

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN SCIENCES ET GÉNIE DES MATÉRIAUX  
LIGNOCELLULOSSIQUES

PAR  
ZEINAB HAMZEH

ÉTUDE SUR L'UTILISATION DE COCKTAIL DE BACTÉRIOPHAGES POUR  
L'ÉLABORATION DE SURFACES ANTIBACTÉRIENNES.

DÉCEMBRE 2014

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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 ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## REMERCIEMENTS

---

Je remercie tout d'abord le professeur Patrice J. Mangin pour m'avoir accueilli dans son laboratoire de recherche et m'avoir ainsi permis d'approfondir et d'appliquer sur un sujet captivant et d'actualité les connaissances acquises durant mes études.

Je remercie également le Centre de Recherche sur les Matériaux Lignocellulosiques (CRML), l'Université du Québec à Trois-Rivières pour m'avoir permis de réaliser mon stage.

Je remercie également le réseau Sentinel du CRSNG, et plus particulièrement professeur Robert H. Pelton, directeur scientifique, professeur Mansel W. Griffiths, et Monsieur Hani Anany, tous deux du Centre de Recherche Canadien de Sécurité Alimentaire (CRIFS), université de Guelph, pour m'avoir fournir les phages utilisés dans cette étude.

Je tiens à remercier Madame Micheline Boulianne du département de chimie-biologie à l'UQTR pour ses aides et ses conseils en matière de microbiologie.

Je tiens aussi à remercier mes collègues du laboratoire de CRML, notamment Fabrice Roussiere, Tarik Jabrane, Gabriel St Pierre Lemieux, Salome Piault et Clément Villemont pour leur soutien et leur disponibilité, ainsi que tous ceux que j'aurai pu oublier. Je remercie aussi, et plus spécifiquement, Agnès Lejeune, pour son aide lors des analyses en microscopie.

Finalement, je remercie le Conseil de Recherche en Sciences naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) et les partenaires industriels du réseau Sentinel pour leur financement.

Je tiens à terminer par remercier ma famille pour le soutien et le support qu'elle m'a offert.

Août 2014

## RÉSUMÉ

---

Au cours des dernières années, l'intérêt des consommateurs pour les aliments « prêts à manger » et « faciles à consommer » a augmenté les risques quotidiens de faire face à des maladies d'origine alimentaire. En effet, les surfaces des aliments peuvent parfois être contaminées par des bactéries pathogènes avec les risques de maladie qui en découlent. Pour lutter contre ces contaminations, l'utilisation d'un emballage alimentaire antibactérien pourrait être une solution.

Récemment, avec l'augmentation de taux des bactéries résistantes aux antibiotiques, les chercheurs font de plus en plus recours à d'autres agents antibactériens. Parmi ceux-ci, les phages représentent un agent bioactif naturel extrêmement efficace. La possibilité de fixer ces agents en surface des matériaux tels que les papiers, utilisés pour l'élaboration des emballages, pourrait servir à y ajouter des propriétés antibactériennes.

Parmi les emballages alimentaires existants, les papiers présentent des nombreux, et probablement les meilleurs avantages : ils sont de sources renouvelables (fibre de bois ou autre), biodégradables, non dispendieux, économique à produire, largement répandus, etc..... Un autre avantage du papier réside en la possibilité d'adsorber les phages en surface pour le rendre antibactérien. Récemment, les chercheurs du CRML ont montré que l'adsorption de phages en surface de papier permet de le rendre bioactif. Lorsqu'un papier modifié par des phages retenus en surface est mis en contact avec un tapis bactérien, une zone de lyse, résultante de la destruction des bactéries, est observée. Bien que les bactéries aient la possibilité de développer des résistances contre les phages, cette résistance est plus difficile à mettre en place que celle développée contre les antibiotiques : les phages ayant eux-aussi la possibilité de muter. D'autre part, l'utilisation d'un cocktail de phages, soit plusieurs types de phages en combinaison, ciblant un seul et même type de bactérie peut servir à diminuer l'effet

de cette résistance. Un autre avantage de l'utilisation d'un cocktail de phages ciblant alors plusieurs bactéries, vient de la possibilité de lutter contre plusieurs familles de bactéries en même temps.

Le présent travail cible plus spécifiquement l'étude de la dynamique de croissance de la zone de lyse lors de l'utilisation d'un cocktail de phages. Pour ce faire, il est divisé en trois parties.

Une première partie est dédiée à l'ensemencement des bactéries, à la préparation d'un tapis bactérien et à la préparation de phages. Nous avons utilisé des bactéries non-pathogènes de type *E. coli* B. Après la détermination de la concentration de souche bactérienne, nous avons utilisé la méthode de la double couche d'agar. Deux familles de phages (*T4* et *EcomAG10*) à plusieurs concentrations ont été préparées. Les phages ont été utilisés seuls et en cocktail (mélange).

La deuxième partie porte sur l'étude de l'efficacité de phages, soit seuls ou en cocktail, pour tuer et/ou limiter la prolifération des bactéries. Une étude de la croissance de la zone de lyse en fonction du temps, directement sur boîte de Petri, est présentée dans tous les cas, phages seuls (1 type) ou en cocktail (2 types). Nous avons constaté que les deux phages individuellement ainsi que le cocktail sont capables de détruire les souches d'*E. coli* B. Néanmoins, nous avons observé que les bactéries *E. coli* B développent une résistance contre les phages *T4*. Cette résistance n'a pas été constatée dans le cas de phages *EcomAG10* et du cocktail de phages. De plus, les aires de la zone de lyse de phages *T4* étaient plus grandes que celle de phages *EcomAG10*. En ce qui concerne le cocktail, les aires donnaient des valeurs intermédiaires. Nous avons montré que le temps d'apparition et l'aire de la zone de lyse dépendent d'une manière significative de la concentration de phages utilisée. Pour des concentrations élevées, le temps d'apparition est plus rapide. Dans tous les cas, une apparition d'un plateau de l'aire de lyse a été observée à partir de 8 heures.

La troisième partie consiste à appliquer les phages, seuls ou en cocktail, sur des papiers afin de préparer des papiers bioactifs à base de phages. Vu que les orientations et les charges retenues en surface influencent les interactions entre les phages et les bactéries, *i.e.* les propriétés bioactives, des modifications des charges de surface du papier par ajout de l'amidon cationique, ajout de polydopamine, et la modification de la porosité de surface par calandrage du papier sont aussi effectués avant l'application de phages. L'étude de l'influence de chaque modification sur l'efficacité antibactérienne ainsi que sur la croissance de la dynamique de la

zone de lyse est ainsi exploitée. Nous avons constaté que les phages *EcomAG10* sont globalement plus efficaces que les phages *T4*. L'utilisation d'un cocktail de phages améliore significativement l'efficacité des papiers. La modification de la charge de surface des fibres de cellulose apporte une légère augmentation de la zone de lyse par rapport au papier témoin. Le calandrage en fonction de la rétention des phages en surface donne globalement de meilleurs résultats que les modifications des charges de surface.

Le cocktail de phages, associé à un papier calandré, résulte en une bioactivité largement supérieure à tous les autres cas étudiés. Il semble que l'utilisation d'un cocktail de phages puisse éviter l'apparition des bactéries résistantes en plus d'offrir la possibilité de lutter contre plusieurs bactéries en même temps.

#### **Mots clés**

Papier bioactif – Bactérie *Escherichia coli B* – Bactériophages *T4* et *EcomAG10* – Zone de lyse – Surface antibactérienne.

# TABLE DES MATIÈRES

---

<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>11</b>
1.1.    INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	11
1.2.    PROBLEMATIQUE GENERALE: .....	11
1.3.    APPROCHE DE PROJET (SENTINEL): EMBALLAGES ANTIBACTÉRIENS .....	13
1.4.    OBJECTIF DE PROJET DE MAITRISE .....	13
<b>2. ETUDE BIBIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>15</b>
2.1.    GÉNÉRALITÉS:.....	15
2.2.    LES BACTERIOPHAGES .....	17
2.2.1. <i>Définition</i> .....	17
2.2.2. <i>Classification</i> .....	17
2.2.3. <i>Sources</i> .....	18
2.2.4. <i>Historique</i> .....	18
2.2.5. <i>Comparaison phages-antibiotiques</i> .....	20
2.2.6. <i>Limites d'utilisation de phages contre les bactéries</i> .....	21
2.2.7. <i>Les phages de l'étude : T4 et EcomAG10</i> .....	23
2.3.    DYNAMIQUE DE L'ACTION DE PHAGES .....	25
2.3.1. <i>Interaction phages bactéries</i> .....	25
2.3.2. <i>Le cas de phages T4</i> .....	26
2.3.3. <i>Études bibliographique de la dynamique</i> .....	30
2.3.4. <i>Vers des surfaces bioactives</i> .....	32
<b>3. MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>35</b>
3.1.    CULTURES BACTERIENNES .....	35
3.1.1. <i>Préparation de TSB</i> .....	35
3.1.2. <i>Préparation de TSA</i> .....	35
3.1.3. <i>Préparation de la culture bactérienne</i> .....	36
3.1.4. <i>Détermination de la concentration de la culture bactérienne</i> .....	36
3.1.5. <i>Formation d'un tapis bactérien (Double couche agar)</i> .....	37
3.2.    BACTERIOPHAGES.....	38
3.2.1. <i>Productions</i> .....	38
3.2.2. <i>Dilution de phages</i> .....	38
3.2.3. <i>Détermination de la concentration de phages</i> .....	38
3.3.    DETERMINATION DE L'EFFICACITE ANTIBACTÉRIENNE.....	39
3.3.1. <i>Ensemencement direct de phages</i> .....	40
3.3.2. <i>Adsorption de phages sur papiers</i> .....	41
3.3.1. <i>Caractérisation des papiers</i> .....	44
<b>4. RESULTATS &amp; DISCUSSIONS .....</b>	<b>47</b>
4.1.    CARACTERISATION DES BACTERIES: .....	47

4.2.	CONCENTRATION DES BACTERIES.....	48
4.3.	CONCENTRATION DES PHAGES.....	48
4.4.	ZONE DE LYSE SANS PAPIER.....	48
4.4.1.	<i>Efficacité des phages.....</i>	48
4.4.2.	<i>Dynamique de la zone de lyse: le cas de phages T4.....</i>	50
4.4.1.	<i>Dynamique de la zone de lyse: le cas de phages EcomAG10.....</i>	54
4.4.2.	<i>Comparison T4 et EcomAG10:.....</i>	55
4.4.3.	<i>Dynamique de la zone de lyse: le cas de cocktail de phages (T4 et EcomAG10) .....</i>	55
4.5.	ZONE DE LYSE AVEC PAPIER .....	58
4.5.1.	<i>Influence de la concentration de phages:.....</i>	59
4.5.2.	<i>Analyse et discussion.....</i>	65
<b>CONCLUSIONS .....</b>		<b>66</b>

## LISTES DES FIGURES

---

Figure 1 : Évolution du nombre de documents scientifiques portant sur les Phages et l'alimentation (Food) en fonction de l'année (données obtenues à partir de Scopus).....	20
Figure 2 : Image d'un phage T4.....	23
Figure 3 : Représentation schématique des trois parties du phage T4.....	24
Figure 4 : Cycle lytique du phage T4 [34] .....	27
Figure 5 : Représentation de l'infection d'une bactérie par un phage T [34]. .....	27
Figure 6 : Représentation de la réPLICATION de l'ADN virale [34].....	29
Figure 7 : Représentation du ribosome décryptant l'information génétique [34]. .....	29
Figure 8 : Image inspirée de Levin et al. [39] représentant la coexistence de phages et de bactéries en fonction du temps (les points au dessus représentent les phages).....	31
Figure 9 : Comparaison schématique d'une a) adsorption arbitraire de phages et b) adsorption orientée de phages sur une surface parfaitement plane.....	33
Figure 10 : Colonies de bactéries dans une boîte de Petri contenant le TSA comme milieu de culture.....	36
Figure 11 : Illustration schématique de la formation de la double couche utilisée pour le test antibactérien. ....	37
Figure 12 : Illustration schématique de la dilution de phages.....	38
Figure 13 : Image des zones de lyse sur une boîte de Petri contenant un mélange phages-bactéries utilisé pour déterminer la concentration de phages.....	39
Figure 14 : Illustration schématique de la détermination de l'aire de la zone de lyse d'un tapis bactérien, par de phages, sur une boîte de Petri. ....	40
Figure 15 : Schéma de l'orientation optimale de phages sur le papier. ....	41
Figure 16 : Formette anglaise (1) et presse (2).....	43
Figure 17 : Image des bactéries obtenues par le microscope optique. ....	47
Figure 18 : Images de la zone de lyse de phages a) T4, b) EcomAG10 et c) cocktail de phages après 8 heures. ....	49
Figure 19 : Analyse par microscopie électronique à transmission du tapis bactérien (a) et de la zone de lyse (b et c).....	50
Figure 20 : Image de la croissance de la zone de lyse qui montre la présence de deux zones, zone interne (foncée) et zone externe (claire). ....	50
Figure 21 : Variation de la zone de lyse en fonction du temps pour différentes concentrations de phages T4.....	51

Figure 22 : Variation de la zone de lyse totale (zones claire et foncée) en fonction du temps pour différentes concentrations de phages T4.....	52
Figure 23 : Image de la disparition de la zone de lyse après une semaine de contact entre les phages et le tapis bactérien.....	53
Figure 24 : Images obtenues par un microscope optique des a) bactéries <i>E. coli</i> et b) des bactéries résistantes qui envahissent la zone de lyse initiale. ....	53
Figure 25 : Variation de la zone de lyse (zone totale) en fonction du temps pour différentes concentrations de phages EcomAG10.....	54
Figure 26 : Variation de la zone de lyse en fonction du temps pour différentes concentrations de cocktail de phages.....	56
Figure 27 : Variation de l'aire de la zone de lyse en fonction du temps pour différentes concentrations de cocktail de phages pour une longue durée. ....	57
Figure 28 : Comparaison de l'aire de la zone de lyse entre les phages seuls et en cocktails pour une concentration de $10^8$ ufp/mL et un temps de 2 heures.....	58
Figure 29 : Variation de l'aire de la zone de lyse pour un papier de référence modifié par les phages T4, EcomAG10 et un cocktail de phages.....	60
Figure 30 : Différents papiers bioactifs à base de phage T4 a) Papier de référence b) Papier modifié avec de l'amidon cationique c) Papier modifié avec de polydopamine d) Papier calandré. ....	61
Figure 31 : Variation de l'aire de la zone de lyse pour les phages T4 pour trois surfaces de papiers (papier de référence, papier + amidon et papier calandré). ....	62
Figure 32 : Différents papiers bioactifs à base de phages EcomAG10 a) Papier de référence b) Papier modifié avec de l'amidon cationique c) Papier modifié avec de polydopamine d) Papier calandré. ....	63
Figure 33 : Variation de l'aire de la zone de lyse pour les phages EcomAG10 pour quatre papiers : papier de référence, papier + amidon, papier + polydopamine et papier calandré). ...	63
Figure 34 : Images des zones de lyse pour des papiers modifiés avec un cocktail de phages de T4 et d'EcomAG10. a) papier de référence, b) papier + amidon cationique, c) papier + polydopamine et c) papier calandré. ....	64
Figure 35 : Variation de l'aire de la zone de lyse pour le cocktail de phages pour quatre papiers (papier de référence, papier + amidon, papier + polydopamine, et papier calandré). ....	64
Figure 36 : Comparaison des aires de la zone de lyse pour l'ensemble des cas étudiés après 22 heures. ....	65

## LISTE DES TABLEAUX

---

Tableau 1. Les bactéries le plus répandues dans le domaine alimentaire, maladies associées, symptômes et sources des bactéries .....	12
Tableau 2 : Comparaison entre phages et antibiotiques (avantages et inconvénients) .....	22
Tableau 4 : Propriétés des différents papiers .....	45
Tableau 5 : Résultats des tests d'identifications bactériens.....	48

## LISTE DES ACRONYMES

ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
CRIFS	Centre de Recherche Canadien de Sécurité Alimentaire
CRML	Centre de recherches sur les matériaux lignocellulosiques
CRSNG	Conseil de Recherche en Sciences naturelles et en Génie du Canada
gp	protéine (pour gene product)
HR	humidité relative
LPS	lipopolysaccharides
LTF	fibres caudales longues
NSBK	Northern Bleached Softwood Kraft (pâte de résineux kraft blanchie)
PE	polyéthylène
PTFE	polytétrafluoroéthylène (téflon)
PEG	polyéthylène glycol
STF	fibres caudales courtes
TSA	Trypticase Soja Agar
TSB	bouillon trypticase soja
UFC/ml	unité faisant colonie, par millilitre
UFP/ml	unité de formation de plages, par millilitre

---

## 1. INTRODUCTION

---

### 1.1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les matériaux les plus utilisés pour fabriquer des emballages alimentaires sont les plastiques, les verres, les textiles, le fer-blanc, les alliages d'aluminium, les cartons et les papiers. Les deux derniers, soient les cartons et les papiers, issus des fibres biodégradables, renouvelables et largement abondantes, se présentent parmi les moins chers. L'introduction de nouvelles propriétés ou « fonctionnalités » à ces matériaux, comme, par exemple le caractère antibactérien, permet d'augmenter leurs utilisations dans le domaine alimentaire tout en respectant, le mieux possible, les exigences environnementales. D'autre part, cette augmentation d'utilisation permet aussi de venir au secours de l'industrie des pâtes et papiers qui connaissent actuellement un recul majeur dû à la baisse de l'utilisation des papiers impression-écriture, et surtout du papier journal. En outre, le papier offre un avantage technique par rapport aux autres matériaux. En effet c'est un matériau solide, flexible, et facile à modifier lors des opérations de transformation, notamment l'état de surface par calandrage pour en modifier la porosité, ce qui permet [1] la fixation des agents antibactériens en surface.

### 1.2. PROBLÉMATIQUE GÉNÉRALE:

Ces dernières années, la modification de notre mode de vie a affecté nos habitudes alimentaires. Nos intérêts pour les aliments « prêts à manger » et « faciles à consommer » ont augmenté les risques de maladies d'origine alimentaire. En effet, les aliments, et plus encore la surface des aliments, peuvent parfois être contaminés par des bactéries pathogènes qui risque de nous rendre malades. Les bactéries sont omniprésentes dans l'environnement avec une estimation globale (terre entière) de  $4 \times 10^{30}$  à  $6 \times 10^{30}$  cellules [2], il serait donc primordial de prendre les précautions nécessaires pour éviter les effets directs des bactéries pathogènes sur notre santé (infections, maladies...). En novembre 2012, la contamination par la souche bactérienne *E. coli* dans l'entreprise canadienne de conditionnement de la viande XL FOODs Inc est un exemple notable de ce sujet [3]. La contamination de graines de soja germées par l'*E. coli* en Europe (2011) qui a causé la maladie de plus de 1600 personnes est un autre exemple [4].

Le tableau 1 regroupe les trois bactéries pathogènes les plus répandues dans le domaine alimentaire, les maladies qui y sont associées, les symptômes et les sources.

***Tableau 1. Les bactéries les plus répandues dans le domaine alimentaire, maladies associées, symptômes et sources des bactéries.***

Bactéries	Maladies	Symptômes	Sources
<i>Salmonella</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Gastroentérites</li> <li>▪ Fièvre typhoïde</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Fièvres</li> <li>▪ Diarrhées</li> <li>▪ Vomissements</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Fruits et légumes non lavés</li> <li>▪ Viandes non cuite</li> <li>▪ Œufs</li> </ul>
<i>Escherichia coli (E. coli)</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Gastroentérites</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Nausées</li> <li>▪ Vomissements</li> <li>▪ Pertes de sang</li> <li>▪ Crampes d'estomac</li> <li>▪ Peu ou pas de fièvre</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Viande non cuite</li> <li>▪ Lait (cru) non pasteurisé</li> <li>▪ Fromages non pasteurisés</li> <li>▪ Jus</li> </ul>
<i>Listéria monocytogènes</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Listérose</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Fièvres</li> <li>▪ Douleurs musculaires</li> <li>▪ Pertes d'équilibres</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Fromages</li> </ul>

Le gouvernement du Canada estime à environ 4 millions le nombre de cas de maladies d'origine alimentaire au Canada chaque année [5].

Trois solutions peuvent être considérées pour éviter le développement d'un grand nombre de ces maladies :

1. Trouver un moyen pour détecter la présence des bactéries pathogènes sachant que nous sommes incapables de détecter la présence des agents pathogènes par nos seuls cinq sens.
2. Stocker les aliments d'une manière sécuritaire et naturelle, de préférence sans aucun recours à des produits chimiques, afin d'éliminer ou tout du moins de minimiser le contact des aliments avec toute cause extérieure de contamination.

3. Éliminer ou réduire d'une manière systématique tous les genres de contaminations par un traitement permanent des surfaces par un agent antibactérien.

### **1.3. APPROCHE DE PROJET (SENTINEL): EMBALLAGES ANTIBACTÉRIENS**

Dans la vision de réduire les impacts négatifs sur la société des bactéries et agents pathogènes, suite à une proposition de professeur Robert H. Pelton, de l'université Mc Master en Ontario, le Canada, par l'intermédiaire du CRSNG (Conseil de Recherche en Sciences naturelles et en Génie du Canada) et de quelques industriels, a créé le réseau SENTINEL dont l'objectif principal est le développement de papiers bioactifs. Un papier bioactif est un papier qui a la capacité de détecter, d'intercepter et/ou de désactiver des agents pathogènes. Pour créer ce type de matériaux, il faut réussir à fixer à la surface de papier des agents actifs, capables de reconnaître et de signaler la présence d'agents pathogènes, voire de les éliminer. Les applications potentielles du papier bioactif sont multiples : emballages alimentaires sécuritaires, masques et vêtements, détection, etc.

Les agents bioactifs ciblés dans le cadre de SENTINEL sont les enzymes, les anticorps, les acides nucléiques et les bactériophages (appelés plus simplement « phages »). Dans le cadre global du projet UQTR, l'équipe du CRML sous la direction de professeur Patrice Mangin a choisi de se concentrer sur le développement et la fabrication de papiers bioactifs à base de phages et d'en démontrer la faisabilité pour de grands tonnages, à l'échelle industrielle et commerciale.

### **1.4. OBJECTIF DE PROJET DE MAÎTRISE**

L'objectif de notre maîtrise consiste à étudier la dynamique de la zone de lyse des cocktails de phages lorsqu'ils sont appliqués sur un tapis bactérien. L'idée originale de l'utilisation de cocktail de phages provient de professeur Mansel W. Griffiths, du Centre de Recherche Canadien de Sécurité Alimentaire (CRIFS), université de Guelph, et membre du réseau SENTINEL. Notre étude vise ainsi à comprendre le comportement d'un cocktail de phages lorsqu'il est mis en contact avec une souche bactérienne et le développement de la zone de lyse en fonction du temps et de la quantité de phages appliquée. Pour ce faire deux phages ont été sélectionnés visant la même cible bactérienne. Globalement, l'utilisation d'un cocktail de phages offre deux avantages majeurs :

1. Plusieurs types de phages qui attaquent spécifiquement un genre de bactéries : dans ce cas, si les bactéries développent une résistance vers un type de phages, la présence d'un autre type de phages permet toujours au papier bioactif de conserver un pouvoir antibactérien.
2. Plusieurs phages qui attaquent spécifiquement plusieurs genres de bactéries : dans ce cas, le papier bioactif a la possibilité de lutter contre plusieurs genres de bactéries en même temps. On pourrait par exemple imaginer un papier qui lutterait à la fois contre la *Salmonella*, l'*E. coli* et la *Listéria monocytogènes*.

Dans une première partie de notre travail, une étude de l'activité antibactérienne ainsi que de la dynamique de phages de forme unique, en contact direct avec des bactéries hôtes, est exploitée. Par la suite, la même étude est effectuée lorsqu'un cocktail de phages, réduit dans notre cas d'étude à deux types seulement, est utilisé.

Dans une deuxième partie, l'adsorption et le caractère antibactérien de phages, à la fois sous forme unique et en cocktail, déposés sur un papier sont étudiés.

Dans une dernière partie, l'influence de la modification de surface des papiers, à la fois par modification de charges de surface et par modification de la porosité, avant l'adsorption de phages, sur l'activité antibactérienne ainsi que sur la dynamique de croissance de la zone de lyse est mise en avant.

---

## 2. ETUDE BIBIOGRAPHIQUE

---

Ce chapitre est consacré à l'étude bibliographique des surfaces bioactives. En particulier, les études basées sur l'utilisation de phages comme agents bioactifs.

### 2.1. GÉNÉRALITÉS:

Une surface antibactérienne est une surface capable de lutter contre les bactéries. Ces surfaces se divisent en deux grandes catégories.

Une première catégorie se base sur la diminution ou l'élimination de l'adhésion des bactéries sur les surfaces afin d'éviter la formation d'un biofilm en repoussant les bactéries, soit par répulsion électrostatique, par répulsion stérique ou en utilisant des surfaces avec faible énergie de surface. Dans ce cas, il est nécessaire de modifier la chimie de surfaces ; par exemple : greffage d'un polymère tel que le polyéthylène glycol (PEG). Cependant, le prix relativement élevé d'un tel traitement en limite les applications à une échelle industrielle.

Une autre catégorie se base sur la présence d'agents pouvant tuer les bactéries, soit en tuant des bactéries en contact avec les agents, soit en libérant de tels agents proches de la surface. Dans ce cas, il devient nécessaire de fixer, chimiquement ou physiquement, des agents antibactériens à la surface. Les agents antibactériens les plus célèbres, découverts dans les années 1940, sont les antibiotiques. Cette découverte a permis de sauver la vie de millions de personnes. Cependant, plusieurs souches bactériennes ont développé, et développent, des résistances face aux traitements basés sur l'utilisation des antibiotiques. Dans un article publié par Otto Cars *et al.* [6], l'auteur mentionne que 25 000 personnes meurent en Europe chaque année par manque de traitements contre les bactéries « résistantes » à l'origine des infections. Pour résoudre ce problème, d'autres voies sont en cours de développement :

1. la mise au point de nouveaux antibiotiques efficaces.
2. l'élaboration ou la mise au point d'alternatives à l'utilisation d'antibiotiques.

La fabrication de nouveaux antibiotiques reste particulièrement longue et coûteuse. De plus, les bactéries deviennent souvent résistantes peu après la commercialisation de ces nouveaux antibiotiques. Par conséquent, les chercheurs du domaine considèrent que cela devient une nécessité de se tourner vers d'autres alternatives afin de trouver de nouveaux

agents antibactériens efficaces, non-dispendieux et qui offrent de plus la possibilité d'éviter les problèmes de résistance.

Une voie pour lutter contre les bactéries est l'utilisation des nanoparticules [7] comme par exemple des nanoparticules d'oxydes de zinc, de magnésium, de titane, d'argent, de cuivre, d'or ou autres. Les nanoparticules peuvent être greffées en surface pour élaborer de telles surfaces antibactériennes. En revanche, l'échelle nanométrique modifie les propriétés et/ou le comportement de matériaux. Il peut en résulter la génération de phénomènes de toxicité et d'écotoxicité qui restent à être étudiés plus en détail. Le danger pour la santé de l'homme et des animaux est ici associé à la possible pénétration dans l'organisme de particules nanométriques par les voies respiratoires, cutanées et digestives [8,9].

Une autre voie considère le potentiel d'utilisation des polymères ayant des propriétés antibactériennes. Des nombreuses études [10,11] ont été effectuées à ce sujet. Néanmoins, quelques problèmes, principalement d'ordres économiques et écologiques, restent à régler pour une application à une grande échelle car, en général, l'emploi des polymères nécessite l'utilisation d'un solvant organique. D'autres solutions ont été proposées dont l'utilisation d'une suspension aqueuse de polymères antibactériens qui nécessite l'incorporation d'un bloc de polymères hydrophiles pour élaborer un copolymère capable de former des micelles dans l'eau. Les coûts d'un tel processus, relativement laborieux, en limite aussi l'utilisation à une échelle industrielle.

Une alternative, en train de devenir d'actualité voire plus courante, pour la lutte contre les bactéries consiste à utiliser des agents bioactifs [12] qui sont spécifiques, *i.e.* ciblés sur une bactérie bien précise, tels que : les anticorps, les aptamères, les enzymes et les phages. Chaque agent comporte certains avantages par rapport à un autre. Dans le cadre du projet SENTINEL, notre travail se concentre sur l'utilisation de phages. Les phages représentent une voie d'avenir potentielle extrêmement intéressante pour lutter contre les bactéries [13,14,15]. Pour cette raison, cette étude est ciblée sur l'utilisation de phages comme agents bioactifs.

## 2.2. LES BACTÉRIOPHAGES

### 2.2.1. Définition

Les bactériophages, communément appelés phages, sont des virus infectant les bactéries [16]. Les phages sont des commensaux\* normaux de l'humain que l'on retrouve fréquemment dans le tractus gastro-intestinal, sur la peau, dans l'urine et dans la bouche. Ce sont les prédateurs naturels des bactéries. Ils identifient les surfaces auxquelles ils se lient grâce à des récepteurs spécifiques puis ils insèrent leur matériel génétique à l'intérieur des bactéries cibles. Comme tous les virus, ils se caractérisent par la possession d'un seul acide nucléique et par un parasitisme intracellulaire obligatoire. Une caractéristique unique des phages consiste dans une croissance « par cascade » après interactions avec les bactéries. En même temps, ils ont la particularité d'avoir une étroite spécificité d'espèce bactérienne ; ils attaquent des bactéries en particulier, à l'opposé des antibiotiques qui ciblent des spectres plus larges. De plus, les phages n'ont pas d'impact sur les tissus humains.

Le domaine de la bactériophagie s'étend aux espèces bactériennes les plus diverses: Gram<sup>+</sup>, Gram<sup>-</sup>, acido-résistantes, sporulées ou non sporulées, aérobies ou non aérobies, saprophytes ou pathogènes.

### 2.2.2. Classification

Comme tous les virus, les phages sont classés en fonction de la nature de leur acide nucléique et de leur structure : type de symétrie, présence ou absence d'une enveloppe.

#### Les Caudovirales

Les phages classés dans l'ordre des *Caudovirales* sont les plus nombreux, soit plus de 80 % des bactériophages connus. Ils présentent une symétrie originale qualifiée de binaire. Les virions sont constitués d'une tête à symétrie cubique renfermant l'ADN (acide désoxyribonucléique) et d'une queue à symétrie hélicoïdale. La queue est constituée d'un cylindre central creux communiquant avec la tête et son extrémité distale présente une plaque terminale, pourvue de fibres caudales et de crochets. Le génome est non segmenté et il est constitué d'une molécule d'ADN bicaténaire et linéaire.

---

\* Micro-organisme qui est l'hôte habituel d'un organisme sans lui causer de dommage.

## Les Myoviridae

Les représentants de la famille des *Myoviridae* ont une queue longue d'environ 100 nm. Ils possèdent une gaine contractile entourant le cylindre central de la queue ; ce qui leur permet d'injecter leur ADN dans la cellule bactérienne. Certains de ces virus sont bien connus. C'est le cas de phages *T2* (*Enterobacteria phage T2*), *T4* (*Enterobacteria phage T4*), *T6* (*Enterobacteria phage T6*) et *Mu* (*Enterobacteria phage Mu*).

## Les Siphoviridae

Les *Siphovirida* ont une queue longue d'environ 100 nm et non contractile. Les phages *T1* (*Enterobacteria phage T1*), *T5* (*Enterobacteria phage T5*) et  $\lambda$  (*Enterobacteria phage  $\lambda$* ) sont classés au sein de cette famille.

## Les Podoviridae

Les *Podoviridae* ont une queue courte d'environ 20 nm et non contractile. Les bactériophages *T3* (*Enterobacteria phage T3*), *T7* (*Enterobacteria phage T7*) et *P22* (*Enterobacteria phage P22*) sont quelques exemples de virus classés dans cette famille.

### **2.2.3. Sources**

Les sources naturelles de phages sont multiples. Ils sont extraits du sol, des eaux de rivières, de la mer, des eaux d'égout, etc. Ils sont présents chez la plupart des végétaux, dans le tube digestif et les déjections des animaux homéothermes (qui ont une température corporelle constante) ou poikilothermes (qui ne contrôlent pas leur température corporelle) ainsi que chez les insectes. Le facteur essentiel de la dissémination de phages dans la nature est la fréquence des bactéries spontanément lysogènes.

Les phages sont considérés comme étant plus nombreux dans la biosphère que n'importe quel autre groupe d'organismes, les procaryotes inclus. Dans les eaux littorales, on trouve plus de  $10^6$  phages par millilitre et on estime à environ  $10^{30}$  virions la population totale de phages classés dans l'ordre des *Caudovirales*.

### **2.2.4. Historique**

Les phages ont été découverts indépendamment par le bactériologue anglais Frederick Twort [17] en 1915 et par le biologiste canadien Félix d'Hérelle [18] en 1917 qui les baptisa « bactériophages ». Frederick Twort avait remarqué que des colonies de microcoques, un genre de bactéries, prenaient parfois un aspect vitreux, dû à une destruction des cellules bactériennes, et que cette caractéristique était transmissible à des colonies normales par simple contact.

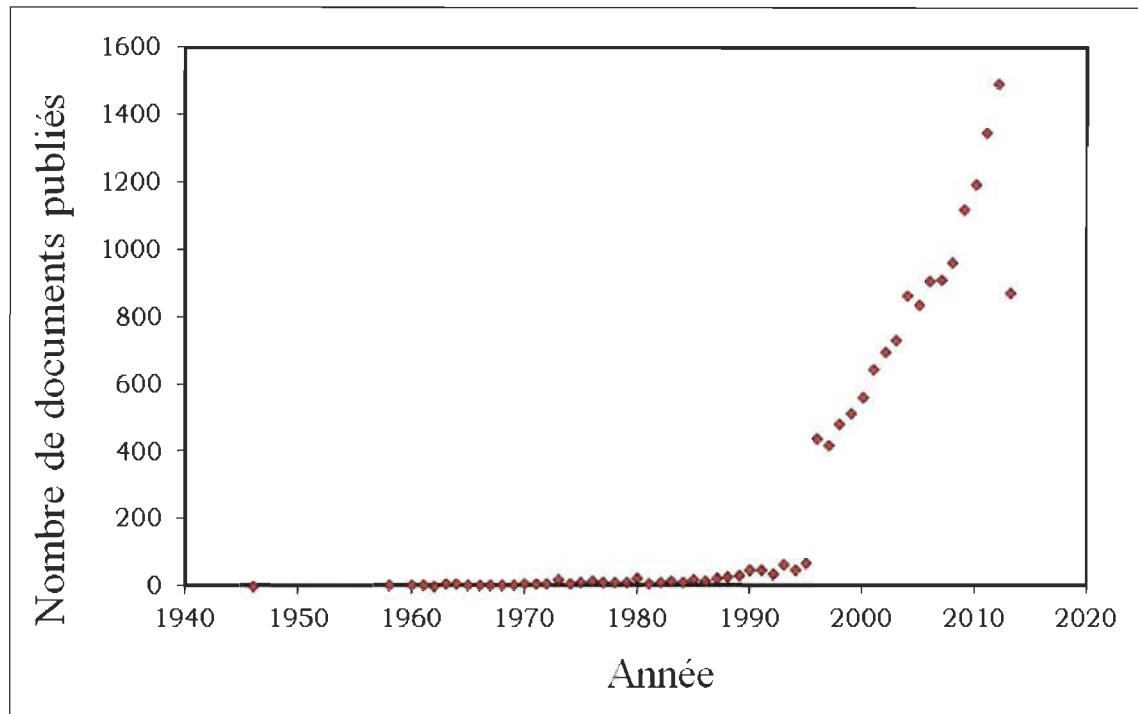
Félix d'Herelle fit une observation similaire en découvrant dans les selles de malades atteints de dysenterie bacillaire, un agent infectieux capable de détruire spécifiquement des cultures de *Shigella dysenteriae*.

La première application de phages pour traiter des maladies infectieuses remonte à 1921 par Bruynoghe et Maisin [19] qui les ont utilisés avec succès pour traiter des maladies de peau dues au *Staphylococcus* sp. Ils ont aussi été utilisés pour traiter la dysenterie, le choléra et la fièvre typhoïde. Dans les années 1930, plusieurs produits à base de phages qui ont été commercialisés aux Etats-Unis ont reçu des rapports positifs sur leur efficacité, particulièrement pour les infections dues aux *Staphylococcus* sp. et les maladies intestinales. En Géorgie, où les phages sont étudiés depuis 1934, des chercheurs ont rapporté que la thérapie phagique avait un taux de succès de 80% contre les infections d'entérocoques [19]. En Pologne, les médecins ont eu un taux de succès de 90% contre des cas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *E. coli* [20]. Cependant, l'enthousiasme de départ pour les phages a vite été remplacé par un scepticisme critique suite à des rapports négatifs sur l'inactivité de certaines préparations commerciales ainsi que la mort de patients traités [21,22]. Les résultats mitigés de la thérapie phagique, l'usage inapproprié de phages, le manque de connaissances sur la nature de phages, le manque de standards de pureté et les études incontrôlées ont eu pour effet que, avec la découverte des antibiotiques et l'éclatement de la deuxième guerre mondiale, la phagothérapie a été abandonnée dans les pays occidentaux. Toutefois, les phages ont toujours continué à être utilisés comme agents thérapeutiques avec succès en Europe de l'Est et dans l'ex-Union soviétique [23].

De nos jours, la technologie biomédicale est bien différente de ce qu'elle était aux premiers temps de la recherche sur la thérapie phagique. Nos connaissances sur les propriétés biologiques des phages et les mécanismes régissant l'interaction phage-bactérie se sont grandement améliorées et élargies. Ces avancées peuvent maintenant permettre le développement de préparations de phages thérapeutiques sécuritaires ayant une efficacité optimale envers leurs hôtes bactériens spécifiques afin d'intégrer la thérapie phagique à nos méthodes de prévention et de traitement des infections bactériennes.

Récemment les phages ont été utilisés pour lutter contre les contaminations des produits alimentaires [24,25,26,27]. Une efficacité de l'utilisation de phages a été démontrée dans le cas de la production de viandes rouges, soit bétails, moutons et porcs, et de la production de viandes blanches, soit volailles. Les phages ont ainsi été utilisés, soit sous formes uniques soit en cocktails. Une certaine résistance des bactéries a été observée lorsque les phages ont été

employés sous formes uniques. L'utilisation des cocktails a diminué cette résistance. La Figure 1 représente la variation du nombre de documents publiés en fonction des années, obtenus à partir de moteur de recherche Scopus lorsque les deux mots clés « Phage » et « Food » ont été employés.



**Figure 1 : Évolution du nombre de documents scientifiques portant sur les Phages et l'alimentation (Food) en fonction de l'année (données obtenues à partir de Scopus).**

L'augmentation du nombre de documents publiés montre bien l'intérêt croissant et le potentiel d'utilisation des phages pour protéger les aliments contre les infections bactériennes. D'autre part, une étude récente [28] a montré la possibilité d'utiliser des phages pour le traitement de l'eau afin d'éviter la formation d'un biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*.

L'adsorption physique ou chimique de phages sur des surfaces des matériaux a été développée récemment. Une étude plus détaillée sur ce sujet est présentée à la fin de ce chapitre.

#### **2.2.5. Comparaison phages-antibiotiques**

L'utilisation de phages, comme agents de lutte contre les bactéries et la formation de biofilm, présente de nombreux avantages par rapport aux antibiotiques [29,30,31]. Les phages

sont déjà présents et actifs dans la nature. Ils sont relativement faciles à isoler et leur production est simple, rapide et peu coûteuse. De plus, ils possèdent la capacité d'évoluer en s'adaptant aux bactéries qu'ils infectent, c'est-à-dire de muter en présence de bactéries résistantes aux phages. Cependant, les mutations qui causent la résistance bactérienne aux antibiotiques sont différentes de celles qui causent la résistance phagique car chaque traitement agit à différents niveaux de la bactérie [32]. Les phages peuvent malgré tout toujours évoluer naturellement en s'adaptant aux mécanismes de résistance des bactéries.

La haute spécificité des phages envers une espèce et parfois même un genre, évite la destruction non spécifique des bactéries, donc de la flore normale des patients. Ainsi, l'équilibre de l'organisme est maintenu sans risque d'infections secondaires opportunistes ou de diarrhées qui sont des effets secondaires fréquents avec l'emploi d'antibiotiques à large spectre. Comme ils n'infectent que les bactéries et non les cellules des organismes pluricellulaires, ils sont de plus sans danger pour l'homme, les animaux ou les plantes.

Un autre avantage intéressant est leur capacité de croissance exponentielle rapide directement au site d'infection en suivant la croissance de l'hôte bactérien jusqu'à la disparition des bactéries. Il y a donc une persistance à long terme du traitement. Ceci implique qu'une seule dose de phages peut théoriquement traiter une infection, *i.e.* limitant ainsi l'administration de plusieurs doses pendant la durée du traitement. Les traitements phagiques représentent donc un des rares traitements multiplicatifs, sinon le seul.

#### **2.2.6. Limites d'utilisation de phages contre les bactéries**

Si un spectre d'hôte très étroit confère aux phages un avantage de taille face aux antibiotiques, il peut aussi être considéré comme un inconvénient. Cette haute spécificité entraîne la nécessité d'avoir une large banque de phages disponibles bien caractérisés et des méthodes pour déterminer rapidement quel phage serait efficace contre l'infection. Même si aucun effet secondaire dommageable n'a été rapporté avec l'utilisation de phages, la pureté de la préparation reste un critère primordial voire critique. Les phages étant relâchés à partir des bactéries lysées, les préparations brutes peuvent contenir des lipopolysaccharides (LPS), peptidoglycan ou autre composant toxique pouvant causer un choc septique. Cependant, les phages peuvent être facilement purifiés par différentes techniques comme la centrifugation haute vitesse ou la chromatographie qui permettent d'éliminer les impuretés et de rendre les préparations de phages non toxiques. Le tableau 2 représente une comparaison entre les phages et les antibiotiques.

**Tableau 2 : Comparaison entre phages et antibiotiques (avantages et inconvénients).**

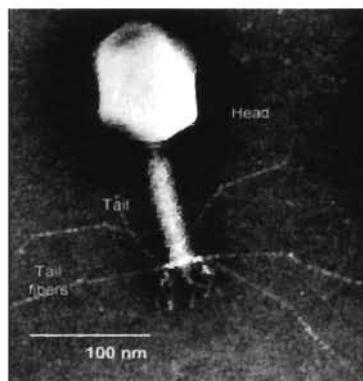
Phages	Antibiotiques
Avantages	Avantages
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Très spécifiques: ils attaquent seulement les bactéries cibles.</li> <li>• Pas d'effets secondaires.</li> <li>• Autoreproduction exponentielle en présence de bactéries : augmentation de la concentration de phages en fonction du temps.</li> <li>• La sélection des phages contre des bactéries résistantes ne nécessite pas des années de travail.</li> <li>• La production est simple et relativement peu coûteuse.</li> <li>• Très abondants dans la nature (écologique).</li> <li>• Ennemis naturels de bactéries.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ils peuvent être utilisés sans nécessiter d'identifier la bactérie pathogène.</li> </ul>
Inconvénients	Inconvénients
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vu la haute spécificité de l'attaque du phage, il faut préalablement identifier la bactérie avant le traitement.</li> <li>• Pas d'attaque spécifique : possibilité de tuer des bactéries non-pathogènes utiles; ce qui peut causer des effets secondaires.</li> <li>• Les bactéries résistantes aux antibiotiques sont des bactéries pathogènes.</li> <li>• Développement des antibiotiques contre les bactéries résistantes nécessitent beaucoup du temps.</li> <li>• Synthétiques : <i>a priori</i> non écologiques.</li> <li>• Concentration diminue en fonction du temps.</li> </ul>

### 2.2.7. Les phages de l'étude : T4 et EcomAG10

Dans cette étude, les deux phages *T4* et *EcomAG10* ont été utilisés comme des agents antibactériens. Vu que les deux ont la même structure et le même mode d'interaction avec les bactéries, par la suite seule la description de la composition du phage *T4* sera développée.

#### Composition

Le phage *T4* [33] (Figure 2) est un virus de la famille des *myoviridae* et de l'ordre des *Caudovirales*. *T4* et *EcomAG10* attaquent spécifiquement la bactérie *E. coli*.

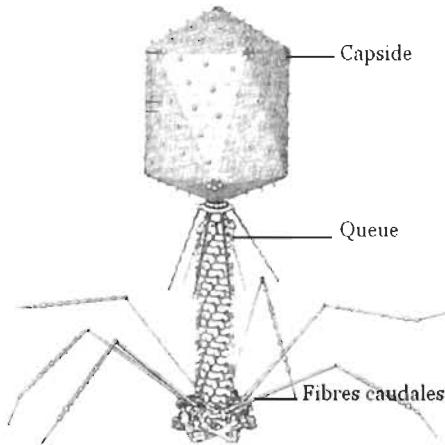


**Figure 2 : Image d'un phage T4.**

Le phage existe comme un virion, soit une particule virale complète avec enveloppe protéinique externe ou capsid et une molécule d'acide nucléique d'ARN ou d'ADN à l'intérieur. Il est inactif jusqu'à ce que l'étendue des pattes soit en contact avec la surface d'un type *E. coli*, grâce à des capteurs, déclenchant ainsi le phage en action. Ce phage contient environ 168,000 paires de bases ADN double brin. Le code génétique comporte toutes les informations nécessaires pour créer de nouveaux phages.

Le phage *T4* est composé de 3 parties principales (Figure 3) :

- a- La capsid.
- b- La queue.
- c- Les fibres caudales.



**Figure 3 : Représentation schématique des trois parties du phage T4.**

a. La capsidé

La capsidé possède une forme icosaèdre et contient l'ADN double brin du virus. Elle mesure approximativement 100-110 nm de long et 80 nm de diamètre [34]. Elle est composée des protéines et des glycoprotéines.

b. La queue

Elle mesure 113 nm de long et 16 nm de large [34] et elle peut se diviser en trois parties :

1. L'axe central rigide (gp3, gp 19, gp29) par lequel sera injecté l'ADN lors de l'infection (gp = gene product).
2. La gaine contractile (gp15, gp18) qui se compresse pour enfoncer l'axe central dans membrane cellulaire et injecter l'ADN virale dans la cellule.
3. Le plateau composé de deux parties, le centre (gp5, gp26, gp27, gp28, gp48 et gp54) et les 6 coins (gp6, gp7, gp8, gp10, gp11, gp53 et gp25). Le plateau peut prendre deux conformations, hexagonale (conformation de base) ou étoile (pendant l'infection). Sur le plateau se greffe les fibres caudales.

c. Les fibres caudales

Il existe deux sortes de fibres caudales, courtes (STF) et longues (LTF). Les fibres caudales servent à l'adsorption du phage. Les STF sont le gp12. Les LTF sont un complexe des gp34, gp35, gp36 et gp37.

## 2.3. DYNAMIQUE DE L'ACTION DE PHAGES

La rencontre d'un phage et d'une bactérie se fait au hasard et la probabilité de contact dépend du nombre des bactéries et de phages présents. Un contact phage-bactérie peut donner lieu à trois possibilités :

1. La bactérie résiste à l'infection. La résistance résulte soit de l'absence de récepteurs permettant la fixation du phage, soit de la présence d'enzymes de restriction capables de dégrader l'acide nucléique phagique.
2. Le phage ou uniquement l'acide nucléique du phage pénètre dans la bactérie. Le phage se multiplie à l'intérieur de la cellule bactérienne. Le cycle, qualifié de *cycle lytique*, est productif. Le phage est qualifié de virulent. Selon les phages, le cycle productif peut conduire ou non à une lyse, soit à une destruction de la bactérie.
3. Le phage ou uniquement l'acide nucléique du phage pénètre dans la bactérie. L'acide nucléique phagique s'intègre dans le génome bactérien où il persiste à l'état latent sous forme de prophage. Le cycle est qualifié de lysogénique et le bactériophage est appelé phage tempéré.

### 2.3.1. Interaction phages bactéries

L'activité d'un phage sur les bactéries sensibles conduit à la lyse phagique, c'est-à-dire soit à l'éclaircissement des cultures microbiennes en milieu liquide, soit, dans le cas de cultures sur milieu solide, à l'apparition des "plages", petites **zones de lyse** limitées, circulaires, claires ou voilées, qui révèlent la formation d'un clone de phage par multiplication d'un corpuscule de virus, et ce, aux dépens de la culture bactérienne. La numération des plages est la principale méthode de titrage des suspensions de corpuscules de bactériophage. Plusieurs étapes se déroulent entre la rencontre phage-bactérie jusqu'à la libération des nouveaux phages.

#### Étapes préliminaires

Les étapes préliminaires, soit adsorption et pénétration, sont communes aux cycles productif et lysogénique.

Le phage se fixe sur des récepteurs spécifiques de la bactérie présents, soit sur la paroi (lipo-polysaccharide, protéines, acides téchoïques), soit sur la membrane cellulaire, soit sur les flagelles, soit sur les pili communs soit sur les pili sexuels. C'est le cas des phages classés dans la famille des *Leviviridae*.

Pour les phages de l'ordre des *Caudovirales*, la fixation fait intervenir une fibre de la queue qui se lie à un récepteur de la paroi. Très rapidement les autres fibres se fixent sur le

récepteur avec pour conséquence d'attacher solidement le phage à la bactérie et permettre ainsi la mise en contact de la plaque terminale avec la paroi bactérienne.

Pour que l'adsorption soit possible, il faut que les récepteurs phagiques et bactériens présentent une étroite spécificité l'un envers l'autre.

### Cycle productif

L'infection de la cellule conduit à une réorganisation de l'activité métabolique et la machinerie cellulaire est détournée au seul profit des synthèses virales.

La réplication du phage *T4* (*Enterobacteria phage T4*) nous servira de modèle pour la réplication des virus à ADN dont les détails seront présentés plus loin.

### Cycle lysogénique

Les phages, appartenant tous à l'ordre des *Caudovirales* sont appelés des phages tempérés. Ils peuvent établir avec les bactéries des rapports de longue durée, éventuellement réversibles, qualifiés de lysogénie. La bactérie est dite lysogène et le cycle de réplication phagique est appelé cycle lysogénique. Au cours de la lysogénie, l'ADN phagique est intégré au chromosome bactérien sous la forme d'un prophage incapable de se répliquer de façon autonome. La réplication du prophage est liée à celle du chromosome bactérien. La lysogénie a été découverte avec le phage  $\lambda$  (*Enterobacteria phage  $\lambda$* ) infectant *E. coli*. L'induction, soit le passage d'un cycle lysogénique à un cycle productif, peut être spontanée ou induite. L'induction spontanée est rare. Selon le phage et la bactérie, elle se produit à une fréquence variant de  $10^{-2}$  (soit toutes les 100 divisions bactériennes) à  $10^{-6}$ . La fréquence de l'induction est augmentée par les rayons UV, les rayons X, l'ypérite, l'éthylène-imine, des peroxydes organiques, etc. Le prophage est alors libéré et le cycle productif peut se dérouler normalement.

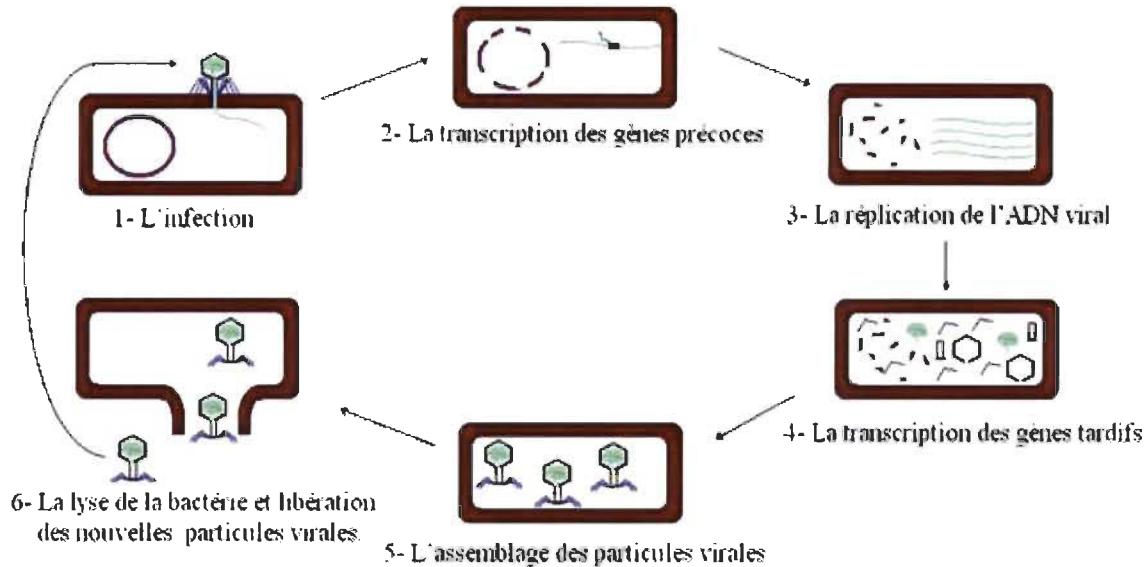
Nous présenterons ci-après le cas de phage *T4* et ses interactions avec *E. coli*.

#### **2.3.2. Le cas de phages *T4***

Le phage *T4* est virulent avec un cycle de vie conséquemment lytique [35]. La bactérie infectée ne peut plus se reproduire et est obligatoirement tuée. Le cycle se déroule en 6 étapes (Figure 4):

1. L'infection
2. La transcription des gènes précoces
3. La réplication de l'ADN viral
4. La transcription des gènes tardifs

5. L'assemblage des particules virales
6. La lyse de la bactérie infectée pour relâcher les nouvelles particules virales.

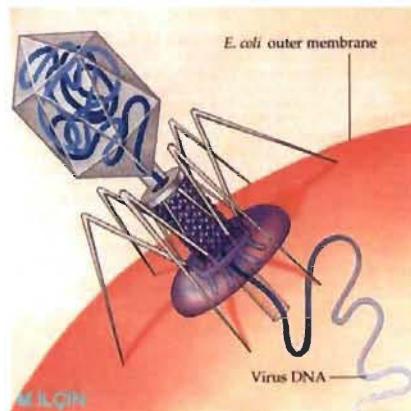


**Figure 4 : Cycle lytique du phage T4 [34]**

#### L'infection

L'infection de la cellule conduit à une réorganisation de l'activité métabolique et la machinerie cellulaire de la bactérie est détournée au seul profit des synthèses virales. L'infection se déroule en deux étapes (Figure 5) :

- a. L'attachement ou adsorption du phage à la membrane d'*E. coli*
- b. L'injection du matériel génétique du phage T4 dans *E. coli*



**Figure 5 : Représentation de l'infection d'une bactérie par un phage T [34].**

Adsorption. Pour que l'adsorption soit possible, il faut que les récepteurs phagiques et bactériens présentent une étroite spécificité l'un envers l'autre. Une bactérie n'est donc sensible qu'à un nombre limité de phages et un phage n'est généralement capable d'infecter qu'un nombre restreint de bactéries. Dans le cas de phages *T4* et *E. coli*, l'adsorption est initiée par la présence, à la surface d'*E. coli*, des récepteurs nécessaires à la fixation du phage *T4*. Toutefois pour qu'il puisse y avoir adsorption, il faut que le phage *T4* soit compétent à l'attachement. L'attachement du phage *T4* sur *E. coli* se fait grâce à six fibres caudales se déployant sur les récepteurs de la cible. Cette phase d'attachement dure environ 10 secondes.

Injection. Le phage *T4*, se comporte comme une seringue. Il injecte par la queue ADN et enzyme qui étaient jusque-là conservés dans la capsid. L'ADN viral est injecté dans la cellule hôte, la bactérie *E. coli*.

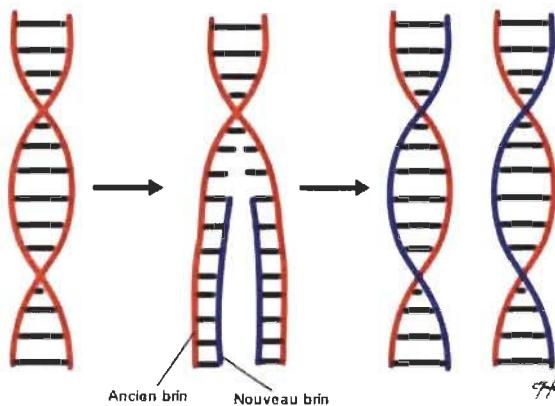
#### La transcription des gènes précoce

Une fois l'ADN du phage injecté dans la bactérie, les gènes du phage *T4* possédant des promoteurs (une courte séquence d'ADN) semblables à ceux des gènes de la cellule hôte sont transcrits grâce à sa machinerie (ARN polymérase de la cellule hôte), se sont des gènes précoce [36]. Au début de l'infection, ils sont en compétition avec les gènes de la bactérie. Cependant, les gènes du *T4* sont privilégiés par rapport à ceux de la bactérie car ils possèdent de meilleurs promoteurs. Les gènes précoce du *T4* sont donc rapidement transcrits.

Les gènes précoce ont différentes fonctions, ils codent pour des enzymes ; l'endonucléase (des enzymes de restriction qui coupent un brin d'ADN en fragments plus courts) qui attaque l'ADN de l'hôte pour stopper la transcription des gènes, et d'autres enzymes servant à la réplication de l'ADN.

#### La réplication de l'ADN viral

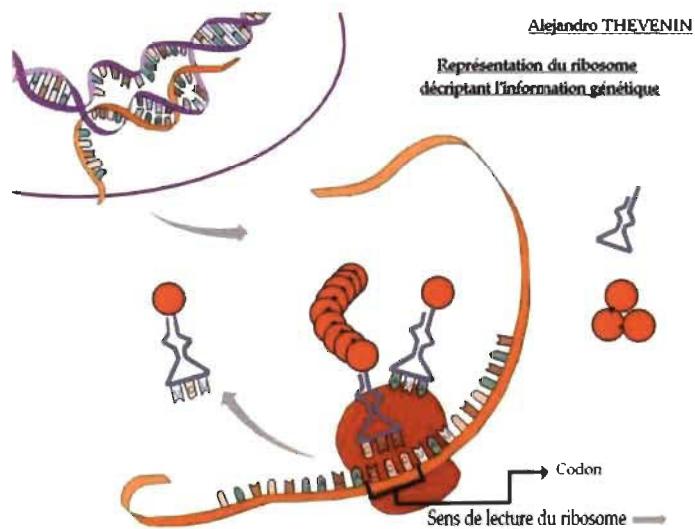
Suite à la transcription des gènes précoce, l'ADN viral vient s'accrocher au bout de l'ADN de la bactérie et se réplique normalement (Figure 6).



**Figure 6 : Représentation de la réPLICATION de l'ADN virale [34].**

#### La transcription des gènes tardifs

Les gènes tardifs créent des protéines nécessaires à l'assemblage des particules virales (Figure 7).



**Figure 7 : Représentation du ribosome décryptant l'information génétique [34].**

#### Assemblage des particules virales

Les protéines se regroupent pour former trois sous-composants, puis elles s'assemblent par étapes pour former un nouveau bactériophage T4 :

- L'assemblage de la capside
- L'assemblage de la queue
- L'assemblage des fibres caudales

- L'assemblage des trois sous-composants : La capsidé va tout d'abord s'attacher à la queue puis les fibres caudales se fixent à l'ensemble.

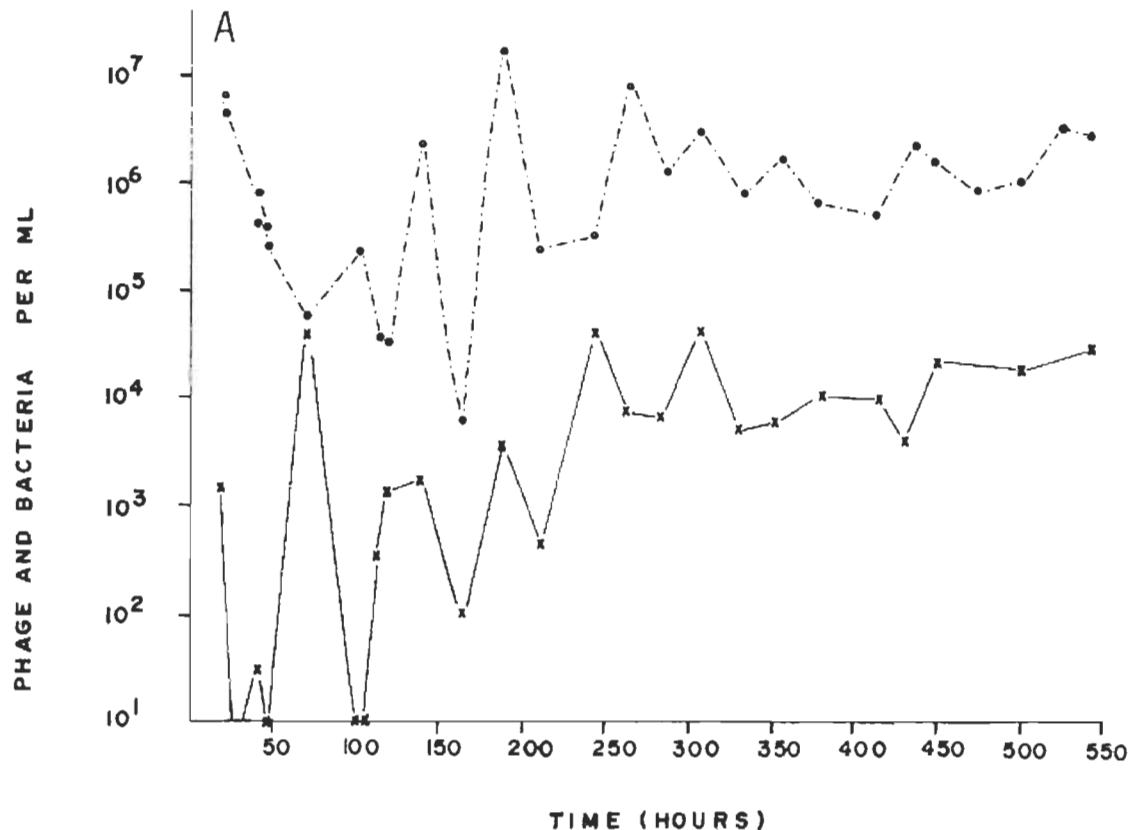
### La lyse de la bactéries et libération de nouveaux phages *T4*

La lyse de la bactéries permet de relâcher les particules virales nouvellement formées. Une vingtaine de minutes après l'infection, les bactéries commencent à être détériorées à cause de l'accumulation de certaines protéines du phage dans le milieu intracellulaire. Ainsi, en détruisant des bactéries pathogènes, le Phage *T4* contribue à la guérison de l'individu.

Les nouveaux phages, jusqu'à 200 particules virales par bactéries infectée, sont relâchés et peuvent alors s'attaquer à d'autres bactéries suivant une progression quasi-géométrique.

#### **2.3.3. *Études bibliographique de la dynamique***

Plusieurs études existent sur les interactions entre phages et bactéries. Elles proposent des résultats prometteurs sur la possibilité de l'utilisation de phages dans la lutte contre les bactéries. En général, les phages détruisent les bactéries pour se reproduire. Néanmoins, quelques problèmes se développent au fur et à mesure que le temps d'interaction phage-bactérie augmente. Par exemple, les bactéries développent progressivement des résistances contre les phages [37]. Le taux de développement de résistance aux phages est néanmoins dix fois plus faible que celui aux antibiotiques [38]. Une conséquence directe de la résistance bactérienne se traduit par une coexistence phages/bactéries. Cette coexistence de phages et de bactéries est reportée dans la littérature [39,40,41]. Levin et ses collaborateurs [39, 40] ont effectué une étude sur la modélisation d'interaction entre un phage *T2* et une bactérie de type *E. coli*. Ils montrent une coexistence phages-bactéries en fonction du temps telle qu'illustrée à la Figure 8. Une population hétérogène est présente à un certain moment (moins de 100 heures), représentée par la destruction des bactéries par les phages mais une augmentation de la quantité de bactéries parallèlement aux phages est observée par la suite, à des cycles d'environ 30 minutes.



**Figure 8 :** Image inspirée de Levin *et al.* [39] représentant la coexistence de phages et de bactéries en fonction du temps (les points au dessus représentent les phages).

Des résultats similaires ont été observés par Mizoguchi *et al.* [41] qui montrent la coévolution de phage *PP01* et d'*E. coli* en fonction du temps. Une étude de la dynamique de croissance de phage *T4* en présence de bactéries *E. coli* a été effectuée par Bohannan et Lenski [42]. Dans cette étude, les auteurs évoquent la présence de bactéries résistantes et la présence aussi de populations de phages et de bactéries coexistantes. Ces études ont été effectuées en mélangeant des phages avec des bactéries en solution.

#### Le cocktail de phages

Une solution proposée aux bactéries résistantes contre les phages est **l'utilisation d'un cocktail de phages** avec différents récepteurs ; ce qui permet de limiter encore plus l'apparition de résistance [43,44]. La possibilité d'utiliser plusieurs phages pour une même famille de bactéries permet d'éviter le problème relié à la résistance bactérienne. Même si les bactéries développent une résistance pour la première famille de phages, elles sont attaquées

par les autres familles de phages. Il reste des études à réaliser à propos de l'utilisation de cocktails de phages et surtout de la dynamique d'attaque et de l'effet synergique des phages lorsqu'ils seront mis ensemble en contact avec les bactéries. Aucune étude n'existe concernant l'application de cocktail de phages sur papier.

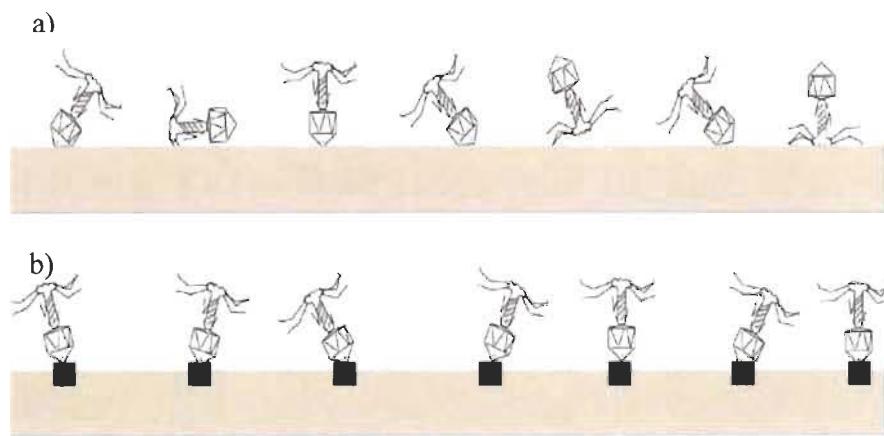
#### **2.3.4. Vers des surfaces bioactives**

Afin d'élaborer des surfaces bioactives basées sur l'utilisation de phages comme agent bioactif, il est nécessaire de les fixer, chimiquement ou physiquement, sur la surface de manière à ce que les fibres caudales de phages, la partie qui doit s'adsorber sur la membrane bactérienne, soient orientés vers l'extérieur de la surface. La possibilité de fixer les phages en surfaces de matériaux permettrait d'élaborer des surfaces antibactériennes. Des études récentes ont montré la possibilité et la faisabilité de l'adsorption de phages sur les surfaces des matériaux utilisables dans notre vie quotidienne, telles que les emballages alimentaires [45] les billets de banques antibactérienne [46] les papiers pour impression [47].

Bennet *et al.* [48] ont adsorbé des phages *Sapphyre* sur des surfaces de polystyrène dans le but de capturer les *Salmonella* d'une suspension. Ils mentionnent que l'orientation de phages en surface joue un rôle dans la capture de bactéries. Par conséquent, pour élaborer des surfaces bioactives, il faudrait prendre en considération l'orientation des phages en surface. Markoishvili *et al.* [49] ont adsorbé des phages sur la surface d'un polymère biodégradable, un polyester amide, et montrent une efficacité pour traiter des patients infectés par des bactéries pathogènes. Yang *et al.* [50] ont adsorbé chimiquement des phages *M13* sur des surfaces d'or pour fabriquer un biodétecteur. Dans le cadre du réseau SENTINEL, Cademartiri *et al.* [51] ont adsorbé physiquement des phages sur des nanoparticules de silices modifiées chimiquement. Ils montrent que les phages ne se détachent pas facilement par rinçage et, le plus important, qu'ils restent actifs après adsorption. Hosseiniidoust *et al.* [52] ont adsorbé des phages, physiquement et chimiquement, sur des surfaces de verre et montrent le caractère antibactérien des surfaces obtenues. Pearson *et al.* [53] décrivent une méthode de fixation chimique des phages *T1* et  $\Phi$ *I1* au polyéthylène (PE) et à des matériaux de type téflon (PTFE ou polytétrafluoroéthylène). Ils ont montré que les surfaces modifiées sont capables de tuer des bactéries comme *E. coli* et *S. aureus*.

L'utilisation de papiers comme support d'adsorption de phages, ou d'autres agents bioactifs, offre plusieurs avantages économiques et écologiques [1,54,55,56] par rapport aux supports métalliques ou ceux basés sur l'utilisation des polymères d'origine fossile. Dans le cas

des papiers, formés essentiellement de cellulose, hémicelluloses ou lignine, il s'agit de polymères verts, d'origine renouvelable (forêts, végétaux), biodégradables, non dispendieux, largement répandus, non toxiques, et facilement modifiables pour augmenter leur potentiel d'adsorption de phages, ou d'autres agents bioactifs en surface, principalement par impression). Dans le cadre du réseau SENTINEL, Tolba *et al.* [57] ont modifié génétiquement les phages *T4* pour les adsorber d'une manière orientée sur des surfaces de cellulose. Récemment, toujours dans le cadre du réseau SENTINEL, Anany *et al.* [58] ont utilisé une méthode plus simple pour contrôler l'orientation et l'adsorption, d'un cocktail de trois phages sur des membranes à base de cellulose (membrane de cellulose utilisée pour le dialyse). Ils montrent l'intérêt de modifier la charge de surface afin d'augmenter l'efficacité de membranes. Une surface de charge positive semble améliorer les orientations de phages en surface et permettre ainsi un meilleur contact entre les fibres caudales et les bactéries. Cette modification contribue à une augmentation du nombre de bactéries tuées. Une illustration schématique, inspirée par Jabrane *et al.* [54], présentée à la Figure 9 montre une comparaison entre une adsorption aléatoire de phages en surface, sans aucune orientation, par rapport à adsorption orientée de phages. L'adsorption orientée permet théoriquement une augmentation de l'efficacité antibactérienne. Le niveau de planéité de la surface, si on considère par exemple les papiers, peut modifier un tel résultat.



**Figure 9 :** Comparaison schématique d'une a) adsorption arbitraire de phages et b) adsorption orientée de phages sur une surface parfaitement plane.

Une étude par Jabrane *et al.* [55], sur la possibilité de la commercialisation des papiers bioactifs à base de phages a été récemment publiée. Dans cette étude, les auteurs ont adsorbé

des phages sur des papiers par impression. Ils analysent notamment l'influence de la vitesse d'impression et de la force d'appui, ou pression d'impression, durant l'impression. Ils montrent aussi l'influence de la porosité de surface, mesurée par la perméabilité à l'air, du support sur la bioactivité du papier. D'après les auteurs, une difficulté reste cependant à résoudre avant le passage à l'étape commerciale, à grande échelle, soit l'impact des débris de bactéries tuées par les phages dans des applications d'emballage alimentaire. Rabinovitch *et al.* [59] reportent que ces débris pourraient même limiter voire stopper la zone de lyse. Ils considèrent que les phages peuvent s'attaquer aux débris de manière quasi-suicidaire (pas de matériel génétique pour se reproduire). De plus, quand le nombre de débris devient conséquent, les débris peuvent jouer un rôle de barrière protectrice pour les bactéries vivantes.

A ce jour, peu voire aucune étude n'a été effectuée sur le développement de la zone de lyse d'un cocktail de phages lorsque les phages sont adsorbés sur les papiers. C'est d'ailleurs la principale originalité de cette étude dont le but est d'étudier et, si possible de comprendre, la dynamique de la zone de lyse d'un cocktail de phages constitué par deux phages.

### **3. MATÉRIELS ET MÉTHODES**

---

L'effet antibactérien des phages est évalué sur les bactéries cultivées en milieu solide gélosé en boîte de Petri par la méthode de la double couche. Ce chapitre est consacré à la description de cette méthode et aux matériaux nécessaires pour la mettre en œuvre. Nous décrivons ici la préparation de la culture bactérienne, la production de phages, le test antibactérien et la mesure quantitative de la zone de lyse. La fin de ce chapitre traite de la fabrication des papiers utilisés pour fixer de phages.

#### **3.1. CULTURES BACTÉRIENNES**

Pour des raisons du niveau de sécurité insuffisant de nos laboratoires, une culture bactérienne non pathogène de type *E. coli* B est ici utilisée. La préparation et le dénombrement de la culture se déroulent en plusieurs étapes et nécessitent l'utilisation des milieux de culture\* telle que le TSB (Bouillon Trypticase soja) et le TSA (Trypticase Soja Agar).

##### **3.1.1. Préparation de TSB**

Le TSB est un milieu nutritif liquide. La nature liquide facilite la préparation des cultures homogènes. Le milieu permet la croissance d'un grand nombre de microorganismes, en particulier des bactéries. Une masse de 30 g de TSB est dissout dans 1 L d'eau déminéralisée. La solution est ensuite portée à ébullition puis distribuée, par quantités de 3 mL, dans des tubes. Les tubes sont ensuite stérilisés dans l'autoclave pendant 20 minutes avant d'être stockés dans un réfrigérateur jusqu'à l'utilisation.

##### **3.1.2. Préparation de TSA**

Le TSA est un milieu nutritif solide. Une masse de 40 g de TSA est dissout dans 1 L d'eau déminéralisée. La solution est ensuite portée à ébullition puis stérilisée dans un autoclave pendant 20 minutes. La solution est étalée dans plusieurs boîtes de Petri à raison de 25 ml par boîte. Les boîtes sont ensuite déposées dans un incubateur† à 37°C pendant 24 heures afin d'obtenir un tapis solide de TSA. Les boîtes doivent être entreposées dans un réfrigérateur jusqu'à utilisation. Les boîtes sont nécessaires au dénombrement des bactéries et des phages et pour les tests antibactériens.

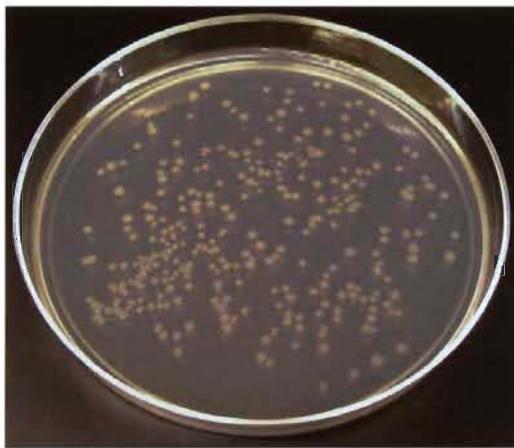
---

\* Milieu de culture: est un support au sein duquel des micro-organismes peuvent se multiplier.

† Un incubateur est une enceinte thermostatée

### **3.1.3. Préparation de la culture bactérienne**

La première étape de préparation de la culture bactérienne est de « repiquer » une boîte de bactéries. Une petite quantité de solution bactérienne est étalée dans une boîte de Petri contenant le TSA. À 37°C dans un milieu riche, la souche bactérienne *E. coli* se divise pour donner une nouvelle génération toutes les 20 minutes. Après 18 heures dans un incubateur à T = 37°C, les bactéries grandissent et forment des colonies par regroupement de plusieurs bactéries alors visibles à l'œil nu, tel qu'illustré à la Figure 10.



**Figure 10 : Colonies de bactéries dans une boîte de Petri contenant le TSA comme milieu de culture.**

La seconde étape consiste à préparer une pré-culture bactérienne à partir de la boîte de bactéries. Une colonie isolée est mise dans un tube de TSB (3 mL) puis elle est conservée à l'incubateur pendant 18 heures afin que les bactéries se développent.

### **3.1.4. Détermination de la concentration de la culture bactérienne**

La concentration en bactéries présente dans la pré-culture doit être ensuite mesurée. Pour ce faire, plusieurs dilutions de  $10^{-1}$  à  $10^{-8}$  sont préparées à partir de la solution initiale, dans de l'eau physiologique (9 g NaCl dans un litre d'eau, soit à 0,9 %). Une petite quantité (0,1 mL) de chaque dilution est prélevée et étalée sur une boîte de Petri contenant du TSA. Après 18 heures à l'incubateur, les bactéries sont sous forme de colonies qui peuvent être comptées. Pour améliorer la précision de la mesure, 3 exemplaires sont réalisés pour chaque dilution. La détermination de la concentration initiale de bactéries est possible grâce à l'équation ci-dessous reliant le nombre de dilution, le volume de la solution ajouté et le nombre des colonies de bactéries, soit :

$$C = \frac{x}{V_{inoc} \times 10^{-dil}} \text{ UFC/mL}$$

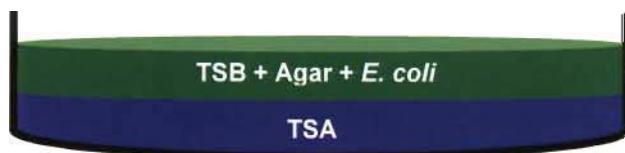
avec :

$x$	le nombre de colonies
$V_{inoc}$	le volume mis dans la boîte et
dil	la dilution utilisée, et
UFC/mL	unité faisant (ou de formation de) colonie, par millilitre.

Cette formule est valable pour un nombre de colonies compris entre 30 et 300 UFC/mL.

### **3.1.5. Formation d'un tapis bactérien (Double couche agar)**

Nous avons adopté la technique de la double couche d'agar pour effectuer le test antibactérien avec les phages. Comme le nom l'indique, la technique présente deux couches distinctes, illustrées à la Figure 11. La première couche est une couche nutritive dite « dure » de TSA. Vu la nature solide de la couche, la diffusion des phages y est difficile. C'est pour cela qu'une deuxième couche composée de TSB et d'Agar<sup>†</sup> est ajoutée au-dessus de cette première couche. L'ajout d'agar à 7 g/L permet la formation d'une solution gélose demi-molle de TSB. Les bactéries sont ensuite mélangées dans la solution de TSB/agar avant la formation de la deuxième couche. La nature demi-molle de la couche offre deux avantages car elle permet a) d'obtenir une distribution homogène des bactéries et b) aux phages de mieux diffuser afin d'interagir avec les bactéries présentes.



**Figure 11 : Illustration schématique de la formation de la double couche utilisée pour le test antibactérien.**

Sans la présence d'un agent antibactérien, les cellules bactériennes sur le milieu de culture gélosé se multiplient et forme, au bout d'un certain temps, un tapis bactérien. L'ajout des phages permet de détruire les bactéries qui se présentent dans la solution molle de TSB. La

<sup>†</sup> Agar : un polysaccharide complexe extrait d'une algue marine et utilisé comme gélifiant végétal dans les milieux de culture

mort des bactéries et la naissance des nouveaux phages se traduisent par l'apparition d'une zone claire, visible à l'œil nu, appelée zone de lyse. La mesure de l'aire de la zone de lyse en fonction du temps permet de quantifier le développement de la zone, et conséquemment de l'activité des phages en fonction de la quantité et de la nature de phages ajoutés.

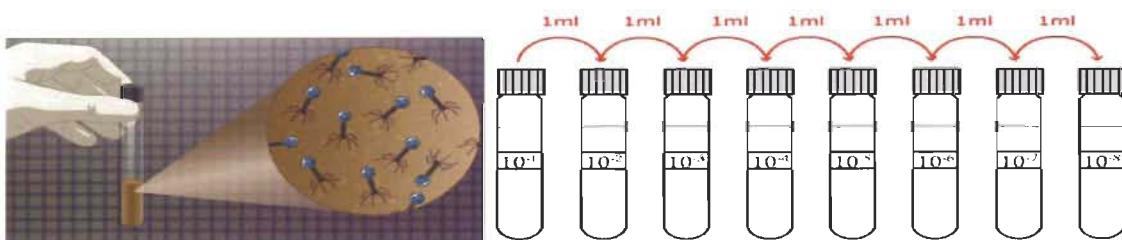
### **3.2. BACTÉRIOPHAGES**

#### ***3.2.1. Productions***

La préparation de phages se fait en plusieurs étapes. La première étape consiste à incorporer 5 mL de bactéries prélevé d'une pré-culture, préparée préféablement la veille, dans 1 L de TSB. La solution obtenue est placée pendant 2 heures dans un incubateur-agitateur à 37°C afin de faire proliférer les bactéries. Ensuite, 2 mL de phages sont ajoutés à la solution. La solution est mise à l'incubateur-agitateur à 25°C pendant 18 heures pour permettre la production de phages en détruisant les bactéries. La solution de phages est ensuite centrifugée afin d'enlever les grosses particules de la solution. Deux filtrations sont alors effectuées. La première avec un filtre de pores de 2  $\mu\text{m}$  pour filtrer les gros débris bactériennes et la seconde avec un filtre de pores de 0,4  $\mu\text{m}$  afin d'éliminer les petits débris et de ne laisser passer seulement les phages (taille maximale de 0,2  $\mu\text{m}$ ). Après filtrations, la solution de phages est conservée dans une chambre froide à une température de 4 °C jusqu'au moment de l'utilisation.

#### ***3.2.2. Dilution de phages***

Les phages produits ont une concentration élevée. Pour déterminer précisément la concentration de phages, il est nécessaire de diluer la solution. Pour ce faire, 8 dilutions dans l'eau physiologique (NaCl 0,9 %) à raison  $10^{-1}$  sont effectuées (Figure 12).



**Figure 12 : Illustration schématique de la dilution de phages.**

#### ***3.2.3. Détermination de la concentration de phages***

La concentration de phages s'obtient en mélangeant 100  $\mu\text{l}$  des bactéries et 100  $\mu\text{l}$  de chaque dilution successive de phages dans un milieu nutritif de gélose demi molle formé de

TSB (5 mL) et d'agar (7 g/L). Chaque mélange est versé sur une boîte de Petri contenant le TSA. La boîte est ensuite mise dans un incubateur pendant 24 heures pour permettre l'apparition des zones de lyse en surface. Les zones de lyse sont par la suite comptées afin de déterminer la concentration de phages tel que présenté à la Figure 13. Pour pouvoir compter les phages, il faut idéalement que leur nombre soit compris entre 15 et 250 UFP/mL. La concentration initiale, en unité de formation de plages par millilitres, est calculée par la formule suivante :

$$C = \frac{x}{V_{inoc} \times 10^{-dil}} \text{ UFP/mL}$$

Avec  $x$  le nombre de phages,  $V_{inoc}$ , le volume mis dans la boîte et  $dil$ , la dilution utilisée.



**Figure 13 : Image des zones de lyse sur une boîte de Petri contenant un mélange phages-bactéries utilisé pour déterminer la concentration de phages.**

### 3.3. DÉTERMINATION DE L'EFFICACITÉ ANTIBACTÉRIENNE

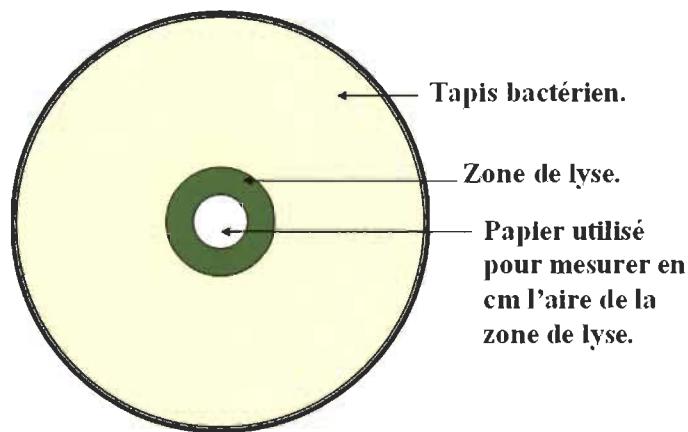
L'effet antibactérien de phages est testé sur les bactéries cultivées en milieux solide gélosé en boîtes de Petri. Nous avons adopté deux stratégies pour effectuer le test antibactérien, soit :

1. L'ajout directement de phages sur le tapis bactérien, et
2. L'adsorption de phages sur des papiers, en vue de la formation des papiers bioactifs. Les papiers sont placés en contact direct avec le tapis bactérien.

La première stratégie permet d'éviter l'influence de l'orientation de phages sur les papiers. La deuxième permet, après déterminations des meilleures conditions d'un point de vue de la concentration de phage d'évaluer les papiers bioactifs même et de comprendre l'influence

de la nature de la surface de papiers sur les orientations de phages, *i.e.* sur l'efficacité antibactérienne.

Dans les deux stratégies, des images de la zone de lyse sont prises à l'aide d'un appareil photographique permettant le suivi du développement des zones de lyse en fonction du temps. Des images sont capturées chaque deux heures, et ce, pendant trois jours. Cette méthode permet l'analyse de la dynamique de développement de la zone de lyse en fonction du temps et, conséquemment, l'évolution de la bioactivité en fonction du temps. Les images sont analysées par un logiciel d'analyse d'image (Adobe Photoshop CS3). Dans le cas de la première stratégie, un rond de papier de 6 mm de diamètre est collé à l'extérieur de chaque boîte de Petri afin d'avoir un repère de surface permettant une détermination précise de l'aire de la zone de lyse (Figure 14). Dans le cas de la deuxième stratégie, les pastilles de papier utilisé comme support de phages, soit des confettis circulaires de 6 mm de diamètre provenant d'une découpe par perforatrice, servent à déterminer l'aire de la zone de lyse.



**Figure 14 : Illustration schématique de la détermination de l'aire de la zone de lyse d'un tapis bactérien, par de phages, sur une boîte de Petri.**

### **3.3.1. Ensemencement direct de phages**

#### **Cas de phages uniques**

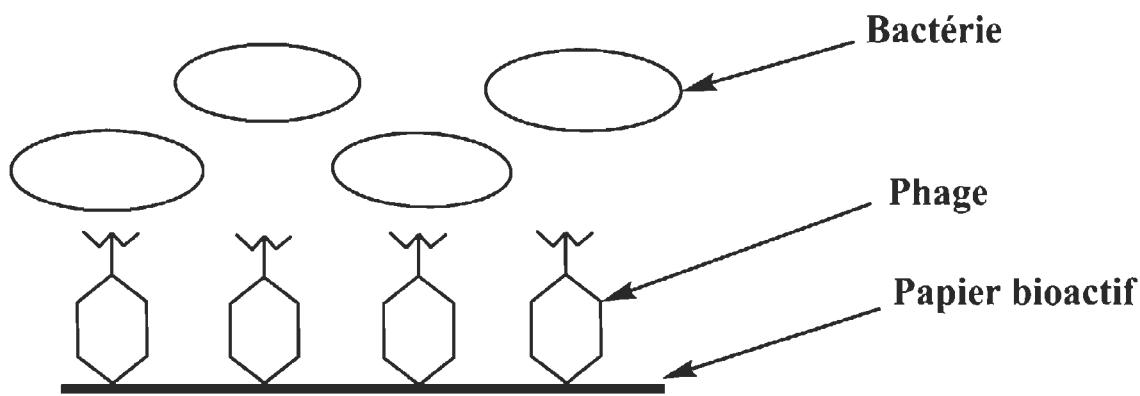
Après une série de 8 dilutions de phages, 2  $\mu$ l de chaque concentration de phages *T4* ou *EcomAG10* sont versés directement sur la surface de tapis bactérien. Trois boîtes sont préparées et analysées par concentration.

## Cas d'un cocktail de phages

2  $\mu$ l de chaque concentration de deux phages sont mélangés dans un tube stérile. Le mélange est ensuite versé sur la boîte de Petri contenant le tapis bactérien.

### **3.3.2. Adsorption de phages sur papiers**

Afin de former des papiers bioactifs, les phages ont été adsorbés, soit phages uniques soit en cocktail, sur des supports formés de papiers. Pour qu'un phage puisse attaquer une bactérie, il faut que la base et les fibres caudales soient libres de contacter l'enveloppe de la bactérie. Ainsi, la tête du phage doit de préférence être positionnée à la surface du papier, tel qu'illustré à la Figure 15.



**Figure 15 : Schéma de l'orientation optimale de phages sur le papier.**

Les papiers ont été préparés en utilisant de la pâte Kraft (Northern Bleached Softwood Kraft ou NBSK). La pâte est constituée de fibres de résineux qui ont subies un traitement Kraft, soit un procédé alcalin qui extrait la lignine, et blanchies, habituellement par un procédé au peroxyde d'hydrogène qui permet d'éliminer les composés colorés, dont la lignine résiduelle, des fibres. Néanmoins, deux problèmes dus à l'utilisation des papiers peuvent se manifester lors de l'adsorption de phages. Premièrement, la surface des fibres est naturellement négative, or la tête de phages est également chargée négativement. De plus, la base du phage possède une légère charge positive. Ainsi c'est la queue qui, normalement, doit préférentiellement être attirée vers la surface du papier. Secondelement, la porosité du réseau fibreux peut diminuer ou favoriser, selon le cas, le taux de rétention des phages en surface du papier.

Pour essayer de répondre aux questions posées par ces deux points, nous avons évalué deux modifications de la surface de papiers avant l'adsorption de phages.

1. Une modification de la chimie de surfaces de fibres par adsorption en surface d'amidon cationique ou de polydopamine afin d'étudier l'influence d'une charge cationique sur l'orientation de phages en surface du papier.

2. Une modification de la surface par calandrage afin, en modifiant la porosité de la surface, d'augmenter le nombre de phages retenus.

L'objectif de cette étude ne consistant pas à étudier la formation des formettes papier dans une approche « papetière », nous nous sommes limités à la description des protocoles utilisés pour obtenir les supports. Les caractérisations des papiers et l'optimisation des paramètres expérimentaux ont fait l'objet d'une autre étude au sein de notre groupe de recherche, notamment par Tarik Jabrane [1]. Il a ainsi été démontré que la polydopamine et l'amidon cationique transformant la charge de surface de papier en la rendant positive et que le calandrage rendant la surface du papier plus lisse et moins poreuse peuvent avoir des effets bénéfiques sur la rétention en surface des phages; la relation n'est cependant pas linéaire.

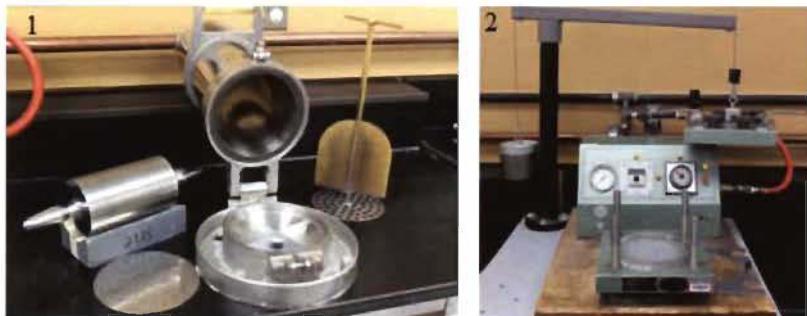
#### Élaboration des supports à base de papiers

La fabrication de formettes de papiers est effectuée au moyen de la formette anglaise qui permet de fabriquer des échantillons de papier de  $70 \text{ g/m}^2$  de grammage, reproductibles en laboratoire. La norme [ISO 5269/1, TAPPI T 205] décrit la préparation de formettes en plusieurs étapes :

- La désintégration des fibres ; qui consiste à désintégrer 20 g de pâte durant 10 minutes, dans 2 litres d'eau. Une fois la désintégration terminée, 2 litres d'eau sont ajoutés à la suspension.
- La dispersion des fibres ; qui consiste à disperser les fibres dans 15 L d'eau.
- La formation des formettes, illustré à Figure 16-1.

Le principe de formation des formettes est simple. Il revient à injecter 900 g de la suspension de fibres, à raison de 1,4 g par formette pour obtenir un grammage de  $70 \text{ g/m}^2$ , dans une colonne et de la remplir avec de l'eau jusqu'au niveau indiqué. La dispersion de pâte est homogénéisée manuellement à l'aide d'un mélangeur. L'eau est ensuite être drainée et une toile métallique disposée au fond de la colonne jouer le rôle de filtre. Les fibres sont retenues, avec une orientation aléatoire sur le filtre. La feuille humide est décollée du filtre à l'aide de deux

papiers buvards, d'une plaque métallique circulaire et d'un rouleau métallique. Cette étape permet un premier séchage qui est complété par deux séchages consécutifs, de cinq puis de deux minutes réalisés à l'aide d'une presse, tel qu'illustré à la Figure 16-2.



**Figure 16 : Formette anglaise (1) et presse (2)**

Les formettes sont ensuite séchées à 50°C pendant 10 minutes puis stockées dans une chambre à humidité et température contrôlées à 50 % HR (humidité relative) et une température de 23°C.

#### Modification de la surface de papier par l'amidon cationique

La modification du papier avec de l'amidon cationique est un procédé peu coûteux et courant dans l'industrie papetière. Une solution d'amidon cationique à 10 % est cuite dans un bain-marie pendant une heure pour obtenir une forme gélatinisée de la solution. La solution est ensuite ajoutée à la suspension de fibres avant la formation de papiers. Le mélange est ensuite utilisé pour fabriquer les formettes anglaises. L'adsorption de l'amidon cationique sur les fibres permet de rendre la surface des fibres chargées, donc du papier formé, positivement et par conséquent améliorer potentiellement l'orientation des phages en surface.

#### Modification de la surface de papier par la polydopamine

La dopamine est un composé légèrement basique ( $\text{pH} = 8,5$ ) qui peut polymériser sur tous les types de surface sous forme d'une couche, fine et uniforme de polydopamine de charge positive. Pour polymériser la dopamine, les fibres cellulosiques sont immergées dans une solution de 2g/L de dopamine pendant 24 heures à  $\text{pH} = 8,5$  en présence d'un agent oxydant (periodate de sodium ou  $\text{NaIO}_4$ ) dans un rapport polydopamine/ $\text{NaIO}_4$  de 2:1. Les fibres sont ensuite lavées avec de l'eau déminéralisé et filtrées afin d'enlever l'excès de réactifs, puis utilisées pour fabriquer des formettes.

## Calandrage de papier

Le calandrage consiste à passer la formette entre deux rouleaux chauffants qui vont compacter la structure du papier et lisser la feuille. Cette opération post-fabrication de la formette permet de réduire la porosité de la surface et d'augmenter potentiellement la quantité de phages adsorbée en surface.

### ***3.3.1. Caractérisation des papiers***

Les principales grandeurs qui peuvent avoir une influence sur l'adhésion de phages au papier sont la main (ou bouffant du papier), la porosité et la charge des fibres. La main est l'inverse de la densité, en  $\text{cm}^3/\text{g}$ . Elle est une caractéristique de la structure du papier. Pour une étude comparative, les papiers étudiés doivent normalement avoir une main similaire. La porosité est indiquée par la mesure de la perméabilité à l'air. En effet, plus un papier est poreux, plus les phages vont pénétrer à l'intérieur de la structure et ne pourront donc pas être disponibles pour attaquer les bactéries. Il faut cependant noter qu'un certain niveau de porosité est nécessaire pour maintenir durablement les phages en surface du papier [1]. Ainsi l'effet de la porosité est ici étudié par l'approche du calandrage du papier. Pour l'obtention d'une bioactivité optimale, il est facilement concevable que les phages ne soient qu'en, et exclusivement en, surface du papier. Enfin, la mesure du potentiel Zeta permet de mesurer la charge cationique des fibres cellulosiques. Étant donné que les phages sont chargés, la détermination des charges des fibres permet aussi de mieux comprendre les orientations de phages en surface. Bien que la main et la porosité soient mesurées sur les papiers, de par la méthode même, la mesure du potentiel Zeta est effectuée sur les fibres en suspension, avant la formation des papiers. Le Tableau 3 regroupe l'ensemble des grandeurs qui caractérisent les papiers utilisés dans notre étude.

**Tableau 3 : Propriétés des différents papiers**

Formettes/fibres	Données	Main (cm <sup>3</sup> /g)	Porosité (mL/min)	Potentiel Zeta (mV)
Références	Moyenne	2,94	12299	- 19,7
	Erreur	4%	7%	3%
	Écart-type	0,01	842	0,6
Modifiées avec de l'amidon cationique	Moyenne	2,73	11454	9,7
	Erreur	5%	1%	8%
	Écart-type	0,01	65	0,8
Modifiées avec la polydopamine	Moyenne	2,62	10853	4,3
	Erreur	4%	4%	8%
	Écart-type	0,01	385	0,4
Calandrées	Moyenne	0,1	300	- 19,7
	Erreur	5%	10 %	3%
	Écart-type	0,5	30	0,6

Les charges de surfaces de fibres, constitutantes les papiers de références, sont négatives. Ceci est du à la présence des groupes hydroxyles en surfaces des fibres de celluloses. La présence de l'amidon cationique et de polydopamine a inversé la charge des surfaces des fibres. Par conséquent la modification des charges des surfaces a bien été effectuée. Comme les autres paramètres, tels que la main et la porosité, n'ont pas été modifiés d'une manière significative, cela permet d'étudier l'influence de charge des surfaces sur l'adsorption de phages. D'autre part, en ce qui concerne le calandrage des papiers qui n'a pas d'influence sur la charge des surfaces des fibres, une diminution significative de la porosité et de la main ont été constatée. Ceci pourrait influencer les nombres de phages retenus en surfaces du papier. Il est en première approximation possible de considérer comme aléatoire

l'orientation des phages en surface, et ce, en fonction des faibles différences de rugosité de la surface du papier.

### Adsorption de phages

Les trois types de papiers préparés ainsi qu'un papier non modifié, utilisé comme papier témoin, sont traités avec des phages. Pour ce faire, 2  $\mu$ L de phages, sous formes unique, sont déposés sur une pastille de papier de 6 mm de diamètre, découpée avec une perforatrice de bureau. Pour l'adsorption d'un cocktail de phages, 2  $\mu$ L de chaque genre de phages sont mélangés puis déposés sur une pastille de papier de 6 millimètres de diamètre. Le papier est ensuite séché à l'air pendant 10 minutes puis mis en contact avec le tapis bactérien préparé dans la boîte de Petri. Les boîtes sont ensuite conservées à l'incubateur à 37°C pendant toute la durée de l'expérience. Chaque expérience a été faite en triplicata et certaines expériences ont été répétées (2 triplicatas) pour vérifier les résultats. Par la suite, une étude de l'efficacité antibactérienne et de la dynamique de la zone de lyse est effectuée. L'influence de la concentration est aussi analysée. Trois concentrations de phages, dites petite, moyenne et grande concentration sont évaluées, respectivement  $10^3$  ufp/mL,  $10^5$  ufp/mL et  $10^8$  ufp/mL.

---

## 4. RÉSULTATS & DISCUSSIONS

---

Après une courte présentation des valeurs de concentration de bactéries et de phages préparés, la première partie porte sur l'analyse des résultats obtenus en mettant les phages en contact direct avec les bactéries. La deuxième partie porte sur la présentation et l'interprétation des résultats obtenus avec les phages sur les papiers.

### 4.1. CARACTÉRISATION DES BACTÉRIES:

Les bactéries préparées ont été analysées par un microscope optique et par des tests microbiologiques spécifiques aux bactéries. La Figure 17 représente la forme obtenue avec le microscope optique.

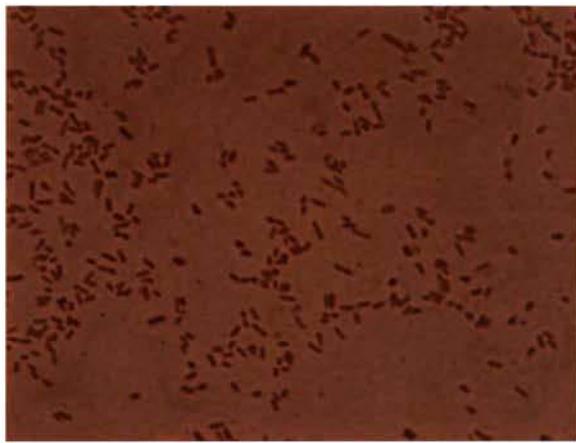


Figure 17 : Image des bactéries obtenues par le microscope optique.

La forme en bâtonnets observée par le microscope optique est typique des bactéries *E. coli*. Le Tableau 4 regroupe les résultats obtenus par différents tests microbiologiques sur les souches bactériennes d'*E. coli* B telles que préparées.

**Tableau 4 : Résultats des tests d'identifications bactériens.**

Tests	Résultats	Commentaires
Test Mac Conkey	Les bactéries croissent	<i>E. coli B</i>
Test Indole	Test négatif	<i>E. coli B</i>
Test MR (Methyl Red)	Test positif	<i>E. coli B</i>
Test VP (Voges-Proskauer)	Test négatif	<i>E. coli B</i>
Test citrate	Test négatif	<i>E. coli B</i>
Fermentation glucose-lactose	Glucose: positif Lactose: positif	<i>E. coli B</i> <i>E. coli B</i>

L'ensemble des tests montrent et confirment que les bactéries préparées sont bien des souches d'*E. coli B*.

#### **4.2. CONCENTRATION DES BACTÉRIES**

Dans cette étude, l'ensemencement des bactéries est répété plusieurs fois pour chaque expérience. La détermination de la concentration révèle une valeur répétitive de  $10^8$  ufc/mL. Tout au long de cette étude la concentration des bactéries est constante.

#### **4.3. CONCENTRATION DES PHAGES**

La détermination des concentrations de phages (*T4* et *EcomAG10*) révèle une valeur de  $10^8$  ufp/mL. Les solutions de phages sont diluées avec de l'eau physiologique et une étude systématique est réalisée sur l'influence de la concentration de phages. 8 concentrations de phages allant de  $10^8$  à  $10^1$  ufp/mL sont ainsi analysées.

#### **4.4. ZONE DE LYSE SANS PAPIER**

##### **4.4.1. Efficacité des phages**

Avant d'étudier la dynamique de la zone de lyse, il a été nécessaire de vérifier l'efficacité de chaque phage ainsi que du cocktail de phages lorsqu'ils sont placés en contact direct avec le tapis bactérien. La Figure 18 montre trois images de la zone de lyse qui

représentent respectivement une zone de lyse de phages *T4*, *EcomAG10* et un cocktail de phage, après 8 heures.

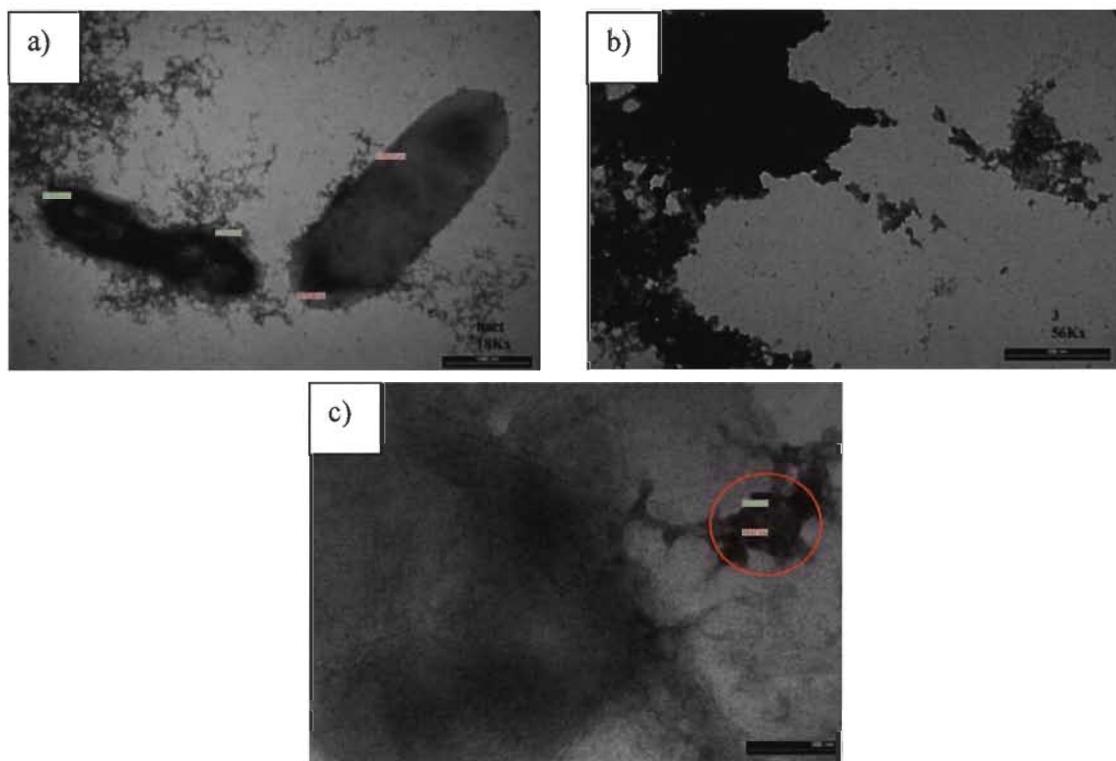


**Figure 18 : Images de la zone de lyse de phages a) *T4*, b) *EcomAG10* et c) cocktail de phages après 8 heures.**

Dans les trois images, l'apparition d'une zone de lyse est observée. Vu la ressemblance entre les trois images, une analyse par microscopie électronique à transmission de la zone de lyse de *T4* a été effectuée. Dans ce cas, on constate clairement le tapis bactérien (

Figure 19a) et la zone de lyse (

Figure 19 b et c).



**Figure 19 : Analyse par microscopie électronique à transmission du tapis bactérien (a) et de la zone de lyse (b et c).**

La Figure 19a montre la présence d'objets en bâtonnets qui sont les images typiques des bactéries *E. coli* B. Les deux Figures 19 b et c ne montrent pas la présence de bactéries. Les objets présents dans la Figure 19 b représentent probablement les débris bactériens résultant de la lyse des bactéries par les phages. Sur la Figure 19 c la présence d'un phage ( cercle rouge) est constatée. Ce résultat montre l'efficacité de phages *T4*, *EcomAG10* et du cocktail pour lutter contre les bactéries. Par la suite une étude de l'influence de la concentration sur la dynamique de la croissance de la zone de lyse est effectuée, et ce, pour chaque cas.

#### **4.4.2. Dynamique de la zone de lyse: le cas de phages *T4***

La croissance de la zone de lyse de phages *T4* a été suivie en fonction du temps pour différentes concentrations. Deux constatations majeures sont à noter :

1. Apparition de deux zones de lyse après 8 heures. Une zone interne, foncée, et une zone externe, claire, telles qu'illustrées à la Figure 20.



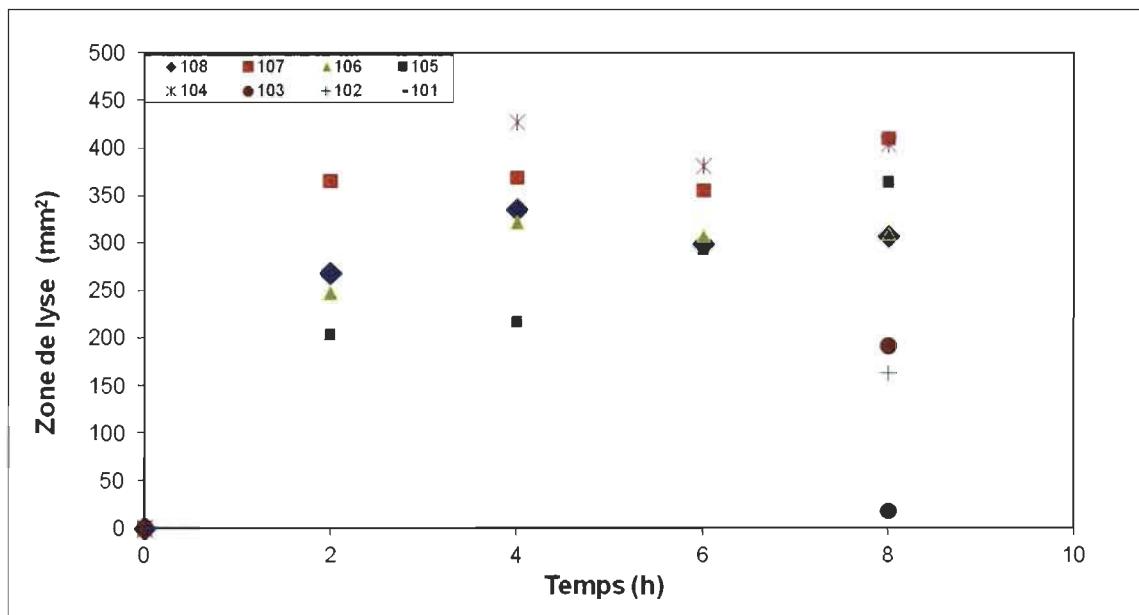
**Figure 20 : Image de la croissance de la zone de lyse qui montre la présence de deux zones, zone interne (foncée) et zone externe (claire).**

La zone interne est due à la disparition de bactéries tuées par les phages. Au départ une grande population de phages est mise en contact avec les bactéries conduisant à une disparition de l'ensemble des bactéries. Tandis que la zone claire représente la zone de diffusion de phages et par conséquent une zone où les bactéries ne sont pas totalement éliminées. Bien que théoriquement chaque phage pénétrant une bactérie doive donner naissance à l'apparition d'environ 200 phages, la rencontre des phages avec des bactéries voisines demeure un

événement de probabilité, en fonction de l'orientation et de la proximité phage-bactérie<sup>§</sup>. De plus, plusieurs phages peuvent attaquer une seule et même bactérie, voire une membrane d'une bactérie déjà éclatée.

Un autre facteur additionnel et potentiel provient du fait qu'une bactérie peut, avec le temps, développer une résistance contre les phages. Cette résistance conduit à une coexistence entre les phages et les bactéries.

Les variations des aires de la zone de lyse claire, zone interne, sans bactérie, ont été mesurées pour les différentes concentrations en fonction du temps. La Figure 21 représente la variation de la zone de lyse jusqu'à une période de 8 heures.

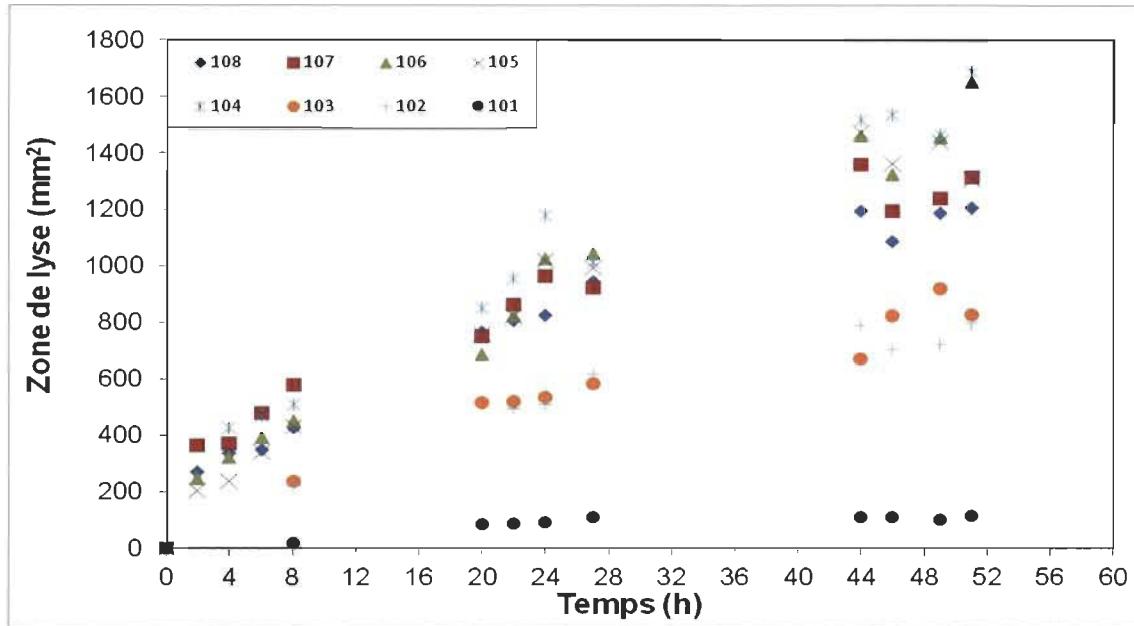


**Figure 21 :** Variation de la zone de lyse en fonction du temps pour différentes concentrations de phages T4.

2. Une dépendance de l'apparition de la zone de lyse en fonction de la concentration est constatée. Pour les concentrations élevées, supérieures à  $10^4$  ufp/mL, l'apparition d'une zone de lyse exploitable est observée à partir de 2 heures. Pour les faibles concentrations de phages l'apparition n'est pas visible avant 8 heures. Une deuxième zone de lyse, zone externe, a été observée; cette zone représente probablement la propagation de phages dans le tapis bactérien.

La variation de la zone de lyse totale, soit zones interne et externe, est présentée à la Figure 22.

<sup>§</sup> Techniquement les phages ne possédant pas de flagelle ne peuvent pas se déplacer par eux-mêmes.



**Figure 22 :** Variation de la zone de lyse totale (zones claire et foncée) en fonction du temps pour différentes concentrations de phages T4.

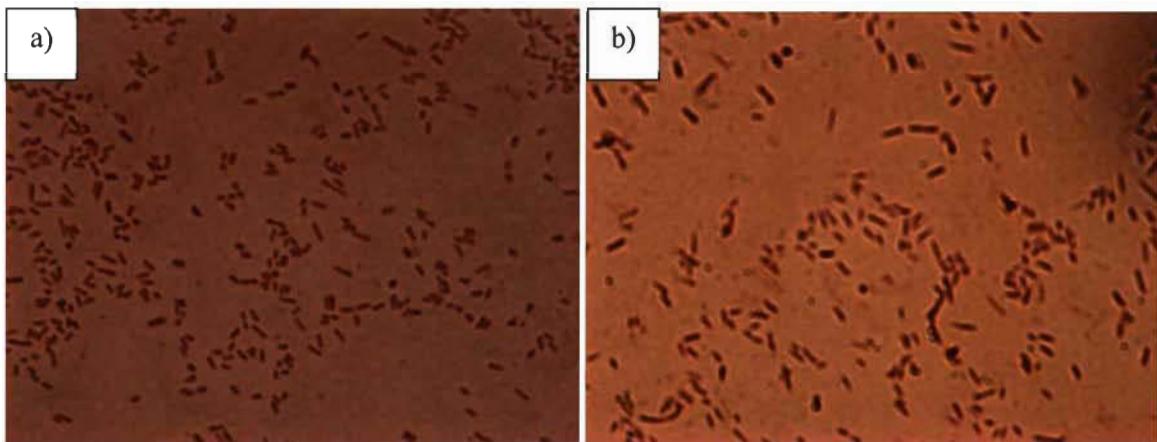
Nous avons constaté que la tendance de la croissance de la zone de lyse reste la même pour les différentes concentrations de phages lorsque le temps augmente. Néanmoins, des résultats comparables pour les concentrations variant entre  $10^4$  ufp/mL et  $10^8$  ufp/mL peuvent être dus à l'existence d'un rapport optimal entre les phages et les bactéries. Au-delà de ce rapport, l'augmentation de la concentration de phages n'améliore pas l'aire de la zone de lyse et l'apparition d'un plateau est observée.

La croissance de la zone de lyse a été surveillée pour un temps plus long que les 8 heures de notre protocole initial. Au-delà d'une semaine, nous avons observé la disparition de la zone de lyse (Figure 23) et l'apparition de colonies bactériennes.



**Figure 23 :** Image de la disparition de la zone de lyse après une semaine de contact entre les phages et le tapis bactérien.

Cette disparition est probablement due à l'apparition des bactéries résistantes. Par la suite, plusieurs essais d'identification des bactéries ont été effectués sur des matières prélevées dans la zone envahie. Une étude microscopique de cette zone a été réalisée par la microscopie optique. Les Figure 24 a et b représentent deux images obtenues par microscopie optique des bactéries *E. coli* B et des bactéries résistantes envahissantes la zone de lyse initiale.



**Figure 24 :** Images obtenues par un microscope optique des a) bactéries *E. coli* et b) des bactéries résistantes qui envahissent la zone de lyse initiale.

Les deux images présentées à la Figure 24 montrent des formes semblables; confirmant l'envahissement de la zone de lyse par des bactéries.

Par la suite, des tests additionnels d'identification ont été effectués pour étudier la nature de ces bactéries. Les différents tests effectués sont présentés au Tableau 4. Ils indiquent et confirment que les bactéries sont *E. coli* B, sauf dans le cas du test de Lactose. Ce dernier donne des résultats positifs sauf sur une partie de la surface de tube : ce qui pourrait être le

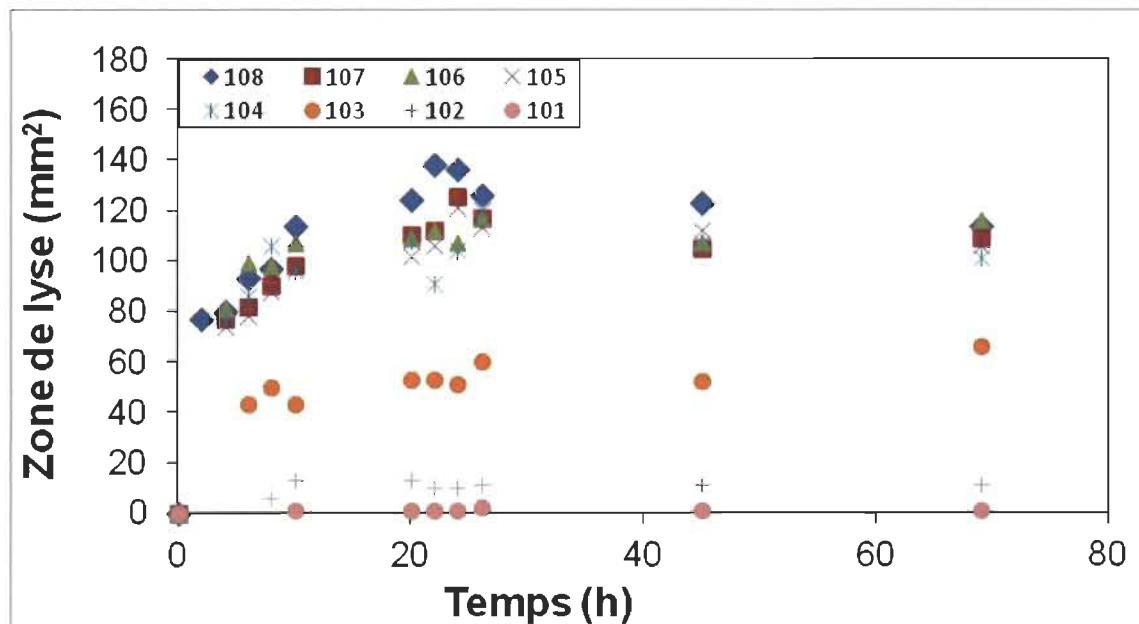
résultat d'une mutation des bactéries pour résister aux attaques de phages. Le temps relativement long (semaine) de contact entre *T4* et *E. coli* B a permis à ces derniers de développer un genre de mutation qui leur a permis de survivre et par la suite d'envahir la zone de lyse initiale (après 8 heures)

#### **4.4.1. Dynamique de la zone de lyse: le cas de phages *EcomAG10***

Les mêmes expériences effectuées avec les phages *T4* ont été répétées avec les phages *EcomAG10* dans le but d'étudier le développement de la zone de lyse pour différentes concentrations de phages.

Les résultats expérimentaux ont montré la présence de deux zones de lyse similaires à celles observées dans le cas du *T4*. Néanmoins, pour un temps plus long, la disparition de la zone de lyse n'a pas été constatée de la même manière que dans le cas du *T4*.

La Figure 25 montre la variation de l'aire de la zone de lyse de phages *EcomAG10* pour différentes concentrations de phages utilisées.



**Figure 25 :** Variation de la zone de lyse (zone totale) en fonction du temps pour différentes concentrations de phages *EcomAG10*.

L'apparition de la zone de lyse dépend de la concentration. Plus la concentration augmente, plus la vitesse d'apparition et l'aire de la zone de lyse augmente. Après 2 heures, l'apparition de la zone de lyse est constatée seulement pour une concentration de  $10^8$  ufp/mL.

Après 10 heures, l'apparition de la zone de lyse est constatée quelque soit la concentration en phages. La tendance de la croissance de la zone de lyse reste la même pour les différentes concentrations. Pour un temps plus long, un plateau est constaté pour l'ensemble des concentrations, et ce, comme pour le phage *T4*. Il semble là aussi qu'un rapport optimal entre les phages et les bactéries existe.

#### **4.4.2. Comparison *T4* et *EcomAG10*:**

Une comparaison entre les deux phages montre, qu'en plus des effets antibactériens pour l'*E. coli B*, ils ont deux points communs majeurs.

1. Une augmentation de la zone de lyse suivie par une formation d'un plateau après un certains temps.
2. La zone de lyse est plus rapide pour les concentrations élevées.

D'autre part, des avantages d'un phage par rapport à l'autre ont été remarqués. Dans le cas des phages *T4*, pour une même concentration phagique, l'aire de la zone de lyse est plus grande que celle des phages *EcomAG10*. L'inconvénient de *T4* est par contre relié à l'apparition des bactéries résistantes. Cette apparition n'a pas été observée dans le cas de l'*EcomAG10*.

#### **4.4.3. Dynamique de la zone de lyse: le cas de cocktail de phages (*T4* et *EcomAG10*)**

Les deux phages ont été appliqués sous forme d'un cocktail sur une culture bactérienne de la même manière que les phages *T4* et *EcomAG10*. Le développement de la zone de lyse est aussi suivi en fonction du temps et l'aire de la zone de lyse mesurée. La Figure 26 représente la première partie de la croissance de la zone de lyse en fonction du temps.

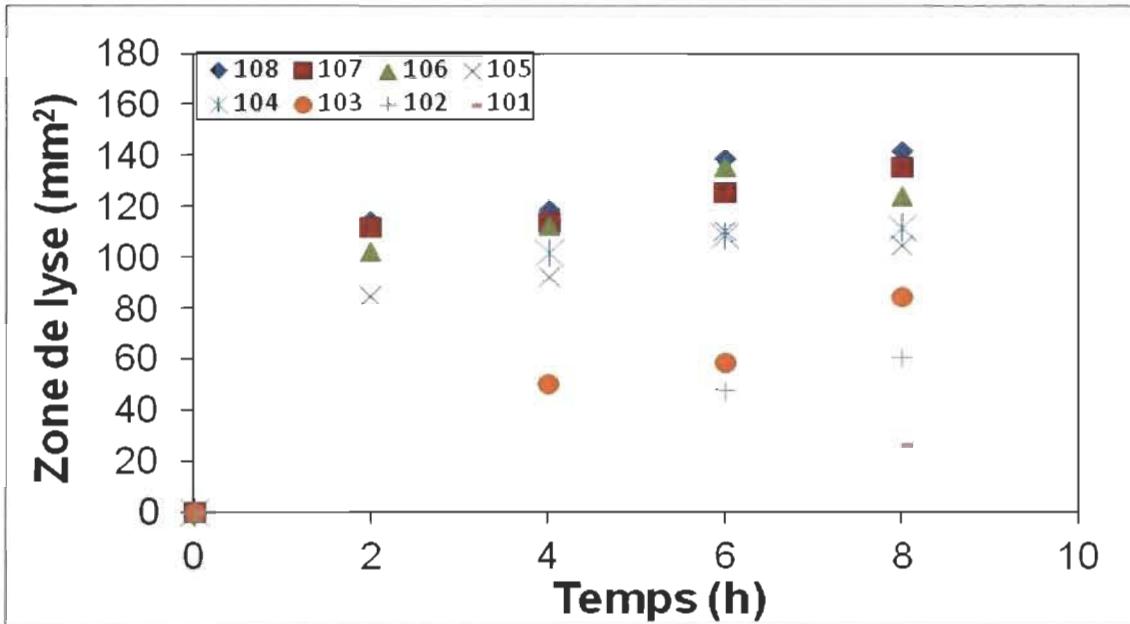
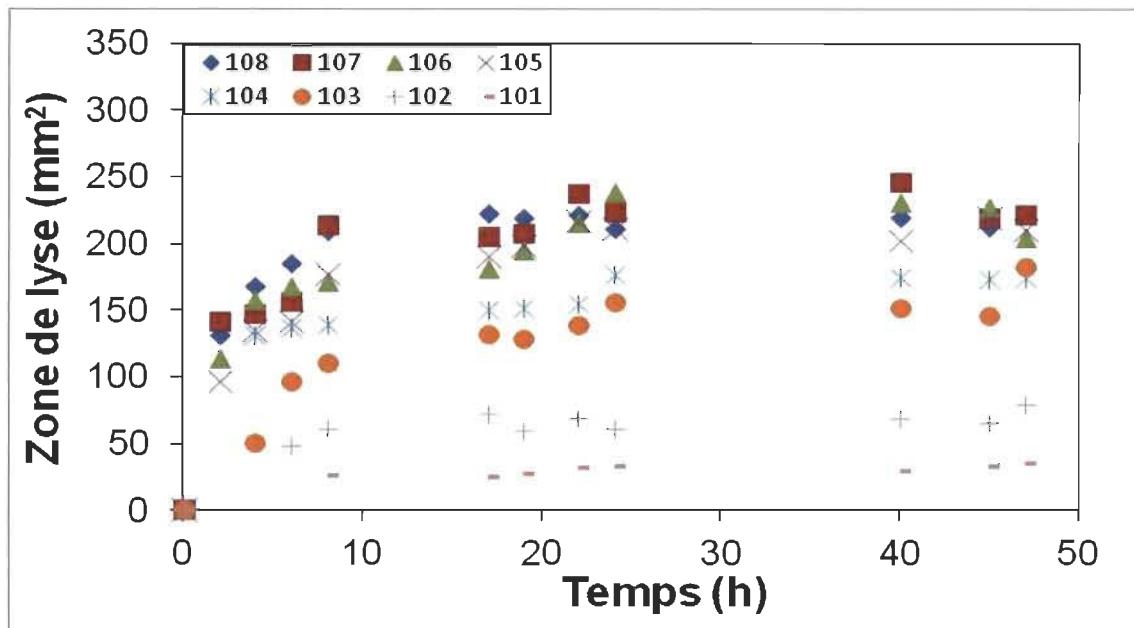


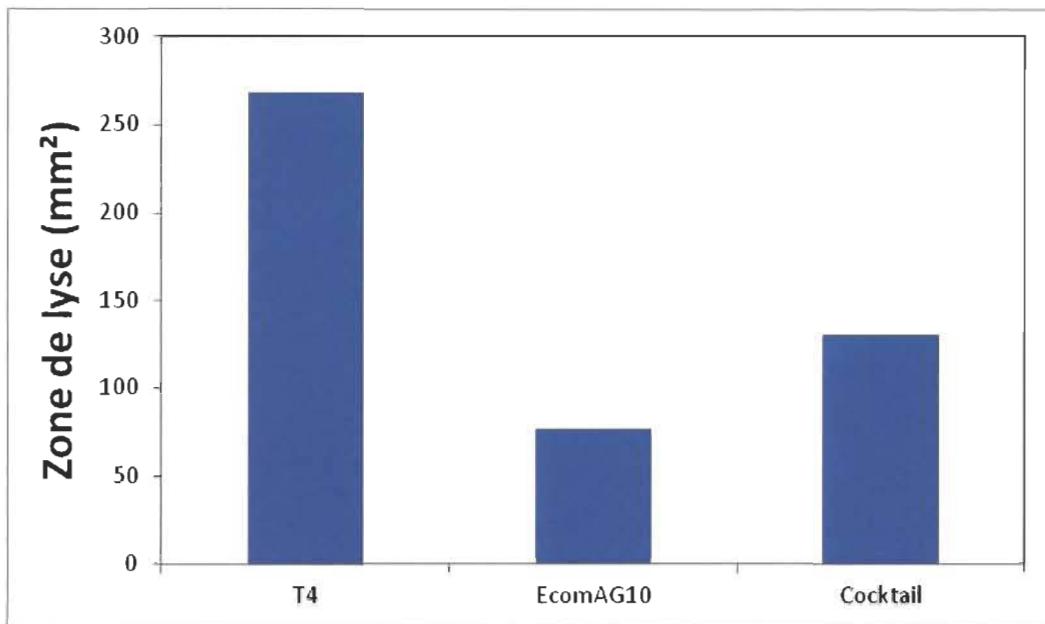
Figure 26 : Variation de la zone de lyse en fonction du temps pour différentes concentrations de cocktail de phages.

La première conclusion d'importance, même si quelque peu attendue, est que le cocktail de phages garde des propriétés antibactériennes. Il n'y a pas d'effet négatif d'un phage par rapport à l'autre qui serait signe d'une synergie négative. D'autre part, l'apparition de la zone de lyse dépend toujours de la concentration de phages, et ce, comme pour les deux cas précédents des phages seuls. La Figure 27 montre la variation de la zone de lyse pour un temps plus long.



**Figure 27 :** Variation de l'aire de la zone de lyse en fonction du temps pour différentes concentrations de cocktail de phages pour une longue durée.

L'apparition d'un plateau est observée à partir de 10 heures; confirmant une fois de plus mais pour un cocktail de phages, l'apparition d'un rapport optimum entre les phages et les bactéries. Cependant, pour une durée de contact plus élevée entre le cocktail et les bactéries, l'apparition des bactéries résistantes, soit la disparition de la zone de lyse, n'a pas été constatée. Une comparaison entre l'aire de la zone de lyse de chaque phage et de cocktail pour un temps de 2 heures et pour une concentration de  $10^8$  ufp/mL est présentée à la Figure 28.



**Figure 28 : Comparaison de l'aire de la zone de lyse entre les phages seuls et en cocktails pour une concentration de  $10^8$  ufp/mL et un temps de 2 heures.**

La comparaison présentée sur la Figure 28 montre que l'aire de la zone de lyse de cocktail de phages se positionne entre celles des deux phages *T4* et *EcomAG10*. Ce résultat montre que les deux phages pourraient fonctionner en même temps pour lutter contre les bactéries. Dans un tel scénario, on peut envisager que les phages *T4* serviraient à augmenter la taille de la zone de lyse, les phages *EcomAG10* joueraient eux un rôle de lutte contre l'apparition des bactéries résistantes. Il est aussi opportun de rappeler ici que l'utilisation de deux phages pourrait servir pour lutter contre plusieurs genres de bactéries.

Pour la suite de notre étude, les phages sont ensemencés sur des papiers afin de fabriquer des papiers bioactifs basés sur l'utilisation d'un cocktail de phages et confirmer, ou non, que les effets obtenus ci-dessus sont transférables.

#### **4.5. ZONE DE LYSE AVEC PAPIER**

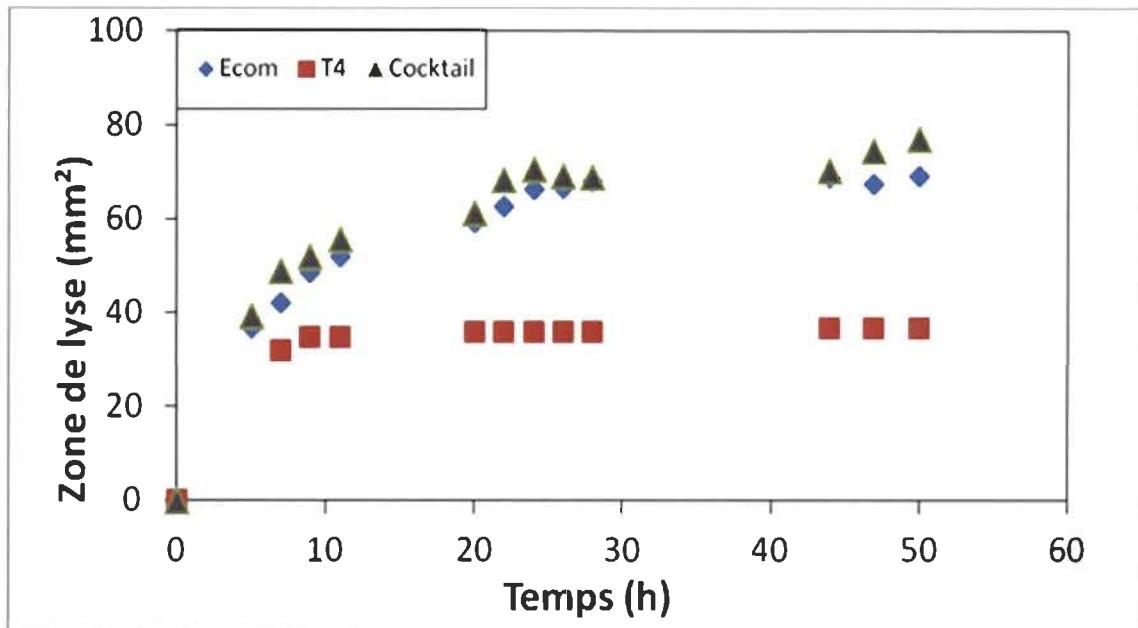
Rappelant que l'efficacité de papiers bioactifs est contrôlée par l'orientation et les nombres de phages retenus en surface des papiers, une orientation optimale est obtenue lorsque les fibres caudales sont orientées vers l'extérieur. D'autre part, la diminution de la porosité de papiers permet d'augmenter la quantité de phages retenue en surface. Pour mieux comprendre l'influence de la modification des papiers sur les phénomènes de bioactivité, les phages sont

appliqués à la fois seuls et en cocktail sur les différents papiers préparés. L'ensemble des tests ont été comparés avec un papier de référence qui n'a pas subit de telles modifications.

#### **4.5.1. Influence de la concentration de phages:**

Trois concentrations de phages ont été choisies pour l'étude sur papier. Une faible concentration de  $10^3$  ufp/mL, une concentration moyenne de  $10^5$  ufp/mL et finalement une concentration élevée de  $10^8$  ufp/mL. Pour le papier de référence et dans les trois cas (*T4*, *EcomAG10* et cocktail), pour la faible concentration, nous n'avons pas constaté l'apparition de la zone de lyse. Bien que pour la même concentration, l'apparition d'une zone de lyse avait été observée avec les phages appliqués directement sur les bactéries, ici l'absence de la bioactivité peut s'expliquer par un faible taux de rétention en surface et/ou une mauvaise orientation des phages; probablement les deux phénomènes. Pour une concentration de  $10^5$  ufp/mL, nous avons constaté que l'aire de la zone de lyse n'est pas vraiment exploitable. Seulement dans le cas d'une concentration élevée de  $10^8$  ufp/mL l'apparition des zones de lyse exploitables est constatée. Par la suite, nous avons choisi de travailler avec une concentration de  $10^8$  ufp/mL pour étudier l'influence de différents traitements de surface des papiers sur la bioactivité.

La Figure 29 représente la variation de l'aire de la zone de lyse en fonction du temps, pour un papier de référence modifié avec la même quantité de phages *T4*, *EcomAG10* et le cocktail de deux phages.



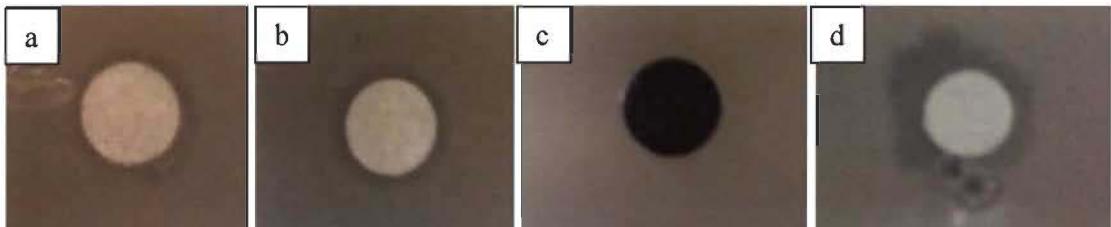
**Figure 29 : Variation de l'aire de la zone de lyse pour un papier de référence modifié par les phages T4, EcomAG10 et un cocktail de phages.**

La Figure 29 montre que la tendance de la croissance de l'aire de la zone de lyse est semblable pour le phage *EcomAG10* appliqué seul et pour le cocktail; celle du phage *T4* étant plus basse. Dans les trois cas, une augmentation de l'aire de la zone de lyse est initialement observée, suivie par la formation d'un plateau, très apparent dans le cas du phage *T4*. Une comparaison entre les trois cas montre que le papier traité avec les phages *T4* possède le caractère antibactérien le plus faible. Dans le cas, où les phages avaient été appliqués directement, sans papier, les phages *T4* étaient plus efficaces. Les taux de rétention et/ou l'orientation des phages sont les explications les plus probables d'un tel résultat. Dans le cas du phage *EcomAG10* sur le papier, les valeurs sont plus élevées. L'utilisation d'un cocktail de phages améliore légèrement les valeurs de l'aire de la zone de lyse.

Vu que nous n'avons pas beaucoup d'information sur la taille de phages *EcomAG10*, les résultats sont présentés en fonction de la modification de surfaces des papiers pour chaque nature de phages. Ceci permet de diminuer les variables : la seule variable étant la nature de la surface de papiers; et de conclure sur l'influence de la modification des surfaces des papiers sur l'amélioration, on pas, de la nature antibactérienne de chaque papier. Nous nous intéresserons donc, pour chaque cas (*T4*, *EcomAG10* et cocktail), à la variation de l'aire des zones de lyse en fonction du temps pour les quatre surfaces, soit le papier de référence, le papier + amidon cationique, le papier + polydopamine et le papier calandré.

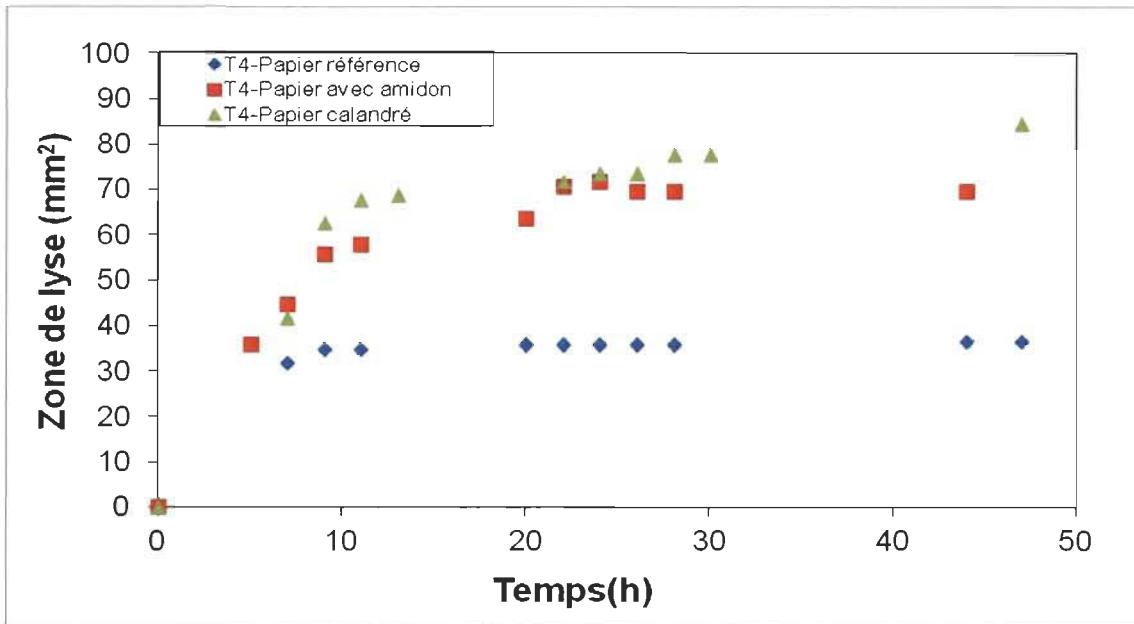
## Le cas des phages T4

Les phages *T4* ont été appliqués sur les quatre types de papiers : référence, modifié avec de l'amidon cationique, modifié avec de la polydopamine et calandré. Ces papiers ont été mis en contact avec le tapis bactérien. La Figure 30 représente un exemple des zones de lyse obtenues avec différents papiers bioactifs à base de phages *T4* (le temps de prise – approximativement 4 heures - est le même dans les quatre cas).



**Figure 30 : Différents papiers bioactifs à base de phage T4 a) Papier de référence b) Papier modifié avec de l'amidon cationique c) Papier modifié avec de polydopamine d) Papier calandré.**

Une apparition de la zone de lyse est constatée sauf dans le cas du papier traité avec de la polydopamine. L'inefficacité bioactive peut être expliquée par des interactions spécifiques entre les phages *T4* et la polydopamine. En effet, les phages *T4* contiennent des fonctions amines qui peuvent interagir avec les fonctions aldéhydes des polydopamines. Cette interaction peut avoir pour conséquence d'augmenter l'adhésion de phages en surface et de diminuer significativement leur déplacement. Dans les autres cas, l'apparition des zones de lyse indique les caractères antibactériens et la bioactivité des papiers. La variation de l'aire de contact en fonction du temps a été calculée et suivie dans chaque cas. La Figure 31 représente la variation dans le temps pour les trois types de papiers et pour le phage *T4*.

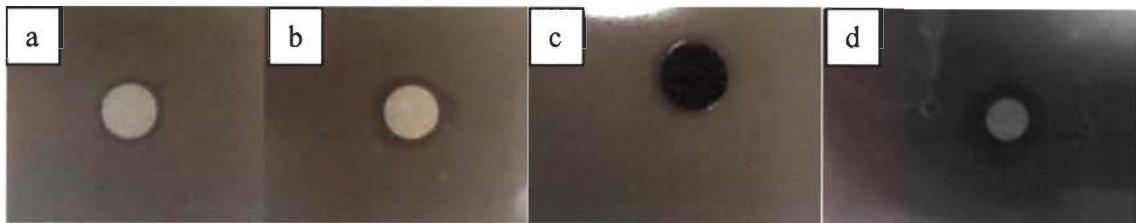


**Figure 31 : Variation de l'aire de la zone de lyse pour les phages T4 pour trois surfaces de papiers (papier de référence, papier + amidon et papier calandré).**

La Figure 31 permet de comparer l'efficacité de chaque papier. L'utilisation de l'amidon cationique ainsi que le calandrage améliorent d'une manière significative les aires de la zone de lyse. Dans le cas de l'amidon cationique, l'augmentation peut être due à l'orientation de phages T4 en surface et/ou à une augmentation de taux de rétention de phages. Dans le cas des papiers calandrés, l'augmentation est expliquée par la seule augmentation des taux de rétention due à une diminution de la porosité de surface.

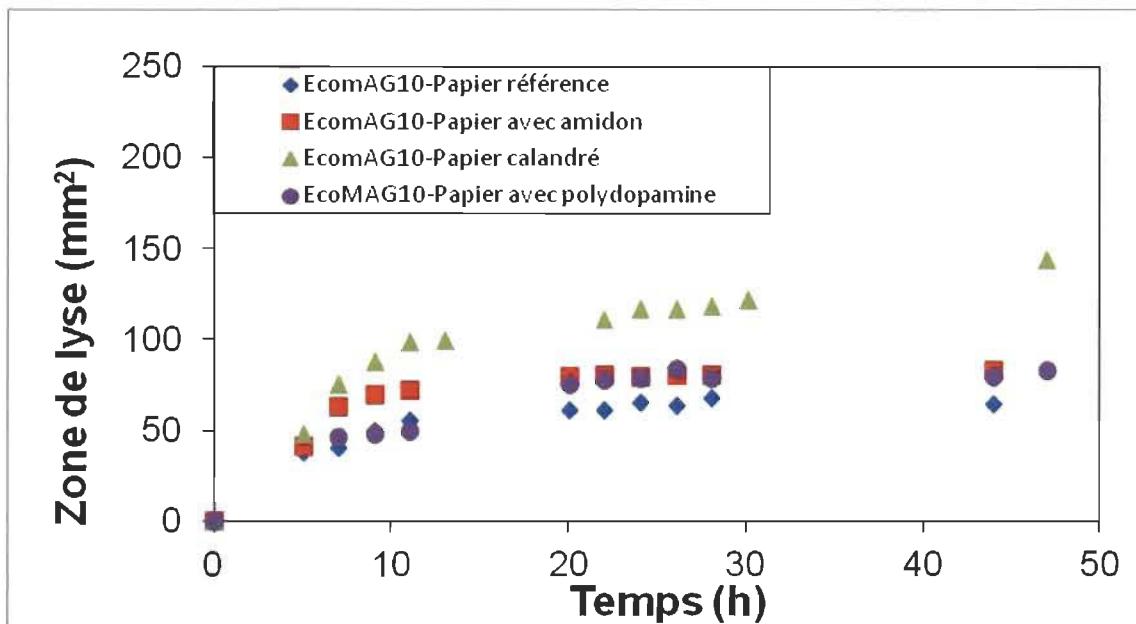
#### Le cas de phages *EcomAG10*

Les phages *EcomAG10* ont été appliqués sur les quatre types de papiers : papier de référence, papier + amidon, papier + polydopamine et papier calandré. Dans les quatre cas, l'apparition d'une zone de lyse a été constatée indiquant que les quatre papiers ont un caractère bioactif. Dans le cas de polydopamine, il serait nécessaire d'avoir plus d'information sur les phages *EcomAG10* pour mieux comprendre l'apparition de la zone de lyse. D'autre part, une comparaison entre les deux surfaces, par une étude microscopique, après adsorption de phages (cas T4 et *EcomAG10*) permet cependant de mieux comprendre l'apparition, ou pas, de la zone de lyse. La Figure 32 représente un exemple des zones de lyse obtenues avec différents papiers bioactifs à base de phages *EcomAG10* (le temps de prise est le même dans les quatre cas).



**Figure 32 :** Différents papiers bioactifs à base de phages EcomAG10 a) Papier de référence b) Papier modifié avec de l'amidon cationique c) Papier modifié avec de polydopamine d) Papier calandré.

La variation de l'aire de contact en fonction du temps a été suivie pour chaque cas. La Figure 33 représente cette variation en fonction du temps pour les quatre cas.

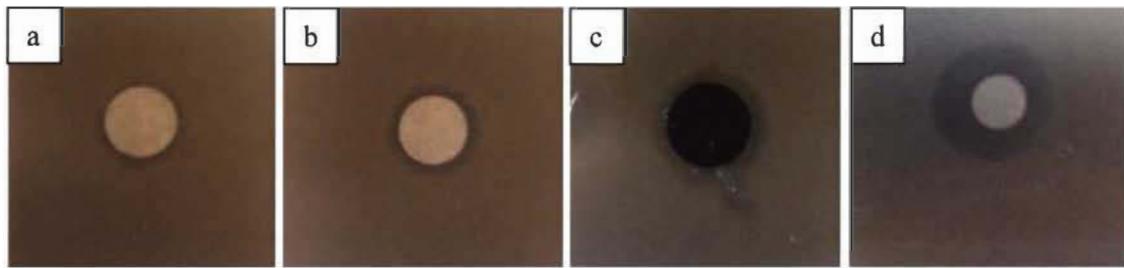


**Figure 33 :** Variation de l'aire de la zone de lyse pour les phages EcomAG10 pour quatre papiers : papier de référence, papier + amidon, papier + polydopamine et papier calandré).

La Figure 33 montre que la présence de l'amidon cationique et de la polydopamine a légèrement augmenté les valeurs des aires de zones de lyse. Par contre, le calandrage donne de meilleurs résultats. Il semble que le taux de rétention en surface soit le paramètre le plus important dans le cas de l'EcomAG10.

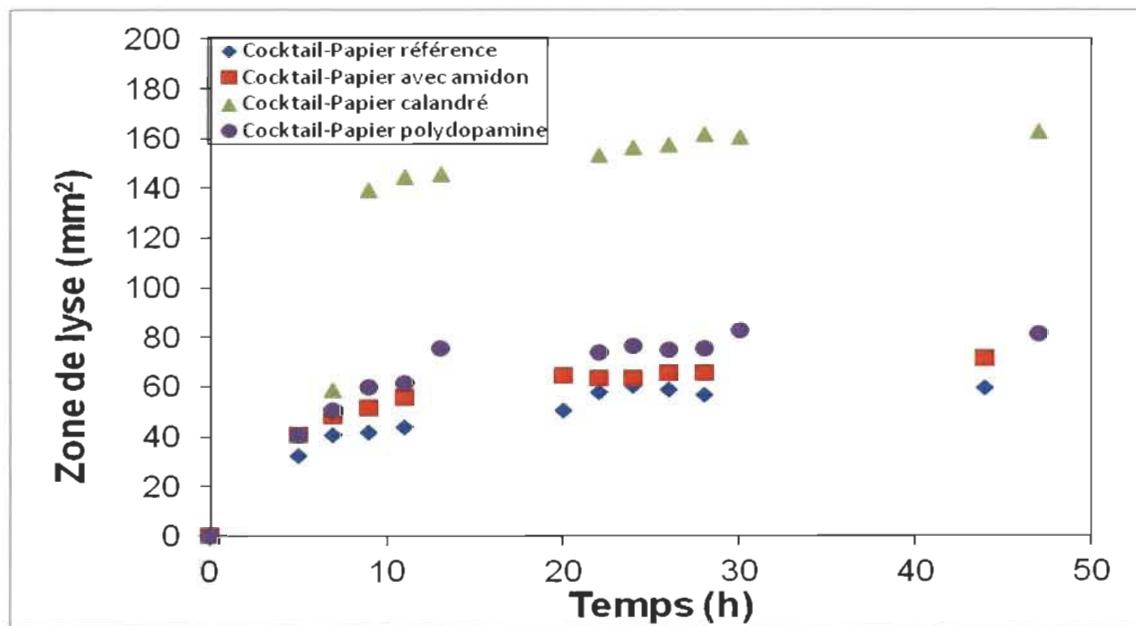
## Le cas d'un cocktail de phages de *T4* et d'*EcomAG10*

Un cocktail de phages de *T4* et d'*EcomAG10* a été appliqué sur les quatre types de papiers. Nous avons remarqué que dans les quatre cas, les papiers sont bioactifs. Les images représentées sur la Figure 34 montrent les zones de lyse pour les quatre papiers.



**Figure 34 :** Images des zones de lyse pour des papiers modifiés avec un cocktail de phages de *T4* et d'*EcomAG10*. a) papier de référence, b) papier + amidon cationique, c) papier + polydopamine et c) papier calandré.

Nous avons suivi la variation de l'aire de la zone de lyse pour l'ensemble des papiers dans le temps tel qu'illustré à la Figure 35.

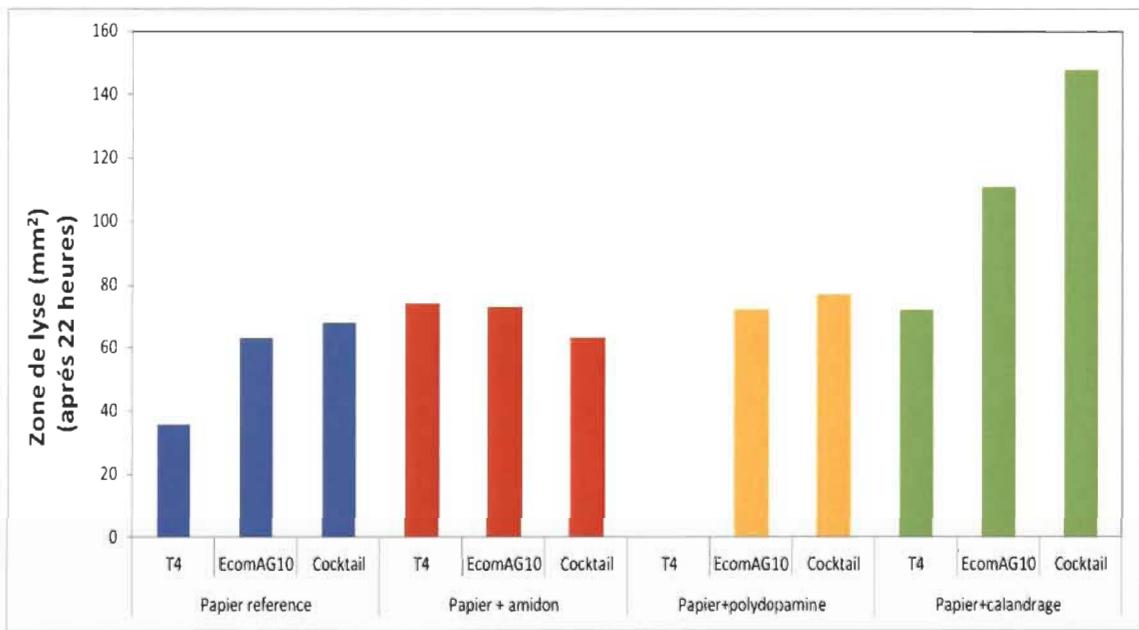


**Figure 35 :** Variation de l'aire de la zone de lyse pour le cocktail de phages pour quatre papiers (papier de référence, papier + amidon, papier + polydopamine, et papier calandré).

Comme les résultats obtenus pour les phages *EcomAG10*, le calandrage des papiers améliore de manière significative les valeurs des aires de la zone de lyse dans le cas d'un cocktail de phages.

#### **4.5.2. Analyse et discussion**

La Figure 36 représente une comparaison des aires de la zone de lyse pour l'ensemble des cas étudiés après 22 heures.



**Figure 36 : Comparaison des aires de la zone de lyse pour l'ensemble des cas étudiés après 22 heures.**

Pour l'ensemble des résultats obtenus sur les différents papiers, il est clair que l'application d'un cocktail de phages sur un papier calandré donne les meilleurs résultats. Le calandrage diminue la porosité d'un papier et permet d'augmenter la quantité de phages retenus en surface. Cette rétention de surface améliore le caractère bioactif d'un papier. D'autre part, l'utilisation d'un cocktail de phages permet d'éviter le problème de résistances bactériennes. En considérant une extension de notre travail, un cocktail approprié permettrait aussi de lutter contre plusieurs bactéries en même temps. Il serait intéressant de combiner les deux traitements, amidon cationique et calandrage, des papiers pour étudier l'influence d'un tel traitement sur la bioactivité. Il serait aussi important de combiner cette étude avec une étude microscopique des phages en surfaces des papiers afin de mieux interpréter les résultats et de mieux comprendre l'origine de l'amélioration des propriétés bioactives des surfaces.

---

## CONCLUSIONS

---

Le but de ce mémoire était l'étude de la dynamique de la zone de lyse des phages utilisés seuls et d'un cocktail de phages formé de phages *T4* et d'*EcomAG10*.

Dans une première partie, nous avons montré que les phages appliqués directement sur un tapis bactérien, seuls et en cocktails, sont capables d'éliminer ou de contrôler les bactéries *E.coli B*. Nous avons montré que le temps d'apparition et l'aire de la zone de lyse dépendent d'une manière significative de la concentration de phages utilisés. Pour des concentrations élevées, le temps d'apparition est plus rapide. D'autre part, concernant les aires de la zone de lyse, pour un temps donné, une différence dans le temps d'apparition de la zone de lyse est observée pour les faibles concentrations et des résultats comparables ont été notés pour les grandes concentrations, *i.e.* les temps d'apparition et l'aire de la zone sont comparables. Ceci est probablement dû à l'existence d'un rapport optimal de coexistence entre les phages et les bactéries. Dans le cas des phages *T4*, l'aire de lyse est plus grande et l'apparition plus rapide que les phages *EcomAG10* pour une même concentration de phages. D'autre part, nous avons montré que les cocktails de phages possèdent des propriétés antibactériennes mais donnent des résultats intermédiaires entre les deux phages.

En ce qui concerne le développement de l'aire de la zone de lyse en fonction du temps, nous avons constaté dans le cas de phages *T4*, l'apparition des bactéries résistantes après quelques jours de contact. Dans le cas d'*EcomAG10* et du cocktail de phages, nous n'avons pas observé l'apparition des bactéries résistantes. Dans tous les cas, une apparition d'un plateau de l'aire de lyse a été observée au-delà de 8 heures. Il semble que l'utilisation d'un cocktail de phages puisse éviter l'apparition des bactéries résistantes en plus d'offrir la possibilité de lutter contre plusieurs bactéries en même temps.

En ce qui concerne l'immobilisation de phages sur les papiers dans le but d'élaborer des papiers bioactifs, nous avons montré que l'utilisation de l'amidon cationique et de polydopamine modifie la charge des surfaces des fibres avec une amélioration notable de la bioactivé pour le phage *T4* mais marginale pour le phage *EcomAG10* et dans le cas du cocktail. Dans quasiment tous les cas, pour une concentration élevée de phages, il apparait que les phages sont bien adsorbés et actifs sur le papier : nous proposons que l'impact principal est la rétention des phages en surface, probablement combinée mais dans une moindre mesure au

phénomène d'orientation des phages. Ainsi, la problématique initiale soulevée, à savoir la création d'un papier d'emballage capable de limiter les bactéries pathogènes dans les aliments, a été vérifiée.

Dans le cas des papiers, nous avons constaté que les phages *EcomAG10* sont globalement plus efficaces que les phages *T4*. L'utilisation d'un cocktail de phages améliore significativement l'efficacité des papiers (résultats après 22 heures). La modification de la charge de surface des fibres de cellulose apporte une légère augmentation de la zone de lyse, comparée au papier témoin. Les deux modifications, polydopamine et amidon, résultent en un même ordre de grandeur des zones. Cependant, les phages *T4* n'ont pas donné de résultats sur le papier modifié à la polydopamine. Le phénomène peut s'expliquer par le fait que les interactions entre les phages *T4* et la polydopamine occasionnent des liaisons spécifiques trop fortes, limitant ainsi la mobilité de phages et par conséquent le caractère bioactif.

Le calandrage donne globalement de meilleurs résultats que les modifications des charges de surface. Le nombre de phages retenus en surface et non dans la structure interne du papier étant le facteur déterminant de la bioactivité d'un papier, la porosité du papier a une grande influence sur la zone de lyse. En effet, les phages qui ne pénètrent pas la structure du papier sont plus aptes, avec une bonne orientation, à combattre les bactéries : ce qui résulte en une meilleure efficacité bioactive.

Le cocktail de phages, associé à un papier calandré, résulte en une bioactivité largement supérieure à tous les autres cas étudiés. La comparaison des différents papiers utilisés amène à la conclusion générale que le calandrage du papier donne les meilleurs résultats.

Comme extension ou travaux futurs, nous proposons d'évaluer une combinaison des deux modifications, tel que amidon cationique et calandrage, pour vérifier l'influence de la l'orientation des phages et de la rétention en surface associée au calandrage. Nous proposons de modéliser mathématiquement la dynamique de croissance de la zone de lyse pour mieux comprendre les phénomènes de croissance de l'aire de la zone de lyse.

Dans la continuité du projet du réseau SENTINEL, des essais devraient être mis en place pour commencer à vérifier l'effet de ces nouveaux papiers bioactifs sur les aliments : donc essais réels avec bactéries pathogène *in situ*. L'utilisation de ce type d'emballage par l'industrie alimentaire devrait ainsi permettre de garantir la sécurité et l'innocuité des produits emballés en plus de limiter le gaspillage alimentaire. Finalement, nous croyons que le

développement de tels emballages papier représente des solutions d'emballages recyclables, biodégradables et plus respectueuses de l'environnement.

## BIBLIOGRAPHIE

---

1. T. Jabrane, « *Méthodologies de fabrication de papier bioactif* », Thèse de doctorat en sciences et génie des matériaux lignocellulosiques, Université du Québec à Trois-Rivières, Août 2014.
2. W. B. Whitman, D. C. Coleman and W. J. Wiebe, “*Prokaryotes: the unseen majority*”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, Vol. 95, p. 6578-6583.
3. M. Croteau and M. Allard, “XL Foods sous haute surveillance” 2012, [En ligne], Adresse URL : <http://www.lapresse.ca/actualites/sante/201210/12/01-4582560-xl-foods-sous-haute-surveillance.php>
4. Lepoint.fr, “E. coli : des graines germées pourraient être à l'origine de l'épidémie” 2011, [En ligne], Adresse URL : [http://www.lepoint.fr/sante/e-coli-des-graines-germees-pourraient-etre-a-l-origine-de-l-epidemie-05-06-2011-1338641\\_40.php](http://www.lepoint.fr/sante/e-coli-des-graines-germees-pourraient-etre-a-l-origine-de-l-epidemie-05-06-2011-1338641_40.php)
5. Agence canadienne d'inspection des aliments, 2013, [En ligne], Adresse URL: <http://www.inspection.gc.ca/aliments/information-pour-les-consommateurs/fiches-de-renseignements/empoisonnements-alimentaire/fra/1331151916451/1331152055552>
6. O. Cars, A. Hedin and A. Heddini, “*The global need for effective antibiotics-Moving towards concerted action*”, Drug Resistance Updates, 2011, Vol. 14, No. 2, p. 68-69.
7. M. J. Hajipour, K. M. Fromm, A. A. Ashkarran, D. J. de Aberasturi, I. R. de Larramendi, T. Rojo, V. Serpooshan, W. J. Parak and M. Mahmoudi, “*Antibacterial properties of nanoparticles*”, Trends in Biotechnology, 2012, Vol. 30, No. 10. p. 499-511.
8. C. M. Jones and E. M. V. Hoek, “*A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment*”, J. Nanopart Res, 2010, Vol. 12, No. 5, p.1531-1551.
9. Jasmina Vidic, “*Nanoparticules pour des applications antibactériennes, antifongiques et antivirales*” Techniques de l'Ingénieur, 2013.

- 
10. J. C. Tiller, “*Antimicrobial Surfaces*”, Adv. Polym. Sci., 2011, Vol. 240, p.193-217.
11. F. Siedenbiedel and J. C. Tiller, “*Antimicrobial Polymers in Solution and on Surfaces: Overview and Functional Principles*”, Polymers, 2012, Vol. 4, No. 1, p. 46-71.
12. F. Kong and Y. M. Hu, “*Biomolecule immobilization techniques for bioactive paper fabrication*”, Anal Bioanal Chem, 2012, Vol. 403, No. 1, p. 7-13
13. J. Alisky, K. Iczkowski, A. Rapoport, and N. Troitsky, “*Bacteriophages Show Promise as Antimicrobial Agents*”, Journal of Infection, 1998, Vol. 36, No. 1, p. 5-15.
14. K. Page, M. Wilsonb and I. P. Parkin, “*Antimicrobial surfaces and their potential in reducing the role of the inanimate*”, J. Mater. Chem., 2009, Vol. 19, No. 23, p. 3819-3831.
15. A. J. Curtright and S. T. Abedon, “*Phage Therapy: Emergent Property Pharmacology*”, Bioanalysis & Biomedicine, 2011, doi:10.4172/1948-593X, S6-002.
16. Larousse, virus, [En ligne], Adresse URL:  
<http://www.larousse.fr/encyclopedie/divers/virus/101864>
17. F. W. Twort, “*An investigation on the nature of ultramicroscopic viruses*”, The Lancet, Vol. 186, No. 4814, p. 1241-1243.
18. F. d'Hérelle, “*On an invisible microbe antagonistic to dysentery bacilli*”, Comptes Rendus Academie des Sciences, 1917, 165:373-5.
19. A. Martineau, 2009. “*Isolement et caractérisation de bactériophages comme moyen de lutte naturel contre les infections nosocomiales*”. Mémoire de maîtrise en Microbiologie et Immunologie, Département de Microbiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal.
20. A. Pirisi, "Phage therapy - advantages over antibiotics?" The Lancet, 2000, Vol. 356, No. 9239, p. 1418.

- 
21. E. Kutter and A. Sulakvelidze. "Bacteriophages Biology and applications", 2005. (livre numérique Google).
22. D. H. Duckworth and P. A. Gulig, "Bacteriophages: potential treatments for bacterial infections" Biodrugs, 2002, Vol. 16, No. 1, p. 57-62.
23. S. T. Abedon, S. J. Kuhl, B. G. Blasdel and E. M. Kutter, "Phage treatment of human infections" Bacteriophage, 2011, Vol. 1, No. 2, p. 66-85.
24. B. Leverenz, W. S. Conway, M. J. Camp, W. J. Janisiewicz, T. Abuladze, M. Yang, R. Saftner, and A. Sulakvelidze, "Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on Fresh-Cut Produce by Treatment with Lytic Bacteriophages and a Bacteriocin" Applied and Environmental Microbiology, 2003, Vol. 69, No. 8, p. 4519-4526.
25. L. D. Goodridge and B. Bisha, "Phage-based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods" Bacteriophage, 2011, Vol. 1, No. 3, p. 130-137.
26. J. A. Hudson, C. Billington, A.J. Cornelius, T. Wilson, S.L.W. On, A. Premaratne and N.J. King, "Use of a bacteriophage to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 on beef", Food Microbiology, 2013, Vol. 36, No. 1, p.14-21.
27. D. Augusto Spricigo, C. Bardina, P. Cortés and M. Llagostera, "Use of a bacteriophage cocktail to control *Salmonella* in food and the food indust" International Journal of Food Microbiology, 2013, Vol. 165, No.2, p. 169-174.
28. C. Potera, "Phages from Wastewater Effective against *P. aeruginosa* in Biofilms", Microbe, 2013, Vol. 8, No. 1, p. 4-5.
29. M. Kutateladze and R. Adamia, "Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics", Trends in Biotechnology, 2010, Vol. 28, No. 12, p. 591-595.

- 
- 30 . R. M. Carlton, “*Phage Therapy: Past History and Future Prospects*”, Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 1999, Vol. 47, No. 5, p. 267-274.
31. R. M. Donlan, “*Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage*”, Trends in Microbiology, 2009, Vol. 17, No. 2, p. 66-72.
32. A. Pirsi, “*Phage therapy-advantages over antibiotics?*”, The Lancet, 2000, Vol. 356, No. 9239, p. 1418.
33. E. S. Miller, E. Kutter, G. Mosig, F. Arisaka, T. Kunisawa and W. Ruger, “*Bacteriophage T4 Genome*”, Microbiology and molecular biology reviews, 2003, Vol. 67, No. 1, p. 86-156.
- 34 . Comment attaque le Phage T4 ? [En ligne], Adresse URL : <http://phage-t4-tpe.emonsite.com/pages/iii-le-phage-t4/comment-attaque-le-phage-t4.html>
35. M. G. Rossmann, V. V. Mesyanzhinov, F. Arisaka and P. G. Leiman, “*The bacteriophage T4 DNA injection machine*”, Current Opinion in Structural Biology, 2004, Vol. 14, No. 2, p. 171-180.
36. Le phage T4, [En ligne], Adresse URL : <http://idleplongeur.free.fr/phaget4/>
37. S. T. Abedon, “*Bacterial ‘immunity’ against bacteriophages*”, Bacteriophage, 2012, Vol. 2, No. 1, p. 1-5.
38. A. Sulakvelidze, Z. Alavidze and J. G. Morris, “*Bacteriophage Therapy*”, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001, Vol. 45, No. 3, p. 649-659.
39. B. R. Levin, F. M. Stewart, and L. Chao, “*Resource-limited growth, competition and predation. A model and experimental studies with bacteria and bacteriophage*”, Amer. Natur. 1977, Vol. 111, No. 977, p. 3-24.
40. R. E. Lenski and B. R. Levin, “*Constraints on the Coevolution of Bacteria and Virulent Phage: A Model, Some Experiments, and Predictions for Natural Communities*”, The American Naturalist, 1985, Vol. 125, No. 4, p. 585-602.

- 
41. K. Mizoguchi, M. Morita, C. R. Fischer, M. Yoichi, Y. Tanji and H. Unno, “*Coevolution of Bacteriophage PP01 and Escherichia coli O157:H7 in Continuous Culture*”, Applied and environmental microbiology, 2003, Vol. 69, No. 1, p. 170-176.
42. B. J. M. Bohannan and R. E. Lenski, “*Effect of Resource Enrichment on a Chemostat Community of Bacteria and Bacteriophage*”, Ecology, 1997, Vol. 78, No. 8, p. 2303-2315.
43. G. O’Flynn, R. P. Ross, G. F. Fitzgerald, and A. Coffey, “*Evaluation of a Cocktail of Three Bacteriophages for Biocontrol of Escherichia coli O157:H7*”, Applied and Environmental Microbiology, 2004, Vol. 70, No. 6, p. 3417-3424.
44. Y. Tanji, T. Shimada, H. Fukudomi, K. Miyanaga, Y. Nakai and H. Unno, “*Therapeutic Use of Phage Cocktail for controlling Escherichia coli O157 : H7 in Gastrointestinal Tract of Mice*”, Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005, Vol. 100, No. 3, p. 280-287.
45. Intili, H.S., “*Antimicrobial Paper*”. US Patent 4,533,435. 1985: United States.
46. Krupnick, S., “*Antimicrobial treatment of currency paper*”. PCT PatentWO 99/42658. 1999: United States.
47. Klimpl, F. and K. Sonenberg, “*Antimicrobial Paper*”. US Patent 6,939,442 B2. 2005: United States.
48. A. R. Bennett, F. G. C. Davids, S. Vlahodimou, J. G. Banks and R. P. Betts, “*The use of bacteriophage-based systems for the separation and concentration of Salmonella*”, J. Appl. Microbiol., 1997, Vol. 83, No. 2, 259-65.
49. K. Markoishvili, G. Tsitlanadze, R. Katsarava, J. G. Morris, and A. Sulakvelidze, “*A novel sustained-release matrix based on biodegradable poly(ester amide)s and impregnated with bacteriophages and an antibiotic shows promise in management of infected venous stasis ulcers and other poorly healing wounds*”, International Journal of Dermatology, 2002, Vol. 41, No.7, p. 453-458.

- 
50. L. M. C. Yang, P. Y. Tam, B. J. Murray, T. M. McIntire, C. M. Overstreet, G. A. Weiss, and R. M. Penner, “*Virus Electrodes for Universal Biodetection*”, Anal. Chem. 2006, Vol. 78, No. 10, p. 3265-3270.
51. R. Cademartiri, H. Anany, I. Gross, R. Bhayani , M. Griffiths and M. A. Brook, “*Immobilization of bacteriophages on modified silica particles*”, Biomaterials, 2010, Vol. 31, No.7, p. 1904-1910.
52. Z. Hosseiniidoust, T. G. M. Van de Ven and N. Tufenkji, “*Bacterial Capture Efficiency and Antimicrobial Activity of Phage-Functionalized Model Surfaces*”, Langmuir, 2011, Vol. 27, No. 9, p. 5472-5480.
53. H. A. Pearson, G. S. Sahukhal, M. O. Elasri, and M. W. Urban, “*Phage-Bacterium War on Polymeric Surfaces: Can Surface-Anchored Bacteriophages Eliminate Microbial Infections?*”, Biomacromolecules, 2013, Vol. 14, No. 5, p. 1257-1261.
54. T. Jabrane, J. Jeaidi, M. Dubé, and P. J. Mangin, “*Gravure Printing of Enzymes and Phages*”, Advances in Printing and Media Technology, 2008, Vol. 35, p. 279-288.
55. T. Jabrane, M. Dubé, M. Griffiths and P. J. Mangin, “*Towards a commercial production of phage-based bioactive paper*”, Journal of Science & Technology for Forest Products and Processes, 2011, Vol.1, No.1. p. 6-13.
56. R. Pelton, “*Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics*”, Trends in Analytical chemistry, 2009, Vol. 28, No. 8, p. 925-942.
57. M. Tolba, O. Minikh, L. Y. Brovko, S. Evoy, and M. W. Griffiths, “*Oriented immobilization of bacteriophages for biosensor applications*”, Applied and Environmental Microbiology, 2010, Vol. 76, No. 2, p. 528-535.

- 
58. H. Anany, W. Chen, R. Pelton and M.W. Griffiths, “*Biocontrol of Listeria monocytogenes and E. coli O157:H7 in Meat using Phage Immobilized on Modified Cellulose Membranes*”, Appl Environ Microbiol. 2011, Vol. 77, No. 18, p. 6379-6387.
59. A. Rabinovitcha, I. Aviramb and A. Zaritsky, “*Bacterial debris-an ecological mechanism for coexistence of bacteria and their viruses*”, 2003, Journal of Theoretical Biology, Vol. 224, No. 3, p. 377-383.