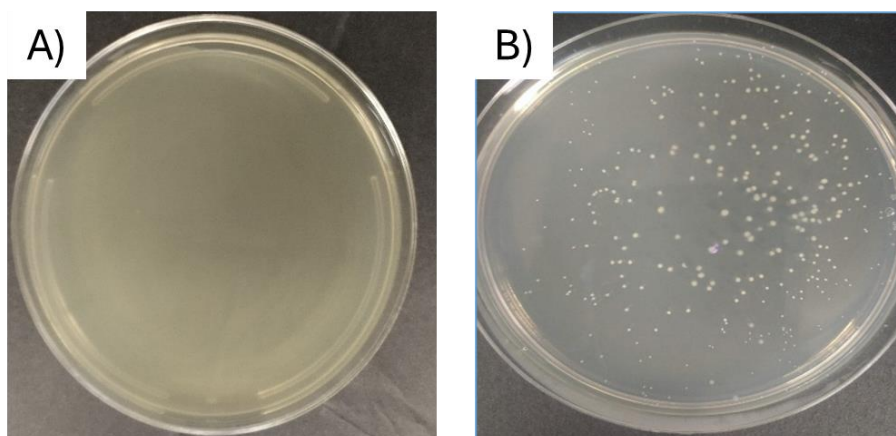


Figure 4.4 A) Boîte de Pétri contenant un milieu de culture TA sans *L. monocytogenes*; B) Boîte de Pétri contenant *L. monocytogenes*.

Les résultats obtenus ont démontré l'efficacité des deux produits commerciaux à base de phages, P100 et ListShield, dans l'inhibition de *L. monocytogenes*. Ces deux produits ont donc été retenus pour la suite de l'étude portant sur l'interaction entre les phages et *L. monocytogenes*.

4.1.3 Activité antibactérienne d'une combinaison de phages et d'huile essentielle

Cette section présente les résultats des tests d'activité antibactérienne effectués pour évaluer l'efficacité d'un mélange combinant des phages et des huiles essentielles. Un volume de 60 μl de chaque huile essentielle a été mélangé avec un volume de 60 μl de phages P100. Une goutte de 20 μl a été déposée sur le tapis bactérien de *L. monocytogenes* (concentration 10^9 CFU/ml). La Figure 4.5 présente les images de la zone de lyse pour les cinq mélanges après 24 heures d'incubation à 30°C.

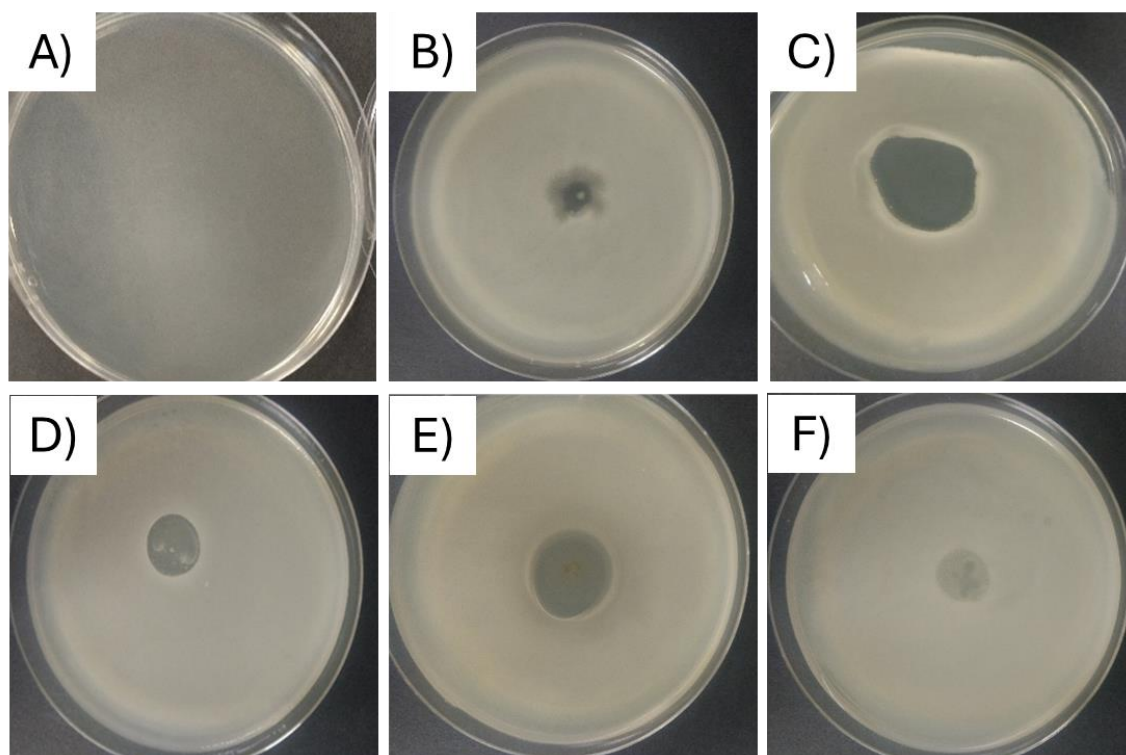


Figure 4.5 Zones de lyse observée après application de 20 μ l d'un mélange de phages P100 avec les huiles essentielles A) témoin de croissance bactérienne, B) épinette noire, C) menthe poivrée, D) huile de cèdre, E) clou de girofle et E) bouleau jaune.

Pour l'ensemble des huiles utilisées, une activité antibactérienne a été observée. Dans le cas du mélange phages P100-bouleau jaune, l'activité est légèrement moins prononcée. Pour les autres mélanges, les résultats qualitatifs, sont comparables.

Bien que le caractère antibactérien des huiles essentielles étudiées (seules et en combinaison avec les phages) ait été confirmé par les résultats, ces agents n'ont pas été retenus pour la suite de l'étude. Cette décision repose sur plusieurs considérations pratiques et économiques:

- 1) leur forte odeur, susceptible d'altérer les propriétés organoleptiques des produits alimentaires ciblés;
- 2) le risque de contamination de la machinerie (notamment de la machine à papier) nécessitant des procédures de nettoyage spécifiques et coûteuses;

- 3) le coût d'approvisionnement élevé de certaines huiles essentielles, pouvant représenter un frein important pour une application industrielle à grande échelle ;
- 4) la présence potentielle de composés extractibles pouvant migrer de l'emballage vers l'aliment, ce qui entraînerait des tests réglementaires supplémentaires et des coûts de conformité.

Ces facteurs combinés réduisent la faisabilité technique et économique de l'utilisation des huiles essentielles dans le contexte de cette étude.

4.2 Interactions entre les phages et les bactéries

Toujours dans le but d'étudier l'interaction entre les phages et *L. monocytogenes* pour cribler les paramètres expérimentaux significatifs sur l'activité antibactérienne (objectif 1 de la thèse), il est nécessaire de déterminer les concentrations optimales de bactéries et de phages ainsi que les meilleurs rapports phage-bactérie (multiplicité d'infection, MOI). Cette étape vise à évaluer les interactions entre les deux produits commerciaux de phages (P100 et ListShield) et *L. monocytogenes* en testant différentes combinaisons de concentrations de bactéries et de phages. L'objectif spécifique est d'identifier les ratios phage-bactérie optimaux afin d'optimiser l'usage des phages tout en limitant l'émergence de bactéries résistantes.

Les analyses ont été réalisées à l'aide de deux méthodes complémentaires : un test en milieu semi-solide et un test en milieu liquide utilisant un lecteur de plaques. Le test en milieu semi-solide permet d'évaluer l'interaction bactéries-phages dans un environnement reproduisant des conditions proches de la surface des aliments. Toutefois, lorsque la concentration bactérienne est faible, l'absence d'un tapis bactérien continu peut compliquer la visualisation et la mesure précise des zones d'inhibition. En complément, le test en milieu liquide permet un suivi en temps réel de la cinétique de croissance bactérienne ainsi que de son inhibition par les phages, même à de faibles concentrations initiales. L'utilisation conjointe de ces deux méthodes permet ainsi d'obtenir une évaluation plus complète de l'interaction entre les phages et *L. monocytogenes*.

4.2.1 Interaction entre les phages et *L. monocytogenes* par le test en milieu semi-solide

4.2.1.1 Interaction entre les phages Listshield et *L. monocytogenes*

Le but de cette partie est de déterminer le rapport optimal phages/bactéries (Multiplicité d'Infection, MOI) pour le produit ListShield. Une goutte de 20 µl de la solution de phage (10^8 PFU/ml, concentration de la solution commerciale) a été déposée à la surface de milieux ensemencés avec différentes concentrations de *L. monocytogenes* (10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 et 10^4 CFU/ml), puis incubés pendant 24 heures à 30°C.

L'infectivité a été évaluée par l'observation de zones d'inhibition visibles à l'œil nu. Contrairement à l'essai en tube en milieu liquide, où une inhibition visible de la croissance bactérienne a été observée pour la solution, les essais en double couche Agar n'ont pas permis d'obtenir des résultats reproductibles. Une zone de lyse était bien visible avec la solution non diluée (10^8 PFU/ml), mais cet effet n'a pas pu être systématiquement reproduit lorsque différentes concentrations de bactéries ou de phages étaient testées. Ces expériences ont été réalisées à plusieurs reprises ($n = 3$) avec le même lot de ListShield, confirmant que la variabilité observée était récurrente. Pour vérifier cette hypothèse, il avait été prévu de tester un lot neuf. Cependant, des contraintes logistiques et des délais d'approvisionnement prolongés ont empêché de recevoir le nouveau lot à temps. Face à ces limites expérimentales, et afin d'obtenir des données plus fiables, il a été décidé de poursuivre les travaux uniquement avec le phage P100, dont l'infectivité s'est révélée stable et reproductible dans des conditions expérimentales similaires.

4.2.1.2 Interaction entre les phages P100 et *L. monocytogenes*

Plusieurs concentrations initiales de *L. monocytogenes* ont été préparées (10^4 à 10^9 CFU/ml). Une goutte de 20 µl de la solution de phages P100 (10^{11} PFU/ml, concentration de la solution commerciale) a été déposée sur chaque tapis bactérien, pour obtenir les MOI allant de 10^2 à 10^7 . Cette approche visait à déterminer le MOI optimal pour la concentration commerciale et à évaluer l'efficacité des phages selon la densité bactérienne.

Après 24 heures d'incubation à 30°C, l'infectivité a été confirmée pour toutes les concentrations bactériennes testées (Figure 4.6).

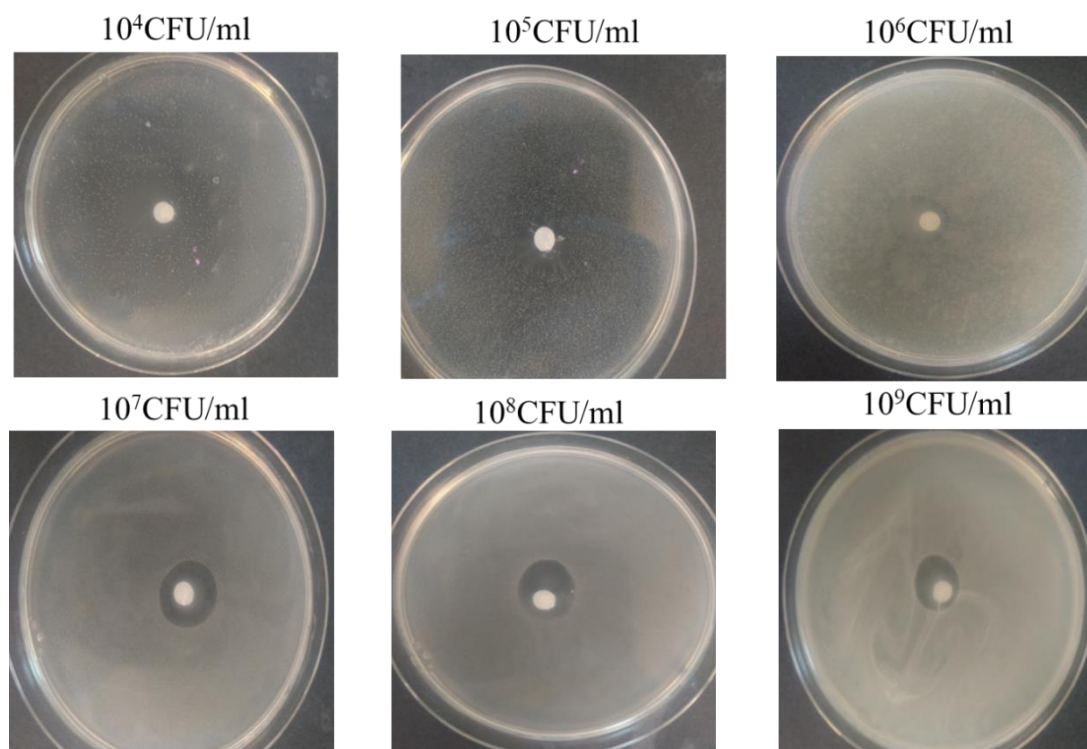


Figure 4.6 Zone de lyse obtenue après application de 20 μ l de la solution de phages P100 (10^{11} PFU/ml) sur *L. monocytogenes* à différentes concentrations (10^4 à 10^9 CFU/ml), après 24 heures d'incubation à 30°C.

L'observation des zones de lyse pour les six concentrations de *L. monocytogenes* révèle l'infectivité des phages à tous les MOI testés.

Plus la concentration en *L. monocytogenes* est élevée, plus la zone de lyse est claire, mais de petite taille. Aux concentrations intermédiaires de 10^6 et 10^7 CFU/ml, l'aire de la zone de lyse est la plus étendue, reflétant une meilleure efficacité des phages à ces niveaux. En revanche, à des concentrations plus élevées, comme 10^8 et 10^9 CFU/ml, l'aire de la zone de lyse est plus petite. Cela s'explique par le fait que les phages nécessitent plus de temps pour lyser un plus grand nombre de *L. monocytogenes*.

L'effet du temps d'incubation a également été étudié en variant les durées de traitement (24, 48 et 72 heures) pour des concentrations de *L. monocytogenes* allant de 10^4 à 10^9 CFU/ml, avec différents MOI (allant de 10^2 à 10^7).

À partir des images capturées, l'aire de la zone de lyse a été mesurée par le logiciel d'analyse d'images (*Adobe Photoshop CS3*). La Figure 4.7 représente la variation de l'aire de la zone de lyse en fonction du temps.

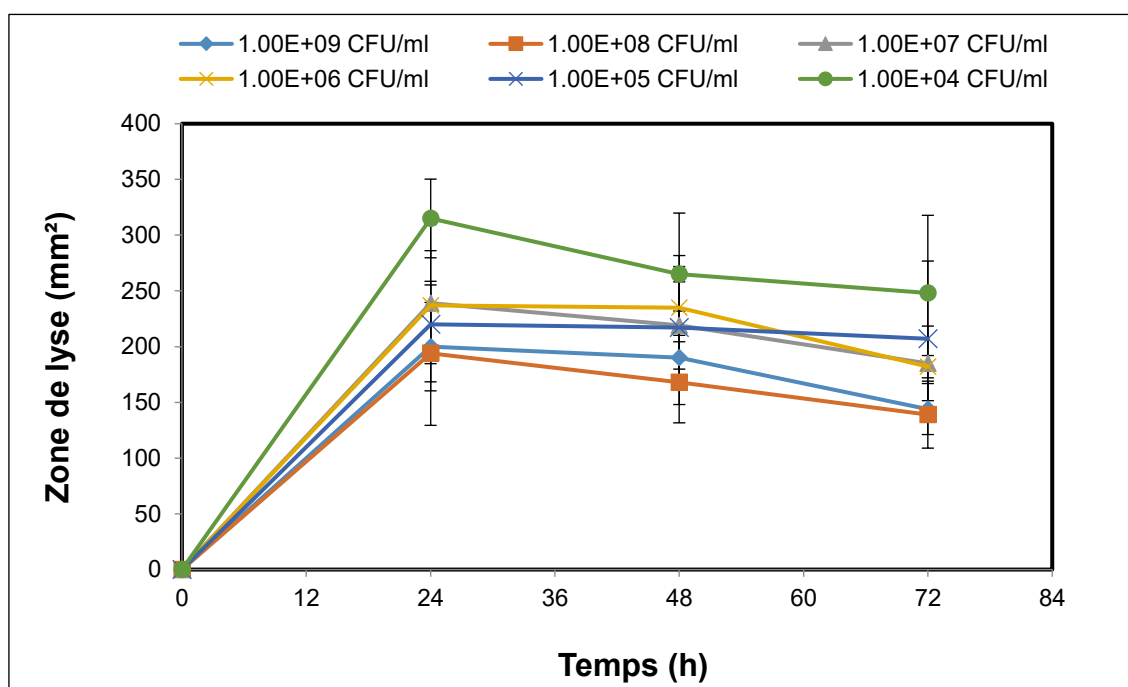


Figure 4.7 Zone de lyse en fonction du temps avec une concentration de phage fixe (10^{11} PFU/ml) et pour les concentrations bactériennes variant entre 10^4 CFU/ml et 10^9 CFU/ml. Les valeurs représentent la moyenne de trois mesures ($n = 3$) et les barres d'erreur indiquent l'écart-type.

Les résultats montrent que, pour toutes les concentrations initiales de *L. monocytogenes* testées (10^4 à 10^9 CFU/ml), l'évolution des zones de lyse suit un profil en deux phases distinctes :

1. **Phase initiale de croissance rapide (0-24 h) :** quelle que soit la concentration, on observe une augmentation rapide de la zone de lyse, atteignant un maximum à 24

heures. Cette croissance traduit l'efficacité initiale élevée des phages P100 lors de l'infection d'une population bactérienne.

2. **Phase de décroissance (24-72 h) :** au-delà du maximum, la diminution de la zone de lyse suit une tendance globalement linéaire jusqu'à 72 heures. Toutefois cette diminution, dont l'allure est comparable entre les concentrations, apparaît modérée. L'hypothèse d'une émergence de bactéries résistantes peut être envisagée.

Pour les concentrations entre 10^4 et 10^6 CFU/ml, correspondant à des MOI élevés de 10^7 à 10^5 , respectivement, les zones de lyse maximales atteignent 315, 220 et 237 mm². Ces valeurs initiales supérieures traduisent un rapport phage/bactérie favorable, permettant une infection plus rapide et plus homogène de la population bactérienne. En revanche, aux concentrations plus élevées en bactéries de 10^7 à 10^9 CFU/ml, correspond à des MOI 10^4 à 10^2 , la compétition accrue entre les phages et les bactéries entraîne des zones de lyse initialement plus modestes (239 à 200 mm²).

Plusieurs facteurs pourraient être à l'origine de cette diminution [166, 167, 168, 169]:

- **Développement de résistance bactérienne :** Les bactéries qui survivent à l'infection par les phages peuvent développer divers mécanismes leur permettant d'échapper à la lyse, réduisant ainsi l'efficacité des phages. Ces mécanismes incluent notamment la modification des récepteurs de surface, empêchant la fixation des phages, ainsi que l'activation de systèmes immunitaires, comme CRISPR-Cas, présent seulement chez une partie des bactéries. Les bactéries résistantes peuvent alors se multiplier, ce qui contribue à la diminution de l'aire de la zone de lyse.
- **Dégradation ou inactivation des phages :** Les phages peuvent être dégradés ou inactivés par des facteurs environnementaux tels que les enzymes produites par les bactéries, des changements de pH ou une température défavorable.
- **Mutations des phages :** Les phages eux-mêmes peuvent subir des mutations qui altèrent leur capacité à infecter et à lyser les bactéries, entraînant une efficacité réduite.

- **Interaction avec les débris bactériens** : Certains phages pourraient se fixer sur des débris de bactéries lysées plutôt que sur des bactéries viables, ce qui limite leur action sur la population bactérienne restante.

La résistance des *L. monocytogenes* aux phages P100 a fait l'objet d'une analyse dans le cadre de la présente étude.

Cette méthode a permis de faire une comparaison entre les différentes concentrations de *L. monocytogenes* en contact avec les phages P100. Bien qu'elle ait certaines limites pour les faibles concentrations bactériennes, elle permet de simuler les conditions proches de la réalité. Elle sera aussi utilisée dans le cas où les phages seront appliqués sur les papiers.

4.2.2 Interaction des phages et *L. monocytogenes* en milieu liquide

Cette partie a permis de modifier simultanément les concentrations des phages et des bactéries. Elle visait à apporter des éclaircissements sur les mécanismes de l'infection de *L. monocytogenes* par le phage P100. Expérimentalement, cinq concentrations bactériennes (10^4 à 10^8 CFU/ml) et cinq concentrations des phages (10^4 à 10^8 PFU/ml) ont été préparées et combinées dans différents puits pour étudier plusieurs rapports MOI. Le rapport MOI qui dépasse le 10^3 est jugé trop élevé et n'a pas été étudié.

La disposition des différentes concentrations de bactéries et de phages utilisées dans cette expérience est détaillée dans la Figure 4.8. Celui-ci reprend la configuration des puits de la plaque (A-H x 1-12) et indique pour chaque puits la concentration initiale en *L. monocytogenes* (CFU/ml) et en phages (PFU/ml). Les puits contenant uniquement du milieu TB servent de contrôle négatif. Les puits contenant uniquement du *L. monocytogenes*, servant de témoin de croissance.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB	TB	TB	$10^4/10^8$	$10^4/10^8$	$10^4/10^8$	$10^7/10^7$	$10^7/10^7$	$10^7/10^7$	$10^5/10^5$	$10^5/10^5$	$10^5/10^5$
B	$0/10^8$	$0/10^8$	$0/10^8$	$10^5/10^8$	$10^5/10^8$	$10^5/10^8$	$10^8/10^7$	$10^8/10^7$	$10^8/10^7$	$10^6/10^5$	$10^6/10^5$	$10^6/10^5$
C	$0/10^8$	$0/10^8$	$0/10^8$	$10^6/10^8$	$10^6/10^8$	$10^6/10^8$	$10^4/10^6$	$10^4/10^6$	$10^4/10^6$	$10^7/10^5$	$10^7/10^5$	$10^7/10^5$
D	$0/10^6$	$0/10^6$	$0/10^6$	$10^7/10^8$	$10^7/10^8$	$10^7/10^8$	$10^5/10^6$	$10^5/10^6$	$10^5/10^6$	$10^8/10^5$	$10^8/10^5$	$10^8/10^5$
E	$0/10^5$	$0/10^5$	$0/10^5$	$10^8/10^8$	$10^8/10^8$	$10^8/10^8$	$10^6/10^6$	$10^6/10^6$	$10^6/10^6$	$10^4/10^4$	$10^4/10^4$	$10^4/10^4$
F	$0/10^4$	$0/10^4$	$0/10^4$	$10^4/10^7$	$10^4/10^7$	$10^4/10^7$	$10^7/10^6$	$10^7/10^6$	$10^7/10^6$	$10^5/10^4$	$10^5/10^4$	$10^5/10^4$
G	$0/10^3$	$0/10^3$	$0/10^3$	$10^5/10^7$	$10^5/10^7$	$10^5/10^7$	$10^8/10^6$	$10^8/10^6$	$10^8/10^6$	$10^6/10^4$	$10^6/10^4$	$10^6/10^4$
H	$0/10^7$	$0/10^7$	$0/10^7$	$10^6/10^7$	$10^6/10^7$	$10^6/10^7$	$10^4/10^5$	$10^4/10^5$	$10^4/10^5$	$10^7/10^4$	$10^7/10^4$	$10^7/10^4$

Figure 4.8 Plan de disposition des puits de la plaque expérimentale (lignes A-H et colonnes 1-12) indiquant les concentrations initiales en *L. monocytogenes* (CFU/ml, dénominateur) et en phages P100 (PFU/ml, numérateur).

La Figure 4.9 illustre les profils de croissance obtenus pour les différentes combinaisons de concentrations de bactéries et de phages présentées dans la Figure 4.8.

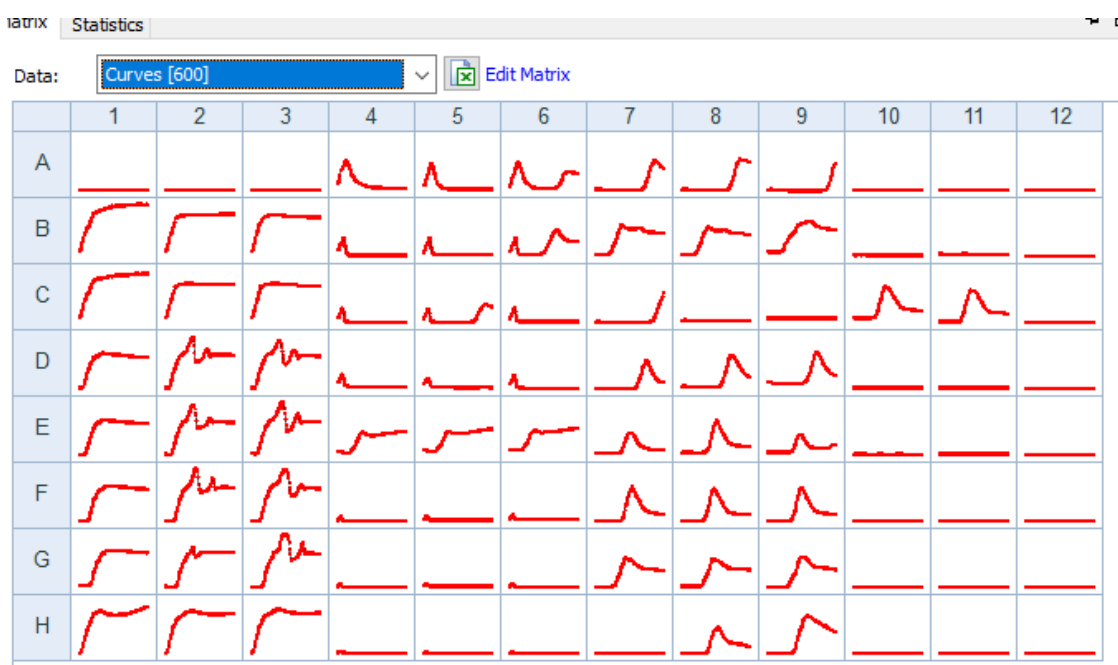


Figure 4.9 Courbes de croissance bactérienne obtenues à partir d'expérience d'interaction phages P100-bactéries *L. monocytogenes* dans un lecteur de plaques.

Les témoins de croissance ont montré une croissance bactérienne typique : une phase latente suivie d'une croissance exponentielle puis d'un plateau stationnaire, ce qui confirme la viabilité des cellules ainsi que le bon fonctionnement des conditions de culture. La durée de la latence dépendait de la concentration bactérienne initiale : plus longue à faible inoculum, car plusieurs divisions étaient nécessaires avant d'atteindre une densité détectable, et quasi inexistante à forte concentration. Après 72 heures d'incubation, le dénombrement sur gélose réalisé à partir de prélèvements effectués dans les puits témoins de croissance a montré que la concentration bactérienne atteignait 10^9 CFU/ml pour l'ensemble des concentrations testées. Les témoins négatifs n'ont présenté aucune augmentation de densité optique, ce qui confirme l'absence de contamination et valide la fiabilité des conditions expérimentales. Dans les puits contenant à la fois des bactéries et des phages, les profils observés varient selon les concentrations initiales et les rapports MOI. Certaines conditions présentaient une chute rapide de la densité optique, jusqu'à devenir indétectable, suggérant une élimination complète des bactéries ou une réduction en dessous du seuil de détection. Dans d'autres cas, la densité optique montrait une diminution initiale suivie d'une augmentation progressive. Cette remontée peut être attribuée à plusieurs phénomènes : (1) une reprise de croissance de *L. monocytogenes* après une phase d'inhibition et une cohabitation phage-bactérie ; (2) le développement de souches résistantes aux phages ; ou (3) la survenue d'une contamination secondaire favorisée par l'inhibition initiale de *L. monocytogenes*.

Afin de vérifier les hypothèses issues de l'observation des courbes, une analyse complémentaire a été réalisée après 72 heures pour chaque condition expérimentale. Elle a consisté en un comptage des bactéries et des phages, ainsi qu'en un test de résistance bactérienne sur milieu Oxford sélectif pour *L. monocytogenes*. Ce milieu, formulé pour inhiber la croissance des bactéries non ciblées, favorise celle de *L. monocytogenes* et permet ainsi de confirmer la présence éventuelle de souches résistantes. Pour examiner plus précisément la cinétique d'interaction, les courbes de la Figure 4.9 ont été extraites et regroupées par concentration initiale en *L. monocytogenes*. Les résultats sont ainsi présentés et interprétés séparément pour chaque condition expérimentale.

4.2.2.1 Cinétique de l'interaction à 10^4 CFU/ml

À propos de la cinétique d'interaction à 10^4 CFU/ml, la Figure 4.10 représente les courbes de croissance de *L. monocytogenes* en absence de phages ainsi qu'en présence de différentes concentrations de phages (10^4 - 10^8 PFU/ml).

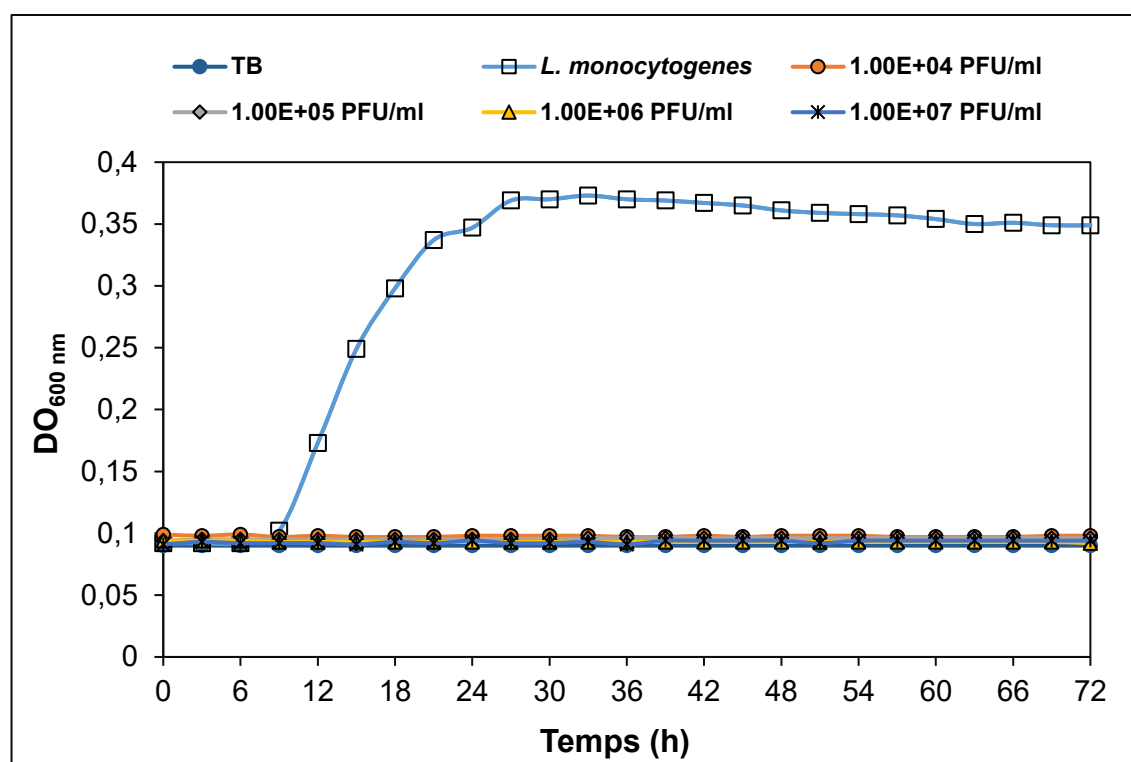


Figure 4.10 Croissance bactérienne de *L. monocytogenes* (concentration initiale 10^4 CFU/ml) sans et en présence des phages à plusieurs concentrations (10^4 - 10^7 PFU/ml).

Le témoin de croissance a montré une phase de latence de 9 heures, suivie d'une phase exponentielle d'une durée de 18 heures. Le plateau de croissance a été atteint après 27 heures. Aucun déclin n'a été observée après 72 heures, confirmant que les conditions expérimentales permettaient une croissance continue. Pour les autres solutions bactériennes mises en contact avec les phages, quelle que soit la concentration de phages et le MOI, aucune phase de croissance n'a été observée. Cette absence peut résulter de l'élimination complète des bactéries par l'action lytique des phages.

Le dénombrement sur gélose après 72 heures d'incubation n'a révélé aucune colonie bactérienne dans les puits, ce qui indique que la concentration était inférieure à la limite de détection de la méthode utilisée (10 CFU/ml). En parallèle, la concentration de phages réalisée après 72 heures d'incubation à partir de prélèvements réalisés dans les puits a montré une augmentation de leur concentration par rapport à la valeur initiale. À titre d'exemple, une concentration initiale de 10^6 PFU/ml a atteint 10^9 PFU/ml en fin d'incubation.

4.2.2.2 Cinétique de l'interaction à 10^5 CFU/ml

Concernant la cinétique d'interaction à 10^5 CFU/ml, la Figure 4.11 représente les courbes de croissance de *L. monocytogenes* en absence de phages ainsi qu'en présence de différentes concentrations de phages (10^4 - 10^8 PFU/ml).

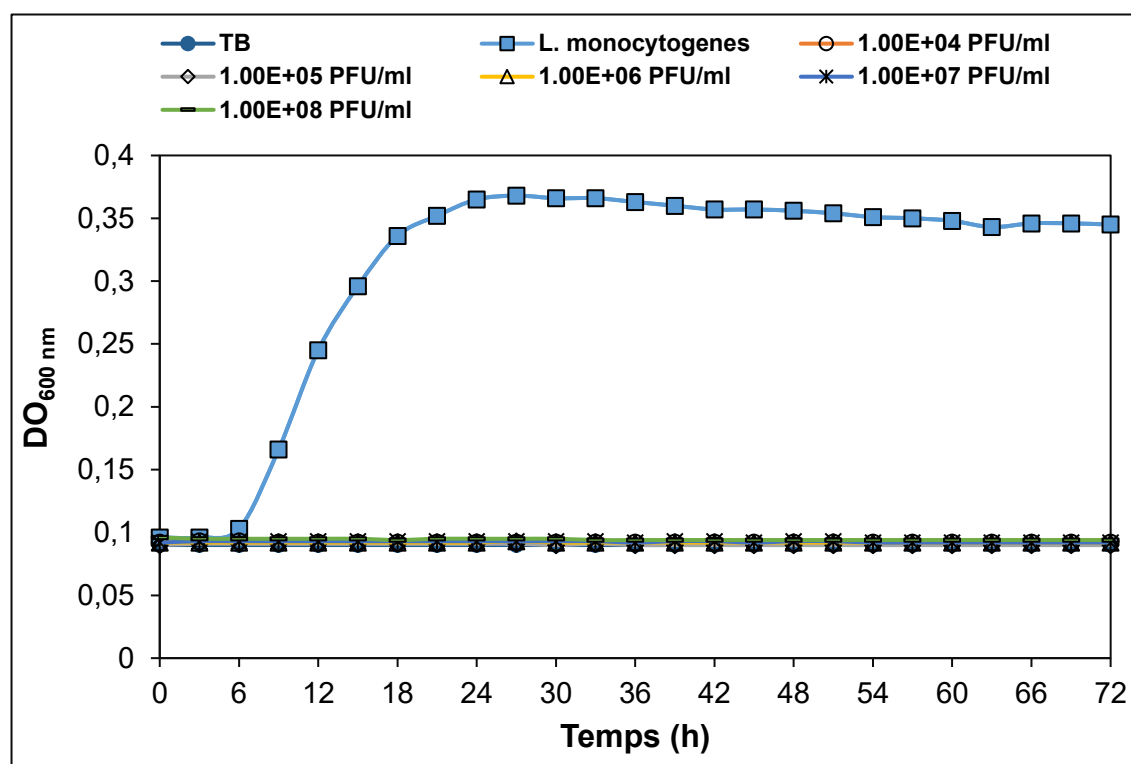


Figure 4.11 Croissance bactérienne de *L. monocytogenes* (concentration initiale 10^5 CFU/ml) sans et en présence des phages à plusieurs concentrations (10^4 - 10^8 PFU/ml).

Le témoin de croissance a présenté une latence de 6 heures suivie d'une phase exponentielle d'environ 18 heures et d'un plateau atteint après 24 heures. L'apparition de la phase de déclin n'a pas été observée. Pour les autres solutions bactériennes en contact avec les phages, et quelle que soit la concentration de phages, les résultats expérimentaux montrent une similitude de la concentration 10^5 CFU/ml avec celle de 10^4 CFU/ml, c'est-à-dire que la densité optique n'a pas augmenté. Le dénombrement après 72 h a confirmé l'absence de bactéries et une augmentation de la concentration de phages.

Pour les deux concentrations 10^4 CFU/ml et 10^5 CFU/ml, l'inhibition observée correspond à une réduction estimée à 8 log par rapport au témoin de croissance. Cette valeur est calculée en comparant la concentration bactérienne finale des puits traités à celle des puits témoins de croissance sans phage après incubation, et non à la concentration initiale de l'inoculum. Ainsi, puisque les témoins de croissance atteignaient 10^9 CFU/ml après 72 heures, une réduction de 8 log signifie que la concentration bactérienne dans les puits traités était d'environ 10 CFU/ml, soit proche de la limite de détection.

4.2.2.3 Cinétique de l'interaction à 10^6 CFU/ml

Lorsque la concentration est de 10^6 CFU/ml, la Figure 4.12 représente les courbes de croissance de *L. monocytogenes*, obtenues en absence de phages et en présence de différentes concentrations de phages (10^4 - 10^8 PFU/ml).

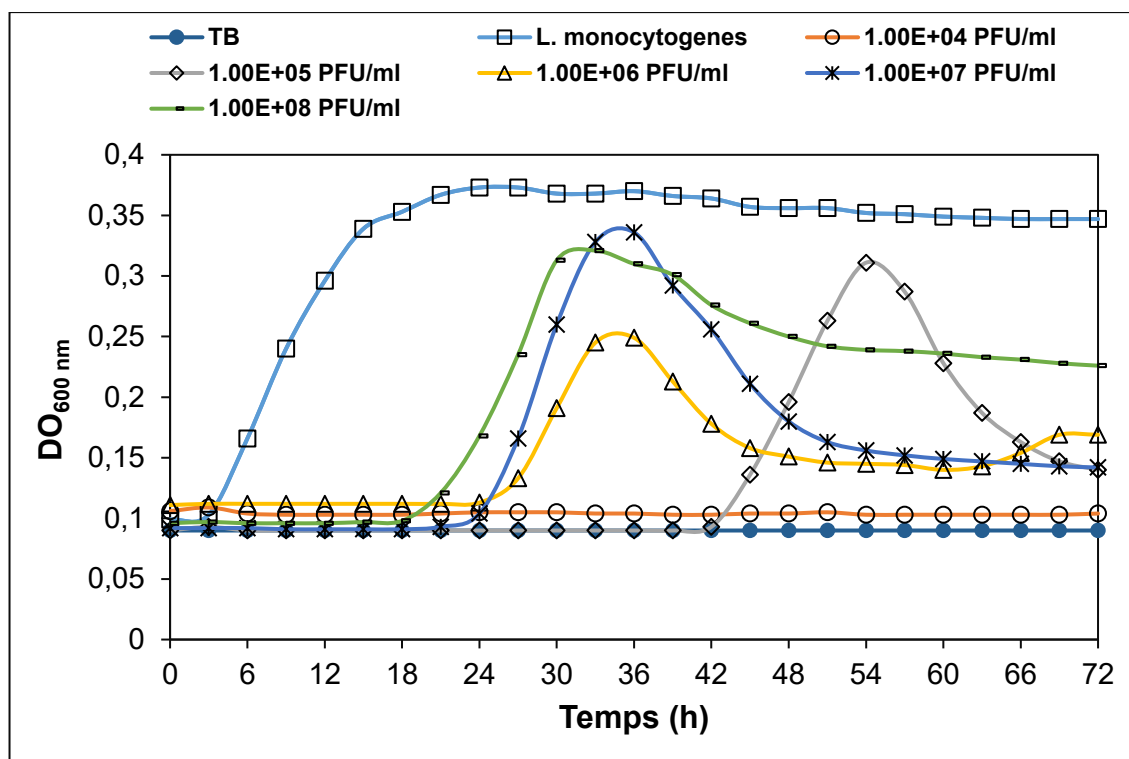


Figure 4.12 Croissance bactérienne de *L. monocytogenes* (concentration initiale 10^6 CFU/ml) sans et en présence des phages à plusieurs concentrations (10^4 - 10^8 PFU/ml).

Le témoin de croissance a débuté après 3 heures et a atteint un plateau vers 18 heures. Pour les puits qui contiennent des phages et des bactéries, les résultats expérimentaux révèlent des différences marquées dans le comportement de croissance bactérienne par rapport aux deux concentrations antérieures (10^4 et 10^5 CFU/ml). De plus, ce comportement varie avec la concentration initiale de *L. monocytogenes*. En comparaison avec la courbe témoin de croissance, aucune augmentation de la densité optique n'est observée dans les 18 premières heures pour toutes les conditions testées avec phages. Cette absence de croissance, rapportée à la concentration bactérienne mesurée dans le témoin de croissance au même temps t , correspond à une réduction estimée d'environ 8 log. Pour la concentration la plus faible de (10^4 PFU/ml; MOI 0,01), l'inhibition est totale pendant toute la durée de suivi : la densité optique reste stable, indiquant l'absence de reprise de croissance de *L. monocytogenes*. Pour les concentrations plus élevées (10^5 , 10^6 , 10^7 ,

10^8 PFU/ml; MOI 0,1; 1; 10; 100), une augmentation de la densité optique est observée à des moments variables entre 18 heures et 72 heures.

Dans l'ensemble des échantillons, la densité optique a atteint un maximum sans toutefois égaler ou dépasser celle des cultures témoins de croissance non exposées aux phages. Après ce maximum, une réduction de la densité optique a été enregistrée, tout en restant supérieure au seuil de l'appareil.

4.2.2.3.1 Caractérisation des isolats de *L. monocytogenes*

Afin de confirmer l'identité des bactéries présentes dans certains puits et d'écartier l'éventualité d'une contamination, plusieurs échantillons, prélevés après 72 heures d'incubation à partir des puits ayant montré une reprise de la croissance, ont été analysés selon la méthode décrite au chapitre 3. Les observations sur milieux TA et Agar Oxford sont présentées à la Figure 4.13.

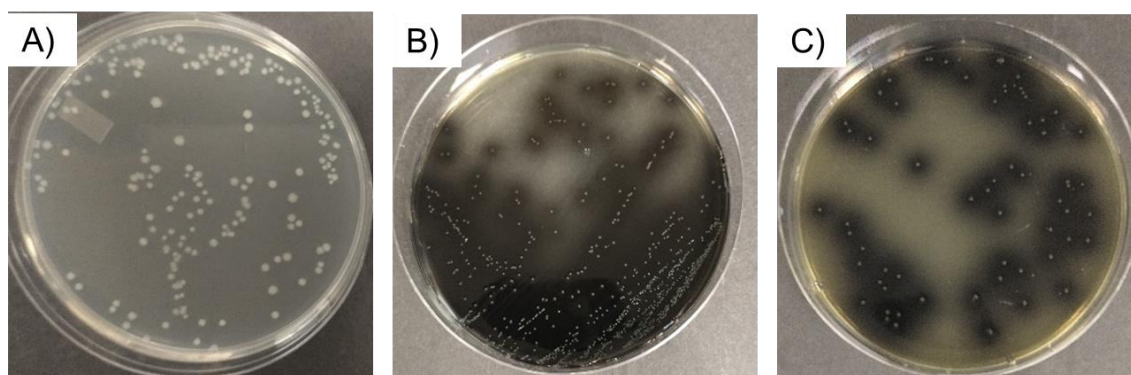


Figure 4.13 Croissance des bactéries isolées sur A) le milieu de culture TA, B) et C) sur le milieu sélectif Oxford.

Les résultats ont révélé la présence de bactéries dans les deux milieux. Aucune quantification par dénombrement n'a été réalisée à cette étape ; l'analyse repose donc sur des observations qualitatives. Sur le milieu TA, l'aspect morphologique des colonies correspond à celui typiquement observé pour *L. monocytogenes*. Par ailleurs, la croissance observée sur le milieu de culture sélectif Oxford confirme cette identification et permet d'exclure toute contamination par d'autres souches bactériennes. Dans le but d'accroître la pureté des souches bactériennes, une double étape d'isolement a été réalisée sur le milieu

sélectif Oxford, ce qui a permis d'obtenir des souches pures destinées aux essais de sensibilité aux phages.

4.2.2.3.2 Évaluation de la résistance des isolats aux phages P100

Les souches pures obtenues ont ensuite été utilisées pour réaliser un essai antibactérien en milieu semi-solide, selon la méthode de la double couche d'Agar, en présence des phages P100. L'objectif de cet essai est de valider la nature résistante de la souche bactérienne sélectionnée. Pour ce faire, les isolats issus des puits ayant montré une reprise de la croissance ont été utilisés. Ces puits correspondaient à des rapports MOI compris entre 0,1 et 100 (soit des concentrations de phages de 10^5 à 10^8 PFU/ml pour une concentration bactérienne initiale de 10^6 CFU/ml). Au total 12 isolats ont été testés. Chaque isolat a été incubé pendant 18 heures à 30°C avec une agitation à 120 rpm. Puis, un tapis bactérien a été préparé conformément au protocole de double couche Agar. Une goutte de 20 μl du phage P100 (10^{11} PFU/ml), a été déposée sur le tapis bactérien, dont la concentration était de 10^9 CFU/ml. La Figure 4.14 illustre l'aspect du tapis bactérien après 24 heures d'incubation en présence des phages P100.

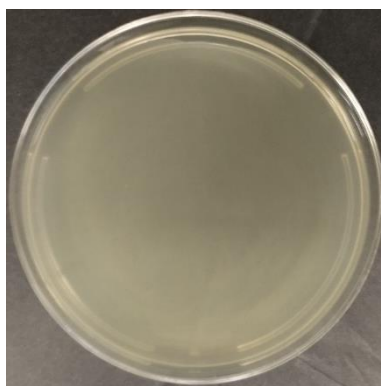


Figure 4.14 Tapis bactérien après 24 heures d'interaction avec les phages P100 (incubation à 30°C).

Les résultats expérimentaux n'ont pas montré l'apparition d'une zone de lyse en surface, suggérant ainsi la présence de *L. monocytogenes* résistante aux phages P100.

4.2.2.4 Cinétique de l'interaction à 10^7 CFU/ml

Pour la cinétique d'interaction à 10^7 CFU/ml, la Figure 4.15 présente les évolutions bactériennes en absence de phages ainsi qu'en présence de différentes concentrations de phages (10^4 - 10^8 PFU/ml).

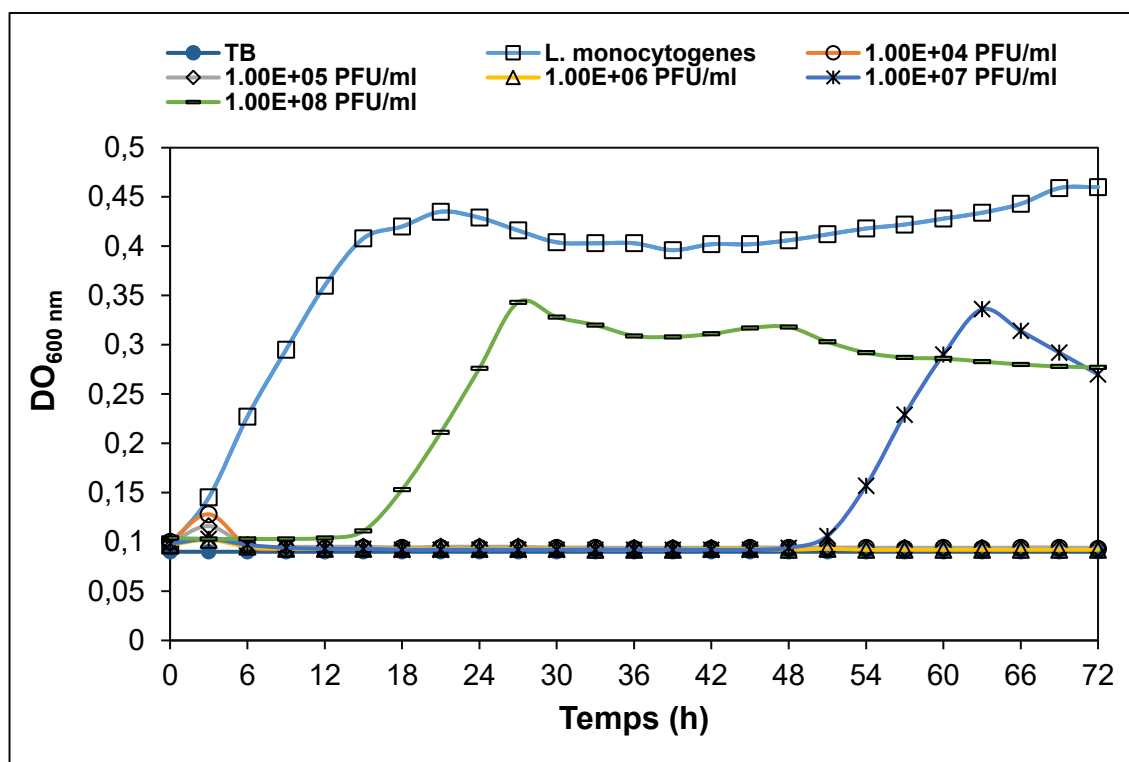


Figure 4.15 Croissance bactérienne de *L. monocytogenes* (concentration initiale 10^7 CFU/ml) sans et en présence des phages à plusieurs concentrations (10^4 - 10^8 PFU/ml).

Les données enregistrées n'ont pas montré la phase latente pour le témoin de croissance; elles offrent plutôt une observation des stades initiaux de la croissance, soulignant le début de la phase exponentielle de croissance bactérienne. Cette observation est attribuée à la concentration initiale significative de la solution bactérienne, laquelle engendre un délai réduit avant l'entrée en phase exponentielle. La stabilisation de la phase stationnaire est observée à partir de la quinzième heure. Dans les puits expérimentaux contenant à la fois des phages et des bactéries, les résultats révèlent des différences dans le profil de croissance bactérienne en fonction des concentrations de la solution de phages. À des faibles

concentrations des phages (10^4 et 10^5 PFU/ml, MOI : 0,001 et 0,01), une élévation marginale de la densité optique est constatée initialement, atteignant un pic modéré après 3 heures d'interaction, suivie d'une réduction de la densité optique en deçà de la limite de détection de l'appareil. Cette inflexion dans la courbe indique le moment où les phages commencent à infecter les bactéries, entraînant une diminution de la croissance bactérienne. À une concentration de phages de 10^6 PFU/ml (MOI = 0,1), aucune augmentation de la densité optique n'a été observée pendant toute la durée de suivi, ce qui suggère une lyse complète des bactéries. Dans ces conditions, ainsi qu'aux deux concentrations plus faibles (10^4 et 10^5 PFU/ml), la comparaison avec le témoin de croissance au même temps t indique une réduction d'environ 8 log de la concentration bactérienne par rapport au témoin de croissance, sans détection de bactéries résistantes. À une concentration de phages de 10^7 PFU/ml (MOI = 1), une inhibition initiale équivalente à 8 log de réduction par rapport au témoin de croissance est également observée, mais celle-ci est suivie d'une reprise de la croissance à partir de 48 h, suggérant l'émergence de bactéries résistantes. En revanche, à la concentration la plus élevée (10^8 PFU/ml; MOI = 10), la réduction relative de 8 log par rapport au témoin de croissance est atteinte dès les 6 premières heures, suivie d'une augmentation précoce de la densité optique, traduisant une reprise plus rapide de la croissance bactérienne résistante. Une procédure analogue à celle appliquée pour la concentration de 10^6 CFU/ml a été exécutée afin d'analyser la solution dans les puits où une élévation de la densité optique a été relevée. Les résultats expérimentaux ont clairement démontré la présence de bactéries résistantes, soulignant ainsi la capacité de ces populations bactériennes à persister et à croître malgré l'influence de l'agent phagique. Cette observation suggère une potentielle évolution adaptative au sein de la population bactérienne en réponse à la pression exercée par les phages et une cohabitation entre les phages et les bactéries est observée.

4.2.2.5 Cinétique de l'interaction à 10^8 CFU/ml

Enfin, pour la concentration la plus élevée testée, soit 10^8 CFU/ml, la Figure 4.16 présente les évolutions bactériennes dans des conditions dépourvues de phages ainsi que sous l'influence de diverses concentrations de phages (10^4 - 10^8 PFU/ml).

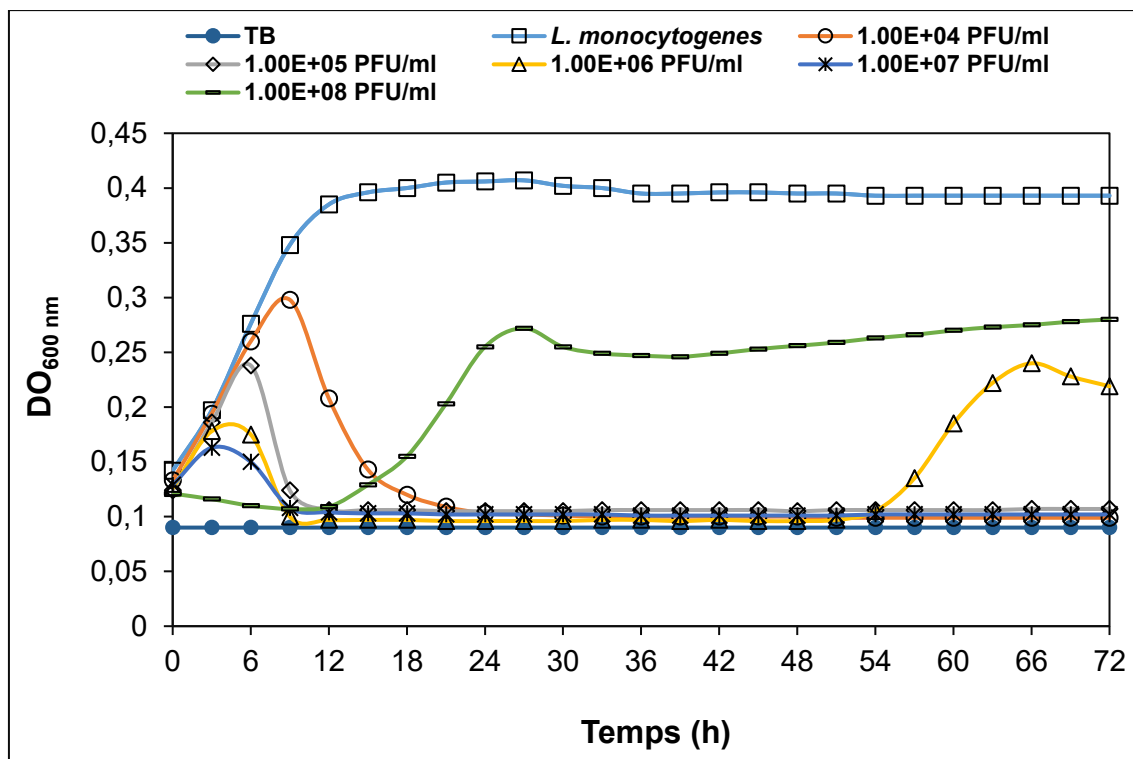


Figure 4.16 Croissance bactérienne de *L. monocytogenes* (concentration initiale 10^8 CFU/ml) sans et en présence des phages à plusieurs concentrations (10^4 - 10^8 PFU/ml).

Les résultats obtenus ne permettent pas d'observer la manifestation d'une phase latente dans le cas du témoin de croissance. Elles offrent plutôt une observation des stades initiaux de la croissance, soulignant le début de la phase exponentielle de croissance bactérienne, similaire à la concentration bactérienne de 10^7 CFU/ml. Cependant, la stabilisation de la phase stationnaire est observée à partir de 12 heures.

Dans les puits expérimentaux contenant à la fois des phages et des bactéries, conformément aux observations antérieures, les données révèlent des différences dans le profil de croissance bactérienne en fonction des concentrations de la solution de phages.

À des concentrations de phages évoluant de 10^4 PFU/ml à 10^7 PFU/ml (MOI : 0,0001 ; 0,001 ; 0,01 et 0,1), l'émergence du pic de la densité optique s'avère un phénomène notable. Les caractéristiques de ces pics, tant en amplitude que dans leur persistance temporelle, démontrent une variabilité marquée en fonction de la concentration de phages. Les

concentrations de phages plus faibles exhibent des pics à la fois plus prononcés et prolongés dans le temps. Par exemple, pour une concentration de 10^4 PFU/ml, le sommet de la densité optique est atteint après 9 heures, amorçant ensuite une décroissance graduelle. Cette diminution persiste jusqu'à ce que la densité optique atteigne un niveau en dessous du seuil de détection de l'appareil, ce qui survient après 21 heures. En revanche, pour la concentration de 10^7 PFU/ml, le pic de la densité optique se manifeste après seulement 3 heures, et la densité optique atteint le seuil de détection de l'appareil après 9 heures. Ces observations soulignent, encore une fois, la dépendance significative des dynamiques de croissance bactérienne vis-à-vis de la concentration de phages, mettant en évidence des réponses distinctes en termes d'amplitude et de durée temporelle des pics de densité optique. Ces observations peuvent être attribuées à la faible concentration initiale de phages, en contraste avec une concentration bactérienne élevée. L'accroissement de la quantité de phages dans le milieu nécessite un temps significatif. En raison de cette concentration initiale, le délai requis pour que la densité de phages atteigne des niveaux susceptibles d'influer notablement sur la croissance bactérienne est prolongé.

Pour la concentration de phages la plus élevée (10^8 PFU/ml), aucune augmentation de la densité optique n'a été observée avant 12 heures, soit le temps nécessaire pour atteindre la phase stationnaire dans la condition témoin de croissance. Cette absence de croissance traduit une activité antibactérienne particulièrement efficace, aboutissant à une lyse complète de la population bactérienne initiale. Cependant, une augmentation marquée de la densité optique est enregistrée après 12 h, atteignant un maximum à 27 h avant de diminuer progressivement. En comparaison, parmi les autres conditions testées, seule la concentration de 10^6 PFU/ml a montré une reprise de la densité optique, observée plus tardivement, à partir de 54 heures. Dans les deux cas (10^6 et 10^8 PFU/ml), les valeurs de la densité optique sont restées inférieures à celles des cultures témoins de croissance non exposées aux phages. Les analyses complémentaires ont confirmé la présence de bactéries résistantes, soulignant la capacité adaptative de *L. monocytogenes* à persister et à se multiplier. Cette observation ne remet toutefois pas en cause l'utilisation des phages comme agents antibactériens, mais met plutôt en évidence la nécessité d'adapter la stratégie d'application afin de limiter l'apparition de résistances.

Cette section de l'étude visait à approfondir la compréhension des interactions complexes entre phages et bactéries et à élaborer des stratégies pour limiter la résistance bactérienne. L'efficacité de ces interactions est principalement liée aux concentrations initiales des bactéries et des phages.

Les résultats suggèrent que, pour des concentrations bactériennes initiales faibles, le MOI n'est pas un facteur déterminant pour obtenir une lyse complète, car le nombre relatif de bactéries à éliminer reste limité et les phages peuvent rapidement atteindre une concentration suffisante pour éliminer la population bactérienne. En revanche, lorsque la concentration bactérienne initiale est élevée, un MOI élevé exerce une pression sélective dès les premières étapes de l'interaction. Cette pression favorise l'apparition rapide de bactéries résistantes, qui survivent à l'attaque initiale et peuvent ensuite se multiplier. À l'inverse, un MOI faible entraîne une infection progressive, laissant plus de temps à la propagation des phages au sein de la population bactérienne et réduisant ainsi la pression sélective immédiate [170]. Ces dynamiques expliquent pourquoi, dans nos essais, la résistance bactérienne a été plus fréquemment observée aux rapports MOI élevés associés à de fortes concentrations initiales de bactéries.

4.3 Effet du support en papier sur les interactions entre les phages et les bactéries

Dans le but d'étudier les paramètres d'application des phages sur différents types de papiers et leurs influences sur leurs propriétés antibactériennes (objectif 2 de la thèse), il est nécessaire de comprendre l'effet du support sur les interactions entre les phages et les bactéries. Cette partie porte sur l'application des phages sur les supports en papier, en examinant l'effet du type de papier, la quantité de phages, les conditions de séchage, l'influence de l'humidité, du temps d'entreposage et de la capacité de mouillabilité du papier sur la performance antibactérienne des phages sur les papiers.

Les caractéristiques physico-chimiques de chaque type de papier, telles que le grammage, la perméabilité à l'air, la capacité d'absorption, la morphologie de surface observée au MEB et le traitement de surface, peuvent influencer la distribution et l'efficacité des

phages. De plus, la quantité optimale de phages appliquée sur le papier, la durée de son entreposage et les conditions environnementales de séchage pourraient avoir un impact sur les propriétés antibactériennes. Par exemple, le temps d'entreposage du papier traité peut affecter la stabilité des phages, nécessitant une évaluation régulière de leur efficacité au fil du temps. Enfin, la capacité de mouillabilité du papier conditionne la distribution uniforme des phages sur sa surface, influençant ainsi leur capacité à entrer en contact avec les bactéries cibles. Comprendre ces différents paramètres est essentiel pour optimiser l'application des phages sur les supports papetiers et garantir leur utilisation réussie dans des environnements industriels et commerciaux.

4.3.1 Caractérisation des papiers

4.3.1.1 Caractérisation des papiers de base et standards

Les propriétés physiques (grammage, épaisseur, densité, perméabilité à l'air et indice Cobb) des papiers de base et des différents papiers formettes standards ont été mesurées (Tableau 4.1). Les papiers fournis par l'entreprise Kruger sont identifiés par la lettre K, tandis que ceux préparés au laboratoire sont identifiés par la lettre F. Les papiers calandrés sont suivis par l'abréviation « Cal ».

Tableau 4.1 Propriétés physiques des papiers de base et des papiers formettes standards.

Papier	Grammage (g/m ²)	Épaisseur (um)	Densité (g/cm ³)	Perméabilité à l'air PPS (ml/min)	Indice Cobb (g/m ²)
30K	30,4	48,5	0,63	847±61	31
50K	53,2	82	0,68	55±1,8	20
30F	30,7	54	0,57	294±38	46,8
50F	49,7	80	0,62	108±6	78,4
90F	90,5	136	0,66	58±5	139,6
130F	132,3	194	0,68	37±2	165,6

Pour les papiers formettes standards (30F, 50F, 90F, 130F), une augmentation du grammage entraîne une hausse de l'absorption d'eau, comme le montre l'augmentation de la

valeur de l'indice Cobb de 46,8 g/m² pour le 30F à 165,6 g/m² pour le 130F. Cette absorption plus importante favorise la rétention d'humidité nécessaire à la protection des phages. À l'inverse, les papiers de base (30K, 50K) montrent une réduction progressive de l'indice Cobb avec l'augmentation du grammage. Cette tendance est attribuée à leur structure plus dense et à la présence d'un traitement industriel conférant une barrière aux liquides. En comparant les papiers de même grammage entre formette standard et papier de base, la différence est significative : pour le grammage 30, l'indice Cobb est de 46,8 pour le 30F et de 31 pour le 30K, tandis que pour le grammage 50, il est de 78,4 pour le 50F contre seulement 20 pour le 50K. Ces écarts illustrent donc l'effet de ce traitement intégré sur la rétention d'eau. Par ailleurs, les papiers évalués présentaient des densités et des perméabilités à l'air contrastées : papier de base 30K (0,63 g/cm³, 847 ml/min), papier de base 50K (0,68 g/cm³, 55 ml/min) et papier formette standard 50F (0,62 g/cm³, 108 ml/min). Des observations complémentaires ont été réalisées par MEB afin de caractériser la morphologie de surface des différents papiers. Parmi les grossissements obtenus ($\times 100$ à $\times 1000$), le grossissement $\times 250$ a été retenu, car il offre un compromis optimal entre la visualisation globale du réseau fibreux et la détection des détails topographiques associés aux traitements de surface. Ce choix permet également une comparaison homogène entre échantillons. La Figure 4.17 présente les images MEB pour les papiers 30K, 50K et 50F.

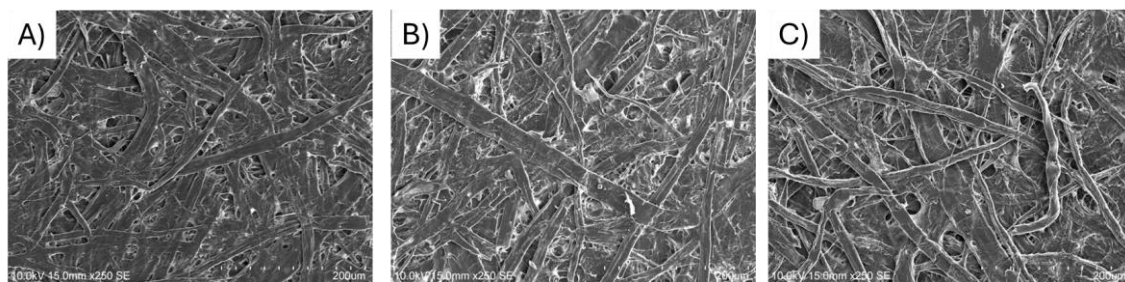


Figure 4.17 Images obtenues par microscopie électronique à balayage (MEB, 10.0 kV, x250) illustrant la morphologie de surface des différents papiers : (A) 30K, (B) 50K et (C) 50F.

Ces images illustrent la surface des papiers utilisés pour l'application des phages. Dans cette étude, à part le calandrage, aucune modification physique des papiers n'a été réalisée, et l'effet de la rugosité n'a pas été spécifiquement évalué. Toutefois, le papier de base

ayant subi des modifications chimiques présente des caractéristiques de surface particulières, notamment des pores visibles susceptibles d'influencer la répartition des phages, y compris leur localisation à différentes profondeurs. Cette hétérogénéité de la surface est typique des papiers industriels non calandrés. L'objectif était donc d'examiner si cette variabilité de structure pouvait affecter l'interaction phages-bactéries et, par conséquent, leur efficacité. La combinaison des pores visibles et des propriétés physiques (densité et perméabilité à l'air) influence potentiellement la diffusion de l'air et, indirectement, la distribution des phages en profondeur.

4.3.1.2 Caractérisation des papiers calandrés

Le Tableau 4.2 regroupe les caractéristiques physiques des papiers Kruger et des papiers formettes standards calandrés.

Tableau 4.2 Propriétés physiques des papiers de base (K) et formettes standards (F) calandrés.

Papier	Grammage (g/m ²)	Épaisseur (μ m)	Densité (g/cm ³)	Perméabilité à l'air PPS (ml /min)	Indice Cobb (g/m ²)
30KCal	30,2	36	0,8	359 $\pm$ 23	28
50KCal	53,3	54	0,9	20 $\pm$ 1,6	22
30FCal	31,2	41	1,3	82,4 $\pm$ 6	43
50FCal	50,4	55	1,1	20,5 $\pm$ 1	71
90FCal	90,8	95	1	8,3 $\pm$ 0,6	114
130FCal	132	136	1	5,4 $\pm$ 0,5	160

Le calandrage a entraîné, pour l'ensemble des papiers, une augmentation de la densité et une réduction de la perméabilité à l'air ainsi que de l'épaisseur. L'indice Cobb a légèrement diminué dans la plupart des cas, à l'exception d'une faible hausse observée pour le papier 50K. Le grammage est resté quasi inchangé, les écarts observés relevant des tolérances de mesure. La diminution de la perméabilité à l'air est appuyée par les observations morphologiques obtenues par MEB (Figure 4.18).

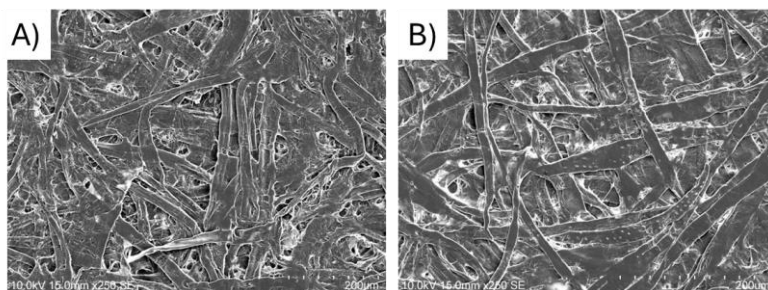


Figure 4.18 Images obtenues par microscopie électronique à balayage (MEB, 10.0 kV, x250) illustrant la morphologie des différents papiers : (E) 50KCal, (F) 50FCal.

Les images mettent en évidence les modifications de la structure fibreuse induites par le calandrage. Les fibres apparaissent aplaties, les pores inter-fibres sont réduits et la surface est plus lisse. La diminution de la perméabilité à l'air observée après calandrage (de 55 à 20 ml/min pour le papier 50KCal, et de 108 à 20,5 ml/min pour le papier 50FCal) est cohérente avec l'augmentation de la densité des papiers ($0,68\text{g/cm}^3$ à $0,9\text{ g/cm}^3$ pour 50K et 50KCal et de $0,62\text{g/cm}^3$ à $1,1\text{ g/cm}^3$ pour 50F et 50FCal). Ces résultats confirment que le calandrage agit comme un traitement mécanique de compactage, réduisant la porosité interne du papier. Cette réduction de perméabilité à l'air pourrait permettre de diminuer la quantité de phages nécessaire pour obtenir la même efficacité antibactérienne en raison d'une meilleure rétention des phages à la surface du papier.

4.3.1.3 Propriétés des papiers modifiés avec l'AKD

Le Tableau 4.3 regroupe les caractéristiques de divers types de papier modifiés avec des concentrations d'agent AKD à 0,5%, 1%, et 2%. Tout au long de cette étude, le mot AKD est ajouté pour désigner ces papiers.

Tableau 4.3 Propriétés physiques des papiers formettes standards avec AKD

Papier	Grammage (g/m ²)	Épaisseur (um)	Densité (g/cm ³)	Perméabilité à l'air PPS (ml/min)	Indice Cobb (g/m ²)
30F AKD 0,5%	31,5	57	0,55	442±68	17
50F AKD 0,5%	51	84	0,63	150±8	21
90F AKD 0,5%	92	139	0,66	71,5±7	23
130F AKD 0,5%	131,5	195	0,66	47,4±2	23
30F AKD 1%	30,5	55	0,55	541±121	15
50F AKD 1%	51,2	88	0,58	137±14	18
90F AKD 1%	92	139	0,66	62,6±3	23
130F AKD 1%	132	194	0,68	48,2±2	23
30F AKD 2%	30,5	55	0,54	473,3±77	15
50F AKD 2%	48	80	0,60	146,1±8	19
90F AKD 2%	88	133	0,66	60,4±3	27
130F AKD 2%	129,6	189	0,68	36,4±1	25

L'ajout de l'AKD a entraîné une forte diminution de l'indice Cobb à grammage égal, indiquant une réduction marquée de l'absorption d'eau. Par exemple, le papier 30F passe de 46,8 à 15 g/m² à 1 % d'AKD (-67,9%), le 50F de 8,4 à 18 g/m² à 1 % d'AKD (-77,0%), le 90F de 139,6 à 23 g/m² à 0,5–1 % d'AKD (-83,5%) et le 130F de 165,6 à 23 g/m² à 0,5-1% d'AKD (-86,1 %). La perméabilité à l'air a au contraire tendance à augmenter pour la plupart des grades. À titre d'exemple : pour le papier 30F, elle passe de 294 ml/min à 442, 541 et 473,3 ml/min aux doses de 0,5%, 1% et 2% d'AKD (+50,3; +84,0 et 61 %) ; pour le 50F, de 108 ml/min à 150, 137 et 146,1 ml/min (+38,9; +26,9 et 35,3 %) Au grammage élevés, l'effet est plus modeste : pour le 90F, de 58 ml/min à 71,5, 62,6 et 60,4 ml/min (+23,3; 7,9 et +4,1 %) ; pour le 130F de 37 ml/min à 47,4, 48,2 et 36,4 (+28,1; +30,3 et -1,6 %). La densité varie faiblement (écarts $\leq 0,04$ g/cm³) sans tendance robuste. En conséquence, nous concluons que l'AKD hydrophobise efficacement les formettes (Cobb en baisse) sans densifier notablement le support et sans fermer systématiquement les chemins d'air (perméabilité souvent en hausse).

4.3.1.4 Propriétés de surface de papiers utilisés

La Figure 4.19 présente plusieurs images représentatives de gouttes d'eau déposées sur différents types de papiers. Ces images ont été sélectionnées à partir de diverses vidéos enregistrées pour illustrer la variabilité de l'interaction entre l'eau et les surfaces étudiées.

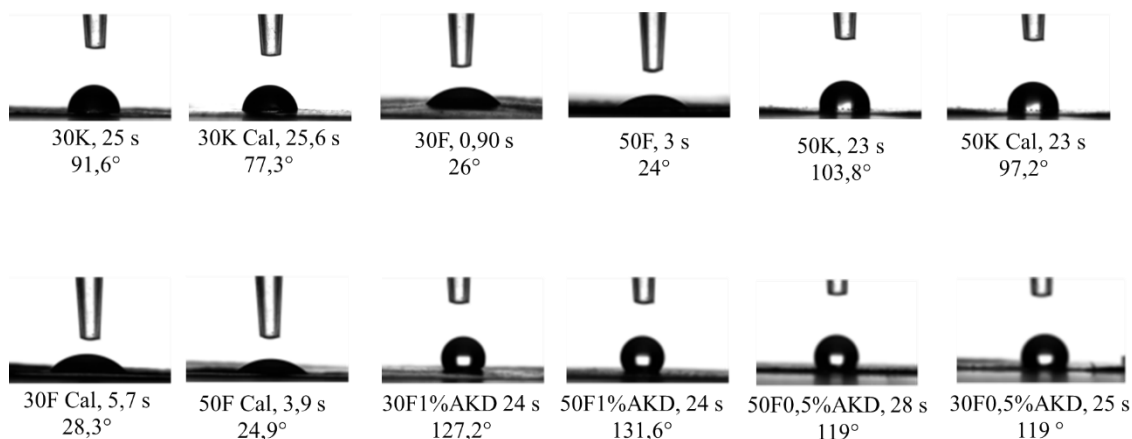


Figure 4.19 Gouttes d'eau sur différents papiers ; le type, le temps de capture (t) et l'angle de contact (θ) sont indiqués sous chaque image.

Les résultats ont démontré que les surfaces sont divisées en deux catégories :

- La première, hydrophile, correspond aux papiers qui absorbent rapidement la goutte d'eau (la goutte est absorbée entre 0,5 et 5 secondes après le contact avec la surface, ce qui correspond à une mouillabilité totale). Cette catégorie regroupe les formettes standards non modifiées (calandrées ou non).
- La deuxième, hydrophobe, regroupe les papiers sur lesquels la goutte d'eau conserve sa forme sphérique au-delà de 25 secondes. Cette figure présente les papiers de base (calandrés) ou non et les formettes standards modifiées avec AKD.

À partir des images, les angles droit et gauche, ainsi que leur moyenne, ont été mesurés par le logiciel *OneAttension*, qui fournit un rapport contenant l'évolution de la goutte à un intervalle de 0,3 s.

Pour appuyer ces observations par une analyse quantitative, la Figure 4.20 représente la variation de l'angle de contact en fonction du temps pour des papiers de grammage de

30 g/m² (30K, 30KCal, 30F, 30FCal et 30F 2% AKD). Les résultats présentés sont une moyenne de cinq mesures par échantillon, réalisées sur différentes zones de la surface.

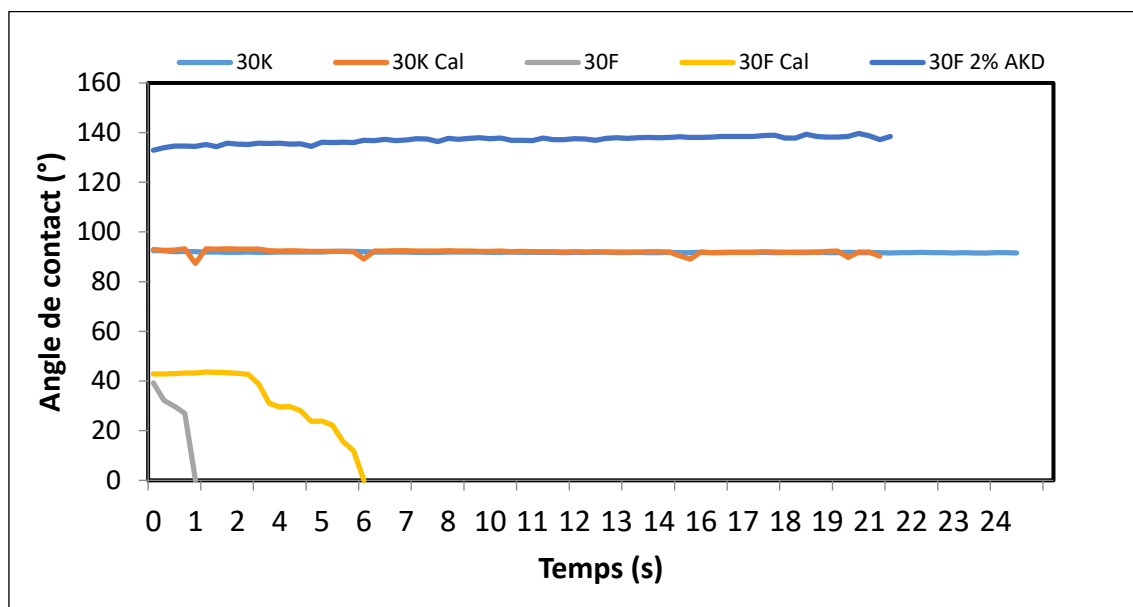


Figure 4.20 Variation de l'angle de contact en fonction du temps d'une goutte d'eau déposée sur des papiers de grammage 30 g/m² (K, K Cal, F, F Cal et F 2% AKD).

L'angle de contact initial mesuré est de 39° pour le papier 30F et de 42° pour le papier 30FCal. Ces différences de comportement sont également visibles à l'échelle microscopique : les images MEB montrent que le calandrage provoque un aplatissement des fibres et une fermeture partielle des pores, ce qui réduit la vitesse d'absorption sans modifier la chimie de surface. Dans les deux cas, cet angle décroît rapidement : il s'annule après 1,2 s pour le papier 30F, contre 6 s pour le papier 30FCal. Cette différence indique que le calandrage ralentit légèrement l'absorption d'eau. Ce résultat est cohérent avec la diminution de la perméabilité à l'air, qui passe de 294 à 82,4 ml/min après calandrage. Toutefois, le comportement global reste hydrophile, car la chimie de surface (cellulose riche en groupements polaires) domine l'interaction entre l'eau et le papier et conduit à une absorption complète. En revanche, les papiers 30K et 30KCal conservent des angles stables proches de 92°, caractérisant des surfaces hydrophobes qui persistent indépendamment du calandrage. La perméabilité à l'air diminue fortement après calandrage (de 847 à 359 ml/min), mais cette variation n'affecte pas la mouillabilité : la chimie de surface domine et explique

le maintien d'un angle élevé. Enfin, le papier 30F 2 % AKD illustre bien ce rôle de la chimie : les angles de contact supérieurs à 130° demeurent stables tout au long de la mesure, conséquence directe de la présence de groupements hydrophobes apportés par l'AKD. Cette analyse permet de distinguer clairement les surfaces absorbantes de celles qui maintiennent la goutte.

Pour comparer l'ensemble des papiers étudié sur une base commune, les valeurs d'angle de contact ont été retenues après une seconde du dépôt de la goutte. Ce choix permet de neutraliser les effets liés à l'absorption rapide et d'offrir une base commune de comparaison. La Figure 4.21 regroupe les valeurs d'angle de contact de l'ensemble des papiers testés.

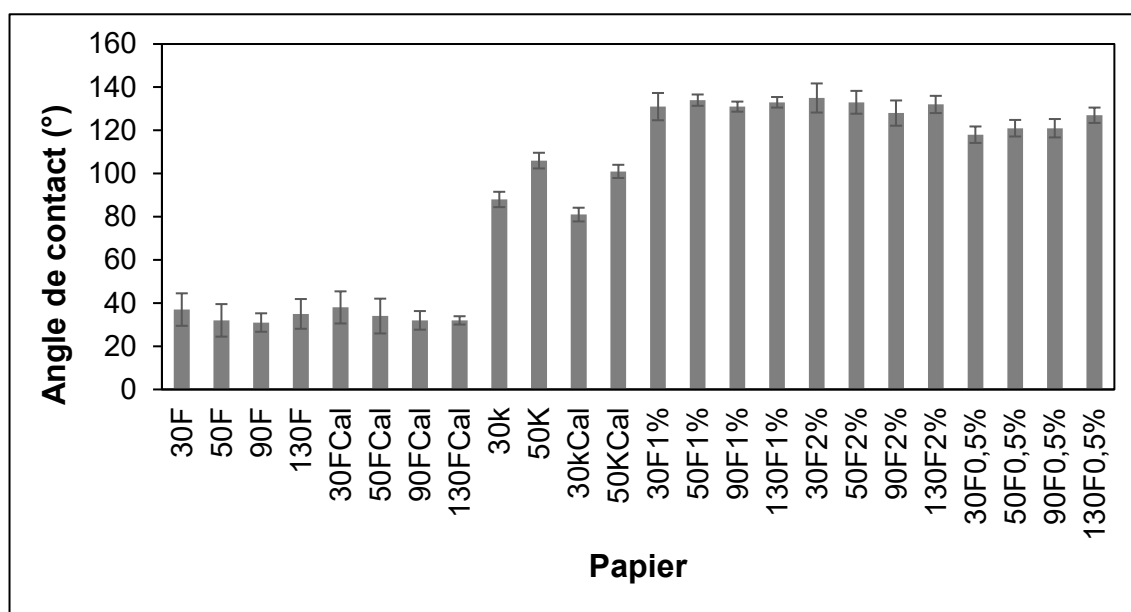


Figure 4.21 Valeurs des angles de contact des différents types de papier utilisés.

Les résultats montrent que, pour les formettes standards, la variation du grammage n'a pas d'effet sur l'angle de contact : la chimie de surface (cellulose) domine la mouillabilité. Pour les formettes modifiées avec l'AKD, l'angle de contact augmente quand le pourcentage passe de 0,5 à 1 %, puis évolue peu entre 1 % et 2 % ; ce plateau s'explique par une couverture de surface proche de la saturation dès $\sim 1\%$ (les surfaces potentielles des fibres sont majoritairement occupées, l'excès d'AKD contribuant peu à l'énergie de surface). Pour les papiers fournis par le partenaire, les valeurs de l'angle de contact ont légèrement

baissé après le calandrage (-7° pour le 30K et -5° pour le 50K). Pour les autres surfaces, le calandrage n'a pas modifié significativement les valeurs des angles de contact. Les légères variations d'angle observées après calandrage traduisent surtout une réduction de la perméabilité à l'air, sans modifier la nature chimique des surfaces.

4.3.1.4.1 Influence de l'agent tensioactif Tween 80 sur l'angle de contact de surface du papier

L'effet de l'agent tensioactif Tween 80 sur le mouillage des papiers a été évalué par mesure de l'angle de contact à l'aide de l'appareil FTA-4000, en déposant des gouttes d'une solution aqueuse contenant 0,5 % de Tween 80. La Figure 4.22 présente la comparaison entre une goutte d'eau et une goutte d'eau contenant 0,5 % de Tween 80 déposées sur le papier 50K, afin d'illustrer l'effet du tensioactif sur le mouillage de la surface.

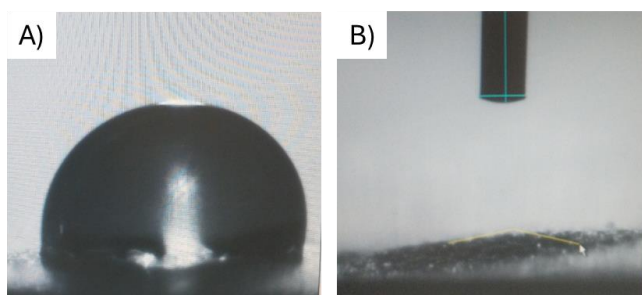


Figure 4.22 Gouttes d'eau déposées sur un papier 50K : A) goutte d'eau (angle de contact $\theta = 98^\circ$) ; B) goutte d'eau contenant 0,5 % de Tween 80 (angle de contact $\theta \approx 0^\circ$ après 70 secondes).

La Figure 4.22 met en évidence la différence de comportement entre une goutte d'eau et une goutte d'eau contenant 0,5 % de Tween 80 déposées sur le papier 50K. Sans ajout de l'agent tensioactif, la goutte d'eau conserve une forme quasi sphérique avec un angle de contact, stable dans le temps, d'environ 98° , traduisant une faible mouillabilité et une absorption limitée de la goutte à la surface du papier. En revanche, en présence du Tween 80, la goutte s'étale rapidement et disparaît complètement après environ 70 secondes. Cela suggère une mouillabilité nettement accrue. Des comportements similaires ont été observés pour le papier 30K et pour le papier 50F modifié avec 0,5 % d'AKD, où la goutte s'est étalée plus rapidement qu'en absence de tensioactif. Pour le papier 50F modifié avec 2 %

d'AKD, une diminution notable de l'angle de contact a été constatée, bien que l'angle n'atteigne pas zéro, indiquant seulement une mouillabilité partielle. Cette comparaison illustre l'effet significatif du tensioactif sur le comportement au mouillage : la réduction de la tension superficielle du liquide transportant les phages favorise l'étalement et la pénétration de la solution aqueuse dans le réseau poreux du papier. Ainsi, le Tween 80 améliorerait la dispersion de la solution de phages à la surface des papiers 30K, 50K, 50F0,5%AKD et 50F2%AKD. Pour compléter cette analyse visuelle par une approche quantitative, la Figure 4.23 présente l'évolution temporelle de l'angle de contact pour la goutte contenant 0,5 % de Tween 80.

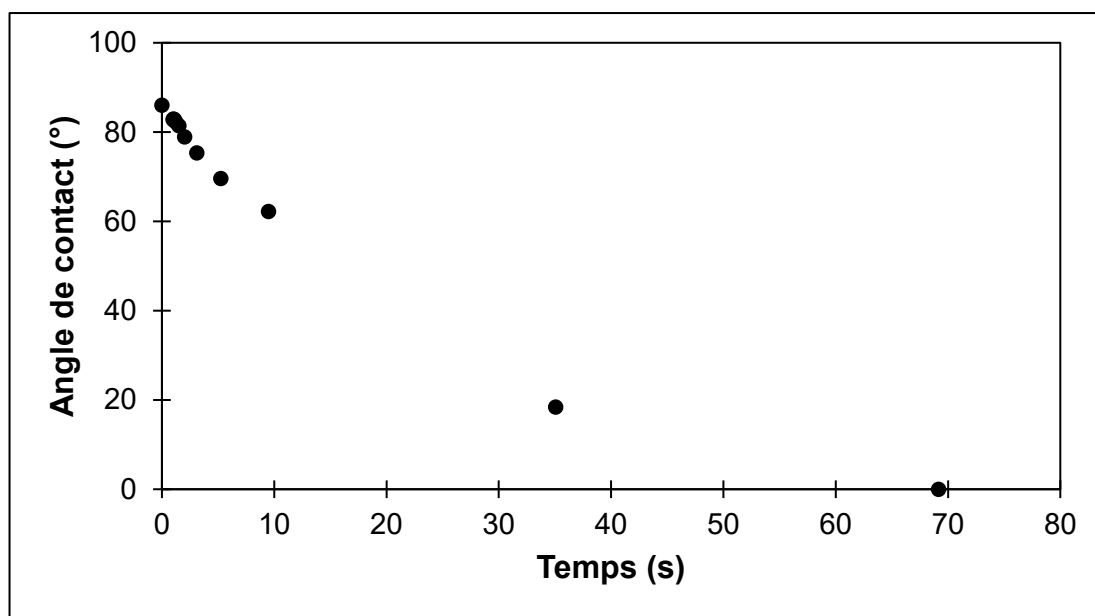


Figure 4.23 Variation de l'angle de contact en fonction de temps pour une goutte d'eau contenant 0,5 % du tensioactif Tween 80 déposée sur le papier 50K.

On observe une diminution rapide de l'angle de contact dès les premières secondes, passant de près de 90° à environ 60° après 10 secondes, puis à 20° après 35 secondes. L'angle devient nul après environ 70 secondes, indiquant une absorption complète de la goutte. Cette évolution confirme le rôle du tensioactif dans la réduction de la tension superficielle du liquide et l'amélioration significative de la mouillabilité du papier 50K. La Figure 4.24 présente les valeurs moyennes des angles de contact mesurés après 4 secondes sur les papiers 30K, 50K, 50F 0,5 %AKD et 50F2%AKD en présence de 0,5 % de Tween 80.

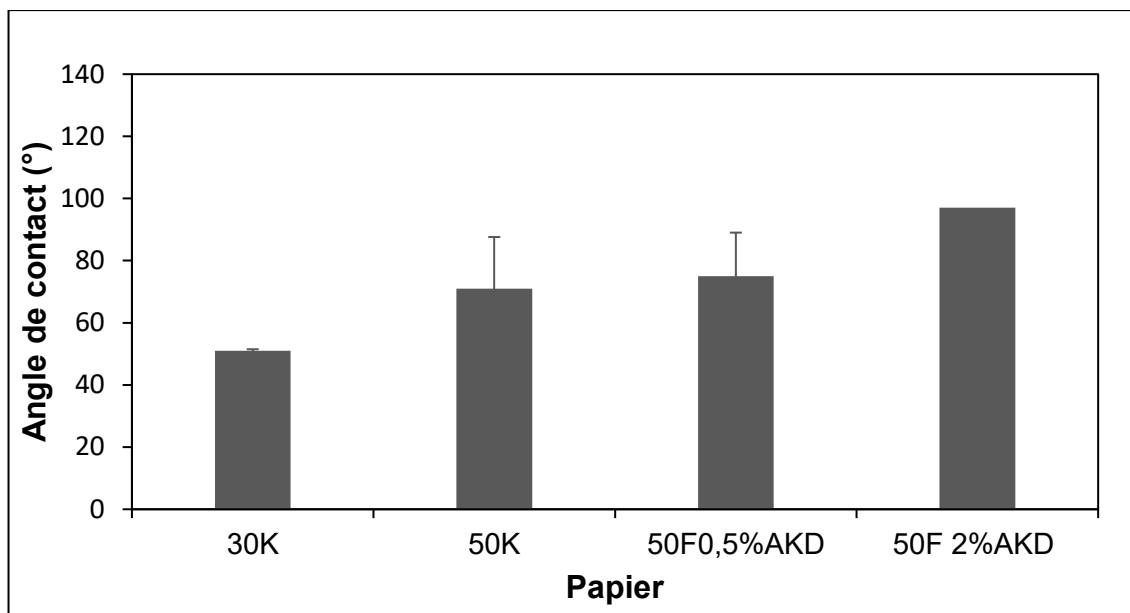


Figure 4.24 Valeurs moyennes des angles de contact mesurés 4 secondes après le dépôt d'une goutte de solution aqueuse contenant 0,5 % de l'agent tensioactif Tween 80 sur différents papiers.

On observe une diminution de l'angle de contact pour l'ensemble des papiers testés par rapport aux mesures réalisées avec l'eau, traduisant une amélioration de la mouillabilité. Cette réduction est particulièrement marquée pour les papiers de base 30K et 50K et le papier 50F 0,5%AKD, dont les angles passent respectivement d'environ 88, 106 et 121° à des valeurs proches de 51, 71 et 75° après 4 secondes. Pour le papier 50F 2%AKD, la présence du tensioactif entraîne aussi une diminution de l'angle passant de 133 à 97°.

Ces résultats confirment que la réduction de la tension superficielle du liquide par le Tween 80 favorise l'étalement et la pénétration du liquide sur les papiers hydrophobes. Ainsi, l'ajout d'un tensioactif constitue une approche efficace pour améliorer la mouillabilité et faciliter l'application homogène de la solution de phages sur ces supports.

4.3.2 Étude des effets combinés de la concentration bactéries-phages et du MOI sur les propriétés antibactériennes sur des supports en papier

Dans le but d'étudier les paramètres d'application des bactériophages sur différents papiers et leurs influences sur leurs propriétés antibactériennes (objectif 2 du projet de doctorat), il est nécessaire d'étudier les effets combinés de la concentration bactéries-phages et du MOI sur les propriétés antibactériennes sur des supports en papier. Le papier 50K étant un papier industriel de grade alimentaire, celui-ci a été utilisé comme papier de référence. Cela nous a permis d'entamer les travaux de recherche avec différentes combinaisons de concentrations de bactéries et de phages, d'étudier les performances des papiers sous différentes conditions d'analyse, et de limiter les variables susceptibles d'influencer les résultats.

Pour ce faire, le papier a été préalablement découpé en petits disques de 6 mm de diamètre, puis stérilisé sous UV des deux côtés afin d'assurer des conditions d'expérimentation aseptiques. Toutefois, en raison de la nature hydrophobe de la surface du papier, une difficulté initiale a été rencontrée lors de l'application de la solution de phages. Pour pallier cela, une approche progressive a été adoptée, impliquant une augmentation graduelle du volume de solution de phage (P100) afin d'obtenir une couverture uniforme de la surface du papier. Après plusieurs essais, il a été déterminé qu'un volume de 20 μ l est adéquat pour couvrir la surface de manière efficace. Une goutte de phage de 20 μ l avec une concentration de 10^{11} PFU/ml a été déposée sur chaque papier, puis laissée à l'air libre pendant 15 minutes à température ambiante (25°C). Cette étape visait l'adsorption initiale des phages à la surface du papier, sans viser un séchage complet. Le volume équivalent a été appliqué sur les autres échantillons de papier (formettes standards et papier 30K) dans le but de réaliser une comparaison systématique.

4.3.2.1 Activité antibactérienne des papiers de base 50K traités avec des phages en milieu semi-solide

4.3.2.1.1 Variation de la concentration des bactéries

Les papiers traités avec une concentration de phages 10^{11} PFU/ml ont été mis en contact avec le tapis bactérien à différentes concentrations bactériennes. En faisant varier la concentration bactérienne de 10^4 à 10^9 CFU/ml, les conditions expérimentales ont permis de tester des MOI allant de 10^7 à 10^2 . La Figure 4.25 représente les résultats d'infectivité pour 6 concentrations bactériennes après 24 heures d'incubation.

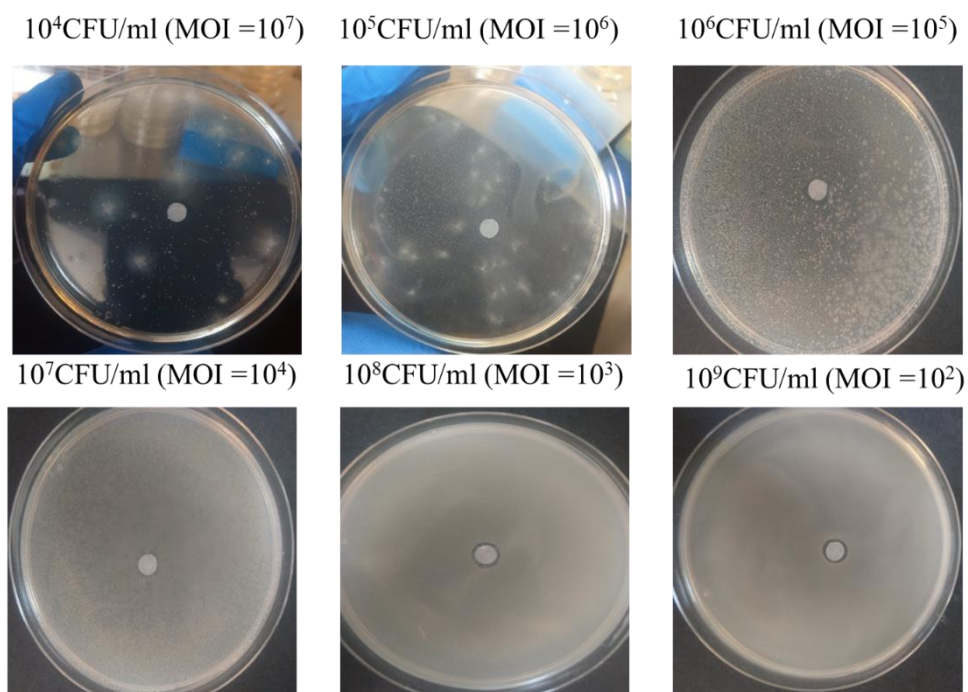


Figure 4.25 Zones de lyse observées sur les papiers 50K traités avec la solution de phage P100 (10^{11} PFU/ml), appliquée sur des tapis bactériens de différentes concentrations après 24 heures d'incubation à 30°C .

De manière générale, une zone de lyse s'est formée autour des papiers traités avec les phages, confirmant l'élimination des bactéries. L'intensité de cette zone varie en fonction de la concentration bactérienne. À faible concentration, la zone de lyse est difficilement détectable, probablement en raison de la dispersion des bactéries sur le milieu de culture. Cette observation suggère une distribution non homogène des bactéries, où la densité bactérienne est insuffisante pour permettre une lyse significative et par conséquent une clai-
rance nette. À l'inverse, à des concentrations bactériennes élevées, les bactéries forment un film continu. La zone de lyse est alors mieux délimitée et apparaît plus marquée.

Le développement de la zone de lyse a été poursuivi en fonction du temps pour les concentrations bactériennes variant entre 10^4 CFU/ml et 10^9 CFU/ml. La Figure 4.26 représente les images pour cette variation pour la concentration 10^9 CFU/ml ($\text{MOI} = 10^2$).

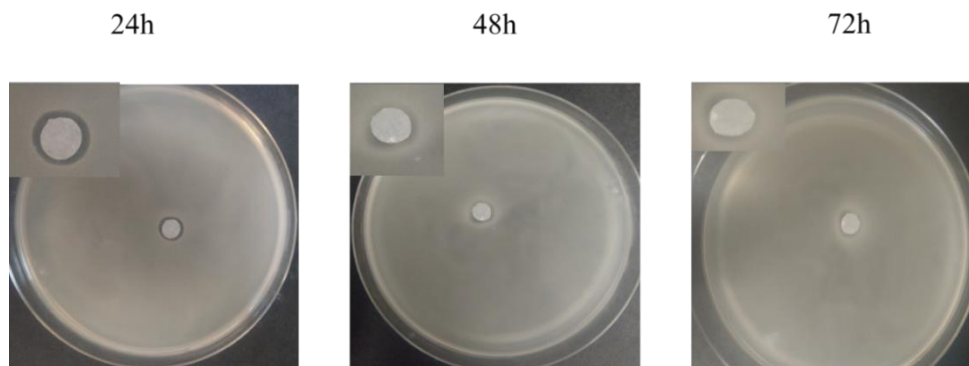


Figure 4.26 Zone de lyse en fonction du temps (incubation à 30°C) pour une concentration bactérienne 10^9 CFU/ml.

À partir de ces images, l'aire de la zone de lyse a été mesurée par le logiciel d'analyse d'images (*Adobe Photoshop CS3*). Dans le cas où la concentration est de 10^4 CFU/ml, la mesure s'est avérée difficile, car la zone n'est pas facilement observable. Par conséquent, cette aire n'a pas été prise en compte dans l'analyse. La Figure 4.27 représente la variation de l'aire de la zone de lyse en fonction du temps.

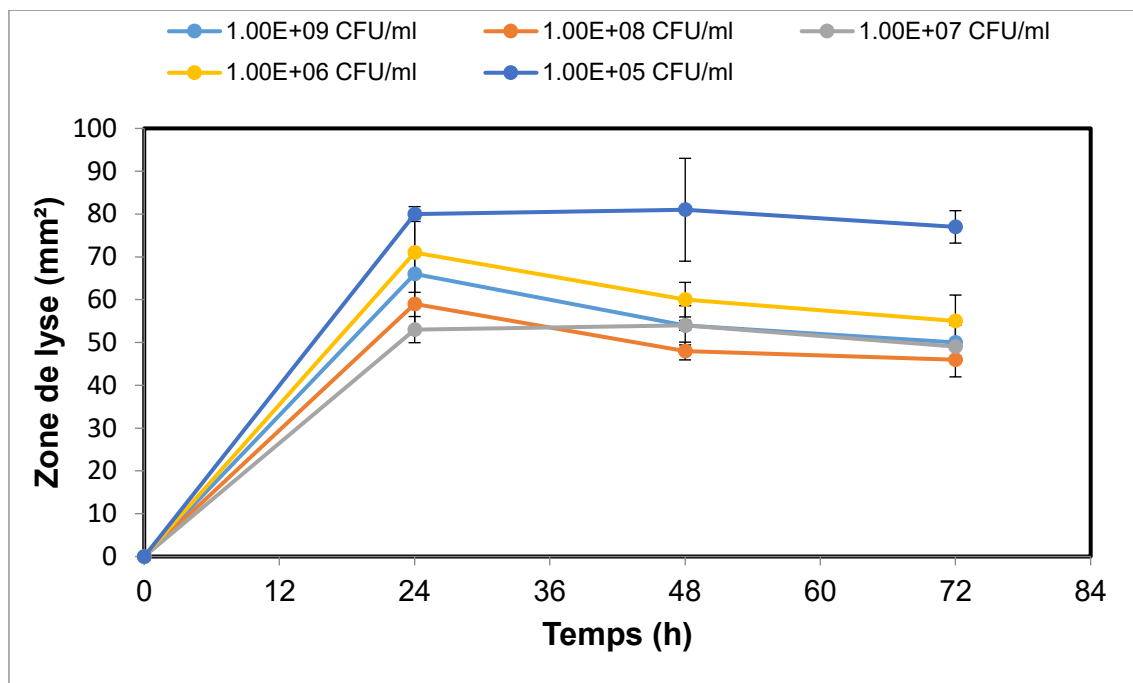


Figure 4.27 Zone de lyse en fonction du temps pour les concentrations bactériennes variant entre 10^5 CFU/ml et 10^9 CFU/ml.

Comme observé dans le test semi-solide sans papier, les résultats soulignent une diminution légère de la zone de lyse au fil du temps, avec plusieurs facteurs potentiels expliquant ce phénomène : une résistance aux phages, des modifications des récepteurs de surface bactérienne, des mutations dans les phages eux-mêmes, ainsi que l'activation de mécanismes de défense bactériens contre l'infection par les phages. Certains phages peuvent également cibler les débris bactériens.

Bien que l'adsorption des phages sur ce type de papier mette en évidence un potentiel antibactérien intéressant, il convient de souligner que cette méthode d'analyse quantitative présente des limites significatives, notamment lorsque les essais sont réalisés à des faibles concentrations bactériennes telles que 10^4 CFU/ml.

4.3.2.1.2 Variation de la concentration de phages

Dans la continuité de l'objectif 2, nous avons évalué l'effet de la concentration en phages sur l'activité antibactérienne des supports, à densité bactérienne constante (10^9 CFU/ml). Une expérience a été menée en utilisant des papiers de base 50K modifiés avec différentes

concentrations de phages (10^{11} , 10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 et 10^5 PFU/ml). La Figure 4.28 regroupe les résultats de quelques concentrations.

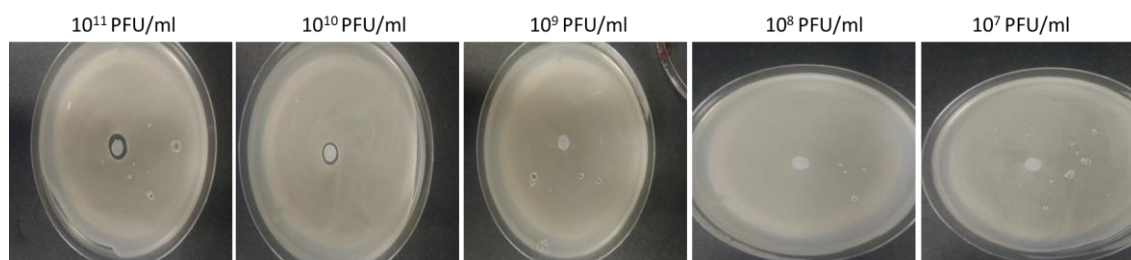


Figure 4.28 Zone de lyse des papiers 50K traités avec des concentrations de phages (10^{11} , 10^{10} , 10^9 , 10^8 et 10^7 PFU/ml) après 24 heures d'incubation.

Les résultats expérimentaux ont mis en évidence une activité antibactérienne notable pour les concentrations de 10^{11} PFU/ml et 10^{10} PFU/ml. En revanche, pour des concentrations inférieures à 10^9 PFU/ml, l'identification des zones de lyse s'est révélée difficile, ce qui a compliqué le traitement d'image. Dans le cadre du test semi-solide ultérieur, seule la concentration de phages permettant une analyse quantitative fiable de la zone de lyse a été retenue.

4.3.2.2 Influence des propriétés physiques des papiers sur leur activité antibactérienne à concentration phages-bactéries et MOI fixes

Afin d'affiner la compréhension des modalités d'application des bactériophages sur différents papiers (objectif 2 de la thèse), il est essentiel d'examiner les effets combinés de la concentration bactéries-phages et du MOI fixes en fonction des propriétés physiques variables des papiers de base et des papiers fabriqués, notamment le grammage et l'épaisseur sur leurs propriétés antibactériennes. Pour approfondir la compréhension de l'impact du support sur l'efficacité antibactérienne, l'utilisation de papiers présentant un grammage contrôlé a été entreprise. Ces paramètres, en maintenant la quantité de phages constante, influencent les propriétés antibactériennes.

Les papiers de base (30K et 50K) et les formettes standards de différents grammages (30F, 50F, 90F et 130F) ont été découpés en petits disques de 6 mm de diamètre, puis stérilisés sous UV des deux côtés. Une goutte de phages de 20 μ l avec une concentration de

10^{11} PFU/ml (7×10^9 PFU/cm²) a été déposée sur chaque papier, puis laissée sécher pendant 15 minutes à température ambiante (25°C). Pour chaque variété de papier, trois échantillons traités avec des phages ont été placés sur une culture bactérienne à une concentration de 10^9 CFU/ml et incubées pendant 24 heures à 30°C. Une goutte de phages de 20 µl a été déposée au centre de la boîte de Pétri, tandis qu'un échantillon de papier non traité par les phages a été placé en tant que témoin. Cette approche expérimentale visait à évaluer la capacité de chaque type de papier, traité par les phages, à lyser les bactéries, tout en permettant une comparaison directe avec les témoins. Cette expérience a été répétée trois fois afin de garantir la reproductibilité des résultats.

Avant d'évaluer l'activité antibactérienne des papiers traités, des observations morphologiques ont été réalisées par MEB afin de vérifier l'effet du dépôt de phages sur la structure des papiers de base. La Figure 4.29 présente les images obtenues pour les papiers 30K et 50K après application des phages.

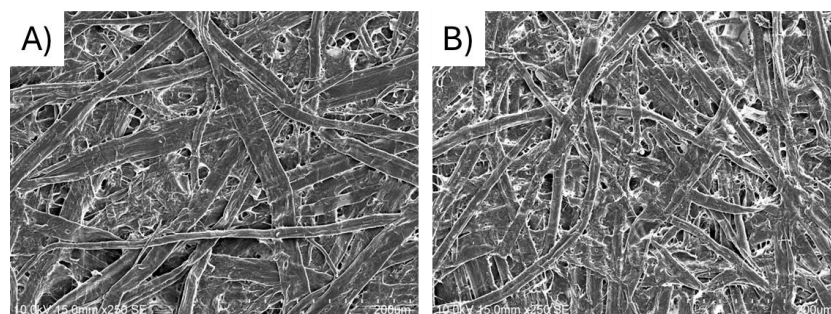


Figure 4.29 Images obtenues par microscopie électronique à balayage (MEB, 10,0 kV, $\times 250$) illustrant la morphologie des papiers de base après dépôt de phages : (A) 30K + phages et (B) 50K + phages.

Les surfaces observées montrent une morphologie globalement similaire à celle des papiers témoins, sans apparition d'agrégats distincts ni de modification visible du réseau fibreux. Aucune structure virale n'a pu être identifiée, ce qui est attendu compte tenu de la taille nanométrique des phages, inférieure à la résolution du MEB utilisé. Ces observations confirment que le traitement par les phages n'altère pas la topographie du support, maintenant l'intégrité physique du matériau.

La Figure 4.30 présente les résultats d'infectivité pour les différents types de papier après l'incubation.

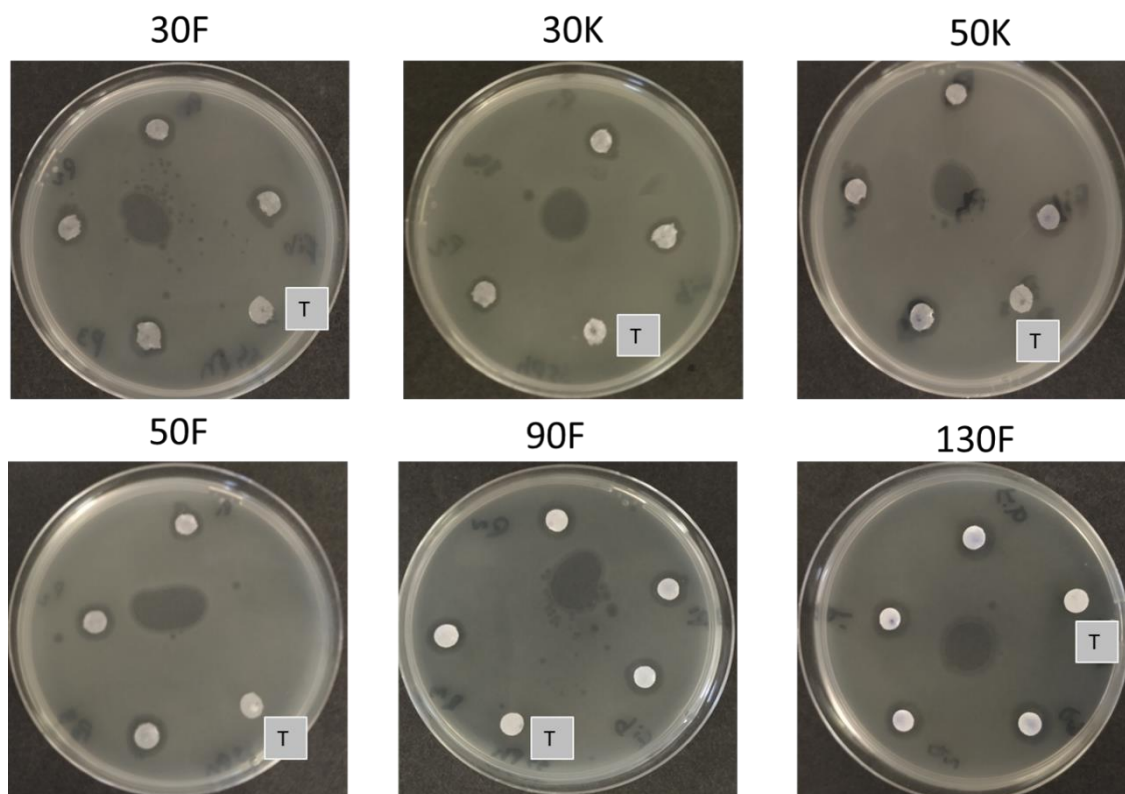


Figure 4.30 Zone de lyse de différents types de papiers. T = témoin (papier non traité). Les autres disques sont traités. Dépôt central : phages seuls.

Des zones de lyse ont été observées pour l'ensemble des échantillons de papier traités, indiquant une activité antibactérienne marquée. À l'inverse, aucune zone de lyse n'a été détectée autour des papiers témoins, ce qui confirme l'absence d'effet antibactérien du support non traité. À partir de ces images, l'aire de la zone de lyse a été mesurée par le logiciel d'analyse d'images (Adobe Photoshop CS3) (Figure 4.31).

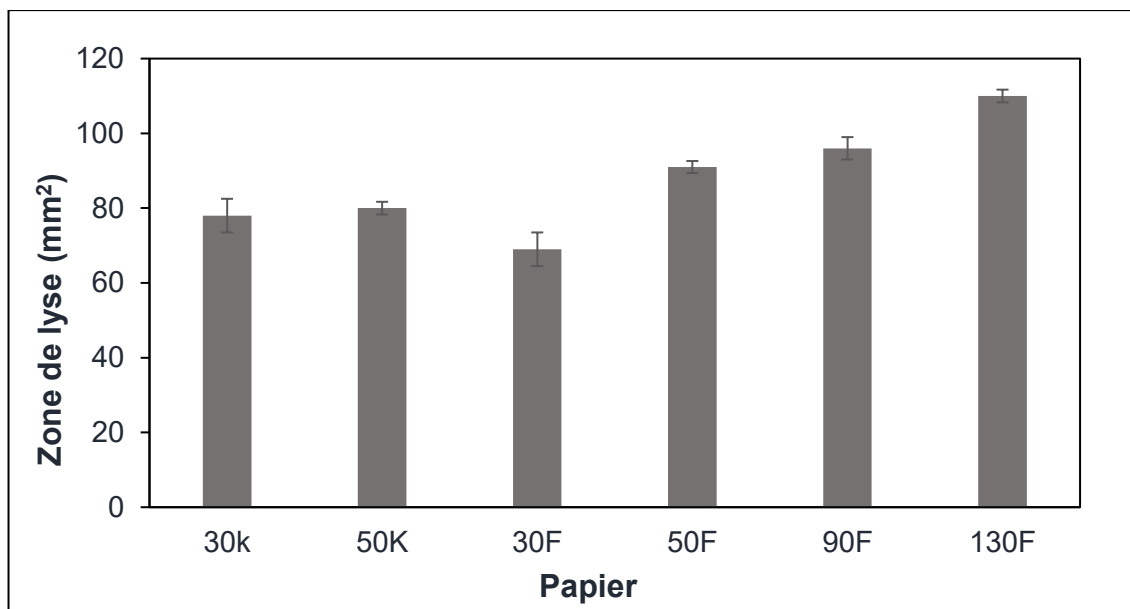


Figure 4.31 Zone de lyse des différents types de papier après une période d'incubation de 24 heures en présence d'une concentration bactérienne de 10^9 CFU/ml.

Les analyses quantitatives n'ont pas mis en évidence de différence significative d'activité antibactérienne entre les deux papiers de base. Cependant, pour les formettes standards, une tendance notable est apparue : une augmentation de l'aire de la zone de lyse a été observée proportionnellement à l'augmentation du grammage du papier. Cette tendance peut s'expliquer par le fait qu'un papier plus épais retient davantage d'humidité et peut protéger les phages plus longtemps avant de les relâcher. Il apparaît ainsi que l'eau présente dans la feuille joue un rôle de "réservoir" qui limite la dessiccation et favorise une libération progressive. Pour vérifier cette possibilité, la littérature scientifique a été consultée pour savoir comment l'humidité de stockage influence la viabilité des phages. Cette interprétation s'avère cohérente avec des travaux rapportant l'importance de l'humidité dans le papier pour la stabilité des phages [159]. À l'inverse, sur les papiers à caractère hydrophobe, 30K et 50K, un angle de contact élevé favorise l'adsorption des phages sur les fibres, diminuant leur disponibilité immédiate et retardant leur libération dans l'agar ; un comportement analogue a été mis en évidence sur des plastiques hydrophobes par Richter et al. [171]. Ces résultats mettent en évidence le rôle déterminant de l'architecture du support (grammage, épaisseur, état de surface) dans l'efficacité antibactérienne des matériaux papetiers, paramètres à intégrer dès la conception.

4.3.2.3 Activité antibactérienne des papiers de base traités avec des phages en milieu liquide

Afin de compléter l'évaluation des conditions d'application des bactériophages sur différents supports (objectif 2 de la thèse), l'activité antibactérienne des papiers de base traités avec des phages a été étudiée en milieu liquide. L'utilisation du lecteur de plaques a permis de suivre l'évolution de la population bactérienne et son inhibition par les phages sur deux types de papier de base au cours du temps. Cette approche permet une caractérisation plus précise des interactions phages-bactéries qu'avec le milieu semi-solide surtout pour les faibles concentrations phages-bactéries. Avant de procéder aux essais d'inhibition en milieu liquide, le temps nécessaire à la libération des phages à partir des papiers a été déterminé.

4.3.2.3.1 Temps de libération des phages

L'objectif principal de cette expérience est de déterminer le temps optimal nécessaire pour que les phages appliqués sur les papiers soient libérés dans une solution bactérienne, afin de maximiser leur concentration dans l'environnement. Les papiers, contenant une concentration initiale de 10^{11} PFU/ml de phages, ont été immergés dans une solution SM pendant différentes durées (10, 20, 30, 45 et 60 minutes). À la fin de chaque intervalle, le papier a été retiré et les phages libérés dans la solution ont été dénombrés. Des papiers distincts ont été utilisés pour chaque temps d'immersion, et l'ensemble des expériences a été réalisé en triplicata afin d'assurer la reproductibilité des résultats. La Figure 4.32 présente la concentration de phages libérés en fonction du temps d'immersion des papiers dans la solution SM.

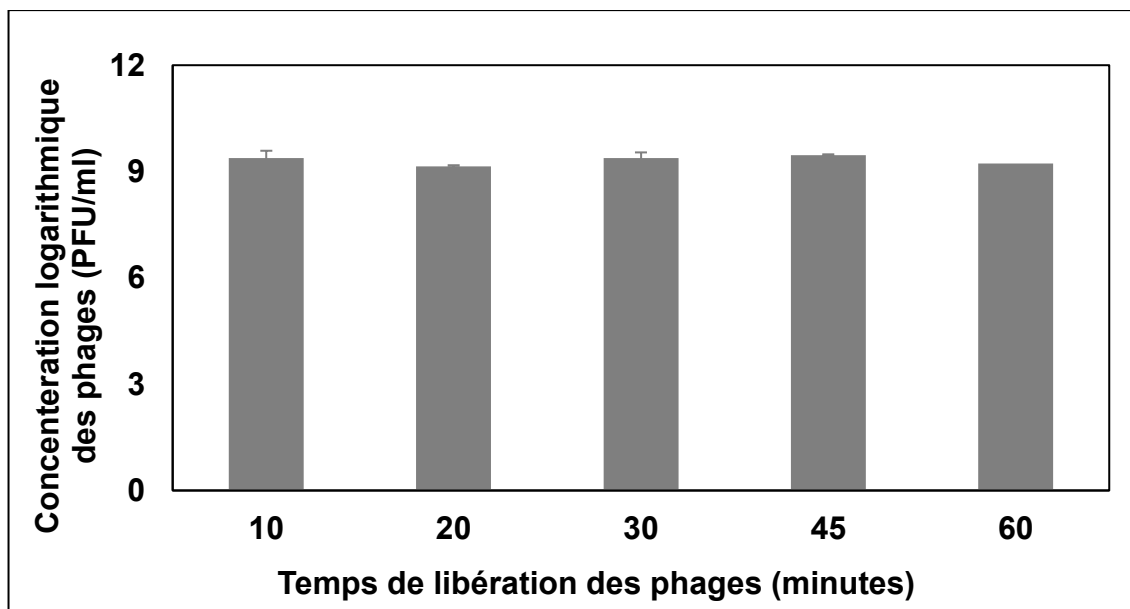


Figure 4.32. Concentration logarithmique des phages libérés par les papiers en fonction du temps d’immersion dans la solution SM.

Les analyses ont montré que la concentration des phages libérés reste globalement stable, autour de 10^9 PFU/ml, quel que soit le temps d’immersion des papiers. De légères variations ont été observées, avec une concentration légèrement plus élevée à 45 minutes ($\approx 9,46 \log_{10}$ PFU/ml) et plus faible à 20 et 60 minutes, mais ces différences restent trop faibles pour être considérées comme significatives. Le temps de 45 minutes a néanmoins été retenu comme condition optimale, car il permet d’assurer une libération maximale des phages tout en correspondant à la durée effective du protocole expérimental, offrant ainsi un compromis entre efficacité et applicabilité. Ces résultats révèlent toutefois que tous les phages ne sont pas entièrement libérés dans la solution, mais qu’une partie significative reste retenue à la surface et/ou dans la structure des papiers. Cette rétention partielle pourrait résulter d’interactions physico-chimiques avec les composants des papiers ainsi que des limitations de diffusion à travers leur structure poreuse. Cette observation souligne l’importance de prendre en compte cette rétention dans l’analyse des résultats expérimentaux et dans la conception de stratégies visant à optimiser la libération des phages pour des applications pratiques.

4.3.2.3.2 Évaluation de l'efficacité des papiers traités avec des solutions de phages à l'aide du lecteur de plaques

L'activité antibactérienne des papiers 30K et 50K traités avec les solutions de phages a été évaluée à l'aide du lecteur de plaques. Les essais ont été réalisés en utilisant les conditions expérimentales décrites dans le chapitre 3, incluant les concentrations bactériennes finales de 10^4 , 10^5 , 10^6 CFU/ml ainsi que les différentes concentrations de phages appliquées sur les disques de papier (10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} PFU/ml). Après l'application de 20 μ l des suspensions phagiques sur les disques et leur immersion dans les mélanges bactériens pendant la durée optimisée de 45 minutes, la croissance de *L. monocytogenes* a été suivie pendant 72 h par mesure de la densité optique à 600 nm. Les témoins négatifs et positifs, préparés comme décrit au chapitre 3, ont permis de valider l'absence de contamination et le bon fonctionnement du test. L'analyse en triplicata a permis d'assurer la reproductibilité des résultats. La Figure 4.33 présente les courbes de croissance, illustrant l'évolution de la densité optique d'une solution bactérienne initiale de 10^4 CFU/ml, en absence de papier traité aux phages (puits de référence) et en présence de papiers 30K traités avec différentes concentrations de phages.

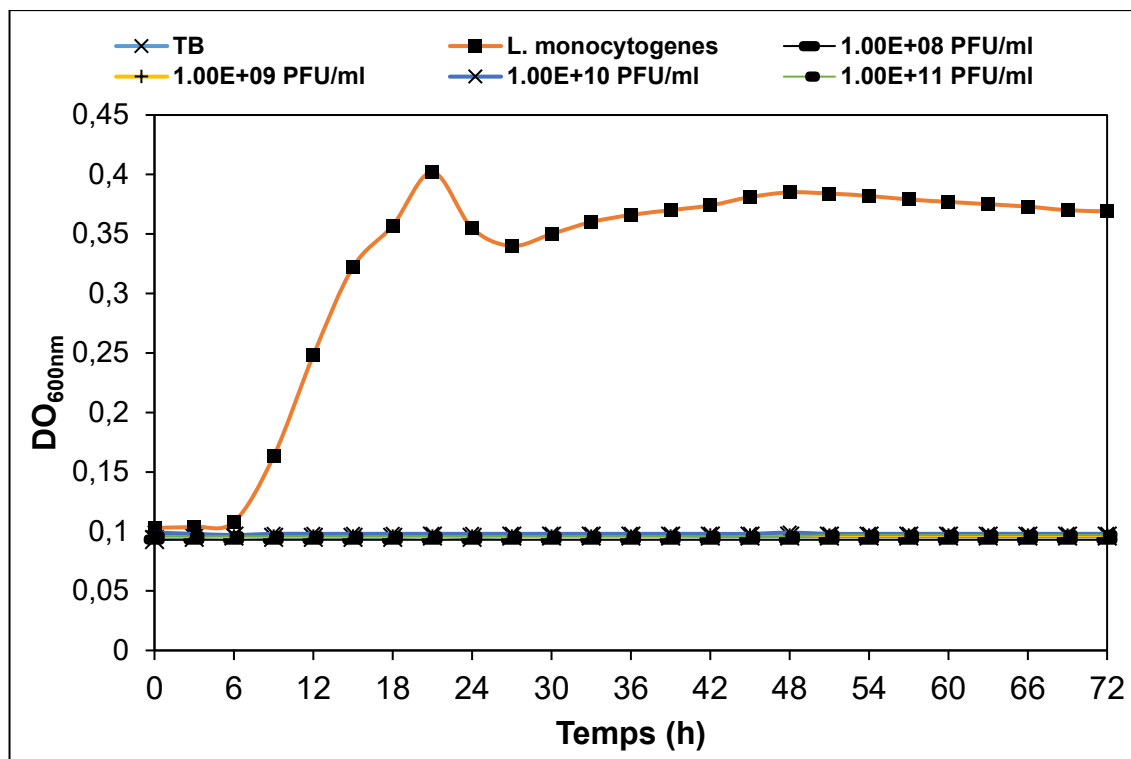


Figure 4.33 Croissance bactérienne de *L. monocytogenes* (concentration initiale 10^4 CFU/ml) sans et en présence de papiers (30K) traités avec différentes concentrations des phages (10^8 - 10^{11} PFU/ml).

Pour la croissance de la solution bactérienne de 10^4 CFU/ml, la phase latente a duré 6 heures, puis l'atteinte du plateau est observée après 21 heures (la phase exponentielle a duré 15 heures). L'apparition de la phase de déclin après 72 heures n'a pas été constatée. Tel qu'observé dans les interactions directes phages-bactéries en solution liquide, les conditions expérimentales favorisent la poursuite de la croissance sans qu'une diminution significative soit observée. Dans le cas des autres solutions bactériennes où les papiers traités avec différentes concentrations de phages ont été ajoutés, aucune phase de croissance n'a été observée, indépendamment de la concentration de phages. Cette absence de croissance est attribuée à l'élimination des bactéries.

À la fin de la période d'incubation (72 heures), un test de comptage a été réalisé pour évaluer les populations de bactéries. Comme observé auparavant, les résultats indiquent que la concentration bactérienne, dans les puits contenant des papiers traités avec des phages, est en deçà de la limite de détection de cette méthode (10 CFU/ml). En revanche,

dans les puits témoins sans phages, la concentration bactérienne atteint 10^9 CFU/ml après 72 heures. Cette comparaison suggère une réduction d'environ 8 log attribuable à l'action antibactérienne des papiers imprégnés de phages.

La Figure 4.34 présente les courbes de croissance, illustrant l'évolution de la densité optique d'une solution bactérienne initiale de 10^5 CFU/ml, en absence de papier traité aux phages (puits de référence) et en présence de papiers 30K traités avec différentes concentrations de phages.

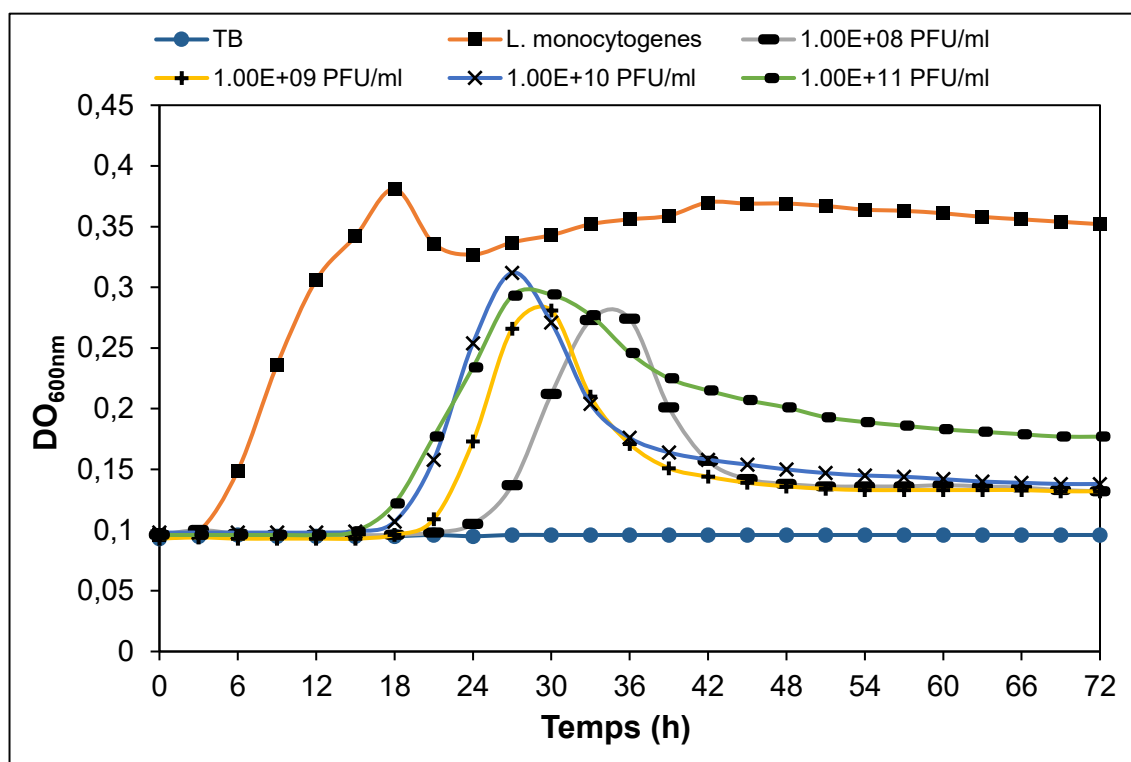


Figure 4.34 Croissance bactérienne de *L. monocytogenes* (concentration initiale 10^5 CFU/ml) sans et en présence des papiers (30K) traités avec différentes concentrations de phages (10^8 - 10^{11} PFU/ml).

Pour la croissance de la solution bactérienne de 10^5 CFU/ml, la phase latente a duré 3 heures. Puis l'atteinte du plateau est observée après 18 heures (la phase exponentielle a duré 15 heures). Aucune observation de l'apparition de la phase de déclin n'a été faite après 72 heures. Dans le cas des autres solutions bactériennes où les papiers traités avec différentes concentrations de phages ont été ajoutés, aucune augmentation de la densité optique

n'a été observée après 3 heures, ce qui indique une inhibition rapide de la croissance bactérienne. Ceci indique que les phages ont provoqué une réduction d'environ 8 log de la concentration bactérienne par rapport au témoin sans phages. Au fil de l'interaction, une augmentation de la densité optique a été observée dans tous les échantillons, indiquant une croissance bactérienne initiale. Cette augmentation a démarré plus rapidement dans les échantillons présentant des papiers avec les concentrations les plus élevées de phages (temps : $10^9 < 10^8 < 10^7 < 10^6$ PFU/ml). Cependant, malgré cette phase de croissance, aucune des courbes n'a atteint le plateau observé dans les échantillons témoins sans phages, suggérant une inhibition partielle de la croissance bactérienne. Par la suite, une diminution significative de la densité optique a été observée dans tous les échantillons, indiquant un déclin de la croissance bactérienne. Ce phénomène est semblable à celui observé lors des interactions directes phages-bactéries reflétant plutôt une cohabitation entre les phages et les bactéries résistantes. Il convient de souligner qu'aucun phénomène similaire n'a été observé dans le cas des interactions directes entre les phages et les bactéries pour une concentration bactérienne de 10^5 CFU/ml. Dans le cadre des expériences utilisant des papiers traités avec des phages, il est essentiel de prendre en compte la rétention des phages par le papier ainsi que leur libération dans le milieu.

La Figure 4.35 présente les courbes de croissance, illustrant l'évolution de la densité optique d'une solution bactérienne initiale de 10^6 CFU/ml, en absence de papier traité avec des phages (puits de référence) et en présence de papiers 30K traités avec différentes concentrations de phages.

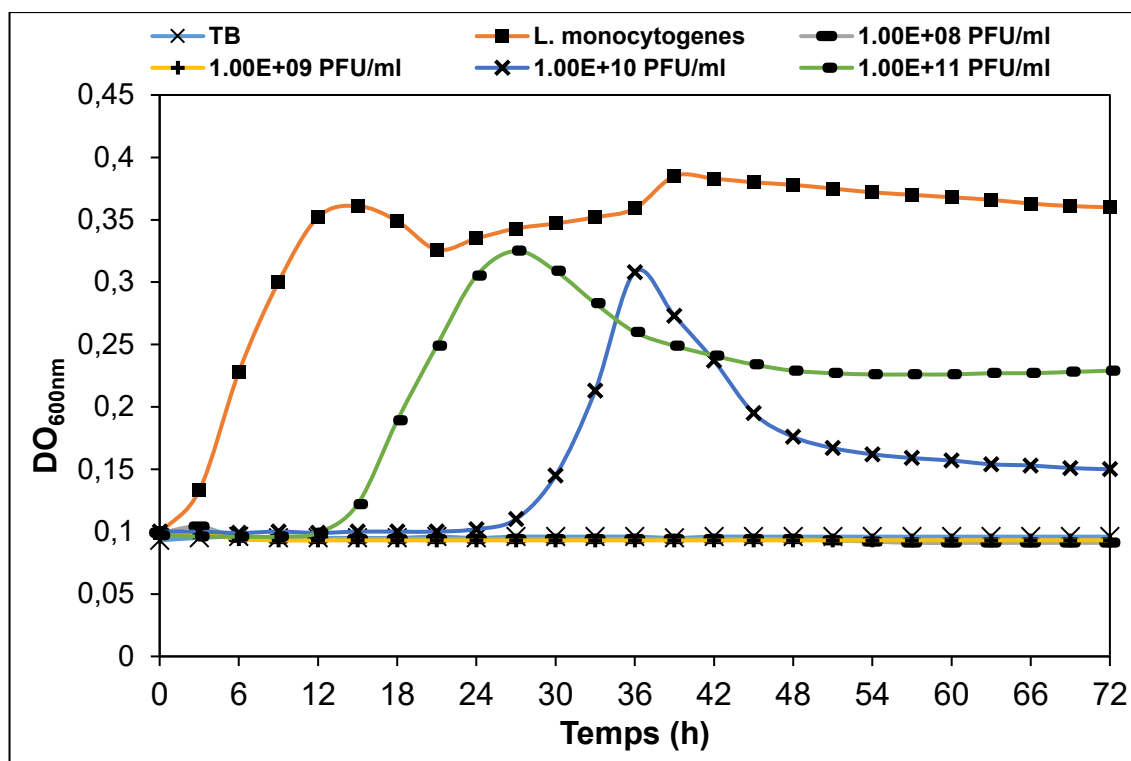


Figure 4.35 Croissance bactérienne de *L. monocytogenes* (concentration initiale 10^6 CFU/ml) sans et en présence des papiers (30K) modifiés à plusieurs concentrations de phages (10^8 - 10^{11} PFU/ml).

Les résultats mettent en évidence l'absence de phase de latence dans la solution exempte de phages. La stabilisation de la phase stationnaire est observée à partir de la quinzième heure. L'apparition de la phase de déclin après 72 heures n'a pas été constatée. Dans le cas des autres solutions bactériennes auxquelles des papiers traités avec différentes concentrations de phages ont été ajoutés, des résultats divergents ont été observés. Pour la solution où les papiers ont été traités avec une solution de phages d'une concentration de 10^9 PFU/ml, une inhibition totale des bactéries a été observée. Dans les puits contenant des papiers traités avec une concentration de 10^8 PFU/ml, l'apparition de bactéries résistantes et d'un stade de cohabitation phages-bactéries a commencé après 15 heures d'incubation. En ce qui concerne les papiers traités avec une solution de phages d'une concentration de 10^{10} PFU/ml, l'augmentation de la densité optique n'a débuté qu'après 27 heures. Dans les deux cas, aucune des courbes n'a atteint le plateau observé dans les échantillons témoins sans phage, suggérant une inhibition partielle de la croissance bactérienne. Par la

suite, une diminution de la densité optique a été observée, cette diminution étant plus prononcée pour la concentration de phages de 10^{10} PFU/ml.

La Figure 4.36 présente les courbes de croissance, illustrant l'évolution de la densité optique d'une solution bactérienne initiale de 10^4 CFU/ml, en absence de papier traité avec des phages (puits de référence) et en présence de papiers 50K traités avec différentes concentrations de phages.

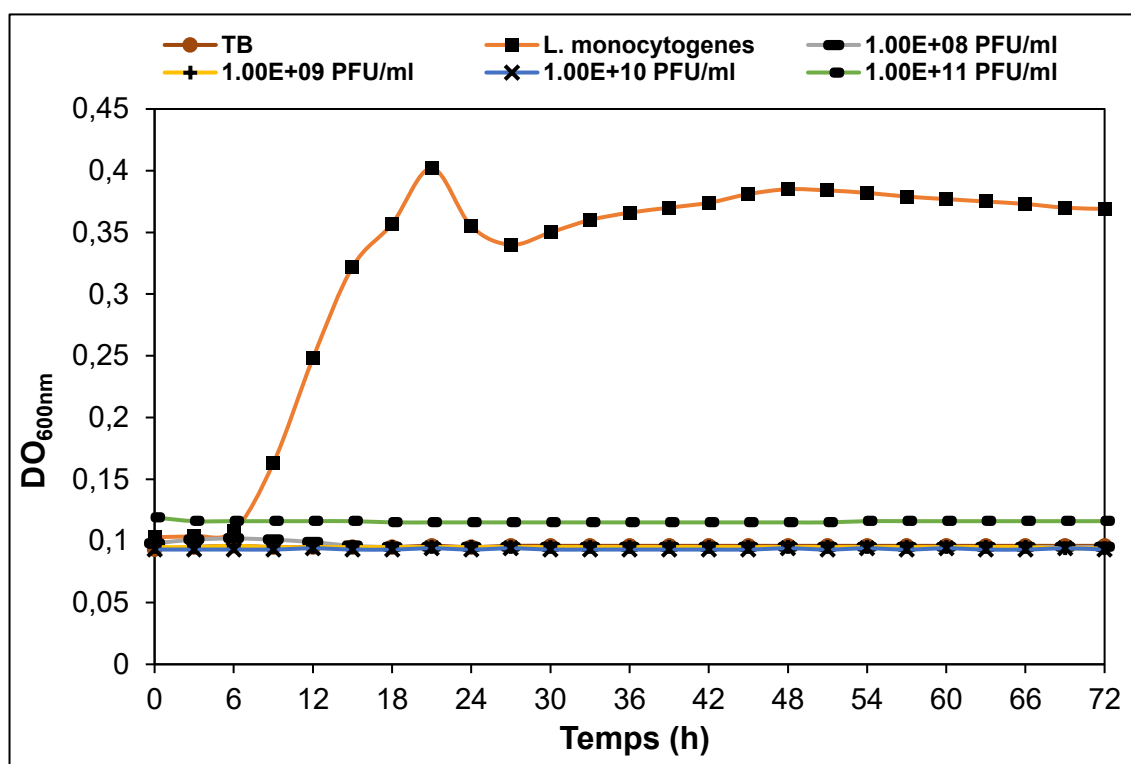


Figure 4.36 Croissance bactérienne de *L. monocytogenes* (concentration initiale 10^4 CFU/ml) sans et en présence des papiers (50K) modifiés à plusieurs concentrations de phages (10^8 - 10^{11} PFU/ml).

Les données obtenues révèlent des résultats similaires entre les papiers 50K et les papiers 30K, suggérant une cohérence dans le comportement de ces deux types de papier pour cette concentration bactérienne.

La Figure 4.37 présente les courbes de croissance, illustrant l'évolution de la densité optique d'une solution bactérienne initiale de 10^5 CFU/ml, en absence de papier traité aux

phages (puits de référence) et en présence de papiers 50K traités avec différentes concentrations de phages.

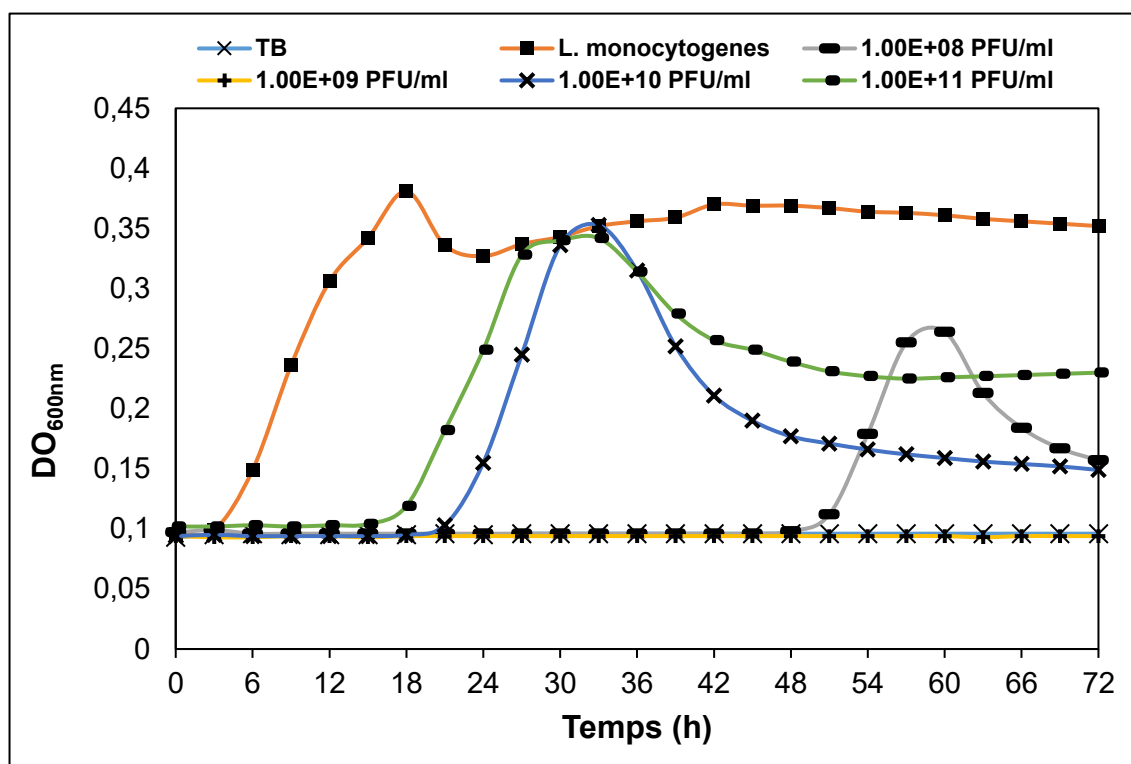


Figure 4.37 Croissance bactérienne de *L. monocytogenes* (concentration initiale 10^5 CFU/ml) sans et en présence des papiers (50K) modifiés à plusieurs concentrations de phages (10^8 - 10^{11} PFU/ml).

Les résultats obtenus avec les papiers 50K pour une concentration bactérienne de 10^5 CFU/ml démontrent que le moment initial d'augmentation de la densité optique est similaire à celui observé pour les papiers 30K dans les cas des papiers traités avec les deux concentrations de phages (10^{11} et 10^{10} PFU/ml). Cependant, l'augmentation de la densité optique a atteint l'intensité observée dans les puits des bactéries témoins. Par la suite, une diminution de la densité optique est observée, suggérant que les phages ont réussi à inhiber à nouveau la croissance bactérienne. Cependant, pour les deux autres concentrations (10^9 et 10^8 PFU/ml), une disparité est remarquée par rapport au comportement du papier 30K. En ce qui concerne la concentration de 10^9 PFU/ml, aucune augmentation de la densité optique n'a été observée. En revanche, pour la concentration de 10^8 PFU/ml, cette augmentation est constatée après 51 heures d'incubation.

La Figure 4.38 présente les courbes de croissance, illustrant l'évolution de la densité optique d'une solution bactérienne initiale de 10^6 CFU/ml, en absence de papier traité avec des phages (puits de référence) et en présence de papiers 50K traités avec différentes concentrations de phages.

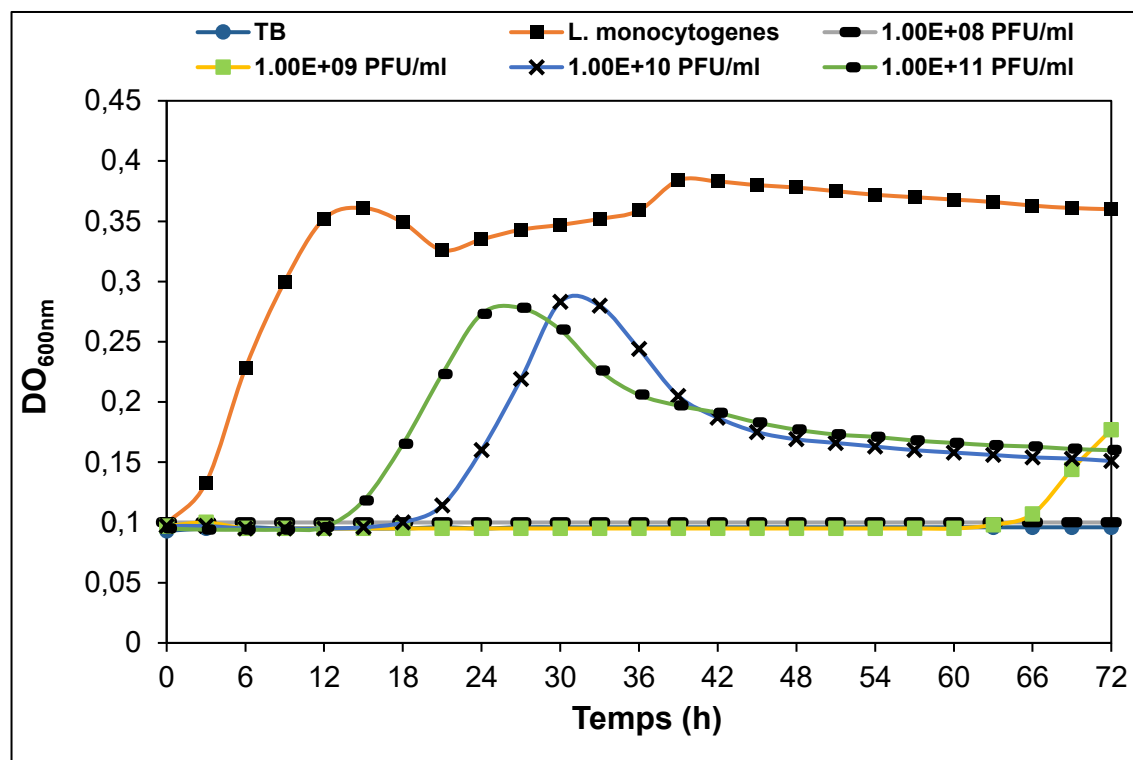


Figure 4.38 Croissance bactérienne de *L. monocytogenes* (concentration initiale 10^6 CFU/ml) sans et en présence des papiers (50K) modifiés à plusieurs concentrations de phages (10^8 - 10^{11} PFU/ml).

Pour la concentration bactérienne de 10^6 CFU/ml, les résultats obtenus avec les papiers 50K sont globalement comparables à ceux des papiers 30K, à l'exception de la condition à 10^9 PFU/ml, où une légère augmentation de la densité optique a été observée à partir de 66 heures d'incubation.

Une comparaison directe entre les deux types de papiers (30K et 50K) à une concentration constante de phages (ex. 10^9 PFU/ml) montre que, pour la faible concentration bactérienne (10^4 CFU/ml), les deux papiers entraînent une inhibition complète de la croissance bactérienne, indiquant une efficacité similaire. Pour les concentrations plus élevées (10^5 et

10^6 CFU/ml), une reprise transitoire de la densité optique est observée pour les deux papiers après environ 24 à 30 heures d'incubation. Ce phénomène, également constaté lors des interactions directes phages–bactéries en milieu liquide, peut être attribué à l'émergence de bactéries résistantes et ne dépend donc pas du support utilisé. Globalement, les papiers 30K et 50K présentent une efficacité antibactérienne comparable à cette concentration de phages, suggérant que la structure du papier influence surtout la cinétique de libération des phages plutôt que leur efficacité intrinsèque. En revanche, lorsque l'on compare ces résultats aux interactions directes phages-bactéries, sans support papier, une différence importante apparaît sur le plan cinétique. En milieu liquide, les phages sont immédiatement disponibles pour infecter les bactéries, alors que sur support papier, une fraction reste fixée ou piégée dans la matrice fibreuse, retardant leur diffusion dans le milieu. Les caractéristiques du papier jouent donc un rôle déterminant dans l'efficacité antibactérienne des phages, un aspect essentiel à considérer pour concevoir et optimiser les systèmes de délivrance.

4.3.2.3.3 Effet du temps de séchage sur l'activité antibactérienne des papiers de base

Cette partie porte sur l'effet de séchage des papiers traités avec les phages sur leur activité antibactérienne (objectif 4 de la thèse). Le but de cette expérience est d'évaluer l'activité antibactérienne des phages P100 appliqués sur du papier en contact avec *L. monocytogenes*, en étudiant l'effet du séchage et de l'entreposage sur cette activité au fil du temps, afin de déterminer la stabilité et l'efficacité des phages dans des conditions prolongées de conservation. Les tests ont été réalisés sur les papiers 50K afin d'évaluer de manière isolée l'effet du temps de séchage sur l'activité antibactérienne.

Les papiers de base 50K, traités avec une solution de phages (une goutte de 20 μ l, 10^{11} PFU/ml), ont été séchés à température ambiante pendant 2 heures, 6 heures, 24 heures, 1 semaine et 2 semaines afin d'évaluer l'effet du temps de séchage et de l'entreposage sur l'activité antibactérienne. Ces durées ont été choisies dans un but expérimental, pour simuler différentes conditions de conservation en laboratoire et déterminer la stabilité des phages au cours du temps. À des fins de comparaison, les papiers de base 30K, également traités de la même manière, ont été séchés pendant 2 heures et 6 heures.

Chaque puits contenait 160 μl de TB, de 20 μl de SM et de 20 μl d'une concentration bactérienne de 10^8 CFU/ml. Par la suite, les papiers séchés ont été ajoutés aux puits et laissés pendant 45 minutes avant d'être retirés. Les plaques ont été insérées dans le lecteur de plaques pour démarrer l'expérimentation conformément au protocole préalablement établi. Chaque échantillon et les témoins ont été analysés en triplicata. La Figure 4.39 regroupe les résultats de la variation de la densité optique en fonction du temps pour les différents papiers 50K traités avec des phages et séchés pendant un temps variable.

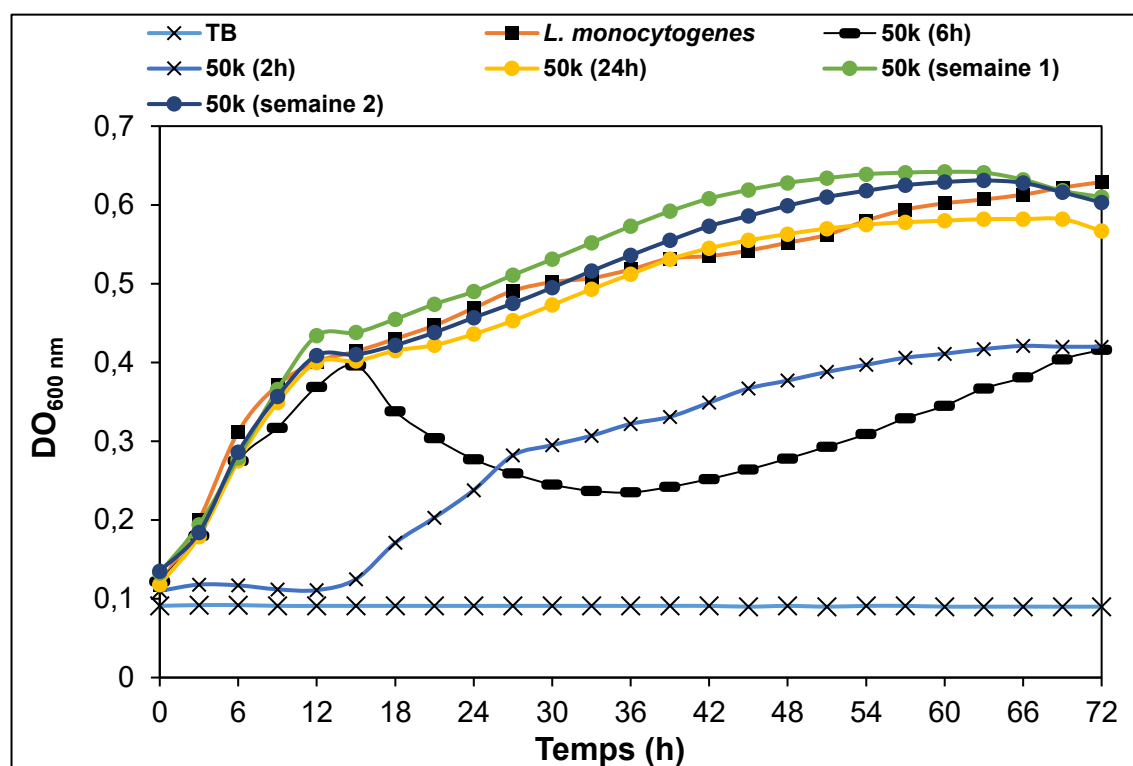


Figure 4.39 Croissance bactérienne de *L. monocytogenes* (10^8 CFU/ml) sur une période de 72 heures pour les papiers après des temps de séchage variés (2 heures, 6 heures, 24 heures, 1 et 2 semaines).

Les résultats obtenus indiquent que pour la souche témoin (10^8 CFU/ml) aucune phase latente n'a été observée, tandis que la phase de croissance exponentielle s'est prolongée sur une durée de 12 heures. Par ailleurs, les données acquises mettent en lumière un impact significatif du temps de séchage sur les propriétés antibactériennes des papiers. Lorsque les papiers sont soumis à un processus de séchage de deux heures, ils révèlent une capacité notable d'inhibition de la croissance bactérienne, suggérant ainsi que les phages appliqués

sur le substrat papier exercent une action antibactérienne efficace. Néanmoins, au-delà d'un intervalle de 15 heures d'interaction, l'émergence de souches bactériennes résistantes est constatée. Malgré cette prolifération, l'intensité de leur croissance ne se montre pas équivalente à celle observée chez les bactéries témoins, ce qui suggère que les papiers maintiennent une efficacité antibactérienne considérable.

Après un temps de séchage de 6 heures, une dynamique de croissance bactérienne parallèle à celle de la souche témoin a été observée jusqu'à 15 heures. Ce niveau maximal de croissance est similaire à celui de la souche témoin. Cependant, cette phase d'augmentation a été suivie par une diminution notable de la densité optique, indiquant l'effet inhibiteur des phages sur les bactéries. Il est important de souligner que, bien que cette réduction fut significative, elle n'a pas abouti à une inhibition complète des souches bactériennes. Cette observation suggère que le potentiel antibactérien des phages reste partiellement actif, même après six heures de séchage.

Pour les papiers séchés pendant 24 heures, une semaine ou deux semaines, aucune activité antibactérienne n'a été détectée. Pour tous les échantillons de papier, la densité optique a atteint un plateau, sans qu'aucune diminution soit constatée. Cette tendance indique que, au-delà d'un seuil de 6 heures de séchage, les propriétés antibactériennes des papiers traités avec les phages semblent se dissiper. Cette observation pourrait refléter une dégradation ou une inactivation des phages au fil du temps, suggérant une fenêtre temporelle optimale pour leur efficacité antibactérienne. Cette perte d'activité antibactérienne pourrait être liée à une dégradation ou une inactivation progressive des phages au cours du séchage. D'ailleurs Zhang et al. [172] ont montré que la stabilité des phages à l'état sec varie selon les conditions de séchage, ce qui confirme nos observations. Ainsi, un séchage prolongé pourrait effectivement compromettre la viabilité des phages appliqués sur le papier.

Une comparaison de l'effet du temps de séchage a été réalisée entre les papiers 30K et 50K. La Figure 4.40 montre les résultats obtenus.

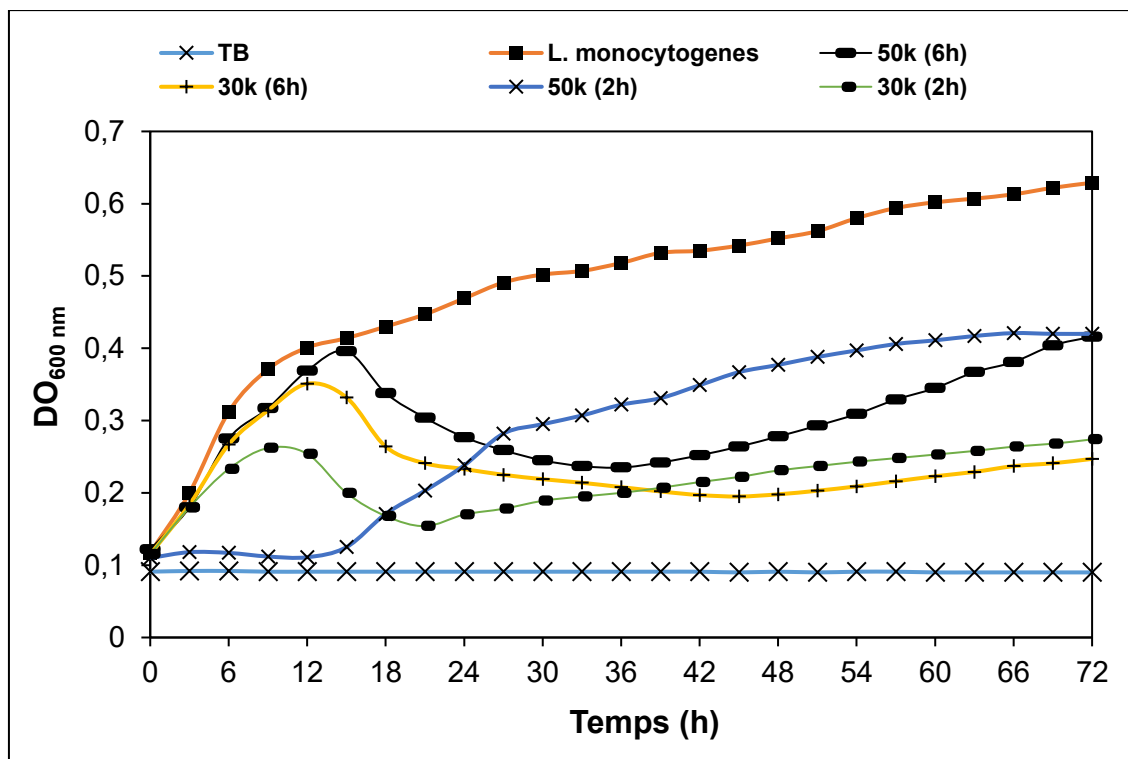


Figure 4.40 Croissance bactérienne de *L. monocytogenes* (10^8 CFU/ml) sur une période de 72 heures pour les deux papiers 30K et 50K après un temps de séchage de 2 heures et 6 heures.

L'analyse des résultats souligne clairement l'impact du temps de séchage sur la capacité antibactérienne des deux papiers traités avec les phages. Pour les papiers 30K, il apparaît que la période de séchage de 2 heures surpasse en efficacité celle de 6 heures. Avec un séchage prolongé de 6 heures, il a été observé que la densité optique suivait initialement la trajectoire de la courbe de croissance de la bactérie témoin, mais par la suite, une réduction a été constatée. Toutefois, cette décroissance n'a pas suffi pour obtenir une inhibition complète des bactéries, suggérant une activité antibactérienne partielle sous ces conditions spécifiques de séchage. Ces observations indiquent un bénéfice marginal en faveur du papier 50K, qui pourrait être attribué à la capacité de rétention d'humidité due à son grammage supérieur et à sa faible perméabilité à l'air. À l'inverse, le papier 30K, plus perméable, sèche plus rapidement, ce qui pourrait réduire la stabilité et l'efficacité des phages intégrés. Cette interprétation est cohérente avec la littérature, qui montre que la

rétenion d'humidité et les conditions de séchage influencent directement la viabilité des phages dans des matrices sèches [159, 172].

4.3.2.4 Effet de l'humidité et du temps d'entreposage sur la stabilité et l'activité antibactérienne des phages appliqués aux papiers de base

Cette partie porte sur l'effet de l'humidité et du temps d'entreposage sur l'activité antibactérienne des papiers traités avec les phages (objectif 4 de la thèse). Deux types de papiers de base 30K et 50K ont été utilisés. L'analyse s'est déroulée en deux phases distinctes : dans un premier temps, l'effet du temps et de l'humidité sur l'infectivité des phages a été étudié. Ensuite, l'évaluation de l'effet combiné de l'humidité et du temps d'entreposage sur l'activité antibactérienne des papiers a été réalisée.

4.3.2.4.1 Influence de l'humidité sur l'infectivité des phages

Tout d'abord, une expérience a été réalisée sur les papiers 30K et 50K traités avec des phages afin d'évaluer leur infectivité au fil du temps dans des conditions d'humidité variables. Pour ce test, des papiers ayant une quantité par cm^2 approximative de 7×10^9 PFU/ cm^2 ont été utilisés. Ce calcul repose sur le dépôt d'une goutte de 20 μl d'une solution de phages, à une concentration de 10^{11} PFU/ml, qui correspond à 2×10^9 PFU répartis sur la surface du disque de 6 mm de diamètre ($0,283 \text{ cm}^2$). Les échantillons ont ensuite été exposés à trois niveaux d'humidité : 30 %, 50 % et 80 %. L'humidité de 30 % a été maintenue sous la hotte. Pour obtenir une humidité de 50 %, les papiers ont été stockés dans une chambre à humidité contrôlée. Une humidité de 80 % a été atteinte en plaçant les papiers dans une enceinte contenant une solution saturée de KCl, maintenant ainsi une humidité relative de 80 %. Les échantillons ont ensuite été soumis à ces conditions d'humidité pendant des périodes prédéfinies : 0 jour, 1 jour, 7 jours, 14 jours, 21 jours et 28 jours. Après chaque intervalle de temps, les papiers ont été immergés dans une solution tampon SM pendant 45 minutes pour libérer les phages. La concentration en phages a ensuite été déterminée à l'aide de la méthode de comptage par double couche agar, décrite précédemment. La Figure 4.41 et la Figure 4.42 présentent respectivement les données relatives à la concentration logarithmique des phages en fonction de l'humidité et du temps d'entreposage et pour les supports en papier 30K et 50K.

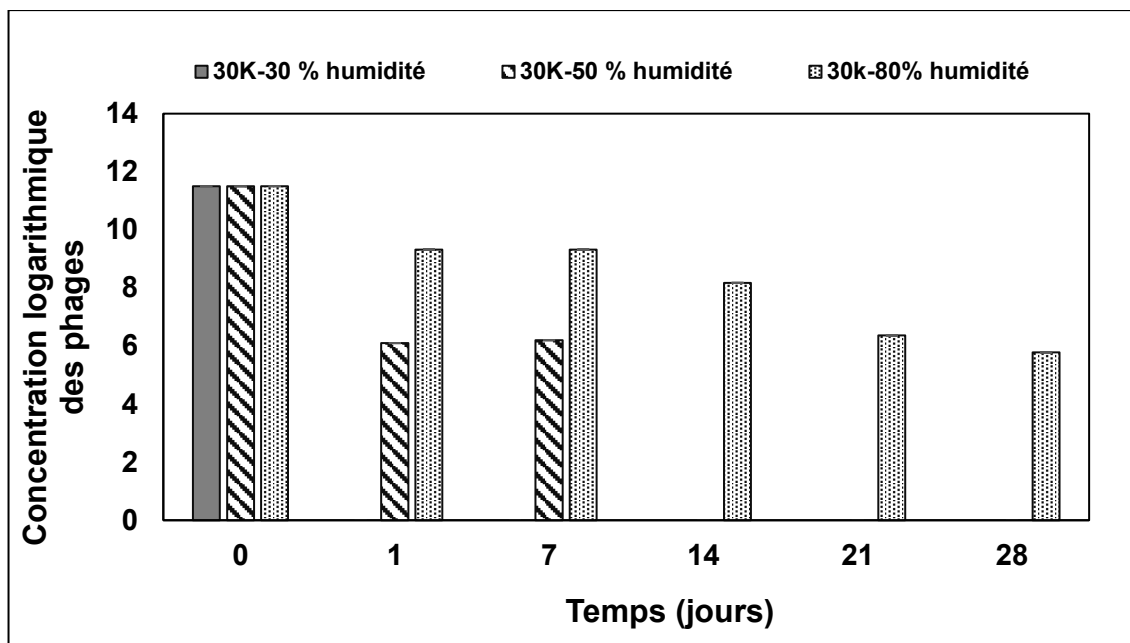


Figure 4.41 Évolution de la concentration logarithmique des phages sur un support en papier de type 30K, en fonction de l'humidité et du temps d'entreposage.

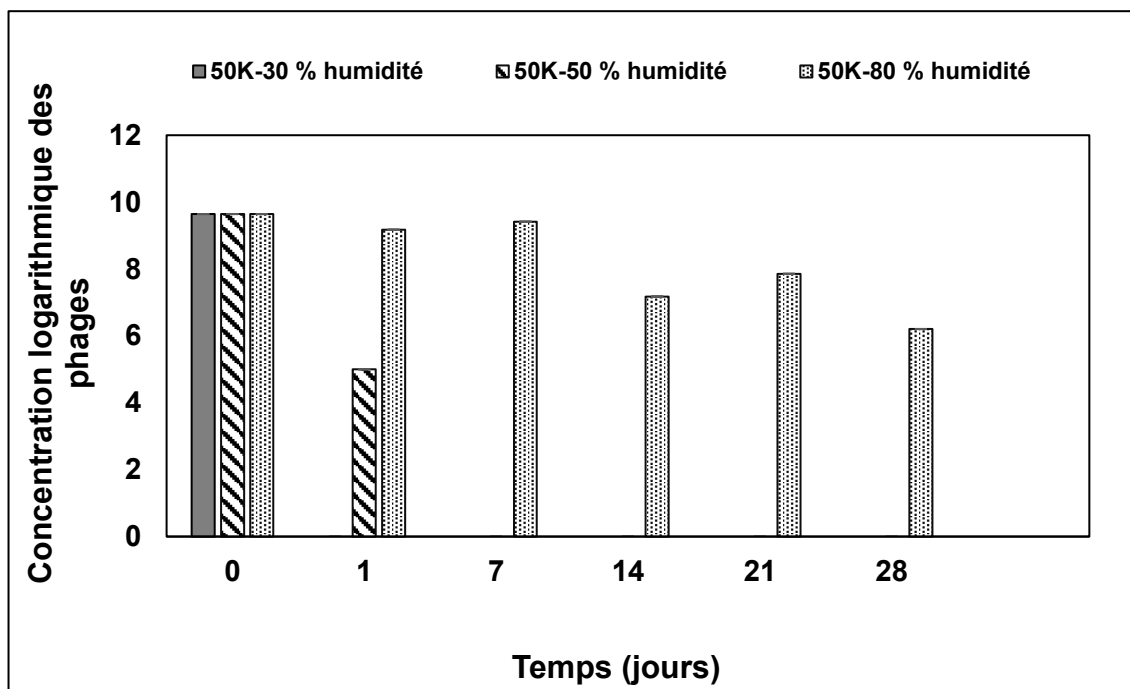


Figure 4.42 Évolution de la concentration logarithmique des phages sur un support en papier de base 50K, en fonction de l'humidité et du temps d'entreposage.

Initialement ($t=0$), quel que soit le niveau d'humidité, les papiers 30K libèrent une quantité plus importante de phages (11,5 log) dans la solution SM que les papiers 50K (9,6 log), entraînant une différence lors du comptage initial. Pour les deux types de papier, une diminution de l'infectivité des phages est observée à 30 % d'humidité pour les échantillons entreposés pendant un jour et jusqu'à 28 jours. À 50 % d'humidité, l'infectivité des phages diminue après un jour, passant à 6,1 log pour le papier 30K et à 5 log pour le papier 50K. Après sept jours, aucun phage infectieux n'a été détecté en solution à partir du papier 50K. En revanche, pour le papier 30K, une diminution progressive est observée, menant à une absence de phages détectables en solution après 14 jours. Toutefois, pour les deux papiers, ces résultats suggèrent soit une inactivation complète des particules, soit la présence de phages piégés dans la matrice, pouvant conserver une activité antibactérienne lors d'un contact direct avec des bactéries.

À 80 % d'humidité, l'infectivité des phages reste à un niveau de 5,7 log pour le papier 30K et de 6,2 log pour le papier 50K, aboutissant à une diminution à 5,8 log et 3,4 log, respectivement, après 28 jours d'entreposage. Ces résultats indiquent que l'humidité relative élevée favorise la conservation de l'infectivité des phages dans la matrice du papier. En effet, à 80 % d'humidité relative, la présence d'une fine couche d'eau adsorbée sur les fibres crée un microenvironnement humide qui limite la dénaturation des protéines de capsid et réduit la dessiccation des particules virales. À l'inverse, sous des humidités plus faibles (30 % ou 50 %), la perte d'eau dans la matrice papetière accélère l'inactivation des phages et la déstabilisation structurale. Ainsi, la stabilité observée à 80 % d'humidité relative chez les papiers 30K et 50K traduit principalement un effet protecteur de l'humidité ambiante, qui maintient les conditions favorables à la survie des phages au cours du temps.

En ce qui concerne l'effet du temps d'entreposage, l'infectivité des phages diminue progressivement avec le temps, passant de 11,5 log à 5,7 log pour le papier 30K et de 9,6 log à 6,2 log pour le papier 50K après 28 jours. Cette évolution traduit une perte partielle d'activité liée à l'entreposage, mais également une différence de comportement entre les deux papiers, possiblement attribuable à leurs propriétés physiques.

4.3.2.4.2 Activité antibactérienne des papiers traités avec des phages sur des géloses semi-solides

Les papiers 30K et 50K, traités par des phages, préalablement exposés à des conditions d'humidité et d'entreposage (0 à 28 jours), ont été déposés sur un tapis de *L. monocytogenes* (10^9 CFU/ml) et incubés à 30°C pendant 24 heures. Les résultats ont mis en évidence la formation des zones de lyse pour tous les papiers ayant libéré des phages dans la solution, ainsi que pour certains échantillons qui n'ont pas présenté de relargage de phages lors de la phase précédente. Les surfaces de ces zones de lyse ont été quantifiées. Les données sont présentées dans les Figure 4.43 et Figure 4.44, où les valeurs nulles indiquent l'absence de zone de lyse.

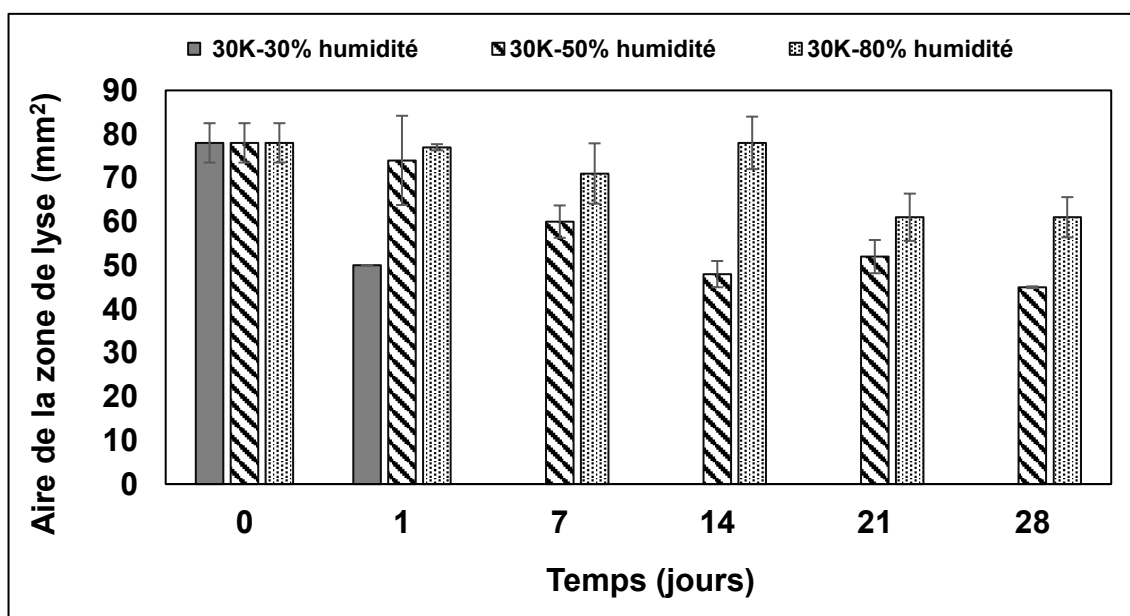


Figure 4.43 Aire de la zone de lyse de papiers de type 30K traités avec des phages en fonction de l'humidité et du temps.

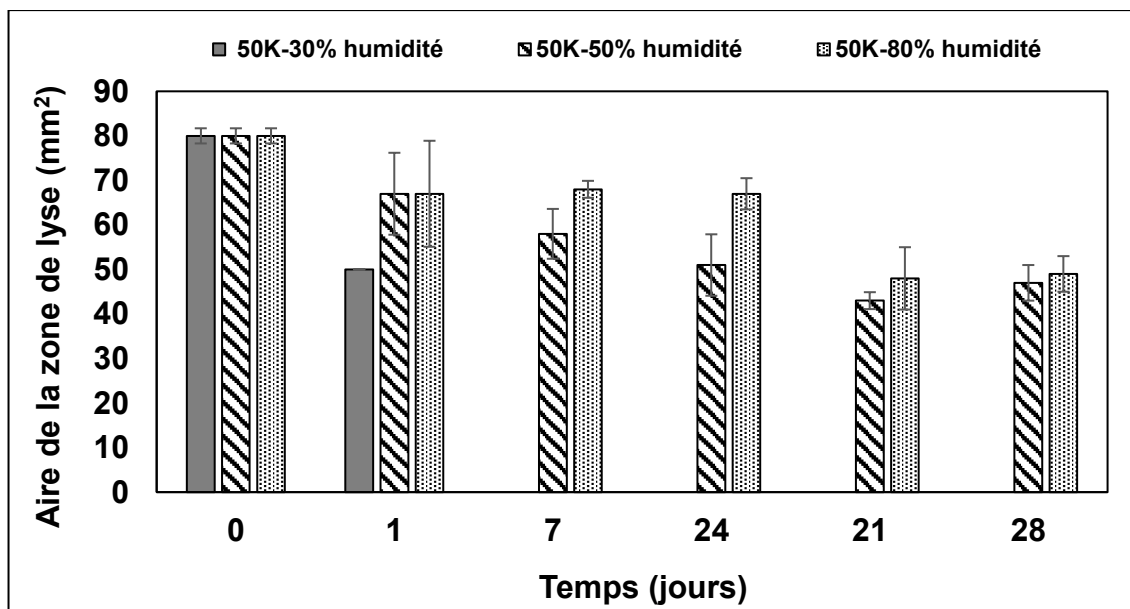


Figure 4.44 Aire de la zone de lyse de papiers de type 50K traités avec des phages en fonction de l'humidité et du temps.

Les résultats obtenus révèlent une corrélation entre l'aire de la zone de lyse et le taux d'humidité au fil du temps pour les deux papiers. Initialement, à $t=0$, les aires de la zone de lyse pour les papiers 30K et 50K sont comparables, indépendamment du taux d'humidité. Cela suggère une activité initiale similaire des deux papiers.

Après un jour, une légère corrélation apparaît entre l'humidité et l'aire de la zone de lyse pour les deux types de papiers, à travers les trois niveaux d'humidité testés. À 30 % d'humidité, où la libération des phages en solution n'a pas été détectée, l'aire de la zone de lyse est plus faible par rapport aux conditions d'humidité supérieures. Cependant, la présence d'une zone de lyse, même réduite, à 30 % d'humidité indique que certains phages demeurent actifs dans la matrice papetière et peuvent encore inhiber la croissance bactérienne. À 50 % et 80 % d'humidité, l'aire de la zone de lyse reste légèrement plus élevée, surtout pour le papier 30K, en cohérence avec une libération des phages observée dans ces conditions.

À l'issue de sept jours de stockage, ainsi qu'aux 14, 21 et 28 jours, des zones de lyse persistent pour les taux d'humidité de 50 % et 80 %, bien que leur taille tende à diminuer légèrement avec le temps. Cela suggère une activité antibactérienne encore mesurable

après plusieurs semaines, mais en déclin progressif. À taux d'humidité et durée d'entreposage équivalents, les deux papiers montrent une efficacité comparable.

Ces expériences conduites sur des substrats papetiers commerciaux ont mis en lumière l'importance des propriétés physico-chimiques des matériaux dans la conception de systèmes antibactériens efficaces, mettant ainsi en évidence le potentiel des papiers traités avec les phages en tant que vecteurs de phages pour l'inhibition de la croissance bactérienne. Par conséquent, une étude subséquente sera entreprise sur des papiers présentant des propriétés contrôlées, afin d'approfondir la compréhension de chaque paramètre impliqué.

4.3.3 Ajustement de la quantité effective des phages selon les types de papiers utilisés

Dans le cadre de l'étude des paramètres d'application des phages sur différents types de papiers et leurs influences sur leurs propriétés antibactériennes (objectif 2 de la thèse), il est essentiel d'ajuster la quantité de phages en fonction des types de papiers utilisés. Pour ce faire, la quantité de solution de phages appliquée sur les papiers est réduite, tout en maintenant une concentration appropriée. Cette quantité correspond à la capacité maximale d'absorption du papier, déterminée à partir de l'indice Cobb, utilisé ici comme référence pour ajuster le volume appliqué. Cette approche vise à évaluer l'efficacité antibactérienne des papiers tout en réduisant les coûts de production en minimisant l'utilisation de la solution de phages. L'objectif est également de déterminer si la réduction de la quantité de solution de phages influence la stabilité et la persistance de l'activité antibactérienne des papiers. Cela permettra de générer des données pertinentes pour l'optimisation de l'utilisation des phages comme agents antibactériens.

Une quantité contrôlée de solution de phages, avec une concentration de 10^{11} PFU/ml, a été déposée sur chaque substrat papier, en fonction de son volume d'absorption respectif déterminé par l'indice Cobb. Dans le cas des papiers de base et des substrats modifiés avec de l'AKD, le caractère hydrophobe de la surface limite la pénétration de la solution, contrairement aux substrats hydrophiles ("formettes standards" et "formettes standards calandrées"), où la solution est rapidement absorbée et répartie de manière plus homogène.

Sur les substrats hydrophobes, la solution reste confinée sous forme de gouttes sphériques, ne s'étendant que partiellement sur la surface. Pour garantir une dispersion uniforme, une intervention mécanique a été nécessaire. Pour favoriser une dispersion plus large, la goutte a été étalée manuellement à l'aide de la pipette, sans contrôle précis de la pression ou de la force appliquée, afin que la solution couvre le plus possible la surface. Sur les substrats hydrophiles, la solution s'est répartie uniformément par absorption naturelle. Par la suite, les résultats ont été présentés en fonction des variables analysées, à savoir le grammage, le calandrage et l'ajout d'AKD, dans le cadre d'une approche visant à évaluer leur impact sur les propriétés antibactériennes des papiers traités avec une faible quantité de solution de phages sur les papiers.

4.3.3.1 Influence du grammage selon le volume déterminé par l'indice Cobb

Les propriétés antibactériennes de différents papiers formettes standards ainsi que des deux papiers de base ont été analysées. Le volume utilisé pour chaque type de papier a été déterminé en fonction de sa capacité d'absorption, selon la valeur de l'indice Cobb. Le Tableau 4.4 présente les volumes de solution appliqués et les concentrations correspondantes de phages par unité de surface.

Tableau 4.4 Volume de phages utilisé et concentration de phages par cm² pour chaque type de papier (en fonction de la valeur Cobb).

Papier	Indice Cobb (g/m ²)	Volume (µl)	PFU/cm ²
30K	31	0,87	3,08x10 ⁸
50K	20	0,56	1,98x10 ⁸
30F	47	1,31	4,63x10 ⁸
50F	78	2,2	7,78x10 ⁸
90F	140	3,9	1,38x10 ⁹
130F	166	4,63	1,64x10 ⁹

Les résultats montrent que la quantité de phages appliquée dépend de la capacité d'absorption propre à chaque type de papier. Ainsi, plus le papier présente une surface hydrophile, plus il peut absorber des phages. En revanche, les papiers hydrophobes absorbent un volume plus faible. En comparaison avec le volume de 20 µl utilisé précédemment dans cette étude, l'ajustement selon l'indice Cobb permet de réduire la quantité de solution

nécessaire, avec des économies allant jusqu'à 35 fois pour les papiers de base et 15 fois pour les formettes standards. Par ailleurs, la variation du grammage des formettes standards offre une opportunité supplémentaire d'optimisation : une diminution du grammage de 130 g/m² à 30 g/m² entraîne une réduction de la quantité de phages d'environ 3,5 fois. Il convient toutefois de souligner que la comparaison entre des grammages très différents, tels que 130 g/m² (carton) et 30 g/m² (papier mince), doit être interprétée avec prudence, car il ne s'agit pas du même type de matériau papetier. Néanmoins, cette observation met en évidence le rôle du grammage dans le contrôle de la quantité de phages retenus et la nécessité d'adapter les propriétés du support à l'application visée.

Une goutte de phages (10^{11} PFU/ml) a été déposée sur chaque papier. Après un temps de séchage de 15 minutes, les papiers ont été placés sur une culture de *L. monocytogenes* à une concentration de 10^9 CFU/ml et incubés à 30°C pendant 24 et 48 heures. La Figure 4.45 présente les résultats obtenus à la suite de cette incubation.

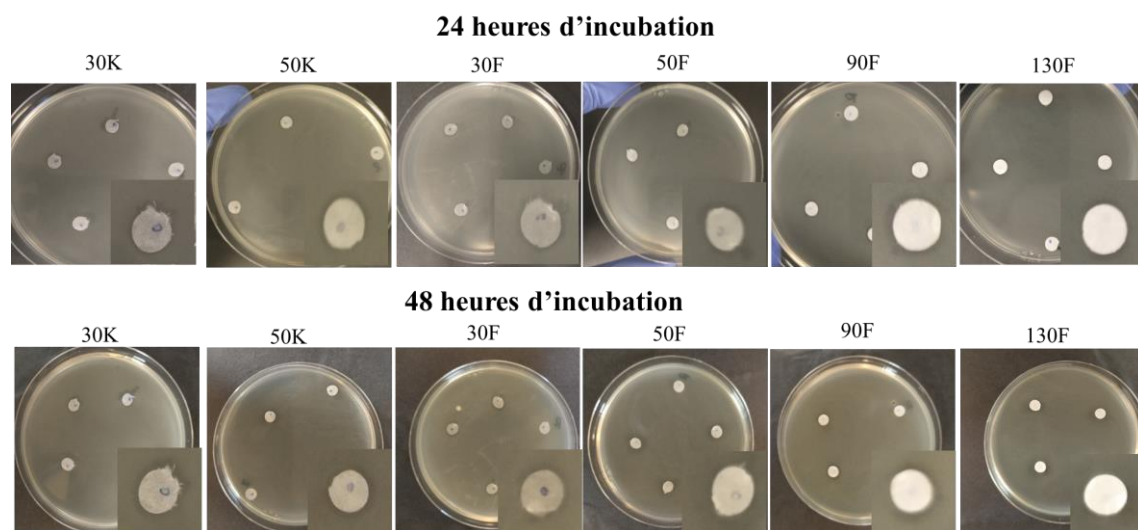


Figure 4.45 Activité antibactérienne pour différents types de papiers traités selon le volume de l'indice Cobb après 24 heures et 48 heures d'incubation (30°C). Concentrations appliquées (PFU/cm²) : 30K = $3,08 \times 10^8$; 50K = $1,98 \times 10^8$; 30F = $4,63 \times 10^8$; 50F = $7,78 \times 10^8$; 90F = $1,38 \times 10^9$; 130F = $1,64 \times 10^9$.

Les résultats montrent que l'ensemble des papiers traités avec les phages présente une activité antibactérienne visible, se traduisant par la formation de zones de lyse autour des

échantillons après 24 et 48 heures d'incubation. Toutefois, la réduction significative de la surface de ces zones, comparée à celle observée avec un volume de 20 μl de solution, met en évidence une corrélation entre la quantité de phages appliquée et l'intensité de l'activité antibactérienne observée. À partir de ces images, les aires de la zone de lyse ont été mesurées pour chaque papier après 24 heures. La Figure 4.46 regroupe les valeurs obtenues.

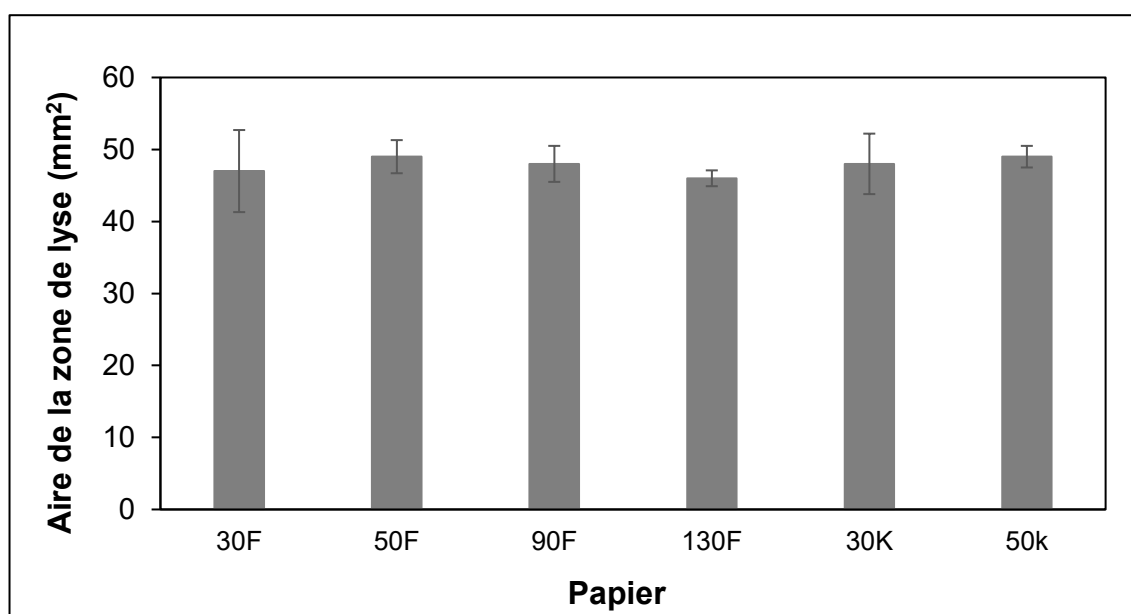


Figure 4.46 Zone de lyse, après 24 heures d'incubation, pour les formettes standards et les papiers de base traités avec des phages, ajustée en fonction du volume de l'indice Cobb.

Les mesures de la zone de lyse observées après 24 heures d'incubation révèlent des valeurs d'un ordre de grandeur comparable entre les différents types de papiers. Cependant, une analyse visuelle révèle une démarcation plus distincte de la zone de lyse pour les papiers à grammage élevé. Cette distinction est aussi observée après 48 heures d'incubation. Cette observation reflète une tendance attribuable à une quantité plus élevée de phages présents dans ces papiers, ainsi qu'à une éventuelle libération de phages pendant la période d'incubation. Les mesures de la zone de lyse observées après 24 heures d'incubation montrent des valeurs d'un ordre de grandeur comparable entre les différents types de papiers. Toutefois, une observation visuelle met en évidence une démarcation plus nette des zones de lyse pour les papiers à grammage élevé, une tendance également perceptible après 48

heures d'incubation. Cette différence pourrait s'expliquer par une rétention plus importante des phages lors du dépôt initial, favorisant une libération plus prolongée au cours de l'incubation.

Un test en milieu liquide, utilisant un lecteur de plaques, a été réalisé sur tous les papiers traités avec les phages selon leur indice Cobb. La Figure 4.47 illustre les résultats de la variation de la densité optique pour les différents papiers.

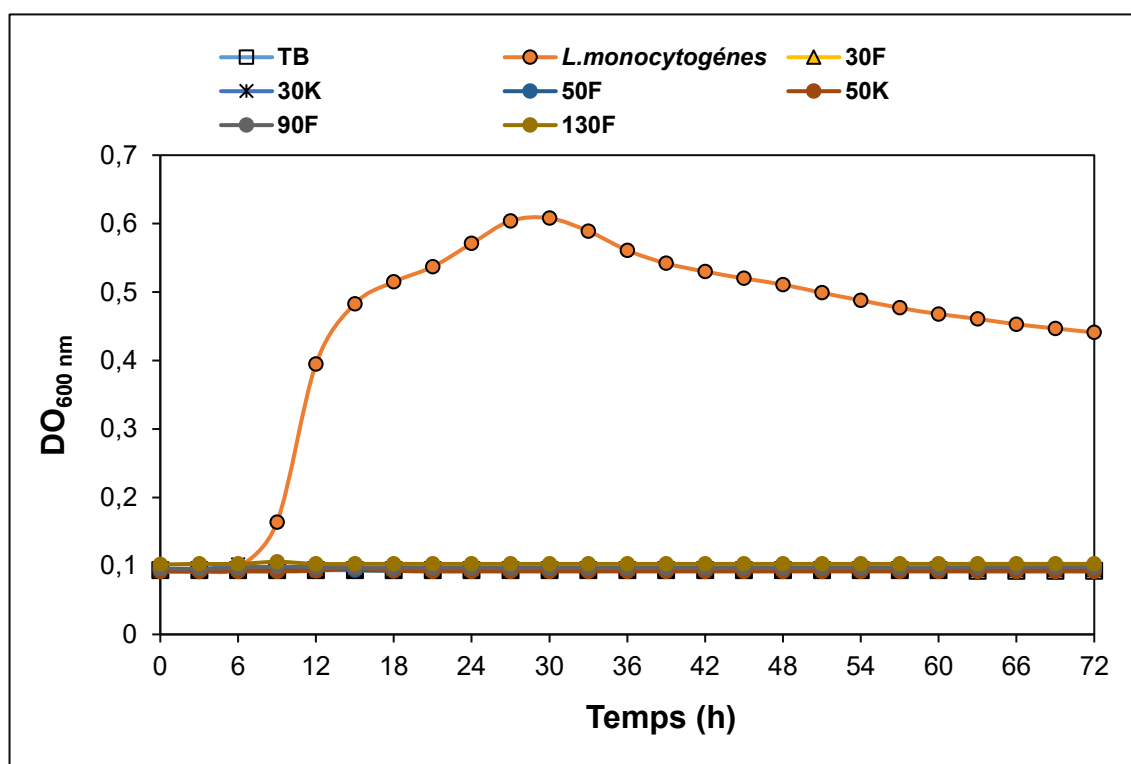


Figure 4.47 Croissance bactérienne de *L. monocytogenes* (concentration initiale 10^4 CFU/ml) en présence des papiers traités avec une quantité de phages selon le volume de l'indice Cobb.

Les résultats ont montré une phase de latence initiale de 6 heures, pendant laquelle la croissance bactérienne est relativement lente. Ensuite, une phase exponentielle s'est manifestée, caractérisée par une augmentation rapide de la densité optique au cours des 15 heures suivantes, atteignant un plateau à 21 heures. Les conditions expérimentales ont favorisé un environnement propice à la croissance bactérienne, sans signe évident de réduction significative. De manière significative, aucun des types de papier traité avec les

phages n'a montré de phase de croissance bactérienne, suggérant une inhibition totale des bactéries. De plus, aucun signe d'émergence de bactéries résistantes n'a été relevé pour les papiers traités selon l'indice Cobb. Ce résultat démontre l'intérêt de minimiser la quantité de phages.

À la fin de la période d'incubation (72 heures), un test de comptage a été réalisé pour évaluer les populations de bactéries. Comme observé auparavant, les résultats indiquent que la concentration bactérienne dans les puits contenant les papiers traités est inférieure à la limite de détection de cette méthode (10 CFU/ml). Pour établir un point de comparaison et quantifier l'efficacité du traitement, un contrôle sans phage a été réalisé dans les mêmes conditions : après 72 heures d'incubation, la concentration bactérienne atteint 10^9 CFU/ml, ce qui correspond à une réduction d'environ 8 log du nombre de bactéries. Cette réduction témoigne de l'efficacité de l'inhibition bactérienne induite par l'action des papiers traités avec les phages selon le volume déterminé par l'indice Cobb. Globalement, l'inhibition bactérienne estimée à 8 unités de réduction logarithmique souligne l'efficacité des substrats testés dans la réduction de la population bactérienne.

Afin de limiter l'apparition de bactéries résistantes et de réduire la quantité de phages, celle appliquée sur chaque substrat a été diminuée de moitié par rapport à la valeur déterminée à partir du volume de l'indice Cobb. Les échantillons ont ensuite été incubés pendant 24 et 48 heures, et les résultats correspondants sont présentés à la Figure 4.48.

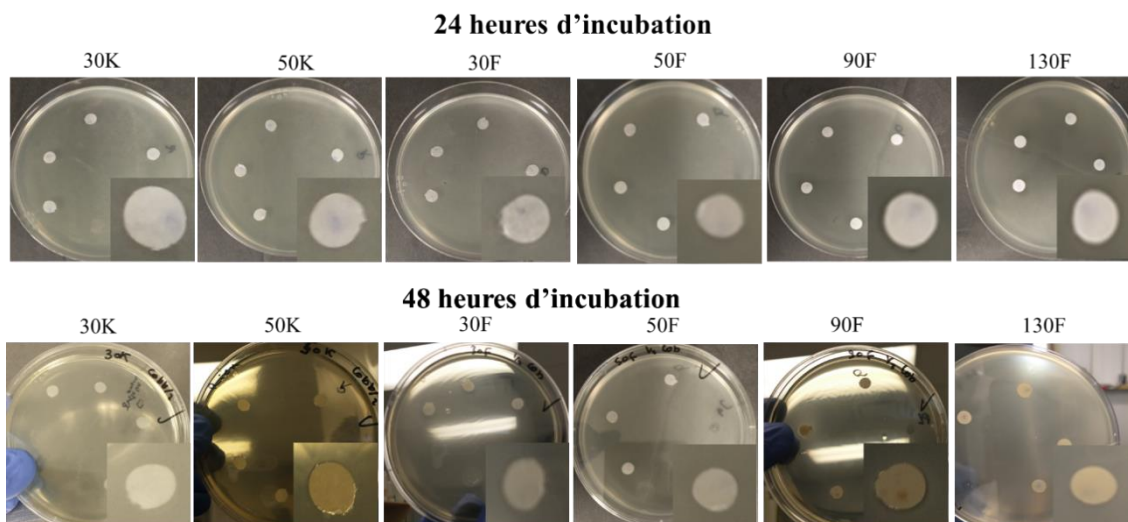


Figure 4.48 Activité antibactérienne pour différents types de papiers traités en fonction de la moitié du volume de l'indice Cobb après 24 heures et 48 heures d'incubation.

Les résultats de l'analyse démontrent la persistance de l'activité antibactérienne sur les échantillons de papier examinés, bien que l'observation visuelle présente parfois des difficultés. L'intensité de la zone de lyse observée est notablement diminuée par rapport à celles obtenues avec le volume de l'indice Cobb dans les observations précédentes. Une distinction est observée entre les formettes standards et les papiers de base, avec une détection plus difficile de la zone de lyse pour ces derniers. Par exemple, dans le cas du papier 50K, un papier sur trois révèle une zone facilement identifiable à l'œil, tandis que pour les formettes standards, un grammage élevé est associé à des zones de lyse plus marquées. La réduction de la quantité de phages sur les papiers de base, du fait de leur caractère hydrophobe, pourrait induire une distribution non uniforme des phages sur la surface du papier. La nature de cette méthode requiert que les phages soient présents sur la périphérie des papiers pour observer une zone de lyse, ce qui pourrait ne pas être le cas avec une faible quantité de phages. En revanche, pour les formettes standards, caractérisées par leur caractère hydrophile, la distribution des phages est plus homogène. À partir de ces images, les aires de la zone de lyse de chaque papier ont été mesurées. La Figure 4.49 regroupe les valeurs obtenues.

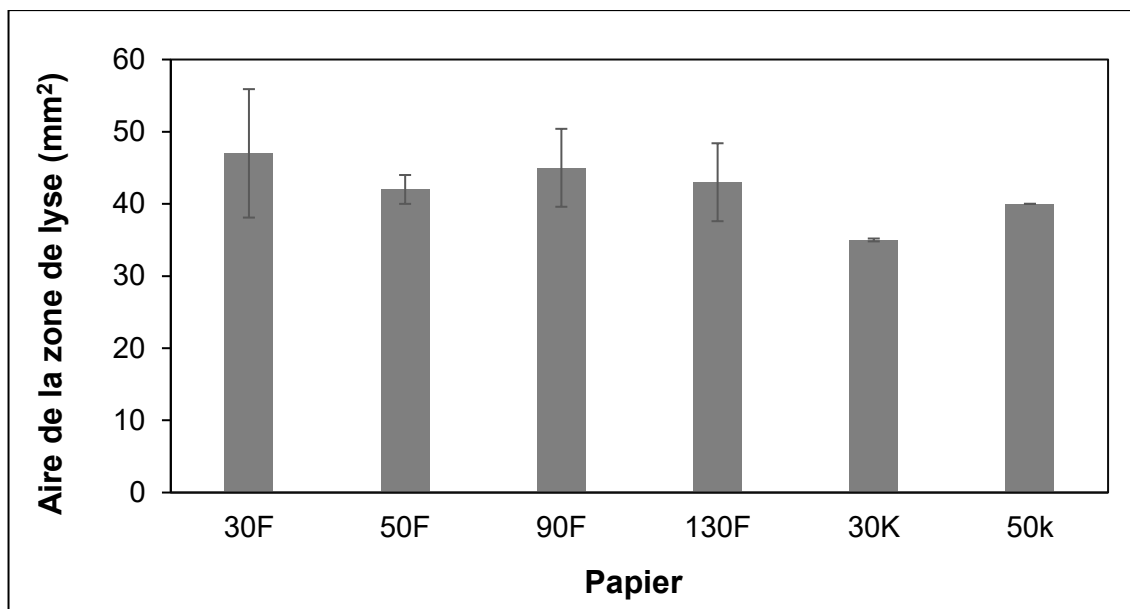


Figure 4.49 Zone de lyse, après 24 heures d'incubation, pour les formettes standards et les papiers de base traités avec des phages, ajustée en fonction du volume correspondant à la moitié de l'indice Cobb.

Les mesures de la zone observées après 24 heures d'incubation révèlent des valeurs d'un ordre de grandeur comparable, reflétant la persistance de l'activité antibactérienne sur les échantillons de papier. Cependant, il est à noter que ces valeurs sont légèrement inférieures à celles obtenues pour le volume de l'indice Cobb, à l'exception des papiers 30F où une similitude de grandeur est observée. Cela suggère que, pour le papier 30F, une quantité plus faible de phages permet d'obtenir une efficacité antibactérienne équivalente.

4.3.3.2 Influence du calandrage en milieu semi-solide

Afin d'évaluer l'impact de la modification des différentes propriétés des papiers sur l'activité antibactérienne des papiers traités avec les phages (objectif 3 de la thèse), les papiers ont été calandrés pour diminuer leur perméabilité à l'air. Pour confirmer l'effet du calandrage sur la morphologie du papier après dépôt de phages, des observations par MEB ont été réalisées sur le papier 50KCal après l'application de phages. La Figure 4.50 présente l'image du papier 50KCal après application des phages.

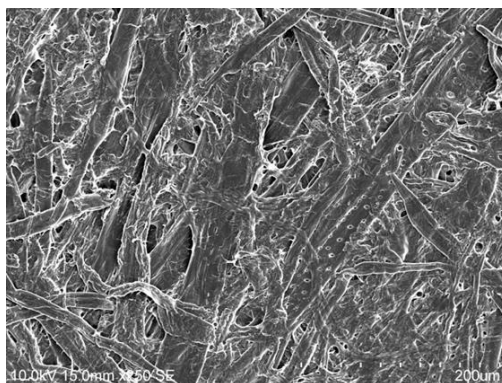


Figure 4.50 Image obtenue par microscopie électronique à balayage (MEB, 10,0 kV, $\times 250$) illustrant la morphologie du papier 50KCal après dépôt de phages.

Comme pour les papiers sans calandrage, aucune structure virale distincte n'est identifiable. De même, le dépôt de phages ne modifie pas la morphologie du papier.

L'effet du processus de calandrage sur les caractéristiques antibactériennes des papiers a été examiné en utilisant deux quantités de phages : une correspondant à l'indice Cobb du papier et une autre équivalant à la moitié de la capacité maximale d'absorption du papier (appelée moitié de l'indice Cobb). À cet effet, les papiers formettes standards calandrés ainsi que les papiers de base ont été analysés. La Figure 4.51 et la Figure 4.52 regroupent respectivement les résultats de l'activité antibactérienne après 24 heures et 48 heures pour les différents papiers calandrés et traités avec la quantité correspondante à l'indice Cobb et à la moitié de l'indice Cobb de chaque papier.

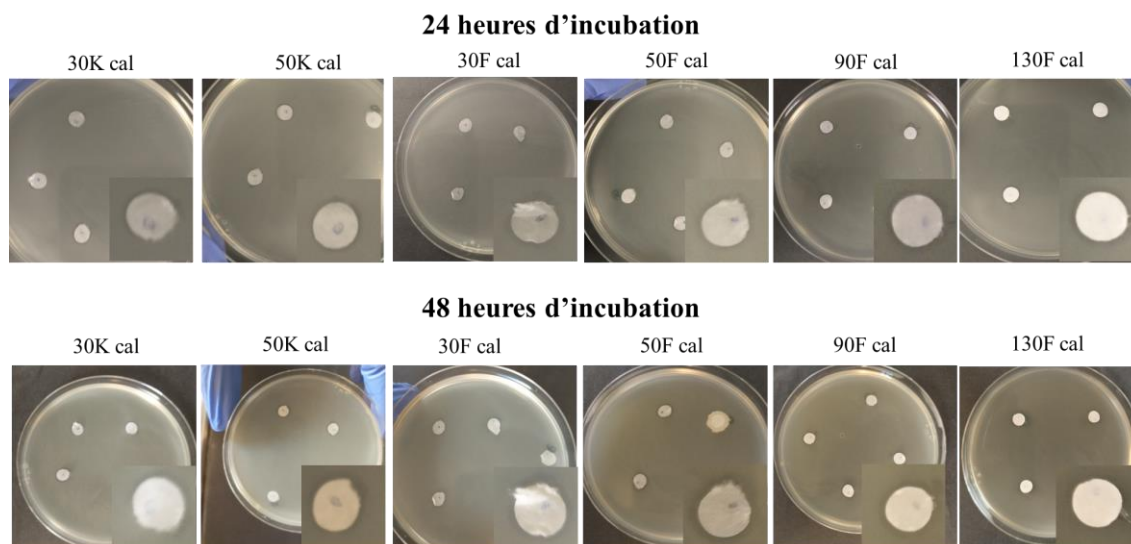


Figure 4.51 Activité antibactérienne des papiers calandrés traités avec des phages selon le volume déterminé par l'indice Cobb après 24 heures et 48 heures d'incubation.

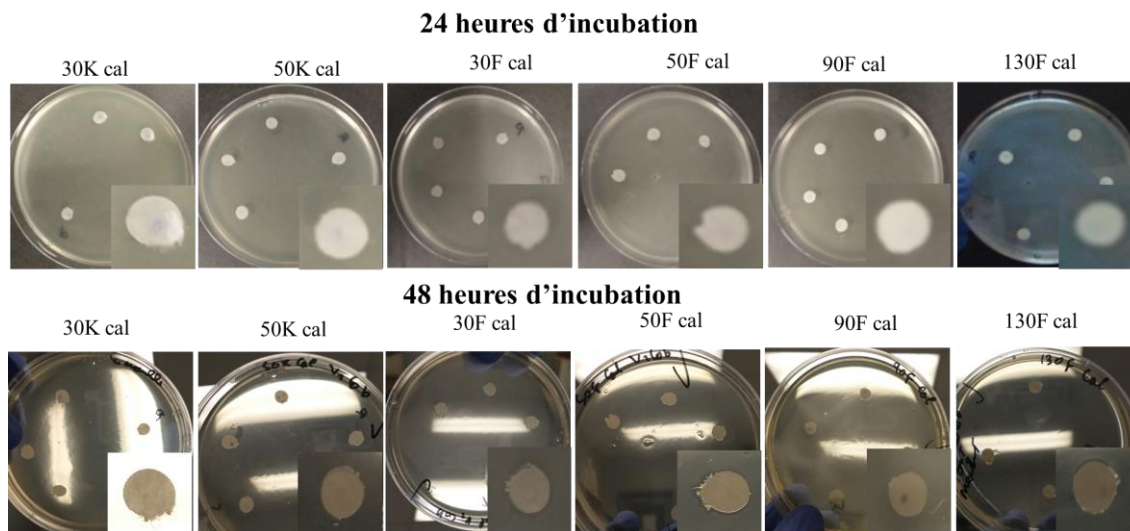


Figure 4.52 Activité antibactérienne pour les différents types de papier calandré traités avec des phages selon un volume de la moitié de l'indice Cobb après 24 heures et 48 heures d'incubation.

Dans les cas du volume équivalent au volume de l'indice Cobb, les résultats visuels n'ont pas révélé d'amélioration notable de la zone de lyse en comparaison avec les papiers non calandrés, que ce soit pour les échantillons formettes standards ou les papiers de base. Les aires de la zone de lyse ont été quantifiées pour chaque cas expérimental, et les résultats sont présentés dans les Figure 4.53 et Figure 4.54.

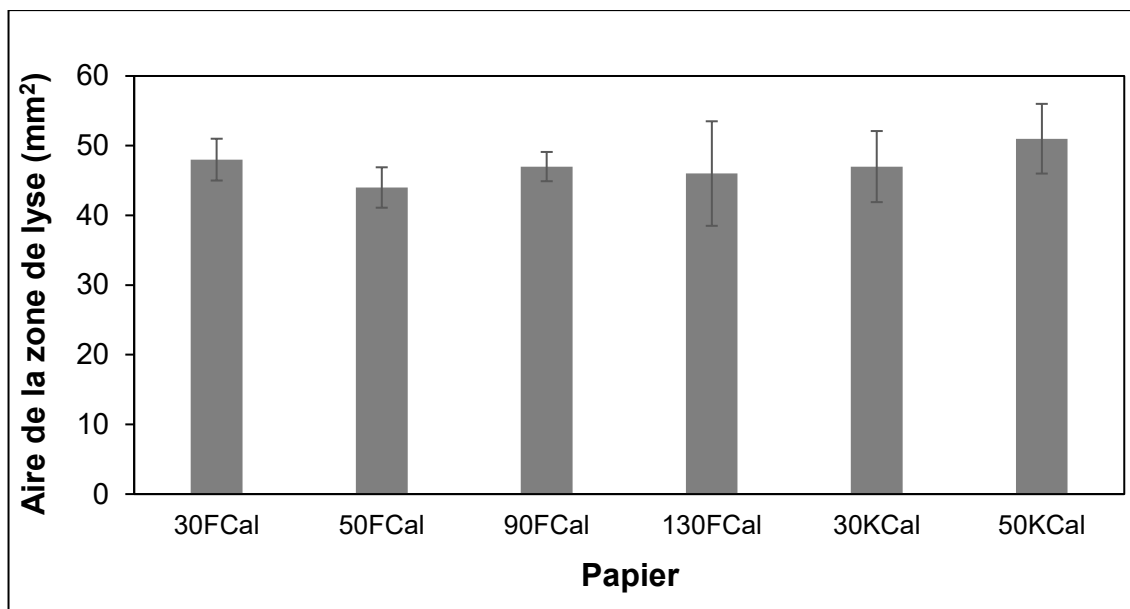


Figure 4.53 Zone de lyse, après 24 heures d'incubation, pour les formettes standards calandrées et les papiers de base calandrés traités avec des phages ajustés en fonction de volumes de l'indice Cobb.

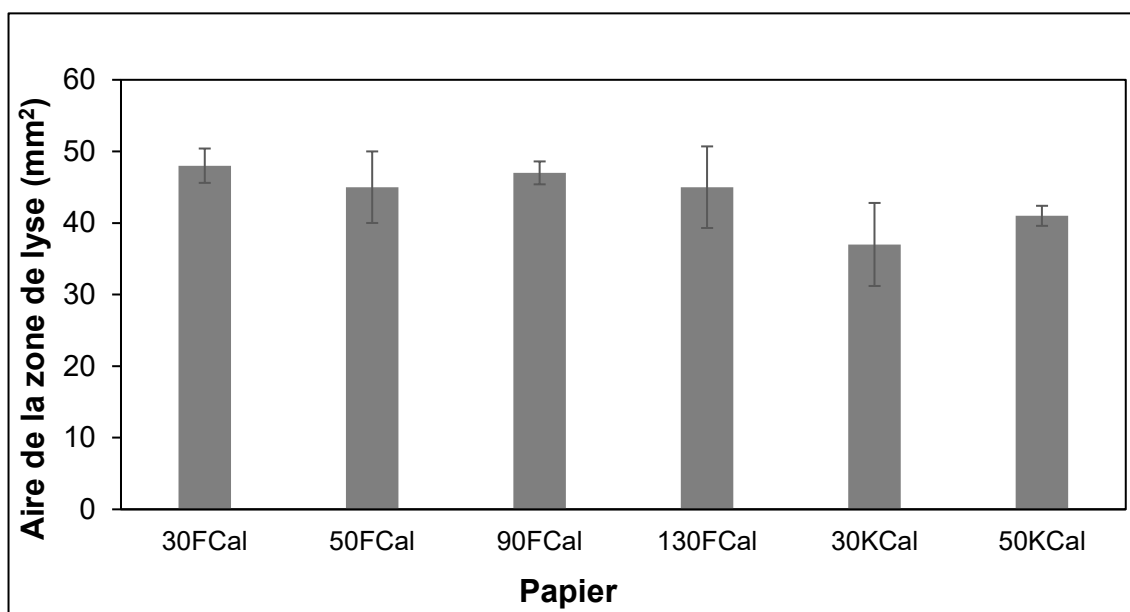


Figure 4.54 Zone de lyse, après 24 heures d'incubation, pour les formettes standards calandrées et les papiers de base calandrés traités avec des phages, ajustée en fonction de la moitié de l'indice Cobb.

Les analyses ont montré que, même avec une structure plus dense induite par le calandrage, les papiers n'ont pas présenté de différence notable dans leur capacité à inhiber la croissance bactérienne. En ce qui concerne le volume correspondant à la moitié de l'indice Cobb, les résultats ont confirmé cette tendance, bien que la quantité de phages soit réduite, l'activité antibactérienne est restée présente, avec des zones de lyse comparables à celles obtenues avec le volume complet. Toutefois, ces zones étaient moins prononcées. Cependant, le calandrage a permis de réduire légèrement la quantité de phages appliquée tout en maintenant une efficacité antibactérienne similaire, offrant ainsi un avantage en termes d'optimisation de leur utilisation.

4.3.3.3 Influence de l'AKD en milieu semi-solide

Toujours dans le but d'évaluer l'impact de la modification des différentes propriétés des papiers sur l'activité antibactérienne des papiers traités avec les phages (objectif 3 de la thèse), les papiers ont été modifiés avec de l'AKD afin de rendre leur surface hydrophobe. Cette modification permet d'obtenir des supports comparables aux papiers de base. L'effet de l'addition d'AKD sur les propriétés antibactériennes des papiers a été étudié en utilisant trois pourcentages d'AKD : 0,5 %, 1 % et 2 %. Pour chaque type de papier, deux quantités de solution phagique ont été appliquées :

- une correspondante à la valeur de l'indice Cobb mesurée pour chaque papier (variant de 15 à 27 g/m² selon le grammage et la concentration en AKD, voir Tableau 4.3),
- et une autre correspondant à la moitié de cette valeur (soit environ 7,5 à 13,5 g/m²).

L'augmentation de ce pourcentage a permis de produire des papiers présentant une hydrophobicité plus élevée, se traduisant par des valeurs d'indice Cobb plus faibles et donc une capacité d'absorption réduite. Les Figure 4.55, Figure 4.56 et Figure 4.57 présentent respectivement les résultats de l'activité antibactérienne après 24 heures et 48 heures pour les papiers contenant de l'AKD et traités avec la quantité correspondante à l'indice Cobb et à la moitié de l'indice Cobb.

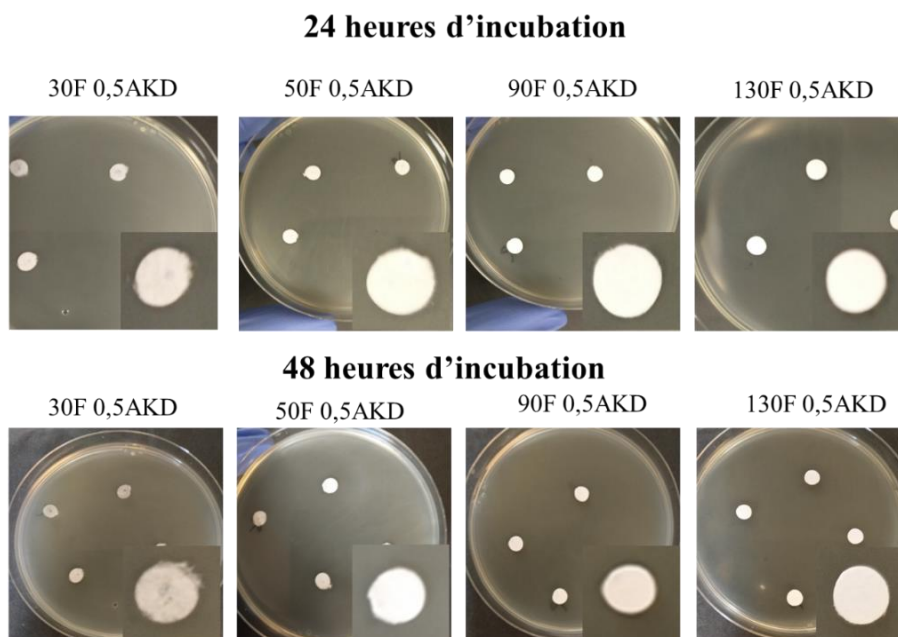


Figure 4.55 Activité antibactérienne pour les formettes standards contenant 0,5 % d'AKD et modifiées selon le volume de l'indice Cobb après 24 heures et 48 heures d'incubation.

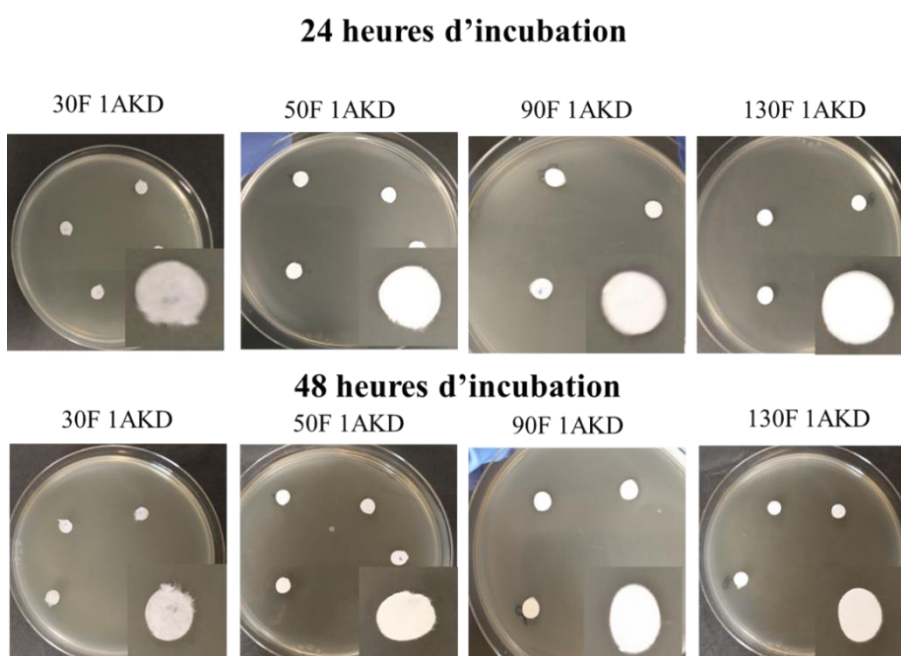


Figure 4.56 Activité antibactérienne pour les formettes standards contenant 1 % d'AKD et modifiées selon le volume de l'indice Cobb après 24 heures et 48 heures d'incubation.

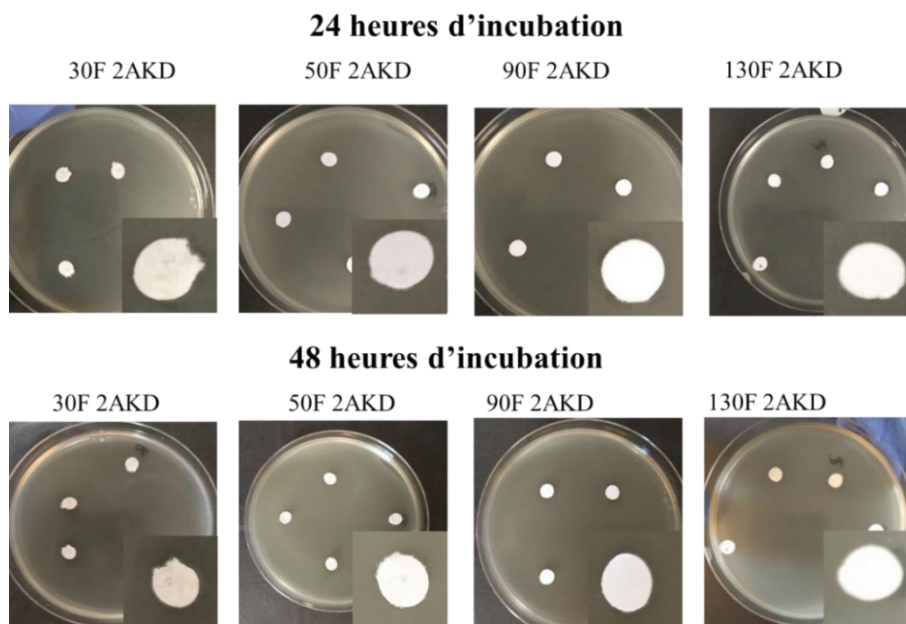


Figure 4.57 Activité antibactérienne pour les formettes standards contenant 2 % d'AKD et traitées selon le volume de l'indice Cobb après 24 heures et 48 heures d'incubation.

Pour l'ensemble des papiers, une zone de lyse s'est manifestée après 24 heures, et cette zone est demeurée présente après 48 heures. Dans quelques cas, où la zone de lyse est visible après 24 heures, une intensification de cette zone est observée après 48 heures. Cependant, aucune différence notable n'a été observée dans l'intensité de la zone de lyse entre les différents types de papiers. Les aires de la zone de lyse ont été mesurées pour chaque papier à partir de ces images. La Figure 4.58 regroupe les aires de la zone de lyse après 24 heures d'incubation.

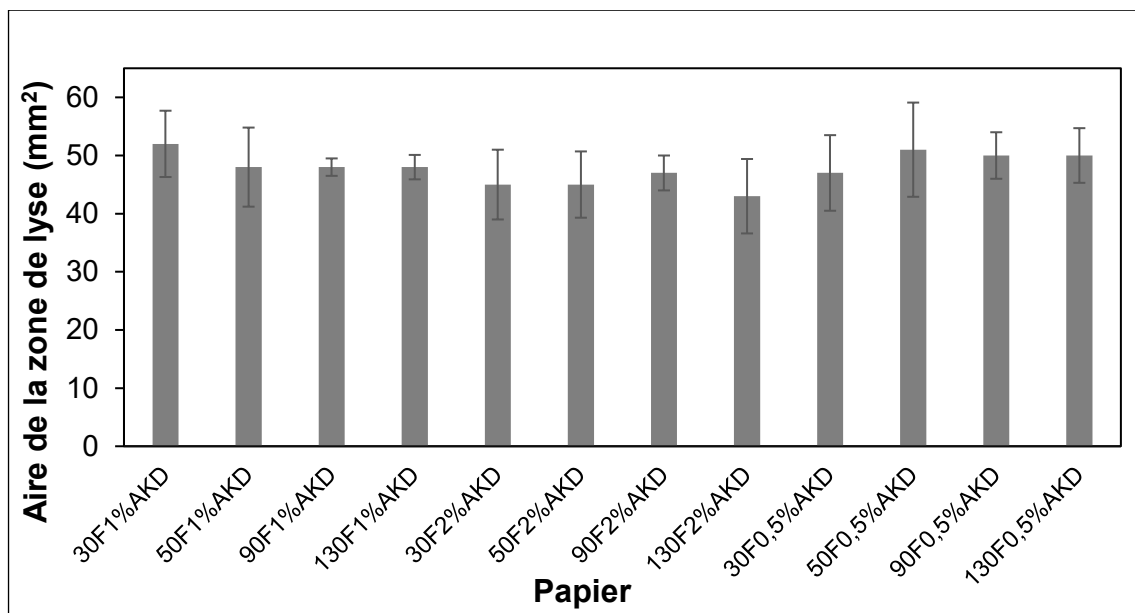


Figure 4.58 Zone de lyse mesurée après 24 heures d'incubation, pour les formettes standards contenant de l'AKD et traitées avec des phages, ajustée en fonction du volume de l'indice Cobb.

Les résultats montrent que les valeurs mesurées sont comparables, confirmant que la variation du pourcentage d'AKD n'a pas entraîné d'augmentation significative de la taille des zones de lyse.

Les mêmes expériences ont été répétées avec une quantité de phages correspondant à la moitié de volume de l'indice Cobb. La Figure 4.59 présente les images pour le pourcentage de 0,5AKD, tandis que les autres images, non représentées ici, ont été utilisées pour mesurer les aires de la zone de lyse.

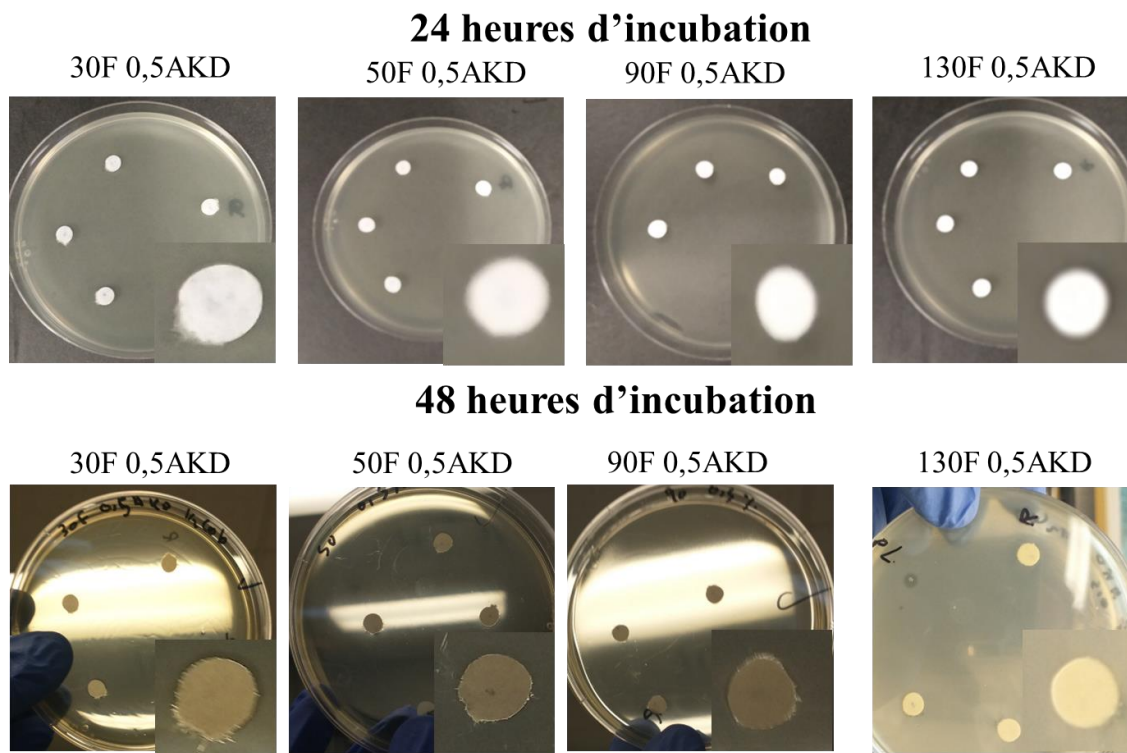


Figure 4.59 Activité antibactérienne pour les formettes standards contenant 0,5 % d'AKD et traitées selon le volume de la moitié de l'indice Cobb après 24 heures et 48 heures d'incubation.

Une zone de lyse, indicative de l'activité antibactérienne, est observée sur tous les échantillons de papier étudiés. Cependant, il est parfois difficile de détecter ces zones de manière précise et homogène. À partir de l'ensemble des images obtenues lors de l'analyse, les aires de la zone de lyse ont été mesurées pour chaque échantillon. Les données ainsi recueillies ont été présentées dans la Figure 4.60.

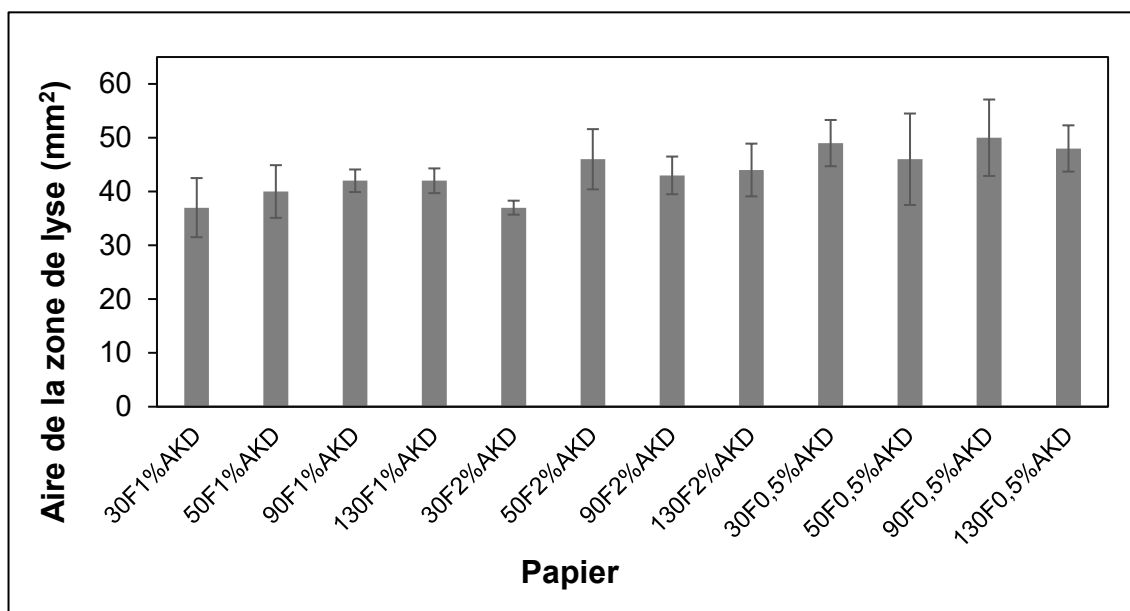


Figure 4.60 Zone de lyse, mesurée après 24 heures d'incubation pour les formettes standards contenant de l'AKD, traités avec des phages selon un volume correspondant à la moitié de l'indice Cobb.

Les mesures de l'aire des zones de lyse montrent une tendance à la diminution de l'activité antibactérienne lorsque la quantité de phages appliquée est réduite, ce qui suggère une corrélation directe entre la dose de phages et l'efficacité du traitement.

4.3.3.4 Effet du séchage

Cette partie porte sur l'effet du séchage du papier sur l'activité antibactérienne des papiers traités avec une quantité de phages optimisée selon le volume de l'indice Cobb (objectif 4 de la thèse). Les papiers (30F, 50F, 90F, 130F, 30K et 50K) traités selon le volume de l'indice Cobb ont été soumis à un processus de séchage pendant 2, 6 et 24 heures à l'air libre sous la hotte (humidité 30 %, température ambiante) avant d'être évalués pour leurs propriétés antibactériennes avec les deux méthodes : milieu semi-solide et milieu liquide.

4.3.3.4.1 Effet du séchage en milieu semi-solide

La Figure 4.61 représente les résultats obtenus pour les différents papiers après 2, 6 et 24 heures de séchage.

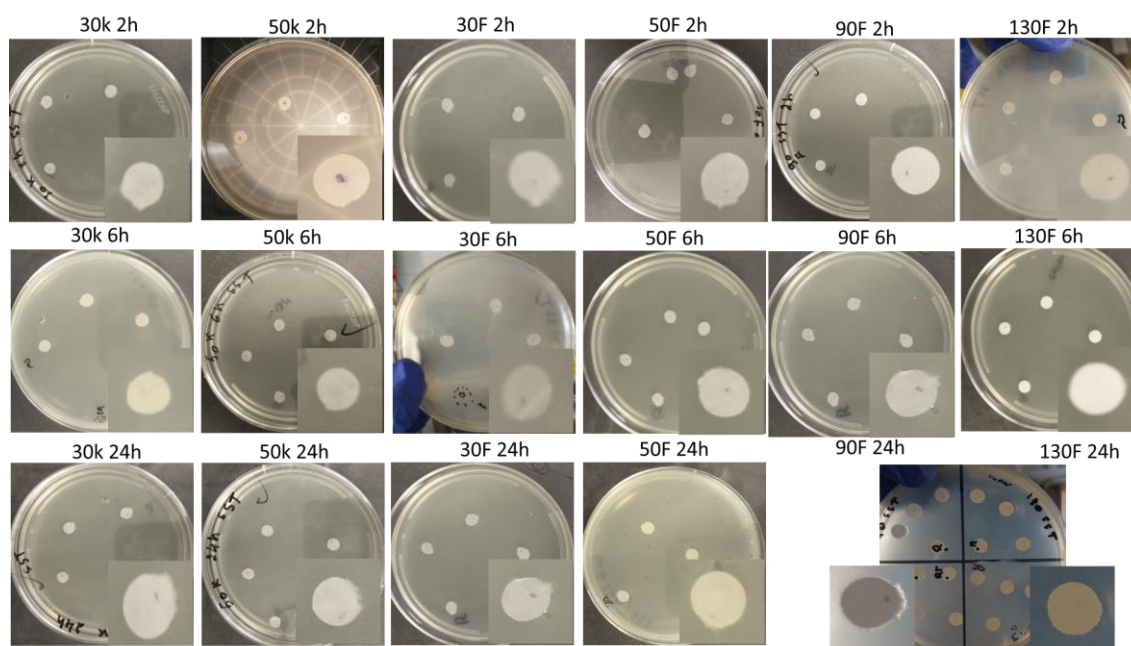


Figure 4.61 Activité antibactérienne pour les papiers de base et les formettes standards, traités selon le volume de l'indice Cobb et soumis à différents temps de séchage, évalués après 24 heures d'incubation.

Les résultats obtenus mettent en évidence une activité antibactérienne détectable sur les papiers soumis à un processus de séchage de deux heures. Cependant, l'identification visuelle de cette activité se révèle complexe, probablement en raison de la réduction de l'intensité des zones de lyse. Notamment, les papiers à grammage élevé (90F et 130F) présentent des zones de lyse plus visibles que les autres échantillons. Pour les papiers 30K, la détection de la zone de lyse n'a pas été possible visuellement. Pour les échantillons ayant subi des périodes de séchage de 6 et 24 heures, l'activité antibactérienne est moins perceptible visuellement, sauf pour le papier 130F où une zone de lyse de faible intensité est observable. Dans le cas d'un grammage élevé, la quantité initiale de phages est également plus élevée, ce qui, combiné à la capacité du papier à retenir l'humidité plus longtemps, contribue à préserver la propriété antibactérienne. Ainsi, cela suggère une réduction proportionnelle de l'efficacité antibactérienne avec la durée du séchage. Cette observation concorde avec les résultats présentés précédemment, qui montrent que la durée du séchage joue un rôle déterminant dans le maintien de l'efficacité des phages sur les papiers.

Les résultats de la Figure 4.61 montrent aussi que l'activité antibactérienne dépend à la fois du temps de séchage et du type de papier utilisé.

- **Séchage de 2 heures** : Une activité antibactérienne détectable est observée sur la majorité des papiers après 2 heures de séchage. Toutefois, la délimitation visuelle des zones de lyse demeure difficile, en raison de la faible intensité de ces zones. Les papiers à grammage élevé, notamment les 90F et 130F, présentent des zones de lyse plus visibles, suggérant une meilleure conservation de l'activité antibactérienne. En revanche, pour les papiers 30K, aucune zone de lyse claire n'a pu être identifiée visuellement.
- **Séchage de 6 heures** : Après 6 heures de séchage, l'activité antibactérienne devient moins perceptible pour la plupart des échantillons. Seuls quelques papiers de grammage élevé montrent encore une inhibition.
- **Séchage de 24 heures** : Au terme de 24 heures de séchage, l'activité antibactérienne est presque entièrement perdue, à l'exception du papier 130F, sur lequel une faible zone de lyse reste visible. Ce comportement peut être attribué à la plus grande capacité de rétention d'humidité et à la plus forte densité initiale de phages de ce type de papier, permettant de préserver partiellement leur activité.

Ces observations indiquent une diminution progressive de l'efficacité antibactérienne au fur et à mesure que la durée du séchage augmente. Ce résultat est en accord avec des études antérieures réalisées avec une application de 20 μ l de solution de phages, confirmant que la durée du séchage constitue un paramètre clé dans le maintien de la viabilité et de l'efficacité des phages appliqués sur des papiers.

4.3.3.4.2 Effet du séchage en milieu liquide

Pour mieux comprendre l'impact du temps de séchage du papier dans le contexte de faibles quantités de phages, un test en milieu liquide a été effectué à l'aide du lecteur de plaques afin d'étudier les propriétés antibactériennes de chaque support. Pour cela, les papiers traités avec les phages ont été analysés après un séchage de deux heures. Cette durée a été déterminée en se basant sur les résultats du test précédent, qui ont révélé les conditions les plus optimales et les plus visibles. La Figure 4.62 illustre les résultats de la variation de la densité optique pour les différents papiers.

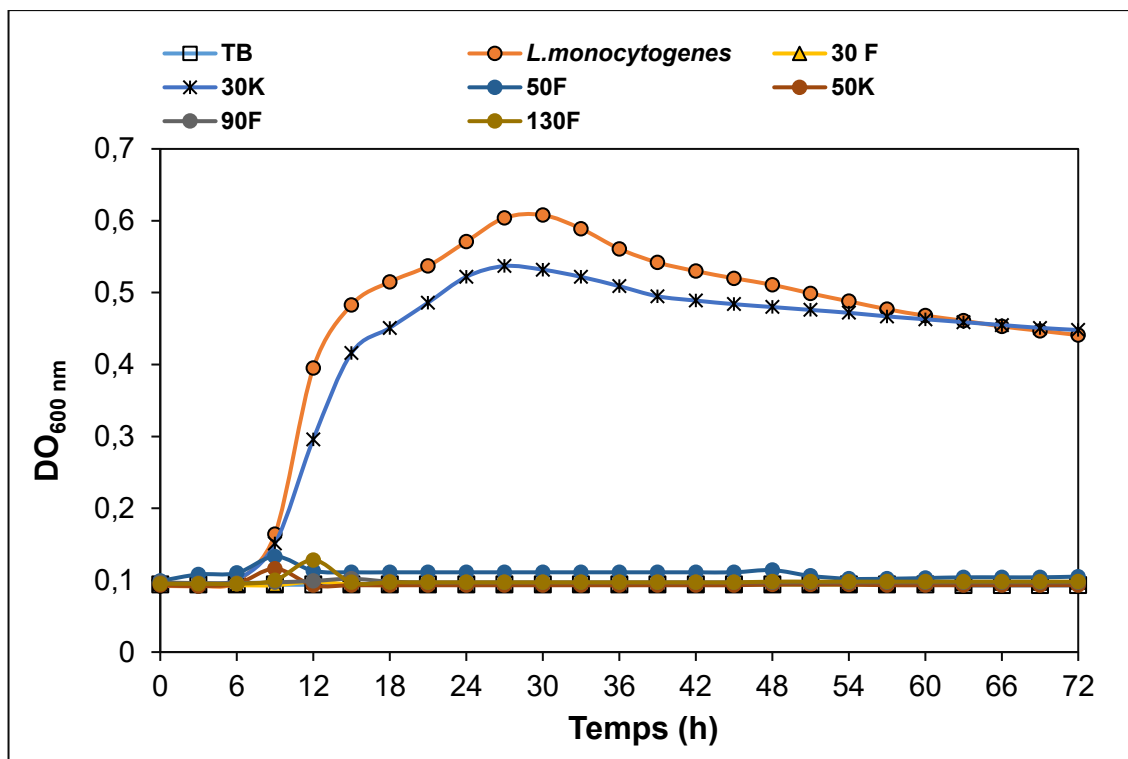


Figure 4.62 Croissance bactérienne de *L. monocytogenes* (concentration initiale 10^4 CFU/ml) en présence des papiers traités avec une quantité de phages selon le volume de l'indice Cobb et séchés pendant 2 heures.

Pour l'échantillon témoin de croissance bactérienne, les résultats ont révélé une phase de latence initiale de 6 heures, caractérisée par une croissance bactérienne relativement lente. Ensuite, une phase exponentielle s'est manifestée, avec une augmentation rapide de la densité optique au cours des 15 heures suivantes, atteignant un plateau à 21 heures. Dans le cas du papier 30K, la courbe de croissance a montré des similitudes avec celle des bactéries sans phages, laissant supposer une possible absence de libération des phages dans la solution. Ce constat confirme l'observation faite lors du test en milieu semi-solide, où aucune zone de lyse n'a été observée. Il est possible que les phages aient été fortement fixés à la surface du papier. Concernant les papiers 30F et 90F, aucune phase de croissance n'a été observée, ce qui suggère une inhibition de l'émergence des bactéries. Quant aux papiers 50F, 50K et 130F, une légère augmentation de la densité optique a été notée au début de la phase de croissance bactérienne, suivie d'une décroissance rapide, indiquant une inhibition des bactéries.

Également, à la fin de la période d'incubation (72 heures), un test de comptage a été réalisé pour évaluer les populations de bactéries. Les puits contenant des papiers traités aux phages présentaient une concentration bactérienne inférieure à la limite de détection (10 CFU/ml), contre 10^9 CFU/ml dans le témoin sans phages, soit une réduction d'environ 8 log.

4.3.3.5 Effet de l'humidité relative en milieu semi-solide

Cette partie porte sur l'effet de l'humidité relative de l'environnement sur l'activité antibactérienne des papiers traités avec une quantité de phages ajustée (objectif 4 de la thèse). Dans cette section, l'impact de l'humidité relative sur les formettes standards traitées avec des phages a été investigué, selon le volume de l'indice Cobb. Comme les résultats précédents ont montré qu'un taux d'humidité de 80 % permet de maintenir l'infektivité des phages, cette condition a été retenue pour évaluer l'efficacité antibactérienne des papiers. Les formettes standards traitées avec des phages, ont été conservées pendant 24 heures à 80 % d'humidité relative, puis testées après 24 heures d'incubation à 30°C (Figure 4.63).

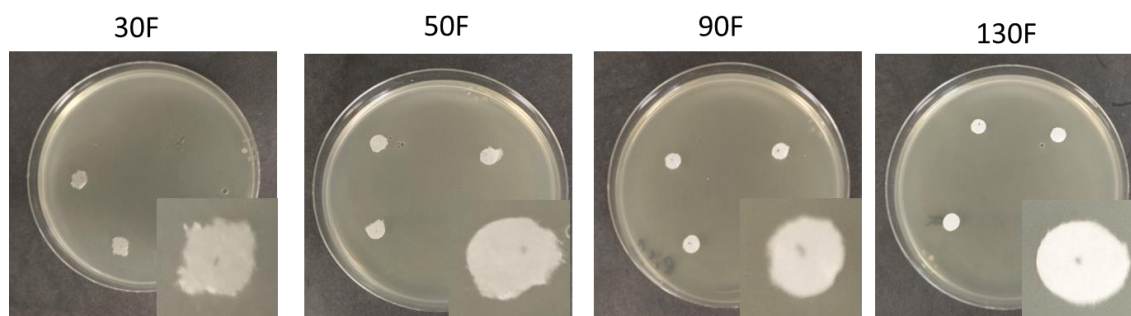


Figure 4.63 Activité antibactérienne pour les formettes standards, traités selon le volume de l'indice Cobb et soumis à une humidité de 80% pendant 24 heures à température ambiante avant évaluation antibactérienne après 24 heures d'incubation.

Les papiers 90F et 130F ont montré la présence de zones de lyse, contrairement aux autres papiers. Ces papiers présentent une épaisseur plus élevée (136 et 194 μm respectivement), ce qui pourrait favoriser une meilleure rétention de l'humidité. Cette rétention pourrait

contribuer à maintenir la stabilité et l'activité antibactérienne des phages sur les surfaces cellulosesques.

4.4 Effets de l'agent tensioactif Tween 80

Afin d'évaluer l'impact potentiel d'un additif (objectif 3 de la thèse) permettant de réduire la tension de surface de la solution de phages pour une meilleure application sur les supports en papiers hydrophobes, le Tween 80 a été utilisé. Avant de réaliser un test avec cet agent tensioactif sur du papier, l'effet de celui-ci sur la croissance d'une souche bactérienne ainsi que sur l'activité des phages a été examiné.

4.4.1 Effet de l'agent tensioactif Tween 80 sur la croissance bactérienne

Une étude a été effectuée pour évaluer l'impact du Tween 80 sur la croissance de la souche bactérienne *L. monocytogenes*. Deux milieux de culture distincts ont été préparés: l'un contenant 0,5 % de Tween 80 et une concentration bactérienne de 10^4 CFU/ml, et l'autre sans Tween 80. L'évolution de la croissance bactérienne dans les deux milieux a été suivie au fil du temps à l'aide d'un lecteur de plaques (Figure 4.64).

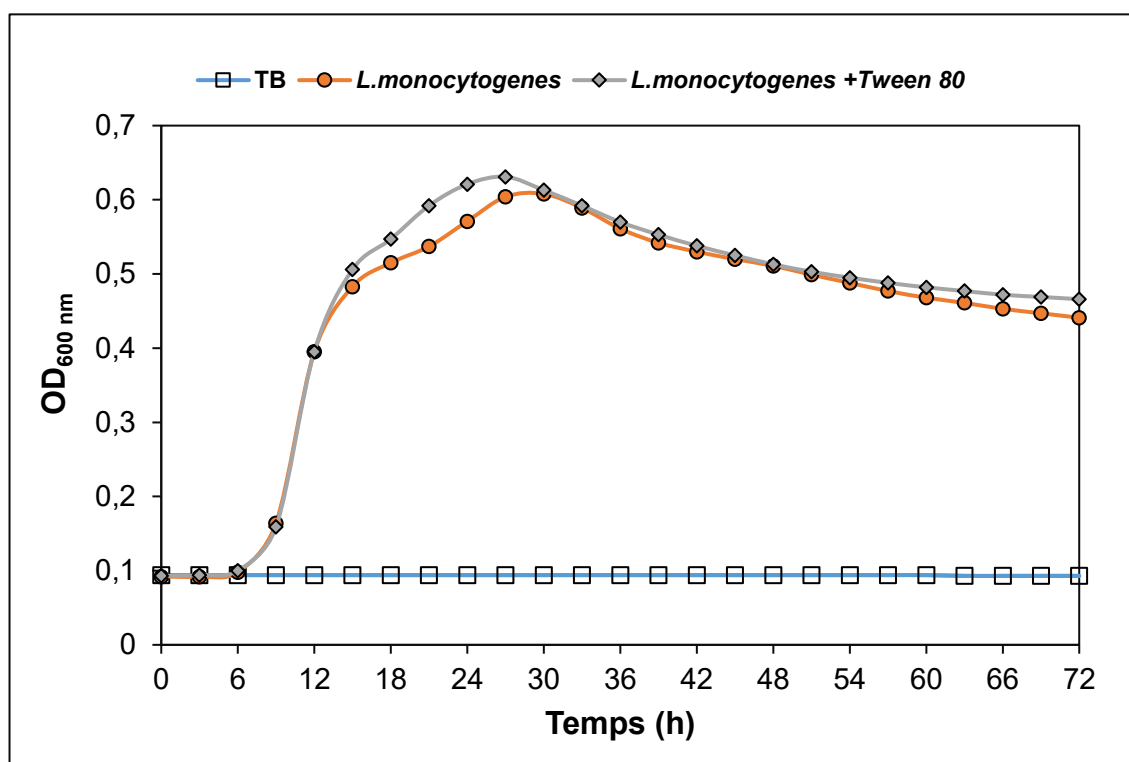


Figure 4.64 Croissance bactérienne de *L. monocytogenes* (concentration initiale de 10^4 CFU/ml) en absence et en présence de Tween 80 à une concentration de 0,5 %.

Les résultats obtenus montrent que les courbes de croissance de *L. monocytogenes* sont similaires en présence et en absence de Tween 80 (0,5 %). Ce constat indique que le Tween 80 n'exerce aucun effet significatif sur le développement bactérien.

4.4.2 Effet de Tween 80 sur l'infectivité des phages

Pour évaluer l'effet du Tween 80 sur l'infectivité des phages, une expérience comparative a été réalisée. Deux solutions ont été préparées: l'une contenant uniquement les phages à une concentration de 10^{11} PFU/ml, et l'autre la même concentration de phages additionnée de 0,5 % de Tween 80. Une goutte de 20 μ l de chaque solution a été ensuite déposée sur un tapis bactérien de *L. monocytogenes* (10^9 CFU/ml), puis incubée pendant 24 heures à 30°C. Les résultats obtenus sont présentés à la Figure 4.65.

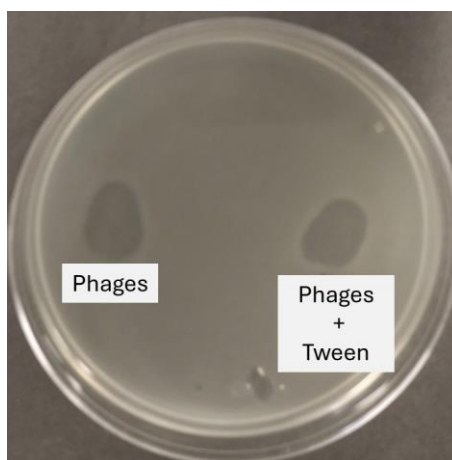


Figure 4.65 Activité antibactérienne de la solution de phages sans et avec Tween 80 après 24 heures d'incubation à 30°C.

Les résultats ont révélé des zones de lyse comparables pour les deux solutions, indiquant que la présence de Tween 80 à 0,5 % n'affecte pas l'infectivité des phages.

4.4.3 Traitement des papiers avec une solution de phages contenant du Tween 80

Une solution de phages a été préparée en y ajoutant 0,5 % de Tween 80. Une goutte de la solution de phages contenant du Tween 80 a été appliquée sur différents types de papiers (30F, 50F, 90F, 130F, 30K et 50K) selon le volume déterminé par l'indice Cobb.

Les résultats ont montré que l'ajout de Tween 80 a significativement amélioré la mouillabilité des papiers de base (30K et 50K) sans nécessiter d'étalement mécanique de la solution. Par ailleurs, l'étalement mécanique ne constitue pas une méthode fiable pour une production industrielle rapide. Cela suggère, conformément aux mesures d'angle de contact réalisées, que le Tween 80 est particulièrement efficace pour améliorer l'absorption et la distribution de la solution de phages sur les surfaces des papiers de base. En revanche, dans le cas des papiers formettes standards, aucune différence notable n'a été observée. La mouillabilité de ces papiers est initialement adéquate, et l'ajout de Tween 80 n'a pas apporté d'amélioration supplémentaire.

Un test antibactérien a été effectué pour les différents papiers en milieu semi-solide et en milieu liquide. La Figure 4.66 regroupe les images après incubation de 24 heures à 30°C.

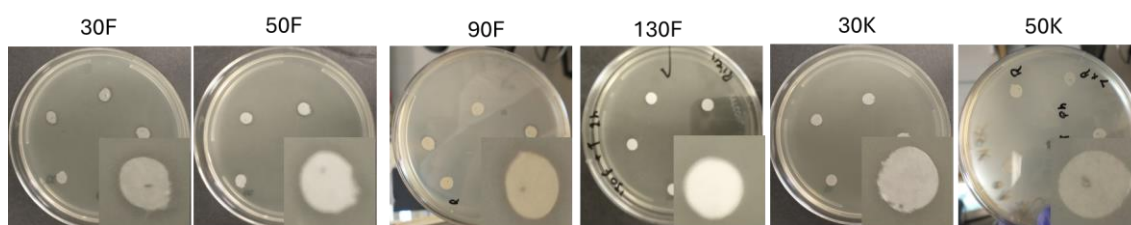


Figure 4.66 Activité antibactérienne pour les papiers de base et les formettes standards, traités selon le volume de l'indice Cobb avec une solution de phage contenant 0,5% de la solution Tween 80, évalués après 24 heures d'incubation.

Les résultats obtenus sont comparables avec ceux obtenus sans Tween 80. Une apparition de la zone de lyse est détectable à l'œil pour l'ensemble des papiers.

Une évaluation de l'activité antibactérienne en milieu liquide a été réalisée à l'aide d'un lecteur de plaques. La Figure 4.67 regroupe les résultats obtenus par le lecteur de plaques pour l'ensemble des papiers.

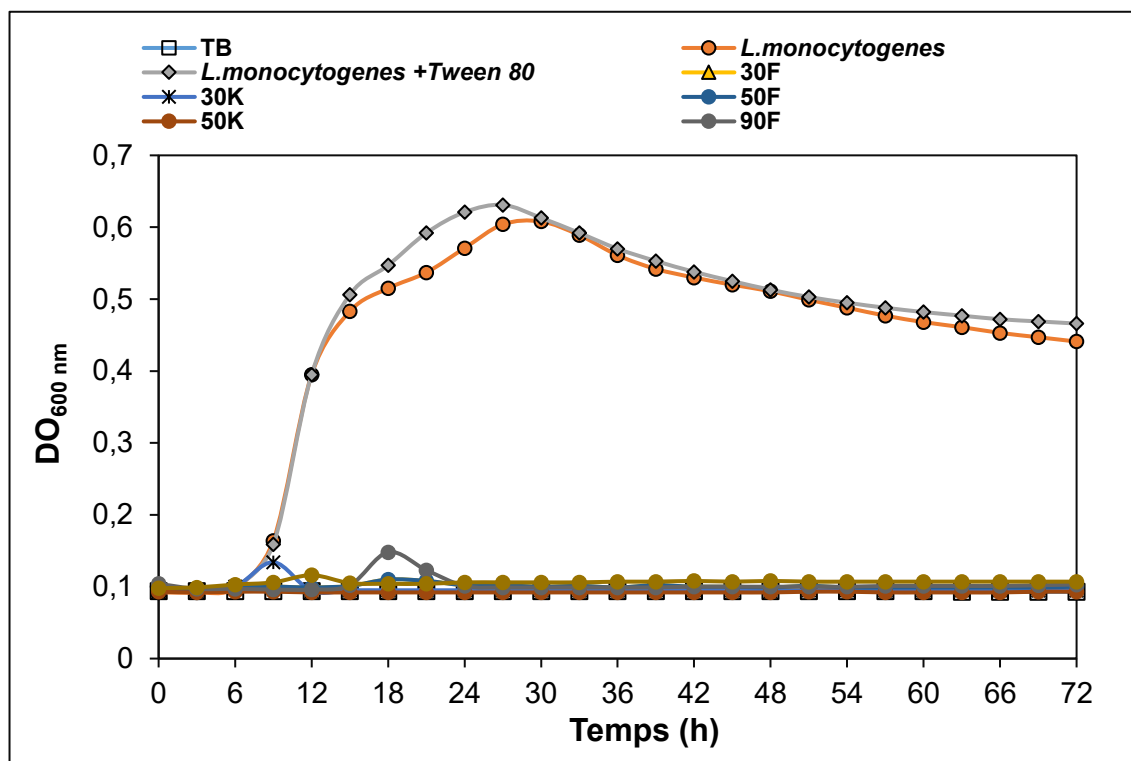


Figure 4.67 Croissance de *L. monocytogenes* (concentration initiale 10^4 CFU/ml) en présence des papiers traités avec une quantité des phages selon le volume de l'indice Cobb en présence de Tween 80.

Les résultats de l'expérience ont révélé une phase de latence initiale de 6 heures, pendant laquelle la croissance de *L. monocytogenes* est relativement lente. Ensuite, une phase exponentielle a été observée, marquée par une augmentation rapide de la densité optique sur une période de 15 heures, jusqu'à atteindre un plateau à 21 heures. Après ce point, une légère diminution de la densité optique a été notée. Certains échantillons de papier, notamment les types 30K, 90F et 130F, ont présenté une phase initiale de croissance bactérienne de faible intensité avant d'atteindre une inhibition complète des bactéries. Par ailleurs, aucun signe d'émergence de bactéries résistantes n'a été détecté sur les papiers traités selon le volume de l'indice Cobb en présence de Tween 80. Ces résultats confirment

les observations précédentes, indiquant que la réduction de la quantité de phages contribue à diminuer la probabilité d'apparition de bactéries résistantes.

Après 72 heures d'incubation, un test de dénombrement a confirmé l'efficacité des papiers traités avec les phages en présence de Tween 80. Les résultats ont révélé une absence de *L. monocytogenes* détectable dans les puits, la concentration étant inférieure à la limite de détection de la méthode (10 CFU/ml). À titre de comparaison, les échantillons témoins dépourvus de phages présentaient une concentration bactérienne d'environ 10^9 CFU/ml. Cette différence traduit une réduction d'environ 8 de la concentration bactérienne, démontrant que l'ajout de Tween 80 n'altère pas l'efficacité antibactérienne des phages appliqués sur les papiers.

La présence de Tween 80 dans la solution a facilité une application homogène, éliminant la nécessité d'interventions mécaniques pour étaler la solution uniformément sur les surfaces des papiers. La zone de lyse observée est similaire entre les échantillons avec et sans Tween 80, indiquant que l'activité antibactérienne des phages est maintenue en présence de cet agent tensioactif.

Cette observation est importante, car elle suggère que Tween 80 peut être utilisé pour améliorer la distribution des phages sur des papiers hydrophobes sans compromettre leur efficacité antibactérienne. Par conséquent, l'intégration de Tween 80 dans les formulations de phages pourrait représenter une méthode viable pour optimiser l'application et la performance des traitements antibactériens, particulièrement dans des contextes où une application uniforme est essentielle pour l'efficacité du traitement. En résumé, l'utilisation de Tween 80 permet non seulement une meilleure manipulation des solutions de phages, mais aussi une conservation intacte des propriétés antibactériennes des phages, ouvrant ainsi des perspectives pour des applications plus larges et plus efficaces dans le domaine de la lutte contre les infections bactériennes.

4.4.4 Traitement des papiers contenant l'AKD avec une solution de phages contenant du Tween 80

Les papiers, présentant une hydrophobicité élevée (angle de contact supérieur à 88°), notamment ceux traités avec 2 % d'AKD (angle de contact $\approx 133^\circ$), ont ensuite été traités avec la solution de phages. L'application de la solution de phages sur ces papiers s'est avérée difficile en l'absence de Tween 80 ou sans étalement mécanique. L'ajout de 0,5 % de Tween 80 a permis une meilleure répartition des phages sur la surface des papiers, sauf pour le papier contenant 2% d'AKD, pour lequel un léger étalement mécanique est resté nécessaire. Par la suite, un essai antibactérien a été réalisé dans un milieu semi-solide pour évaluer l'impact de cette modification sur les propriétés antibactériennes des papiers. La Figure 4.68 regroupe les résultats obtenus après 24 heures d'incubation à 30°C .

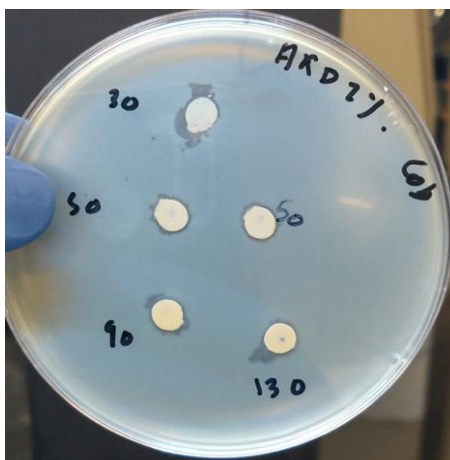


Figure 4.68 Activité antibactérienne pour les formettes standards (2% AKD), traités selon le volume de l'indice Cobb avec une solution de phages contenant 0,5% de la solution Tween 80, évalués après 24 heures d'incubation.

Pour l'ensemble des papiers, quel que soit le grammage, une zone de lyse a été observée, indiquant une activité antibactérienne.

Ces résultats confirment le rôle déterminant du Tween 80 dans l'application homogène des phages. Les mesures d'angle de contact ont montré que la présence de Tween 80 améliore la mouillabilité et, par conséquent, la compatibilité de la solution de phages avec les surfaces hydrophobes. Cette amélioration de la distribution des phages sur les surfaces

hydrophobes des papiers facilite une interaction efficace entre les phages et les bactéries cibles, garantissant ainsi l'inhibition antibactérienne. Sans Tween 80, l'application uniforme des phages sur ces surfaces hydrophobes serait difficile, compromettant potentiellement l'efficacité de l'activité antibactérienne. En conclusion, l'incorporation de Tween 80 est essentielle pour optimiser l'application des phages sur des papiers hydrophobes, assurant une activité antibactérienne.

4.5 Pulvérisation des phages sur papiers

Afin de réaliser un essai d'application de phages sur des papiers à plus grande échelle (objectif 2 de la thèse), des essais de pulvérisation ont été effectués à l'aide d'un flacon en plastique équipé d'une buse, ainsi que d'une machine CLC.

4.5.1 Test à l'aide d'un flacon en plastique équipé d'une buse

L'application d'une solution de phages sur les échantillons de papier 50K a été réalisée à l'aide d'un flacon en plastique muni d'une buse de pulvérisation. Le flacon ainsi que la buse ont été préalablement stérilisés, et l'application s'est déroulée sous la hotte biologique. Pour réguler la quantité des phages, plusieurs nombres d'applications (1 à 3) ont été testés. Toutefois, l'évaluation du poids du papier après chaque application a mis en lumière que l'emploi de cette méthode ne permettrait pas de contrôler précisément la quantité de solution déposée. Malgré cette limitation, un test antibactérien en milieu semi-solide sur les papiers 50K a été réalisé, avec une application ainsi qu'avec deux applications de la solution. Les résultats de ces tests sont présentés dans la Figure 4.69.

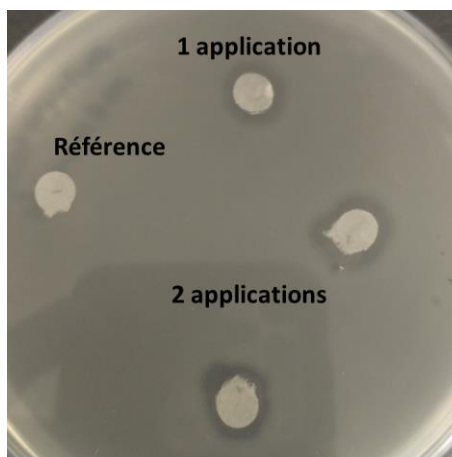


Figure 4.69 Activité antibactérienne pour les papiers 50K traités avec une solution de phages par pulvérisation manuelle.

La formation d'une zone de lyse a été constatée sur les deux cas, que ce soit après une ou deux applications. Cependant, une différence significative a été observée dans l'étendue de la zone de lyse. Plus précisément, lorsque deux applications ont été réalisées, la zone de lyse est notablement plus étendue par rapport à celle observée après une seule application. Cette observation suggère une corrélation entre la quantité de solution pulvérisée et l'intensité de l'effet antibactérien. Il est pertinent de noter que cette méthode entraîne un gaspillage important de phages, ce qui limite son intérêt dans une perspective d'optimisation ou de production à grande échelle.

4.5.2 Essais de pulvérisation à l'aide du CLC

La machine CLC permet de contrôler la quantité et l'uniformité de la solution de phages. Comme indiqué dans la partie « méthode », plusieurs variables ont été testées pour contrôler la quantité appliquée sur les papiers. Avec le meilleur résultat, un test a été d'abord effectué pour vérifier l'efficacité de la solution de phages provenant de la buse. L'objectif était de s'assurer que les conditions d'application et l'état de la machine n'affectaient pas l'infectivité des phages. La Figure 4.70 présente une comparaison de l'activité infectieuse entre la solution de phages à la sortie de la buse et la solution initiale de phages.

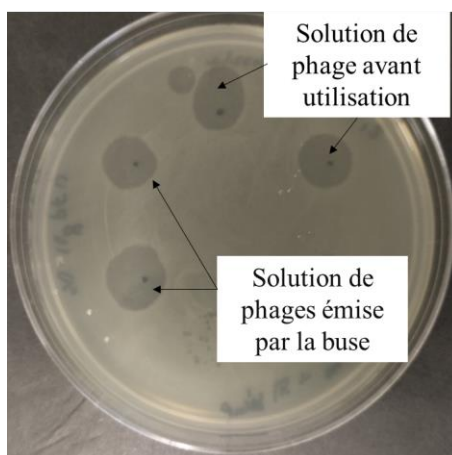


Figure 4.70 Activité antibactérienne de la solution de phages émise par la buse et de la solution initiale de phages.

Les résultats obtenus montrent que la solution de phages conserve ses propriétés antibactériennes, indiquant que les conditions d'application n'affectent pas ces propriétés.

Les deux types d'échantillons ont été testés : les échantillons des papiers non séchés et les échantillons des papiers séchés. La Figure 4.71 présente les résultats d'infectivité après 24 heures d'incubation des papiers, traités avec les phages, à 30°C pendant 24 heures.

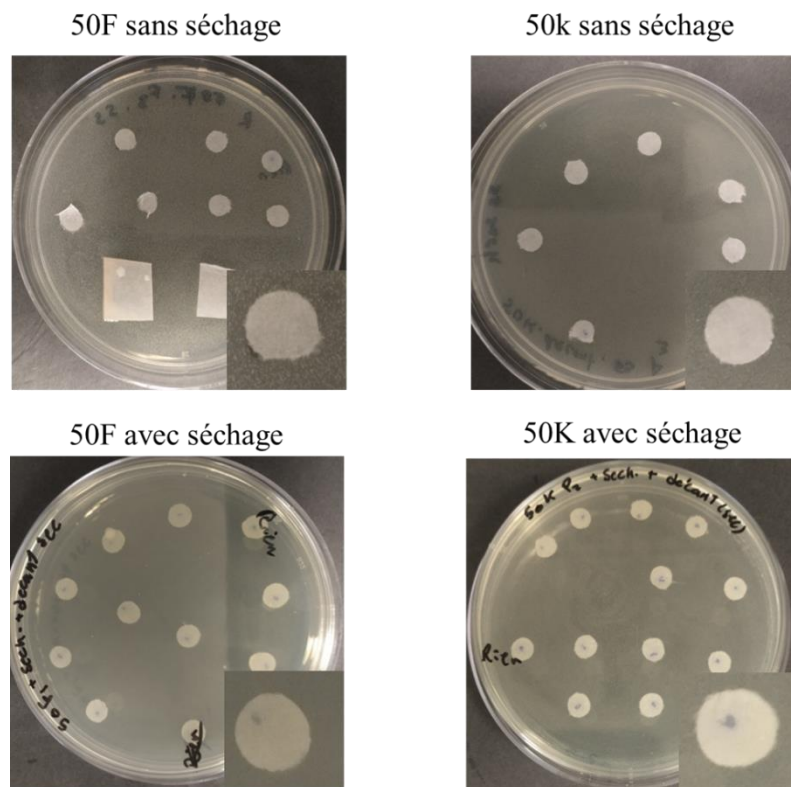


Figure 4.71 Activité antibactérienne pour les papiers 50F et 50K traités avec une solution de phages pulvérisée à l'aide du CLC, sans séchage et après séchage.

Les résultats obtenus montrent une activité antibactérienne faiblement détectable à l'œil nu pour les papiers traités avec les phages non séchés (50F et 50K). Dans le cas des papiers 50F, l'activité antibactérienne est plus visible que celle des papiers 50K. Cette réduction pourrait être due à la pression de pulvérisation, favorisant une pénétration plus profonde des phages dans la structure des papiers, diminuant leur disponibilité immédiate en surface. De plus, la diminution du taux d'humidité du papier lors de l'étape de décontamination pourrait également contribuer à cette réduction.

En revanche, l'examen visuel des papiers séchés thermiquement n'a pas révélé de zones de lyse, possiblement en raison de l'atténuation de l'activité des phages provoquée par le traitement thermique au cours du séchage.

Pour les papiers de base 50K, la solution liquide n'a pas mouillé facilement la surface sur le CLC, reproduisant les difficultés observées lors des applications par goutte. Toutefois, avec le CLC, la pression appliquée semble améliorer la mouillabilité. Comparativement,

le papier 50F a montré une mouillabilité plus efficace. Cette différence peut être attribuée à la nature hydrophobe des papiers 50K, qui limite la répartition uniforme de la solution.

Ces travaux ont prouvé qu'il serait nécessaire d'utiliser du Tween 80 pour assurer une application plus homogène de la solution de phages sur un substrat hydrophobe, sans altérer les propriétés barrières et sans compromettre l'efficacité antibactérienne des phages.

Chapitre 5 - Discussion

L'autorisation réglementaire d'utiliser des phages pour lutter contre des pathogènes alimentaires comme *L. monocytogenes* a ouvert de nouvelles perspectives dans le domaine de la sécurité alimentaire, notamment par leur intégration dans des supports d'emballage actifs. Cette étude visait à exploiter les phages P100, adaptés pour un usage alimentaire, pour contrôler *L. monocytogenes* via une application sur des supports en papier de base et des formettes standards. L'ensemble des résultats obtenus démontre non seulement l'efficacité du phage en milieu liquide et semi-solide, mais également la faisabilité de son application sur des papiers de base et des papiers formettes standards.

Les expériences en milieu liquide ont confirmé la forte capacité d'infection du phage P100, conduisant à des réductions supérieures à 8 log pour des concentrations initiales de 10^4 et 10^5 CFU/ml, indépendamment du MOI. Ce résultat constitue un élément majeur, car il montre que dans des conditions de contamination faibles à modérées, représentatives de nombreuses matrices alimentaires, une dose réduite de phages suffit à assurer une lyse complète. Ces résultats s'inscrivent dans la continuité des observations de Połaska et al. [173] et de Fister et al. [122], qui rapportent une efficacité remarquable du phage P100 dans la réduction de biofilms de *L. monocytogenes*, avec une lyse maximale observée après 24 heures. Toutefois, lorsque la concentration bactérienne est élevée ($\geq 10^6$ CFU/ml), une reprise de croissance après 24 heures a été observée, traduisant l'émergence de souches résistantes. Cette dynamique est cohérente avec les modèles de coévolution phage-bactérie décrits par Labrie et al. [166], selon lesquels une forte pression sélective liée à un MOI élevé favorise l'apparition rapide de bactéries résistantes. Nos résultats confirment cette tendance : pour des concentrations initiales de 10^4 et 10^5 CFU/ml, le phage P100 assure une inhibition complète (>8 log de réduction) quel que soit le MOI (0,1 à 1000), alors qu'en conditions de forte densité bactérienne (10^6 - 10^8 CFU/ml), l'émergence des bactéries résistantes devient plus fréquente. Cette relation met en évidence un point clé : un MOI élevé n'est pas systématiquement bénéfique, car il peut accentuer la pression sélective et accélérer l'apparition de résistances, contrairement à un MOI plus faible qui limite significativement ce phénomène.

Cette conclusion nuance les travaux de Rajnovic [174], qui n'a pas observé de reprise de croissance lors d'interactions phage-*E. coli*, possiblement en raison de différences de systèmes biologiques et d'une durée d'observation limitée (240-300 min). Elle rejoint toutefois les recommandations de Fister et al. [122] qui préconisent une utilisation ciblée et ponctuelle du phage Listex P100 afin de réduire le risque d'apparition des bactéries résistances. L'ensemble de ces éléments souligne l'importance stratégique de contrôler précisément le MOI dans les applications industrielles, particulièrement lorsque des densités bactériennes élevées sont susceptibles d'accélérer l'apparition de résistances.

L'intégration de phages sur des papiers industriels constitue l'innovation centrale de cette thèse. Contrairement à l'hypothèse initiale selon laquelle la porosité et les irrégularités structurelles du papier pourraient nuire à l'efficacité des phages, les résultats démontrent que ces caractéristiques n'ont pas compromis leur activité antibactérienne. Dans les conditions expérimentales mises en œuvre, les papiers commerciaux de base se sont révélés être des supports pertinents, sans nécessité de modifications physiques préalables. Bien que les papiers testés présentent des propriétés physiques variées (grammage, densités, perméabilités à l'air, hydrophobicité), tous ont permis d'obtenir une activité antibactérienne efficace. De manière intéressante, les papiers plus denses et moins perméables (après calandrage) ont atteint des niveaux d'efficacité comparables à ceux des papiers de base tout en nécessitant une quantité moindre de phages, laissant entrevoir un potentiel d'optimisation économique du procédé.

Les résultats montrent également que l'efficacité antibactérienne dépend fortement de paramètres matériaux clés, notamment le grammage, l'humidité, la mouillabilité et les conditions de séchage et de stockage. Les papiers à grammage élevé (90F et 130F) ont mieux conservé l'activité antibactérienne en raison de leur capacité à retenir l'humidité. Il s'agit d'un constat cohérent avec les travaux de Lone [119] et Jabrane [175] qui ont montré que les phages sont particulièrement sensibles au dessèchement rapide, et que leur viabilité dépend d'un environnement hydraté permettant le maintien de la structure des phages. Cette relation directe entre humidité et maintien de l'activité antibactérienne constitue l'un des apports de cette thèse et positionne le grammage et la structure fibreuse comme des paramètres critiques dans la conception de matériaux d'emballage bioactifs.

Ainsi, l'efficacité antibactérienne ne dépend pas uniquement de la présence de phages, mais de l'adéquation entre leurs propriétés biologiques et les propriétés du papier. Les papiers denses et peu absorbants perdent rapidement leur activité en raison d'un dessèchement accéléré, tandis que les papiers plus épais et poreux offrent un microenvironnement humide favorable à la stabilité des phages. Cette conclusion propose une approche de développement : optimiser les propriétés du papier afin de soutenir la viabilité des phages plutôt que d'augmenter systématiquement la dose appliquée. Enfin, cette interprétation fournit un cadre prédictif cohérent : les performances observées en milieu liquide, où l'humidité est maintenue, correspondent à celles des papiers capables de conserver l'eau. Les propriétés hygroscopiques apparaissent ainsi comme un facteur majeur de l'efficacité des phages en conditions réelles d'application et devraient être intégrées aux stratégies industrielles de formulation et de choix des matériaux d'emballage.

Les papiers fournis par le partenaire industriel et ceux modifiés à l'AKD ont présenté une hydrophobie marquée, limitant l'étalement de la solution de phages et compromettant leur application uniforme. L'ajout de Tween 80 s'est révélé déterminant, en améliorant significativement la mouillabilité des surfaces et en permettant une distribution homogène des phages. Ce résultat démontre qu'il est possible d'appliquer efficacement des phages sur des papiers barrières hydrophobes utilisés industriellement, répondant ainsi à l'un des principaux défis technologiques rapportés dans la littérature.

L'ajustement de la quantité de phages appliquée sur les papiers, notamment via l'utilisation de l'indice Cobb, a permis de réduire significativement la dose tout en maintenant une activité antibactérienne robuste. Ce résultat comporte deux implications majeures : une diminution des coûts de production et une réduction du risque d'émergence de souches résistantes. Cette contribution est particulièrement originale, car elle démontre que l'optimisation de la dose ne constitue pas uniquement un enjeu économique, mais également un facteur essentiel pour limiter l'apparition de résistances phagiques.

Certaines limites expérimentales doivent toutefois être prises en considération. Les essais ont été réalisés avec une seule souche de *L. monocytogenes*, ce qui restreint la généralisation des résultats compte tenu de la diversité génétique de l'espèce. Par ailleurs, la perte d'activité constatée lors du séchage infrarouge dans les essais de pulvérisation CLC

représente des contraintes supplémentaires. L'essai de pulvérisation constitue une première démonstration de faisabilité pilote, mais il a mis en évidence deux enjeux majeurs : un risque de contamination de l'équipement et une diminution marquée de l'activité antibactérienne liée au traitement thermique. Ces observations indiquent que le procédé d'application devra être adapté afin de préserver la viabilité des phages. Dans cette optique, le recours à un séchage à basse température, idéalement à température ambiante ou sous flux d'air non chauffé, apparaît plus approprié. Une telle approche permettrait de limiter le stress thermique lors du séchage, étape critique pour le maintien de l'activité antibactérienne, et ainsi de préserver l'intégrité des phages appliqués à la surface du papier.

La stabilité du phage dans des conditions industrielles réelles, incluant le transport, l'entreposage et la durée de conservation, devra également être validée pour garantir une performance durable tout au long de la chaîne logistique.

Enfin, l'absence d'essais sur des matrices alimentaires réelles empêche, à ce stade, d'évaluer pleinement l'efficacité des papiers, traités avec des phages, dans des conditions représentatives de transport, de manipulation et de stockage. Bien que ces limites n'invalident pas les résultats obtenus, elles mettent en évidence plusieurs pistes de recherche nécessaires pour consolider et étendre l'applicabilité de cette approche.

Dans l'ensemble, l'incorporation de phages dans des papetiers s'inscrit pleinement dans une vision de durabilité : elle s'appuie sur des matériaux renouvelables, offre un potentiel de réduction des pertes alimentaires et demeure compatible avec les procédés industriels existants. Cette convergence d'éléments renforce la pertinence de poursuivre le développement d'emballages bioactifs à base de phages pour répondre aux enjeux actuels de sécurité alimentaire et d'écoresponsabilité.

Chapitre 6 - Conclusions et perspectives

6.1 Conclusions

Dans cette étude, différentes approches ont été explorées pour développer des emballages antibactériens à base de papiers fonctionnalisés avec des agents antibactériens dans le but de lutter contre *L. monocytogene*. Les travaux ont porté sur plusieurs aspects : la sélection d'un agent antibactérien de grade alimentaire, la caractérisation des interactions phage-bactérie, la préparation et la modification de différents types de papiers, ainsi que les défis liés à l'application et à la stabilisation des phages sur ces papiers.

Deux produits commerciaux de phages, Listex P100 et ListShield, ainsi que cinq huiles essentielles ont été évalués. Les résultats ont identifié le phage P100 comme l'agent le plus performant et le plus robuste, avec une activité antibactérienne reproductible et adaptée à une intégration dans des emballages alimentaires. En revanche, les phages ListShield ont montré une efficacité limitée, nécessitant des investigations complémentaires. Les huiles essentielles ont démontré un potentiel antibactérien intéressant, mais leur utilisation reste compromise par des contraintes technologiques et sensorielles (odeurs résiduelles, risques de contamination des équipements), limitant leur pertinence industrielle.

L'étude des différents types de papiers préparés, variation de grammage, modification à l'AKD, calandrage et papiers de base industriels, a permis d'identifier les paramètres matériaux influençant la performance des phages appliqués. Les résultats ont mis en évidence le rôle déterminant du grammage, de l'humidité résiduelle et des conditions de séchage et de stockage sur le maintien de l'activité antibactérienne. Les papiers plus épais et plus hygroscopiques ont favorisé une meilleure conservation de l'activité antibactérienne, soulignant l'importance de l'environnement humide au sein de la matrice cellulosique.

L'un des résultats majeurs de cette thèse réside dans la démonstration qu'une réduction significative de la quantité de phages appliquée, basée sur l'indice Cobb, permet de maintenir une efficacité antibactérienne tout en limitant l'apparition de bactéries résistantes. Cette observation constitue une avancée importante, établissant que l'optimisation de la dose ne répond pas uniquement à des enjeux économiques, mais représente également un

facteur clés pour limiter la résistance bactérienne. L'application de phages sur des papiers hydrophobes s'est révélée particulièrement complexe. L'utilisation du tensioactif Tween 80 a permis de surmonter cette limitation en améliorant la mouillabilité et la distribution de la solution de phages, ouvrant ainsi la voie à l'utilisation de papiers barrières industriels sans modification structurelle préalable. Les essais en milieu semi-solide et liquide ont confirmé l'efficacité du phage P100 appliqué sur les différents types de papiers, tout en révélant l'importance critique de l'humidité et des conditions d'entreposage sur le maintien de leur activité. Enfin, la pulvérisation via la technologie CLC a démontré le potentiel d'une application à grande échelle, tout en soulignant la nécessité d'optimiser le procédé pour préserver la viabilité des phages lors du séchage.

Dans l'ensemble, ce travail ouvre des perspectives industrielles prometteuses. L'application d'une formulation de phages sur des matériaux d'emballage à base de fibres cellulose apparaît comme une solution durable et pertinente pour limiter la croissance de *L. monocytogenes* dans la chaîne alimentaire. Cette approche s'inscrit dans une dynamique d'emballages écoresponsables, en combinant matériaux renouvelables, réduction des pertes alimentaires et maintien de la sécurité microbiologique.

6.2 Perspectives

Bien que les objectifs principaux de cette thèse aient été atteints, plusieurs avenues de recherche méritent d'être approfondies afin de consolider et d'élargir l'applicabilité industrielle des papiers fonctionnalisés avec des phages. Dans un premier temps, il serait essentiel d'évaluer l'efficacité des papiers de base et des formettes standards traités avec des phages en présence de Tween 80 directement sur des aliments prêts à manger, tels que la viande. Ces essais permettraient de valider la performance antibactérienne dans des conditions réalistes de transport, de distribution et de stockage, tout en examinant l'influence de la matrice alimentaire, notamment la teneur en protéines, lipides et eau, sur l'activité et la stabilité des phages.

Par ailleurs, l'isolation et la caractérisation de phages ayant survécu au traitement thermique lors du séchage des papiers représentent une perspective particulièrement

prometteuse. Une telle démarche pourrait conduire à l'identification ou à la sélection de phages thermorésistants, mieux adaptés aux procédés industriels impliquant des étapes de séchage ou de transformation à température contrôlée, et ainsi améliorer la compatibilité des phages avec les lignes de production existantes.

Enfin, le développement d'un cocktail de phages spécifiquement formulé pour une application sur supports papetiers constituerait une avancée majeure. Les cocktails actuellement disponibles pour *L. monocytogenes* sont principalement optimisés pour un usage direct sur les aliments, sans considération des contraintes liées aux matériaux d'emballage. Dans le contexte des surfaces cellulosiques, la distribution des particules phagiques, leur diffusion dans la matrice et leur résistance aux conditions industrielles peuvent varier selon les caractéristiques individuelles des phages. Il apparaît donc crucial de tester les phages individuellement, d'évaluer leur compatibilité avec les substrats fibreux et de concevoir une formulation adaptée aux propriétés physiques des matériaux papetiers. Le développement d'un tel cocktail spécialisé, combiné à une optimisation du procédé d'application, pourrait permettre de franchir une étape déterminante vers l'industrialisation de cette technologie, en améliorant à la fois l'efficacité antibactérienne, la robustesse du procédé et la sécurité microbiologique des emballages alimentaires.

Bibliographie

- 1 Brennan, M.A., Derbyshire, E., Tiwari, B.K., Brennan, C.S., “Ready-to-eat snack products: the role of extrusion technology in developing consumer acceptable and nutritious snacks”, *International Journal of Food Science and Technology* 2013, 48(5): 893-902.
- 2 Jiang, J., Xiong, Y.L., “Technologies and mechanisms for safety control of ready-to-eat muscle foods: an updated review”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2015, 55(13): 1886-1901.
- 3 Fung, F., Wang, H.S., Menon, S., “Food safety in the 21st century”, *Biomedical Journal* 2018, 41(2): 88-95.
- 4 Agence canadienne d’inspection des aliments, “Déclaration à la suite de l’enquête sur la salubrité des aliments liée au rappel de diverses boissons végétales des marques Silk et Great Value - Canada.ca”, [En ligne], Adresse URL : <https://www.canada.ca/fr/agence-inspection-aliments/nouvelles/2024/10/declaration-a-la-suite-de-lenquete-sur-la-salubrite-des-aliments-liee-au-rappel-de-diverses-boissons-vegetales-des-marques-silk-et-great-value.html> (page consultée le 28 juin 2025).
- 5 Alberta Health Services, [En ligne], Adresse URL : https://www.albertahealthservices.ca/info/Page18943.aspx?utm_source=chatgpt.com (page consultée le 28 juin 2025).
- 6 Agence de la santé publique du Canada, “Estimations annuelles des maladies d’origine alimentaire au Canada”, [En ligne], Adresse URL : https://www.canada.ca/en/public-health/services/food-borne-illness-canada/yearly-food-borne-illness-estimates-canada.html?utm_source=chatgpt.com (page consultée le 29 juin 2025).

- 7 Majowicz, S.E., McNab, W.B., Sockett, P., Hanzon, S., Dore, K., Edge, V.L., Buffett, M.C., Fazil, A., Read, S., Mcewen, S., Stacey, D., Wilson, J.B., “Burden and Cost of Gastroenteritis in a Canadian Community”, *Journal of Food Protection* 2006, 69(3): 651-659.
- 8 Agence de la santé publique du Canada, “Infographique : Maladies d'origine alimentaire, hospitalisations et décès au Canada”, [En ligne], Adresse URL: <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/publications/aliments-et-nutrition/infographique-maladies-origine-alimentaire-hospitalisations-deces-canada.html> (page consultée le 29 juin 2025).
- 9 Wu, S.T., Hammons, S.N., Silver, R., Neal, J.A., Oliver, H.F., “Retail deli managers and associates have better food safety culture in stores with lower *Listeria monocytogenes* contamination”, *Food Control* 2020, 110: 106983.
- 10 “Archives | La crise de la listériose en 2008” [En ligne], Adresse URL <https://ici.radio-canada.ca/nouvelle/1117853/crise-listeriose-rappel-charcuterie-archives> (page consultée le 29 juin 2025).
- 11 Harvey, R., “Un « ouragan » nommé listeria - L'industrie des fromages fins est fortement ébranlée par la crise” 2008, [En ligne], Adresse URL <https://www.ledevoir.com/societe/205999/un-ouragan-nomme-listeria-l-industrie-des-fromages-fins-est-fortement-ebranlee-par-la-crise> (page consultée le 21 janvier 2021).
- 12 Chen, T., “Nouvelles mesures de maîtrise de la bactérie *Listeria* dans les établissements de transformation alimentaire”, Centre de collaboration nationale en santé environnementale, 2024. [En Ligne], Adresse URL : <https://ccnse.ca/resources/blog/nouvelles-mesures-de-maitrise-de-la-bacterie-listeria-dans-les-etablissements-de> (page consultée le 29 juin 2025).

- 13 Topuz, F., Uyar, T., “Antioxidant, Antibacterial and Antifungal Electrospun Nanofibers for Food Packaging Applications”, *Food Research International* 2020, 130: 108927.
- 14 Poças, F., Selbourne, MdC., “Drivers, advances, and significance of measures for effective circular food packaging”, *Frontiers in Sustainable Food Systems* 2023, 7: 1140295.
- 15 Canada Food Packaging Market Size & Outlook, 2024-2030, [En ligne], Adresse URL : <https://www.grandviewresearch.com/horizon/outlook/food-packaging-market/canada> (page consultée le 29 juin 2025)
- 16 Geyer, R., Jambeck, J.R., Law, K.L., “Production, use, and fate of all plastics ever made”, *Science Advances* 2017, 3(7): e1700782.
- 17 Marsh, K., Bugusu, B., “Food Packaging-Roles, Materials, and Environmental Issues”, *Journal of Food Science* 2007, 72: R39-R55.
- 18 Mohamed, S.A.A., El-Sakhawy, M., El-Sakhawy, M.A.M., “Polysaccharides, Protein and Lipid -Based Natural Edible Films in Food Packaging: A Review”, *Carbohydrate Polymers* 2020, 238: 116178.
- 19 Le plastique à usage unique sera banni au Canada en 2021, [En ligne], Adresse URL <https://www.lapresse.ca/actualites/environnement/2020-01-30/le-plastique-a-usage-unique-sera-banni-au-canada-en-2021> (page consultée le 17 juin 2020).
- 20 Upadhyay, P., Zubair, M., Roopesh, M.S., Ullah, A., “An Overview of Advanced Antimicrobial Food Packaging: Emphasizing Antimicrobial Agents and Polymer-Based Films”, *Polymers* 2024, 16: 2007.
- 21 Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J., “Prokaryotes: the unseen majority”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1998, 95: 6578-6583.

- 22 EFSA BIOHAZ Panel, Ricci, A., Allende, A., et al., “*Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU”, *EFSA Journal* 2018, 16(1): 5134.
- 23 Institut pasteur, “Salmonellose” [En ligne], Adresse URL : <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/salmonellose> (page consultée le 9 juillet 2025).
- 24 Gouvernement du Canada, “Causes de l’infection à *E. coli* (*Escherichia coli*)” [En ligne], Adresse URL : <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/maladies/e-coli/causes-e-coli.html> (page consultée le 9 juillet 2025).
- 25 Herro, R., “Implication du PTS dans la régulation de PrfA, activateur transcriptionnel des gènes de virulence de *Listeria monocytogenes*”, *Thèse de doctorat* 2006, Université Paris XI.
- 26 Roy, B., “Bactériophages de *Listeria* : Formulation d’un bioassainisseur et production par immobilisation cellulaire”, *Thèse de doctorat* 2018, Université de Laval.
- 27 D'amico, D.J., Donnelly, C.W., “Conventional and Innovative Methods for Reducing the Incidence of *Listeria monocytogenes* in Milk and Dairy Products”, *Foods* 2022, 11(23): 3844.
- 28 Caractéristiques et sources de *Listeria monocytogenes*, [En ligne], Adresse URL <https://www.pasteur.fr/fr/file/3252/download?token=nuSFUB9S>, (page consultée le 9 juillet 2025).
- 29 Ammendolia, M.G., Iosi, F., De Berardis, B., Guccione, G., Superti, F., Conte, M.P., Longhi, C., “*Listeria monocytogenes* Behaviour in Presence of Non-UV-Irradiated Titanium Dioxide Nanoparticles”, *PLoS One*. 2014, 9(1): e84986.

- 30 Farber, J.M., Ross, W.H., Harwig, J., “Health risk assessment of *Listeria monocytogenes* in Canada”, *International Journal of Food Microbiology* 1996, 30(2–3): 145-156.
- 31 [En ligne], Santé publique Canada, “Fiche technique – *Listeria monocytogenes* – Agent pathogène”, *Gouvernement du Canada* 2012. Disponible en ligne : <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/biosecurite-biosurete-laboratoire/fiches-techniques-sante-securite-agents-pathogenes-evaluation-risques/listeria-monocytogenes.html> (page consultée le 12 juin 2025)
- 32 Tienungoon, S., Ratkowsky, D.A., McMeekin, T.A., Ross, T., “Growth Limits of *Listeria monocytogenes* as a Function of Temperature, pH, NaCl, and Lactic Acid”, *Applied and Environmental Microbiology* 2000, 66(11): 4979-4987.
- 33 Tabi, M., “*Listeria monocytogenes* et femmes enceintes”, *Thèse de doctorat* 2014, Université de Lorraine.
- 34 [En ligne], Adresse URL <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/maladies/listeriose/causes-listeriose.html> (page consultée le 12 juin 2025)
- 35 [En ligne], Adresse URL <https://www.quebec.ca/sante/problemes-de-sante/a-z/listeriose/> (page consultée le 12 juin 2025)
- 36 La listériose, [En ligne], Adresse URL <https://ici.radio-canada.ca/nouvelle/409133/listeriose> (page consultée le 12 juin 2025).
- 37 [En ligne], Adresse URL <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/avis-sante-publique/2024/rappel-boissons-vegetales-refrigerees-eclosion-cas-listeriose.html> (page consulté le 12 juin 2025).
- 38 Swaminathan, B., Gerner-Smidt, P., “The epidemiology of human listeriosis”, *Microbes and Infection* 2007, 9(10): 1236-1243.

- 39 Gupta, V., Biswas, D., Roy, S., “A Comprehensive Review of Biodegradable Polymer-Based Films and Coatings and Their Food Packaging Applications”, *Materials (Basel)* 2022, 15(17): 5899.
- 40 Pereira de Abreu, D.A., Cruz, J.M., Losada, P.P., “Active and Intelligent Packaging for the Food Industry”, *Food Reviews International* 2012, 28(2): 146-187.
- 41 Dıblan, S., Kaya, S., “Antimicrobials used in active packaging films”, *Food and Health* 2018, 4(1): 63-79.
- 42 “Guidance for Industry: Control of *Listeria monocytogenes* in Refrigerated or Frozen Ready-To-Eat Foods; Draft Guidance" Food and Drug Administration (FDA), 2008.
- 43 U.S. Food and Drug Administration (FDA), “Guidance for Industry: Control of *Listeria monocytogenes* in Refrigerated or Frozen Ready-To-Eat Foods; Draft Guidance”, U.S. Department of Health and Human Services 2017. [En ligne], Adresse URL : <https://inspection.canada.ca/contrôles-preventifs/listeria-monocytogenes/fra/1518103693274/1528201904208> (page consultée le 22 septembre 2023)
- 44 Fang, Z., Zhao, Y., Warner, R.D., Johnson, S.K., “Active and intelligent packaging in meat industry”, *Trends in Food Science & Technology* 2017, 61: 60-71.
- 45 Raheem, D., “Application of plastics and paper as food packaging materials - An overview”, *Emirates Journal of Food and Agriculture* 2012, 25(3): 177-188.
- 46 Cutter, C.N., “Microbial Control by Packaging: A Review”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2002, 42(2): 151-161.
- 47 Su, Y., Yang, B., Liu, J., Sun, B., Cao, C., Zou, X., Lutes, R., He, Z., “Prospects for replacement of some plastics in packaging with lignocellulose materials: A brief review”, *BioResources* 2018, 13(2): 4550-4576.

- 48 Ranvare, A., Jadhav, H., “Review on the Current Scenario in Active and Intelligent Packaging Technologies”, *Journal of Food Processing & Technology* 2023, 14(6): 1001024.
- 49 Ma, Y., Yang, W., Xia, Y., Xue, W., Wum, H., Li, Z., Zhang, F., Qiu, B., Fu, C., “Properties and Applications of Intelligent Packaging Indicators for Food Spoilage” *Membranes* 2022, 12(5): 477.
- 50 Mkhari, T., Adeyemi, J.O., Fawole, O.A., “Recent Advances in the Fabrication of Intelligent Packaging for Food Preservation: A Review”, *Processes* 2025, 13: 539.
- 51 Ncube, L.K., Ude, A.U., Ogunmuyiwa, E.N., Zulkifli, R., Beas, I.N., “Environmental impact of food packaging materials: A review of contemporary development from conventional plastics to polylactic acid-based materials”, *Materials* 2020, 13(21): 4994.
- 52 El-Sayed, S.M., Youssef, A.M., “Eco-friendly biodegradable nanocomposite materials and their recent use in food packaging applications: A review”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2019, 59(18): 3054-3067.
- 53 Cheng, J., Gao, R., Zhu, Y., Lin, Q., “Applications of biodegradable materials in food packaging: A review”, *Alexandria Engineering Journal* 2024, 91: 70-83.
- 54 Siracusa, V., Rocculi, P., Romani, S., Dalla Rosa, M., “Biodegradable polymers for food packaging: a review”, *Trends in Food Science & Technology* 2008, 19(12): 634-643.
- 55 Kale, G., Auras, R., Singh, S. P., “Degradation of commercial biodegradable packages under real composting and ambient exposure conditions”, *Journal of Polymer and the Environment* 2006, 14: 317-334.

- 56 Liu, X., Qin, Z., Ma, Y., Liu, H., Wang, X., “Cellulose-based films for food packaging applications: Review of preparation, properties, and prospects”, *Journal of Renewable Materials* 2023, 11(8): 3203-3225.
- 57 Pelton, R., “Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics”, *Trends in Analytical Chemistry* 2009, 28(8): 925-942.
- 58 Anany, H., Chen, W., Pelton, R., Griffiths, M. W., “Biocontrol of *Listeria monocytogenes* and *E. coli* O157:H7 in Meat using Phage Immobilized on Modified Cellulose Membranes”, *Applied and Environmental Microbiology* 2011, 77(18): 6379-6387.
- 59 Hajipour, M.J., Fromm, K.M., Ashkarran, A.A., de Aberasturi, D.J., de Larramendi, I.R., Rojo, T., Serpooshan, V., Parak W.J., Mahmoudi, M., “Antibacterial properties of nanoparticles”, *Trends in Biotechnology* 2012, 30(10): 499-511.
- 60 Vidic, J., “Nanoparticules pour des applications antibactériennes, antifongiques et antivirales” *Techniques de l’Ingénieur* 2013, NM4060 v1.
- 61 Jones, C.M., Hoek, E.M.V., “A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment”, *Journal of Nanoparticle Research* 2010, 12: 1531-1551.
- 62 Peelman, N., Ragaert, P., De Meulenaer, B., Adons, D., Peeters, R., Cardon, L., Van Impe, F., Devlieghere, F., “Application of bioplastics for food packaging”. *Trends in Food Science & Technology* 2013, 32(2): 128-141.
- 63 Xin, L., Ju, Z., Skonieczna, M., Zhou, P.-K., Huang, R., “Nanoparticles-induced potential toxicity on human health: Applications, toxicity mechanisms, and evaluation models”, *MedComm* 2023, 4(4): e327.
- 64 Siedenbiedel, F., Tiller J.C., “Antimicrobial Polymers in Solution and on Surfaces: Overview and Functional Principles”, *Polymers* 2012, 4(1): 46-71.

- 65 Flórez, M., Gutiérrez, T.J., Alvarez, M.V., “Chitosan for food packaging: Recent advances in active and intelligent films”, *Food Hydrocolloids* 2022, 124: 107328.
- 66 Qu, T., Wang, C., Li, Y., Zhang, X., and Zhao, L., “Antibacterial food packaging with chitosan–cellulose blends for food preservation”, *Polymers* 2025, 17(13): 1850.
- 67 Gkika, D., Liakos, E.V., Vordos, N., Kontogoulidou, C., Magafas, L., Bikiaris, D.N., Bandekas, D.V., Mitropoulos, A.C., Kyzas, G.Z., “Cost Estimation of Polymeric Adsorbents”, *Polymers* 2019, 11(5): 925.
- 68 Guinoiseau, E., “Molécules antibactériennes issues d’huiles essentielles : séparation, identification et mode d’action”, *Thèse de doctorat* 2010, Université de Corse-Pasquale Paoli.
- 69 Vergis, J., Gokulakrishnan, P., Agarwal, R.K., Kumar, A., “Essential Oils as Natural Food Antimicrobial Agents: A Review”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2015, 55(10): 1320-1323.
- 70 Al-Nabulsi, A.A., M. Osaili, T.M., Olaimat, A.N., Almasri, W.E., Ayyash, M., Al-Holy, M.A., Jaradat, Z.W., Obaid, R.S., Holley, R.A., “Inactivation of *Salmonella* spp. in tahini using plant essential oil extracts”, *Food Microbiology* 2020, 86: 103338.
- 71 Les huiles essentielles aux propriétés antibactériennes, [En ligne], Adresse URL <https://www.compagnie-des-sens.fr/antibacteriennes-huiles-essentielles/> (page consultée le 10 juillet 2025).
- 72 Alexandra Martins, A., “Les huiles essentielles antibactériennes : exemple du thym (thymus)”, *Sciences pharmaceutiques* 2020, ffdumas-03230057.

- 73 Ultee, A., Bennik, M.H.J., Moezelaar, R., “The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*”, *Applied and Environmental Microbiology Journal* 2002, 68(4): 1561-1568.
- 74 Francezon, N., Stevanovic, T., “Chemical composition of essential oil and hydrosol from *Picea mariana* bark residue”, *BioResources* 2017, 12(2): 2635-2645.
- 75 Borges, M.F.d.A., Lacerda, R.d.S., Correia, J.P.d.A., de Melo, T.R., Ferreira, S.B., “Potential Antibacterial Action of α -Pinene”, *Medical Sciences Forum* 2022, 12: 11.
- 76 Singh, R., Shushni, M.A.M., Belkheir, A., “Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L”, *Arabian Journal of Chemistry* 2011, 8: 322-328.
- 77 [En ligne], Adresse URL : <https://ecommons.cornell.edu/items/d79fbb21-debe-4856-94f1-66145c4120fd>, Baker, B. P., Grant, J. A., & Malakar-Kuenen, R., “Cedarwood Oil Profile: Active Ingredient Eligible for Minimum Risk Pesticide Use”, New York State Integrated Pest Management, Cornell University, Geneva, NY. (2018) (page consultée le 31 octobre 2024).
- 78 Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A.B., Rouabhia, M., Mahdoui, K., Bakhrouf, A., “The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review”, *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* 2007, 21(6): 501-506.
- 79 Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., “Biological Effects of Essential Oils - A Review”, *Food and Chemical Toxicology* 2008, 46: 446-475.
- 80 Kong, F., Hu, Y.M., “Biomolecule immobilization techniques for bioactive paper fabrication”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2012, 403(1): 7-13.

- 81 Ohk, S.H., Koo, O.K., Sen, T., Yamamoto, C.M., Bhunia, A.K., “*Antibody–aptamer functionalized fibre-optic biosensor for specific detection of Listeria monocytogenes from food*”, *Journal of Applied Microbiology* 2010, 109(3): 808-817.
- 82 Peyre, J., “Création de surfaces antibiofilms par greffage covalent de peptides et enzymes antibactériens sur les surfaces de cuivre et de titane”, *Thèse de doctorat* 2012, Université Pierre et Marie Curie.
- 83 Dortu, C., Thonart, P., “Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires”, *Biotechnologie, Agromonie, Société et Environnement* 2009, 13(1): 143-154.
- 84 Tahiri, I., Desbiens, M., Lacroix, C., Kheadr, E., Fliss, I., “Growth of *Carnobacterium divergens* M35 and production of Divergicin M35 in snow crab by-product, a natural-grade medium” *LWT - Food Science and Technology* 2009, 42(2): 624-632.
- 85 Zheng, J., Tang, X., Wu, R., Yan, Q., Tang, H., Luo, J., Niu, S., Qu, Y., Sun, L., “Identification and characteristics of aptamers against inactivated *Vibrio alginolyticus*”, *LWT – Food Science and Technology* 2015, 64: 1138-1142.
- 86 Ye, Z., Chen, H., Weinans, H., van der Wal, B., Rios, J. L., “*Novel aptamer strategies in combating bacterial infections: from diagnostics to therapeutics*”, *Pharmaceutics* 2014, 16(9): 1140.
- 87 Kawacka, I., Olejnik-Schmidt, A., Schmidt, M., Sip, A., “Effectiveness of Phage-Based Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Food Products and Food Processing Environments”, *Microorganisms* 2020, 8(11): 1764.
- 88 Estorninho, M.J., Teixeira, P., “Fighting *Listeria monocytogenes* with Bacteriophages: Biotechnology for Food Safety”, In: Garcia, M.d.G., Cortês, A. (eds) *Blue Planet Law. Sustainable Development Goals Series*. Springer, Cham, 2023.

- 89 Curtright, A.J., Abedon, S.T., “Phage Therapy: Emergent Property Pharmacology”, *Bioanalysis & Biomedicine* 2011, doi:10.4172/1948-593X, S6-002.
- 90 Martínez, B., García, P., Rodríguez, A., “Swapping the roles of bacteriocins and bacteriophages in food biotechnology”, *Current Opinion in Biotechnology* 2019, 56: 1-6.
- 91 Marcó, M.B., Moineau, S., Quiberoni, A., “Bacteriophages and dairy fermentations”, *Bacteriophage* 2012, 2(3): 149-158.
- 92 Refardt, D., “Within-host competition determines reproductive success of temperate bacteriophages”, *The ISME Journal* 2011, 5(9): 1451-1460.
- 93 Chang, R.Y.K., Kwok, P.C.L., Khanal, D., Morales S., Kutter, E., Li, J., Chan, H.K., “Inhalable bacteriophage powders: Glass transition temperature and bioactivity stabilization”, *Bioengineering & Translational Medicine* 2020, 5(2): 10159.
- 94 Twort, F.W., “An investigation on the nature of ultramicroscopic viruses”, *The Lancet* 1915, 186 (4814): 1241-1243.
- 95 D’Hérelle, F., “On an invisible microbe antagonistic to dysentery bacilli”, *Comptes Rendus de l’Académie des Sciences* 1917, 165: 373-5.
- 96 Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., Morris, J.G., “Bacteriophage therapy” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001, 45(3): 649-659.
- 97 Kutter, E., Sulakvelidze, A., “Bacteriophages Biology and applications”, *Livre numérique Google* 2005.
- 98 Duckworth, D.H., Gulig, P.A., "Bacteriophages: potential treatments for bacterial infections", *Biodrugs* 2002, 16(1): 57-62.

- 99 Abedon, S.T., Kuhl, S.J., Blasdel, B.G., Kutter, E.M., “Phage treatment of human infections”, *Bacteriophage* 2011, 1(2): 66-85.
- 100 de Melo, A.G., Levesque, S., Moineau, S., “Phages as friends and enemies in food processing”, *Current Opinion in Biotechnology* 2018, 49:185-190.
- 101 Zhu, Y., Shang, J., Peng, C., Sun, Y., “Phage family classification under Caudoviricetes: A review of current tools using the latest ICTV classification framework”, *Frontiers in Microbiology* 2022, 13:1032186.
- 102 Elbreki, M., Ross, R.P., Hill, C., O’Mahony, J., McAuliffe, O., Coffey, A., “Bacteriophages and Their Derivatives as Biotherapeutic Agents in Disease Prevention and Treatment”, *Journal of Viruses* 2014, Article ID 382539.
- 103 Chevallereau, A., Pons, B.J., van Houte, S., Westra, E.R., “Interactions between bacterial and phage communities in natural environments”, *Nature Reviews Microbiology* 2022, 20: 49-62.
- 104 Dehbi, M., Sansonett, J., Ouellette, M., Moineau, S., “Determination of phage susceptibility as a clinical diagnostic tool”, *Microorganisms* 2022, 10(4): 953.
- 105 Cui, L., Watanabe, S., Miyanaga, K., Kiga, K., Sasahara, T., Aiba, Y., Tan, X.-E., Veeranarayanan, S., Thititanapakorn, K., Nguyen, H.M., Wannigama, D.L., “A Comprehensive Review on Phage Therapy and Phage-Based Drug Development”, *Antibiotics* 2024, 13(9): 870.
- 106 Abedon, S.T., “Bacterial ‘immunity’ against bacteriophages”, *Bacteriophage* 2012, 2(1): 1-5.
- 107 Mizoguchi, K., Morita, M., Fischer, C.R., Yoichi, M., Tanji, Y., Unno, H., “Coevolution of Bacteriophage PP01 and *Escherichia coli* O157:H7 in Continuous Culture”, *Applied and Environmental Microbiology* 2003, 69(1): 170-176.

- 108 Bohannan, B.J.M., Lenski, R.E., “Effect of resource enrichment on chemostat community of bacteria and bacteriophage”, *Ecology* 1997, 78(8): 2303-2315.
- 109 O’Flynn, G., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Coffey, A., “Evaluation of a Cocktail of Three Bacteriophages for Biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7”, *Applied and Environmental Microbiology* 2004, 70(6): 3417-3424.
- 110 Tanji, Y., Shimada, T., Fukudomi, H., Miyanaga, K., Nakai, Y., Unno, H., “*Therapeutic Use of Phage Cocktail for controlling Escherichia coli O157: H7 in Gastro-intestinal Tract of Mice*”, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2005, 100(3): 280-287.
- 111 Alves, D., Cerqueira, M.A., Pastrana, L.M., Sillankorva, S., “Entrapment of a phage cocktail and cinnamaldehyde on sodium alginate emulsion-based films to fight food contamination by *Escherichia coli* and *Salmonella Enteritidis*” *Food Research International* 2020, 128: 108791.
- 112 Moye, Z., Woolston, J., Sulakvelidze, A., “Bacteriophage applications for food production and processing”, *Viruses* 2018, 10(4): 205.
- 113 Cooper, I.R., “A review of current methods using bacteriophages in live animals, food and animal products intended for human consumption”, *Journal of Microbiological Methods* 2016, 130: 38-47.
- 114 Leverentz, B., Conway, W.S., Camp, M.J., Janisiewicz, W.J., Abuladze, T., Yang, M., Saftner, R., Sulakvelidze, A., “Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on Fresh-Cut Produce by Treatment with Lytic Bacteriophages and a Bacteriocin”, *Applied and Environmental Microbiology* 2003, 69(8): 4519-4526.
- 115 Hudson, J.A., Billington, C., Cornelius, A.J., Wilson, T., On, S.L., Premaratne, A., King, N.J., “Use of a bacteriophage to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 on beef”, *Food Microbiology* 2013, 36(1): 14-21.

- 116 Spricigo, D.A., Bardina, C., Cortés, P., Llagostera, M., “Use of a bacteriophage cocktail to control Salmonella in food and the food industry”, *International Journal of Food Microbiology* 2013, 165(2): 169-174.
- 117 Perera, M.N., Abuladze, T., Li, M., Woolston, J., Sulakvelidze, A., “Bacteriophage cocktail significantly reduces or eliminates *Listeria monocytogenes* contamination on lettuce, apples, cheese, smoked salmon and frozen foods”, *Food Microbiology* 2015, 52: 42-48.
- 118 Prabhu, G., Husak, R., Peterson, R., Hagens, S., Iancu, C., Riemer, Y., Engle, R., “Validation of the Effect of Listex P100 Bacteriophage on Survival of *Listeria Monocytogenes*” *Meat and Muscle Biology* 2016, 1(2):117-118.
- 119 Lone, A., Anany, H., Hakeem, M., Aguis, L., Avdjian, A.C., Bouget, M., Griffiths, M.W., “Development of prototypes of bioactive packaging materials based on immobilized bacteriophages for control of growth of bacterial pathogens in foods”, *International Journal of Food Microbiology* 2016, 217: 49-58.
- 120 Guenther, S., Huwyler, D., Richard, S., Loessner, M.J., “Virulent Bacteriophage for Efficient Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in Ready-To-Eat Foods”, *Applied and Environmental Microbiology* 2009, 75(1): 93-100.
- 121 Nabergoj, D., Modi, P., Podgornik, A., “Effect of bacterial growth rate on bacteriophage population growth rate” *Microbiologyopen* 2018, 7(2): e00558.
- 122 Fister, S., Fuchs, S., Stessl, B., Schoder, D., Wagner, M., Rossmanith, P., “Screening and characterisation of bacteriophage P100 insensitive *Listeria monocytogenes* isolates in Austrian dairy plants”, *Food Control* 2016, 59: 108-117.
- 123 Oechslin, F., “Resistance Development to Bacteriophages Occurring during Bacteriophage Therapy”, *Viruses* 2018, 10: 351.

- 124 Lenski, R.E., Levin, B.R. “Constraints on the Coevolution of Bacteria and Virulent Phage: A Model, Some Experiments, and Predictions for Natural Communities”, *The American Naturalist* 1985, 125(4): 585-602.
- 125 Principi, N., Silvestri, E., Esposito, S., “Advantages and Limitations of Bacteriophages for the Treatment of Bacterial Infections”, *Frontiers in Pharmacology* 2019, 10: 513.
- 126 Cui, H., Yuan, L., Lin, L., “Novel chitosan film embedded with liposome-encapsulated phage for biocontrol of *Escherichia coli* O157: H7 in beef”, *Carbohydrate Polymers* 2017, 177: 156-164.
- 127 Cademartiri, R., Anany, H., Gross I., Bhayani, R., Griffiths, M., Brook, M. A., “Immobilization of bacteriophages on modified silica particles”, *Biomaterials* 2010, 31(7): 1904-1910.
- 128 Bennett, A.R., Davids, F.G.C., Vlahodimou, S., Banks, J.G., Betts, R.P., “The use of bacteriophage-based systems for the separation and concentration of *Salmonella*”, *Applied and Environmental Microbiology* 1997, 83(2): 259-65.
- 129 Hosseinidoust, Z., Van de Ven T.G.M., Tufenkji, N., “Bacterial Capture Efficiency and Antimicrobial Activity of Phage-Functionalized Model Surfaces”, *Langmuir* 2011, 27(9): 5472-5480.
- 130 Kamali, S., Yavarmanesh, M., Najafi, M.B.H., Koocheki, A., “Development of whey protein concentrate/pullulan composite films containing bacteriophage A511: functional properties and anti-Listerial effects during storage”, *Food Packaging and Shelf Life* 2022, 33: 100902.
- 131 Wagh, R.V., Priyadarshi, R., Rhim, J.-W. “Novel bacteriophage-based food packaging: An innovative food safety approach”, *Coatings* 2023, 13(3): 609.

- 132 Radford, D., Guild, B., Strange, P., Ahmed, R., Lim, L.-T., Balamurugan, S. “Characterization of antimicrobial properties of *Salmonella* phage Felix O1 and *Listeria* phage A511 embedded in xanthan coatings on poly(lactic acid) films”, *Food Microbiology* 2017, 66: 117-128.
- 133 Wagh, R.V., Priyadarshi, R., Khan, A., Riahi, Z., Packialakshmi, J.S., Kumar, P., Rindhe, S.N., Rhim, J.-W. “The role of active packaging in the defense against foodborne pathogens with particular attention to bacteriophages”, *Microorganisms* 2025, 13(2): 401.
- 134 O’Connell, L., Marcoux, P.R., Roupioz, Y., “Strategies for Surface Immobilization of Whole Bacteriophages: A Review”, *ACS Biomaterials Science & Engineering* 2021, 7(6): 1987-2014.
- 135 Rindhe, S., Pan, Y., Yang, Q., Zhang, Y., “Application of Bacteriophages in Biopolymer-Based Functional Food Packaging Films”, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2024, 23(4): 8167-8195.
- 136 Zwilling, J.D., Whitham, J., Zambrano, F., Pifano, A., Grunden, A., Jameel, H., Venditti, R., Gonzalez, R., “Survivability of *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14208) and *Listeria innocua* (ATCC 51742) on lignocellulosic materials for paper packaging”, *Heliyon* 2023, 9: e14122.
- 137 Jabrane, T., “Méthodologies de fabrication de papier bioactif”, *Thèse de doctorat en sciences et génie des matériaux lignocellulosiques* Août 2014, Université du Québec à Trois-Rivières.
- 138 Jabrane, T., Dubé, M., Griffiths, M.W., Mangin, P.J., “Towards a commercial production of phage-based bioactive paper”, *Journal of Science & Technology for Forest Products and Processes* 2011, 1(1): 6-13.

- 139 Hamzeh, Z., “Étude sur l’utilisation de cocktail de bactériophages pour l’élaboration de surfaces antibactériennes”, *Mémoire de Maitrise* en sciences et génie des matériaux lignocellulosiques Décembre 2014, Université du Québec à Trois-Rivières.
- 140 ISO. (2012). Paper and board - Determination of grammage (ISO 536:2012). International Organization for Standardization.
- 141 ISO. (2016). Paper, board, pulp and related terms - Vocabulary - Part 4: Paper and board properties and characteristics (ISO 4046-4:2016). International Organization for Standardization.
- 142 ISO. (2014). Paper and board - Determination of water absorptiveness - Cobb method (ISO 535:2014). International Organization for Standardization.
- 143 Mazega, B., El Achaby, M., Kassab, Z., Essamlali, Y., Snik, F., Zahouily, M., “Improving the barrier properties of paper to moisture, air, and grease with nanocellulose-based coating suspensions”, *Nanomaterials*, 2022, 12(20): 3675.
- 144 Hatat-Fraile, M.M., “ Etude des méthodes d'élaboration et de la mise en oeuvre de photocatalyseurs pour le traitement de la micro-pollution bio-réfractaire dans l'eau ”, *Thèse de doctorat* en Sciences des Procédés – Sciences des Aliments Août 2013, Université Montpellier II.
- 145 Liao, R., Shi, L., Zhou, Yi., Jia, C., Feng, J., Zhang, W., He, J., “Synthesis, physicochemical property, and antibacterial activity of novel nonionic 1-alkylaminoglycerol Gemini surfactants”, *Arabian Journal of Chemistry* 2023, 16(10): 105111.
- 146 Mangin, F., “ Synthèses de nouveaux tensioactifs ecocompatibles. Étude de synthèses catalytiques et radicalaires en milieu micellaire ”, *Thèse de doctorat* en Génie des Procédés Industriels et du développement durable, Octobre 2015, Université de Technologie de Compiègne.

- 147 Ramezani, N., Rashidi, F., Azar, P.A., Rezazadeh, S., Mohammadi, A.H., “Structure-based modeling of critical micelle concentration (CMC) of anionic surfactants in brine using intelligent methods”, *Scientific Reports* 2023, 13: 11522.
- 148 Kriegel, C., Festag, M., Kishore, R.S.K., Roethlisberger, D., Schmitt, G., “Pediatric Safety of Polysorbates in Drug Formulations” *Children* 2019, 7(1): 1.
- 149 Chassaing, B., Koren, O., Goodrich, J.K., Poole, A.C., Srinivasan, S., Ley, R.E., Gewirtz, A.T., “Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome”, *Nature* 2015, 519: 92-96.
- 150 [En ligne], Adresse URL : <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/aliments-nutrition/salubrite-aliments/additifs-alimentaires/listes-autorises/4-agents-emulsifiants-gelifiants-stabilisants-epaississants.html>, “Liste des agents émulsifiants, gélifiants, stabilisants ou épaississants autorisés (Listes des additifs alimentaires autorisés)” (page consultée le 20 juin 2020).
- 151 Bide, Y., Arab Fashapoyeh, M., Shokrollahzadeh, S., “Structural investigation and application of Tween 80–choline chloride self-assemblies as osmotic agent for water desalination”, *Scientific Reports* 2024, 14(1): 1–15.
- 152 Sloup, R.E., Cieza, R.J., Needle, D.B., Abramovitch, R.B., Torres, A.G., Waters, C.M., “Polysorbates prevent biofilm formation and pathogenesis of *Escherichia coli* O104:H4” *Biofouling* 2016, 32(9): 1131-1140.
- 153 Vernhes, P., Bloch, J.F., Blayo, A., Pineaux, B., “Effect of calendering on paper surface micro-structure: A multi-scale analysis”, *Journal of Materials Processing Technology* 2009, 209(11): 5204-5210.
- 154 Nicasy, R.J.K., Waldner, C., Erich, S.J.F. Adan, O.C.G., Hirn, U., Huinink, H. P., “Liquid penetration in hydrophobised cellulose based sheets”, *Cellulose* 2024, 31: 5527-5544.

- 155 Hubbe, M.A., "Paper's resistance to wetting - A review of internal sizing chemicals and their effects", *BioResources* 2006, 2(1): 106-145.
- 156 Benkaddour, A., "Production de nanocellulose et modification chimique de sa surface par des agents hydrophobes", *Thèse de doctorat* en sciences et génie des matériaux lignocellulosiques, février 2014, Université du Québec à Trois-Rivières.
- 157 Kumar, S., Chauhan, V.S., Chakrabarti, S.K., "Separation and analysis techniques for bound and unbound alkyl ketene dimer (AKD) in paper: A review", *Arabian Journal of Chemistry* 2016, 9(2): 1636-1642.
- 158 Le Goué, E., "Utilisation de composés biosourcés pour la conception de papiers à haute résistance à l'eau et à propriétés antifongiques", *Thèse de doctorat* en chimie des polymères, octobre 2019, Université de Bordeaux.
- 159 Lai, T.T., Pham, T.T.H., van Lingem, M., Desaulniers, G., Njamen, G., Tolnai, B., Jabrane, T., Moineau, S., Barnabé, S., "Development of Antimicrobial Paper Coatings Containing Bacteriophages and Silver Nanoparticles for Control of Foodborne Pathogens". *Viruses* 2022, 14: 2478.
- 160 Loessner, M.J., Busse, M., "Bacteriophage Typing of *Listeria* Species", *Applied and Environmental Microbiology* 1990, 56(6): 1912-1918.
- 161 Anany, H., Brovko, L., El Dougdoug, N.K., Sohar, J., Fenn, H., Alasiri, N., Jabrane, T., Mangin, P.J., Ali, M.M., Kannan, B., Filipe, C.D.M., Griffiths, M.W., "Print to detect: a rapid and ultrasensitive phage-based dipstick assay for foodborne pathogens", *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2017, 410: 1217-1230.
- 162 Shurtleff, A.C., Bloomfield, H.A., Mort, S., Orr, S.A., Audet, B., Whitaker, T., Richards, M.J., Bavari, S., "Validation of the Filovirus Plaque Assay for Use in Pre-clinical Studies", *Viruses* 2016, 8: 113.

- 163 Mascarenhas, L.A.B., dos Santos, L.M.C., Oliveira, F. et al. "Evaluation of the microbial reduction efficacy and perception of use of an ozonized water spray disinfection technology", *Scientific Reports* 2022, 12: 13019.
- 164 ISO. (2020). ISO 5636-3: Paper and board - Determination of air permeance and air resistance (medium range) - Part 3: Bendtsen method. ISO.
- 165 Bubonja-Šonje, M., Knežević, S., Abram, M., "Challenges to antimicrobial susceptibility testing of plant-derived polyphenolic compounds", *Arh Hig Rada Toksikol.* 2020, 71(4): 300-311.
- 166 Labrie, S., Samson, J., Moineau, S., "Bacteriophage resistance mechanisms", *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8: 317-327.
- 167 Hyman, P., Abedon, S.T., "Bacteriophage host range and bacterial resistance", *Advances in Applied Microbiology* 2010, 70: 217-248.
- 168 Seed, K.D., "Battling phages: How bacteria defend against viral attack", *PLOS Pathogens*, 2015, 11(6): e1004847.
- 169 Rabinovitcha, A., Aviram, I.A., Zaritsky, A., "Bacterial debris-an ecological mechanism for coexistence of bacteria and their viruses", *Journal of Theoretical Biology* 2003, 224(3): 377-383.
- 170 Levin, B.R., Bull, J.J., "Population and evolutionary dynamics of phage therapy", *Nature Reviews Microbiology* 2004, 2(2): 166-173.
- 171 Richter, L., Księżarczyk, K., Paszkowska, K., Janczuk-Richter, M., Niedziółka-Jönsson, J., Gapiński, J., Łoś, M., Hołyst, R., Paczesny, J., "Adsorption of bacteriophages on polypropylene labware affects the reproducibility of phage research", *Scientific Reports* 2021, 11(1): 7387.

- 172 Zhang, Y., Zhang, H., Ghosh, D., “The Stabilizing Excipients in Dry State Therapeutic Phage Formulations”, *AAPS PharmSciTech* 2020, 21(4): 133.
- 173 Połaska, M., Sokołowska, B., “Bacteriophages-a new hope or a huge problem in the food industry”, *AIMS Microbiology* 2019, 5(4): 324-346.
- 174 Rajnovic, D., Munoz-Berbel, X., Mas. J., “Fast phage detection and quantification: An optical density-based approach”, *PLOS ONE* 2019, 14(5): 0216292.
- 175 Jabrane, T., Laloi, M., Dubé, M., Mangin, P.J., “Printing and coating of T4 phage based bioactive paper”, *Advances in Printing and Media Technology* 2010, 37: 351-358.

Annexe : Protocole de préparation de culture de *L. monocytogenes* et des phages

Matériel

Glycérol (30 %) ;
Eau saline (0,85 %) ;
CaCl₂ (préparer et stériliser une solution de stock de 2M) ;
MgCl₂ : 1M ;
Produit virucide : PowerQuat (Sanimart) ;
Éthanol (70 %) ;
Tampon SM ;
Milieu de culture TB, TA.

Appareil

Incubateur – agitateur ;
Incubateur (37°C) ;
Bain-marie (50 – 55°C) ;
Centrifugeuse ;
Autoclave ;
Microonde ;
Micropipettes (5 ml, 1 ml, 100 µl, 20 µl) avec embouts à filtre ;
Seringues stériles ;
Filtre stérile de 0,45 µm et de 0,22 µm ;
Tubes en verre avec bouchons ;
Tubes cryogéniques de stockage de 2 ml ;
Boîtes de Petri stériles ;
Fioles Erlenmeyer de 250 et 500 ml ;
Bouteilles Pyrex de 250 ml et de 500 ml.

Procédure pour *L. monocytogenes* ATCC 19115 sérotype 4 b

1. Rafraîchissement de la souche à partir du stock d'origine

- Préparer 4 tubes contenant 5 ml de milieu Bouillon Trypticase (TB) et les stériliser à 121°C pendant 15 minutes ;
- Inoculer la souche à partir de la culture lyophilisée en poudre dans les tubes ;
- Incuber les tubes à 30°C avec une agitation à 120 tours par minute (rpm) pendant 18 heures.
- Effectuer le comptage sur gélose TA afin de calculer la concentration bactérienne :
 - Réaliser une série de dilutions décimales jusqu'au 10^{-8} de la culture de *L. monocytogenes* dans des tubes contenant de l'eau saline à 0,85 % ou du milieu de culture TB.
 - Étaler 0,1 ml des échantillons dilués sur des boîtes de Petri contenant de la gélose.
 - Incuber les boîtes de Petri à 30°C pendant 24 heures et procéder au comptage des colonies.

2. Cinétique de croissance de la souche

- Préparer deux fioles de 500 ml contenant 100 ml du milieu TB et les stériliser à 121°C pendant 15 minutes ;
- Inoculer les fioles avec : une colonie de la souche à partir de boîte de Petri ou 1 ml de la culture à partir de la culture bactérienne dont la concentration cellulaire est autour de 10^5 CFU/ml ;
- Incuber les fioles à 30°C (agitation 120 rpm pendant 48 heures) ;
- Prélever 5 ml pendant 48 heures (0, 3, 6, 9, 12, 24 et 48 heures) ;
- Faire le décompte sur gélose et mesurer DO (600 nm) des échantillons pour établir la courbe de concentration cellulaire et DO en fonction du temps. Les résultats de décompte permettront de déterminer le temps de croissance maximale (phase exponentielle).

3. Stockage de culture

- Préparer deux fioles de 500 ml contenant 100 ml du milieu TB et les stériliser à 121°C pendant 15 minutes ;
- Inoculer les fioles avec une colonie de la souche à partir d'une boîte de Petri ; ou à partir de la culture bactérienne en liquide dont la concentration cellulaire est autour de 10^5 CFU/ml (diluer la culture avec de l'eau saline si nécessaire)
- Incuber les fioles à 30° C, agitation 120 rpm pendant 18 heures ;
- Prendre chaque 1 ml de la culture dans des tubes de microcentrifugeuse (ou des tubes cryogéniques) et centrifuger les tubes à 4°C pendant 10 minutes. Enlever le surnageant et suspendre le culot dans 1 ml du milieu TB et ajouter 1 ml de glycérol de 15 % ;
- Conserver la culture dans les tubes à -20°C à court terme et à -80°C à long terme.

Procédure pour la préparation des phages

1. Conservation des phages à partir du stock

- Préparer un milieu de TB contenant 15 % glycérol ;
- Mélanger des phages et du milieu à ratio de 50:50 v/v dans des tubes cryogéniques de stockage ;
- Conserver les phages à -20°C pour une utilisation à court terme et à -80°C pour une utilisation à long terme.

2. Amplification de phage à partir du stock d'origine

- Préparer deux fioles de 500 ml contenant 100 ml du milieu TB et les stériliser à 121°C pendant 15 minutes.
- Ajouter du CaCl_2 stérilisé par filtration utilisant un filtre de 0,22 μm (concentration finale de 1,25 mM dans les fioles) ;
- Préparer une culture fraîche de *L. monocytogenes* : décongeler deux tubes cryogéniques contenant la culture conservée, transférer la culture dans chaque fiole et incuber à 30°C pendant 18 heures agitation 120 rpm ;

- Transférer une quantité de phages dans les fioles au ratio phages- *L. monocytogenes* de 10:1 ;
- Incuber les fioles à 30°C (agitation 120 rpm) pendant 18 heures et faire le suivi de turbidité de la culture (vérifier la lyse par la mesure de DO de la culture) ;
- Filtrer la culture avec filtre de 0,45 µm et garder la solution des phages déjà préparée à 4°C pour l'utilisation prochaine.

3. Énumération de phage à partir de l'étape d'amplification

- Préparer 500 ml de milieu d'Agar TA dans une fiole de 1 L et le stériliser.
- Distribuer environ 20 ml de milieu d'Agar dans chaque boîte de Petri.
- Préparer 300 ml de milieu TB en ajoutant 0,75 % d'Agar (TB semi-solide) dans une bouteille en Pyrex et le stériliser. Ajouter du CaCl₂ stérilisé par filtration à une concentration finale de 1,25 mM dans la bouteille.
- Distribuer 3 ml de TB semi-solide dans des tubes stériles.
- Réaliser une série de dilutions décimales des phages à partir du liquide filtré de l'étape d'amplification, avec de l'eau saline à 0,85 % ou dans le milieu de culture.
- Préparer une culture fraîche de *L. monocytogenes* : décongeler un tube cryogénique de culture conservée, transférer la culture dans une fiole de 500 ml contenant 100 ml de TB, et incuber à 30°C pendant 18 heures avec une agitation à 120 rpm (vérifier la concentration cellulaire par la mesure de la densité optique).
- Estimer la concentration des phages en utilisant la méthode de la double couche d'Agar par goutte:
 - Préparer 500 ml de milieu TB en ajoutant 0,75 % d'Agar (TB semi-solide) dans une fiole de 1 L, puis stériliser et refroidir à 50°C.
 - Distribuer 3 ml de TB semi-solide dans des tubes stériles.
 - Inoculer les tubes (un à la fois) avec 0,1 ml de la culture de *L. monocytogenes* et bien mélanger.
 - Verser le contenu des tubes sur des boîtes de Petri contenant déjà du TA et laisser la gélose durcir.

- Distribuer 10 μ l de chaque dilution sur la gélose de Petri et laisser reposer pendant 20 minutes pour permettre le séchage des gouttes.
 - Incuber les boîtes de Petri à 30°C pendant 18 heures et observer l'apparition des plages de lyse pour estimer la concentration de phages ;
-
- Effectuer le comptage des phages en utilisant la méthode de la double couche d'Agar :
 - Ajouter 0,1 ml de chaque dilution de phage et 0,1 ml de la culture de *L. monocytogenes* dans des tubes de TB semi-solide, puis mélanger légèrement ;
 - Verser les mélanges dans des boîtes de Petri, puis agiter manuellement afin de garantir une distribution homogène. ;
 - Incuber les boîtes de Petri à l'envers à 30°C et surveiller l'apparition des zones de lyse, indiquant la présence de phages.