

## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>III</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>IV</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>V</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTE DES ÉQUATIONS .....</b>	<b>X</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES .....</b>	<b>XIII</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>16</b>
<b>CHAPITRE I : CADRE THÉORIQUE.....</b>	<b>18</b>
<b>SECTION 1 : NANOTECHNOLOGIE ET NANOCELLULOSE.....</b>	<b>18</b>
1.1 Les Nanotechnologies .....	18
1.2 La nanotechnologie et la santé humaine .....	19
1.3 Biocompatibilité de la nanocellulose .....	20
1.4 Les papiers bioactifs.....	22
1.5.1 La nanocellulose oxydée (NCO).....	24
1.6 Possibilité d'association .....	26
<b>SECTION 2.....</b>	<b>28</b>
2.1 Les peptides antimicrobiens.....	29
2.1.1 Gramicidine D .....	31
2.1.2 Lactoferricin .....	32
2.1.3 Magainine .....	34
2.1.4 Nisine.....	35
2.2 Peptides antimicrobiens et la résistance.....	38
<b>SECTION 3.....</b>	<b>40</b>
3.1 Flore commensale humaine.....	40
3.2 Staphylococcus sp. ....	41

3.3 Diphtéroïdes .....	43
3.3.1 Corynebacterium minutissimum.....	44
3.4 Autres bactéries.....	45
<b>SECTION 4.....</b>	<b>47</b>
4.1 Les plaies.....	47
4.2 Propriétés recherchées.....	48
4.3 Les pansements .....	50
4.3.1 Les hydrocolloïdes.....	50
4.3.2 Les hydrocellulaires.....	51
4.3.3 Les hydrogels.....	52
4.3.4 Les alginates et chitosan .....	52
4.3.5 Les interfaces et les films .....	53
4.3.6 Les pansements au charbon .....	54
4.3.7 Pansements à l'argent .....	54
4.4 La nanocellulose : un bon candidat? .....	54
<b>SECTION 5.....</b>	<b>56</b>
5.1 Spectroscopie de photoélectron X (XPS).....	56
5.2 Acide bicinchoninique .....	57
5.3 Le Luminotox <sup>TM</sup> .....	58
5.3.1 Réactifs (SAPS).....	62
<b>CHAPITRE II : .....</b>	<b>63</b>
<b>BUTS, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS.....</b>	<b>63</b>
<b>CHAPITRE III.....</b>	<b>64</b>
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODE.....</b>	<b>64</b>
3.1 Préparation des échantillons pour les expérimentations .....	64

3.1.1 Support cellulosique : solution et films de nanocellulose oxydée .....	64
3.1.2 Préparation des échantillons de carton fourni par Cascades inc.....	65
3.1.3 Préparation échantillon pour la spectroscopie .....	66
3.1.4 Préparation échantillon pour le Luminotox .....	66
3.1.5 Milieux de culture.....	70
3.2 Sélections de l'efficacité des peptides antimicrobiens.....	70
3.3 Évaluation de l'utilisation de la NCO et de la cellulose comme source de carbone pour les microorganismes auxanogramme du carbone.....	73
3.4 Utilisation de la nanocellulose comme source de nutriment pour les microorganismes par milieu de culture à la nanocellulose.....	74
3.5 Méthode de fonctionnalisation.....	75
3.5.1 Couplage du peptide antimicrobien sur film de NCO .....	75
3.5.2 Test de couplage entre la NCO aqueuse et nisine.....	76
3.6 Quantification de la fonctionnalisation .....	78
3.6.1 Spectroscopie à photoélectron X .....	78
3.6.2 Détection des protéines avec la trousse à l'acide Bicinchininique.....	79
3.7 Impact de paramètres sur l'efficacité de la nisine .....	79
3.7.1 Impact de la température .....	79
3.7.2 Impact du pH .....	81
<b>CHAPITRE III .....</b>	<b>84</b>
<b>RÉSULTATS ET ANALYSES .....</b>	<b>84</b>
4.1 Fabrication d'un film de nanocellulose oxydé .....	84
4.1.1 Sélection du matériau pour la fabrication des films .....	84
4.1.2 Sélection de la membrane filtrante .....	84
4.1.3 Impact de la filtration sur le film de NCO .....	85
4.2 Effet des peptides antimicrobiens sur la croissance des souches bactériennes	86

4.2.1 Application de la méthode Kirby-Bauer par diffusion sur disque .....	86
4.2.2 Application de la méthode Kirby-Bauer par dépôt direct.....	87
4.3.3 Application de la méthode par dilution en série pour la détermination de la CMI .....	90
4.3.4 Sélection du peptide antimicrobien .....	91
4.4 Évaluation de l'utilisation de la NCO et de la cellulose comme source de carbone pour les microorganismes par auxanogramme du carbone.....	91
4.5 Utilisation de la nanocellulose comme source de nutriment pour les microorganismes par milieu de culture à la nanocellulose.....	94
4.6 Couplage du peptide antimicrobien sur film de NCO et essais antimicrobiens	96
4.7 Test de couplage entre la NCO aqueuse et nisine .....	98
4.7.1 Effet du couplage NCO + nisine au XPS .....	99
4.8 Analyse des protéines solubles dans la NCO par la méthode à l'acide bicinchoninique.....	102
4.9 Luminotox .....	104
4.9.1 Évaluation du SAPS pour le LuminoTox .....	105
4.9.2 Ajustement des cellules du SAPS et échantillon de NCO.....	107
4.9.3 Mesure de l'efficacité photochimique avec <i>Anabaena flos aquae</i> ....	107
4.10 Effet du carton mince de Cascade jumelé avec la nisine .....	110
4.11 Évaluation de l'impact de la température sur la nisine avec le carton de Cascades .....	111
4.12 Évaluation de l'impact du pH sur la nisine avec le carton de Cascades .....	114
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>117</b>
<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>120</b>
<b>ANNEXE A .....</b>	<b>128</b>
<b>ANNEXE B .....</b>	<b>129</b>
<b>ANNEXE C .....</b>	<b>131</b>
<b>ANNEXE D .....</b>	<b>136</b>
<b>ANNEXE E .....</b>	<b>139</b>

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Dilution appropriée du type cellulaire à 470 nm .....	68
Tableau II. Paramètres du LuminoTox proposé par Lab_Bell selon le type cellulaire.....	69
Tableau III. CMI de la nisine chez les bactéries sensibles.....	91
Tableau IV. Résultats obtenus pour les huit premiers films de NCO selon certaines conditions.....	97
Tableau V. Courbe standard avec le BSA.....	102
Tableau VI. Moyenne des concentrations protéiques des échantillons de NCO .....	102
Tableau VII. Effet de la nisine adsorbée sur le carton mince de <i>Cascade</i> sur <i>S. aureus</i> .....	110

**LISTE DES ÉQUATIONS**

ÉQUATION 1 ..... 62

ÉQUATION 2 ..... 62

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. LA FIBRE DE BOIS .....	22
FIGURE 2. OXYDATION DE L'UNITÉ CELLOBIOSE DE LA NCO .....	26
FIGURE 3. RÉACTION DE COUPLAGE DU GROUPEMENT CARBOXYLE DE LA NCO .....	27
FIGURE 4. MODÈLE DE FORMATION D'UN PORE TRANSMEMBRANAIRE PAR LA NISINE .....	37
FIGURE 5. PROTÉINES IMPLIQUÉES DANS LES PHOTOSYSTÈMES ET DE LA CHAÎNE DE TRANSPORT D'ÉLECTRON QUI SONT DES SITES POTENTIELS POUR UNE TOXINE. ....	60
FIGURE 6. PROTOTYPE LUMINOTox DE L'ENTREPRISE LAB_BELL INC. ....	61
FIGURE 7. ÉCHANTILLON DE CARTON MINCE FOURNI PAR CASCADES.....	65
FIGURE 8. ORDRE DE LECTURE DES ÉCHANTILLONS AU LUMINOTox.....	69
FIGURE 9. ORDRE POUR L'AJOUT DES CELLULES DANS LES ÉCHANTILLONS.....	70
FIGURE 10. FILM DE NCO ET DE CELLULOSE NON FILTRÉ, DANS DU PBS .....	86
FIGURE 11. FILM DE NCO ET CELLULOSE, APRÈS FILTRATION, DANS DU PBS .....	86
FIGURE 12. EFFET DE QUATRE PEPTIDES ANTIMICROBIENS SUR LA CROISSANCE DE <i>S. AUREUS</i> SELON LA MÉTHODE KIRBY-BAUER AVEC DISQUES .....	87
FIGURE 13. ANTIBIOGRAMME DES PEPTIDES ANTIMICROBIEN SUR CULTURE DE <i>STREPTOCOCCUS</i> .....	88
FIGURE 14. ANTIBIOGRAMME DES PEPTIDES ANTIMICROBIENS SUR CULTURE DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> .....	89
FIGURE 15. ANTIBIOGRAMME DE PEPTIDES ANTIMICROBIENS SUR CULTURE DE <i>PSEUDOMONAS</i> .....	90
FIGURE 16. DÉNOMBREMENT BACTÉRIEN INITIAL (T0) ET APRÈS 24H (T24) SELON DIFFÉRENTES CONDITIONS (AVEC NCO SOLUTION, NCO FILM, SANS NCO) .....	93
FIGURE 17. DÉNOMBREMENT BACTÉRIEN INITIAL (T0) ET APRÈS 24H (T24) SELON DIFFÉRENTES CONDITIONS (AVEC NCO FILM, NCO SOLUTION, SANS NCO) .....	93
FIGURE 18. PHOTOGRAPHIE DES MILIEUX DE CULTURE AVEC DES INOCULA BACTÉRIENS .....	95
FIGURE 19. DÉPÔT DIRECT DU PRODUIT DE COUPLAGE À LA SURFACE D'UN LIT BACTÉRIEN DE.....	99
<i>C. MINUTISIMUM</i> .....	99
FIGURE 20. SPECTRE DU TÉMOIN ET SPECTRE DE L'ESSAI 2.....	100
FIGURE 21. GROSSISSEMENT DU SPECTRE VIS-À-VIS L'AZOTE.....	101
FIGURE 22. MOYENNE DES CONCENTRATIONS PROTÉIQUES DES ÉCHANTILLONS .....	104
FIGURE 23. INHIBITION DES SAPS APRÈS 6 MINUTES D'INCUBATION .....	106
FIGURE 24. INHIBITION DES SAPS APRÈS 1 HEURE D'INCUBATION. ....	106

FIGURE 25. INHIBITION D'ANABAENA APRES 1 HEURE D'INCUBATION. ....	107
FIGURE 26. INHIBITION D'ANABAENA APRES 6 HEURES D'INCUBATION. ....	108
FIGURE 27. INHIBITION D'ANABAENA APRES 24 HEURES D'INCUBATION. ....	108
FIGURE 28. MESURE QUALITATIVE DE LA TURBIDITE D'ANABAENA DANS DE LA NCO .....	110
FIGURE 29. EFFET DE LA TEMPERATURE ENTRE 20 ET 40°C .....	112
FIGURE 30. EFFET DU PH ENTRE 3,5 ET 6,5 .....	115



## LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

**ABC** : acide bicinchoninique

**Abs**: absorbance

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ARN** : Acide ribonucléique

**ASB**: albumine de sérum bovin

**ATCC** : American type culture collection

**BH**: Brain heart

**BHI** : Brain Heart Infusion

**C** : carbone

**CEP** : complexe enzymatique protéique

**CMB** : concentration minimale bactéricide

**CMI** : concentration minimale inhibitrice

**C. minutissimum** : *Corynebactérium minutissimum*

**CNETE** : Centre national d'électrochimie et technologies environnementales

**COONA**: Acide glucorinique dans l'unité cellobiose

**CO<sub>2</sub>**: Dioxyde de carbone

**CRIEB** : Chaire de recherche industrielle environnement et biotechnologie

**CRML** : Centre de recherche en matériaux lignocellulosiques

**Cu** : cuivre

**Cu<sup>+</sup> et Cu<sup>2+</sup>**: ion de cuivre

**C<sub>6</sub>** : carbone numéro 6 (nomenclature IUPAC)

**DHA** : 2-3-didehydroalanine

**DHB** : 2-3- didehydrobutyrine

**DL<sub>50</sub>** : dose létale effective sur 50% de la population

**DSMZ**: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)

**EDAC** : 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide

**EDTA** : acide éthylène diamine tetra acétique

**Eff** : efficacité photochimique

**ESCA**: Electron spectroscopy for chemical analysis

**Etc.**: *et cetera*

**FDA**: Food and drug agency (États-Unis)

**F<sub>0</sub>**: Fluorescence à faible intensité lumineuse

**F<sub>m</sub>**: Fluorescence à forte intensité lumineuse

**GC**: guanine/cytosine

**Inh**: Inhibition des échantillons

**Lfcin B**: Lactoferricine bovine

**Lfcin H**: Lactoferricine humaine

**N**: Azote

**NaCl** : chlorure de sodium

**NaOH** : hydroxyde de sodium

**NC** : nanocellulose

**NCO** : nanocellulose oxydée

**NHS** : n-hydroxysuccinimide

**MH** : Mueller-Hinton

**O** : oxygène

**OCDE**: Toxicité, irritation, corrosion cutanée

**PS** : photosystème

**PTFE** : Polytetrafluoroethylene ou Téflon

**RPM** : rotations par minute

**SAPS** : système aqueux photosynthétique stabilisé

***S. aureus***: *Staphylococcus aureus*

**TEMPO** : 2,2,6,6- tetramethylepiperidine-1-oxyle

**TSA** : Milieu gélosé trypticase soya

**TSB** : Bouillon trypticase soya

**UFC** : unité formatrice de colonies

**UQTR** : Université du Québec à Trois-Rivières

**UV** : ultraviolet

**VIH-1** : virus de l'immunodéficience humaine de type 1

**XPS**: spectroscopie de photoélectron X

## INTRODUCTION

Dans la conjoncture actuelle, l'industrie des produits forestiers est appelée à diversifier ses produits pour maintenir ou relancer ses activités. Les papiers bioactifs sont une bonne alternative pour diversifier les produits issus de cette industrie, plus spécifiquement les produits du secteur des pâtes et papiers. Des équipes du Centre de recherche sur les matériaux lignocellulosiques de l'Université du Québec à Trois-Rivières (CRML, UQTR) développent actuellement de tels produits. C'est le cas de l'équipe de la Chaire de recherche industrielle en environnement et biotechnologie de la Fondation de l'UQTR (CRIEB) qui explore la possibilité de fabriquer un papier ou autre matrice cellulosique bioactive, fonctionnalisé par addition d'un peptide antimicrobien tuant des bactéries pathogènes. Deux types de support cellulosique ont été explorés, soit un film de nanocellulose oxydée et un carton mince fourni par la compagnie Cascades. De plus, il a été établi selon la littérature que les peptides antimicrobiens (nisine, lactoferricine bovine, magainine 1, gramicidin D) peuvent être efficaces contre des agents pathogènes sur la peau et réduire l'émergence de souches antibactériennes résistantes (Yeaman et al, 2003). La nisine, un peptide efficace contre les bactéries GRAM+ a été le peptide de choix pour les expérimentations pour des raisons d'efficacité, d'homologation et de prix.

Les recherches exploratoires du présent projet de maîtrise ont pour but d'évaluer quel type de support cellulosique sera adéquat pour le développement d'un tel papier et de s'assurer que le support ne favorise pas la croissance des microorganismes ciblés (pathogènes susceptibles de se retrouver au niveau des pieds), soit *Escherichia coli*,

*Pseudomonas aeruginosa* (gram -), *Streptococcus* groupe B, *Staphylococcus aureus* et *Corynebacterium minutissimum* (gram+). De plus, la méthode de fonctionnalisation du support doit être adaptée à la matière première choisie, et une procédure de quantification des fonctions obtenues doit être développée. Finalement, quelques paramètres ont été étudiés (pH et température) sur l'efficacité de la fonctionnalisation du papier. Ce projet de maîtrise pourrait permettre la fabrication de semelles et de pansements intelligents dans le secteur podiatrique pour lutter contre les plaies diabétiques et certaines pathologies infectieuses des pieds comme l'érythrasme et la kératolyse ponctuée superficielle. Ce document présente d'abord des notions théoriques liées au projet et enchaîne ensuite avec la démarche scientifique et expérimentale du projet. Les principaux résultats s'y trouvent ainsi que les conclusions qui en découlent.

## **CHAPITRE I : CADRE THÉORIQUE**

### **SECTION 1 : NANOTECHNOLOGIE ET NANOCELLULOSE**

Il est de mise de définir le cadre théorique du présent projet de recherche afin d'exposer les principales idées qui ont mené à l'expérimentation. Cette section et les suivantes y sont consacrées. Cette section traite des nanotechnologies et de son effet sur la santé humaine, du secteur des papiers bioactifs et des supports celluloses envisagés et leur possibilité d'association.

#### **1.1 Les Nanotechnologies**

Un des supports celluloses à l'étude est la nanocellulose (NC) dont les produits qui en contiennent se classent dans le secteur des nanotechnologies. Ces dernières constituent l'ensemble des études et des procédés de fabrication et de manipulation de structures, de dispositifs et de systèmes, à l'échelle du nanomètre (nm). Les nanotechnologies concernent principalement la conception, la caractérisation, la production et l'application de structures, dispositifs et systèmes par le contrôle de la forme et de la taille à une échelle de 1 à 100 nm (The Royal Society & The Royal Academy of Engineering, 2004.) Le domaine des nanotechnologies est émergent étant donné la tendance de développement des matériaux aux propriétés inédites, toujours supérieurs et plus performants. Dans ce contexte, les nanotechnologies peuvent s'appliquer à l'industrie forestière par le biais de la NC et de sa modification qui en diversifie les applications (Moon, Frihart, Charles, Wegner,

2006). En effet, elle pourrait avoir des utilisations potentielles dans les domaines des matériaux composites, textiles, pharmacologique, alimentaire, cosmétique, électronique et emballage spéciaux (Qvintus-Leino, 2008). Un exemple de cet intérêt est la première usine de fabrication et commercialisation de nanocellulose cristalline qui a été mise sur pied en 2012 par Domtar et FPIInnovations et qui est opérée par la compagnie CelluForce. La nanocellulose cristalline possède de nombreuses propriétés : elle améliore la résistance et la dureté, et peut réduire les dommages causés par l'usure, l'abrasion et la radiation spectrale. Sa réflectivité à la lumière (ajustable de l'ultraviolet à l'infrarouge), son imperméabilité aux gaz et sa stabilité dans le temps, rendent possible la création d'une multitude de nouveaux nanoproduits forestiers qui seront utilisés dans de nombreux secteurs industriels. Elle s'avère également très intéressante également pour le domaine médical (Domtar, 2013). Dans ce domaine, une attention particulière doit être portée à l'innocuité des nanoproduits pour la santé humaine.

## **1.2 La nanotechnologie et la santé humaine**

Les nanotechnologies ont le potentiel de produire de nouveaux produits dans certains secteurs qui exigent une démonstration qui ne pose aucun risque pour la santé humaine. Le risque majeur des nanoparticules sur la santé est le fait que certaines d'entre elles soient solubles dans les liquides biologiques. Leurs effets toxiques sont reliés à leurs différentes composantes chimiques et sont spécifiques aux différentes composantes nanométriques. L'inhalation et la translocation cutanée sont les modes d'absorption accidentelle dans l'organisme. Quant à l'utilisation de la NC issue du

bois sur la peau, il n'y a toutefois aucune étude qui démontre une contre-indication de son utilisation, à ce qui a trait à la nanocellulose microcristalline, la consommation quotidienne de cellulose microcristalline aux États-Unis, sous différentes formes, est estimée entre deux à dix grammes (g) par jour par individu. Elle n'est cependant pas absorbée par les cellules. Lorsqu'inhalée, elle se dépose dans les voies respiratoires où elle peut être retenue, puis éliminée. Elle n'est ni absorbée par voie digestive ni par voie cutanée. Elle n'est pas irritante pour le derme et n'est pas un sensibilisant cutané (CSST, 2007). Selon l'étude de Kovacs et collaborateurs, ils ont fait des tests de toxicité sur les mammifères pour la nanocellulose cristalline. Au test de toxicité orale aiguë chez le rat (OCDE 425), la  $DL_{50}$  (dose létale effective sur 50% de la population) était de 2000 mg/Kg. Aucun effet sous-léthal n'a été observé chez les survivants ni détecté sur les organes (changements pathologiques macroscopiques : forme, taille, poids, consistance, couleur, examen de section). Au test d'irritation dermique aiguë chez le lapin (OCDE 404), aucun signe d'irritation n'est perceptible suite à l'application de 0,5 g et l'index primaire d'irritation était de zéro. Cela laisse envisager que la cellulose microcristalline a une faible toxicité vis-à-vis les mammifères (Kovacs *et al.*, 2011).

### 1.3 Biocompatibilité de la nanocellulose

Même si la cellulose est biodégradable et biocompatible, et que la cellulose microcristalline semble inerte vis-à-vis l'homme, il ne faut pas négliger les effets indésirables associés à la NCO, puisque qu'il n'y pas d'étude sur le sujet à ce jour. De



plus amples recherches devront approfondir l'impact de NCO afin d'assurer son innocuité. Selon une étude de Miyamoto, plus la cellulose est cristalline, plus elle devrait être irritante. La NC étant d'ailleurs hautement cristalline (Miyamoto, *et al.*, 1989). Elle pourrait avoir un effet irritant sur la peau (Occupational Safety and health administration, 2009). Dans ces incertitudes limitées par les études, le papier composé de cellulose représente une alternative à appliquer sur la peau, surtout les papiers bioactifs.

### 1.4 Les papiers bioactifs

Papiers intelligents, papiers à valeur ajoutée et papiers bioactifs sont des termes qui font référence au papier traditionnel auquel des propriétés particulières ou nouvelles ont été ajoutées. Le papier est abordable, facile à produire et à détruire, biodégradable, fibreux, hygroscopique, poreux et sa matière première est renouvelable (Rebaï, Drolet, Vidal et al., 2011). Pour lui donner une valeur ajoutée, il est envisageable d'y incorporer de molécules (phages, protéines, anticorps, etc.) lui donnant des fonctions spécifiques, et ce, à différents niveaux de sa fibre présentée dans la figure 1 ci-dessous.

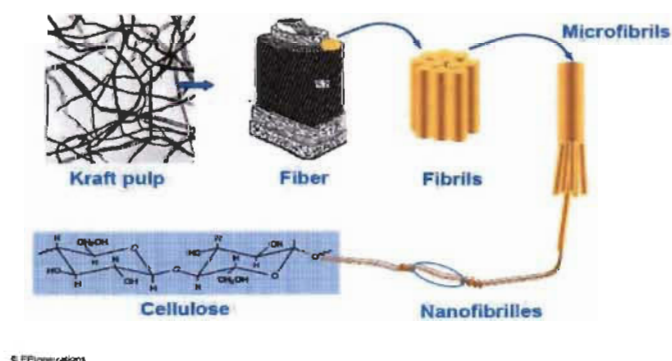


Figure 1. La fibre de bois  
(Source : FPI Innovations, 2013)

Les papiers à valeur ajoutée ont alors un potentiel énorme puisque ces nouvelles molécules ajoutées à leur surface peuvent leur procurer différents usages. Ces papiers gagnent particulièrement en popularité à ce qui a trait à la détection de pathogènes (*Escherishia. coli*, *Listeria. monocytogenes* et *Salmonella typhi*) dans le domaine de

l'alimentation et emballages spéciaux. C'est un champ de recherche émergent au Canada, aux États-Unis, en Australie et en Finlande (Pelton, 2009)

Dans cette optique, les caractéristiques de la NC, modifiée ou non, sont très intéressantes pour la fabrication de papiers bioactifs. La NC se présente en plusieurs types tels les nanocomposites ou les nanobilles, et peut provenir non seulement de fibres de bois, mais aussi de bactéries. La cellulose bactérienne a fait ses preuves dans le domaine médical (Peterson et Gatenholm, 2011). Cette dernière peut être produite par des bactéries telle que *Gluconacetobacter xylinus*. La problématique quant à l'utilisation de cette cellulose demeure sa production à grande échelle (production dans des biofermenteurs et purification du produit). Bien que le laboratoire de la Chaire de recherche industrielle en environnement et biotechnologies (CRIEB) explore actuellement la production de cellulose bactérienne dans des milieux de culture alternatifs et sans coût, tels les eaux blanches de l'industrie papetière. La NC issue des fibres du bois sera ainsi plutôt utilisée quoique le NC d'origine bactérienne demeure toutefois une possibilité de matrice cellulosique très intéressante pour de futurs projets lorsque les difficultés de production à grande échelle auront été surmontées.

L'une des particularités de la NC issue du bois est qu'elle peut se retrouver sous différentes formes selon sa concentration. Elle est sous forme solide à 100% (poids (g)/volume (ml)), elle se gélifie aux alentours de 7% de concentration en milieu aqueux et complètement aqueuse sous les 5%. Cette caractéristique augmente considérablement les applications possibles quant à son utilisation dans les nanotechnologies.. Ainsi, sa biodégradabilité, sa pureté, son taux de cristallinité élevé,

ses propriétés physiques intéressantes ainsi que sa possibilité de fabriquer une membrane transparente font de la NC un substrat potentiel de choix (Zoppe et Orazio 2011). La fabrication de papier à valeur ajoutée suscite de plus en plus d'intérêts. Depuis 1995 au Canada, il existe un groupe, appelé *Réseau Sentinel* qui rassemble tous les chercheurs travaillant sur les papiers bioactifs (Réseau Sentinel, 2013). Ils concentrent leurs recherches principalement sur les papiers de détection de pathogènes et les emballages spéciaux dans le domaine de l'alimentation. Il y aurait cependant un intérêt à s'orienter aussi vers la production de papiers contre des pathogènes à des fins de protection (Lévesque, 2009). Un développement d'un papier bioactif sous forme de pansement pour couvrir des plaies ou la fabrication des semelles prévenant ou guérissant les pathologies podiatriques sont des avenues très prometteuses. Afin d'obtenir ces papiers bioactifs à partir de cette NC, cette dernière doit être chimiquement modifiés afin de créer des sites pour y greffer les molécules fonctionnelles. Une façon de faire est la réalisation d'une oxydation de la NC.

### **1.5.1 La nanocellulose oxydée (NCO)**

Une première matrice cellulosique à étudier dans le cadre de ce projet est la nanocellulose oxydée. Son accessibilité au CRML est la principale raison de ce choix. La NCO est obtenue par une oxydation de la NC, ce qui permet d'y fixer, par des liens covalents, des molécules. Cette approche est très intéressante par rapport à la production de papiers bioactifs. D'autres polysaccharides oxydés possèdent d'ailleurs plusieurs utilisations comme agents de stabilisation, agents de complexation, agents

de gélification et agents pour la préparation de produits cosmétiques et pharmaceutiques (Roumani, 2004).

La NCO est obtenue suite à l'oxydation des groupements alcools primaires en groupements acide carboxylique tel qu'illustré à la figure 2 ci-dessous. Il existe différentes méthodes pour oxyder la nanocellulose, mais celle utilisée dans le présent projet est le système TEMPO (2,2,6,6-tetramethylepipéridine-1-oxyle), puisqu'il permet l'isolation de fibrilles isolées, de l'ordre du nanomètre (Figure 1). De plus, elle est produite au CRML<sup>1</sup>, ce qui l'a rend accessible. La préparation de la nanocellulose à partir du système TEMPO modifie la surface de la cellulose de manière à empêcher la formation de liaisons interfibrilles trop importantes afin de permettre la libération de fibrilles individuelles (Saito, Kimura, Nishiyama et Isogali, 2007). Le système TEMPO consiste à jumeler de la cellulose naïve et le radical TEMPO, et ce, en présence de bromure de sodium (co-catalyseur) et d'hypochlorite de sodium (agent oxydant) sous une légère agitation mécanique. Cette réaction s'effectue à pH 10 en milieux aqueux et produit des fibrilles de cellulose dont les alcools primaires ont été modifiés en groupements carboxyliques accompagnés parfois de groupements aldéhydes sans modification mécanique de la nature du substrat. Une fois la NC oxydée, des molécules fonctionnelles peuvent y être ajoutées

---

<sup>1</sup> Chaire de recherche sur les papiers à valeur ajoutée du professeur Claude Daneault

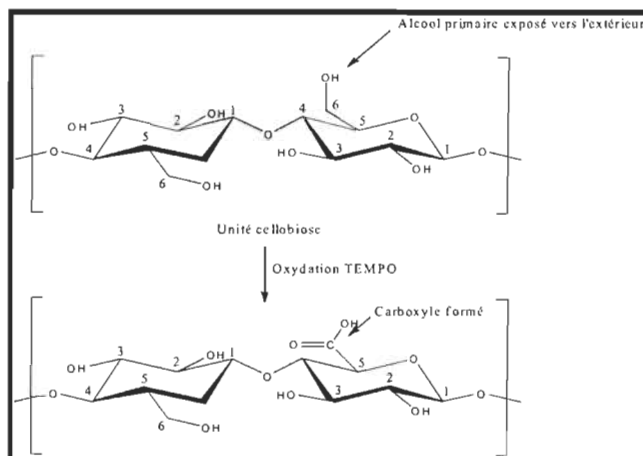


Figure 2. Oxydation de l'unité cellobiose de la NCO

### 1.6 Possibilité d'association

Les groupements carboxyles présents à la surface de cette NCO permettent le couplage avec des fonctions amine d'une molécule d'intérêt à jumeler. Puisque les molécules bioactives protéiniques comportent de tels groupements, elles peuvent être ainsi couplées à la NCO. Plusieurs possibilités de couplage sont possibles, dont celle avec les peptides antimicrobiens, molécules antibactériennes qui feront l'objet de la section 2 du présent chapitre. La réaction de couplage est réalisable en milieu HCl et en présence d'un carbamides tel l'hydrochlorure de 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDAC). Il s'agit d'une réaction nucléophile, très rapide dans des conditions modérées et sans altération du polysaccharide. Lorsque nécessaire, il est possible d'activer l'amine moins nucléophile avec un catalyseur, N-hydroxysuccinimide (NHS). La réaction de couplage est présentée à la figure 3 ci-dessous. Cependant, les travaux de Roumani en 2004 ont démontré que la quantité de NHS n'a pas d'importance sur la réaction, il en faut une concentration minimale

(Lévesque, 2009). Un protocole de couplage doit être développé dans le cadre de cette expérimentation pour un peptide antimicrobien et la NCO. Ces travaux seront basés sur ceux rapportés de Barazzouk (Barazzouk et Daneault, 2012).

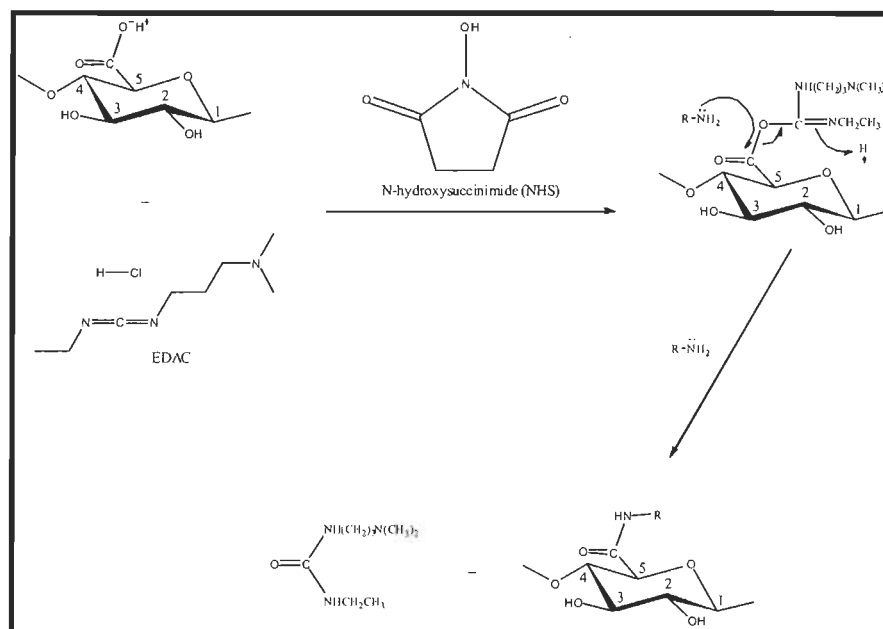


Figure 3. Réaction de couplage du groupement carboxyle de la NCO (R : représente une molécule à greffer)

Si les peptides antimicrobiens peuvent être couplés à la NCO par le biais de cette réaction nucléophile, d'autres stratégies peuvent être employées pour obtenir de la cellulose fonctionnalisée. La cellulose possède un pouvoir d'absorption. Ce mécanisme permet à une substance liquide d'être retenue dans son intégralité à l'intérieur d'une autre substance solide par exemple. Les peptides antimicrobiens, en milieu aqueux, peuvent être absorbés entre les molécules de la membrane cellulosique qui agit comme un tamis moléculaire solide de D-glucose entrant dans la fabrication

de la NC ou bien de la cellulose composant un papier. Tout dépendant de la composition du dit papier le pouvoir absorbant sera différent. Cela dépend de son degré de porosité, d'humidité et de sa densité (Gardner et al., 2008; Adamson, 1982).

## **SECTION 2**

La section 2 traite des peptides antimicrobiens puisque ces derniers permettent de fonctionnaliser un support de type papier cellulosique. Dans le cadre du projet présent de maîtrise, une fonction antimicrobienne qui limite la croissance bactérienne ou inhibe la croissance bactérienne est recherchée. Une vue d'ensemble des peptides antimicrobiens est d'abord présentée, en s'appuyant de quatre peptides antimicrobiens spécifiques avec lesquels des expérimentations furent effectuées en s'appuyant sur les



travaux non-publiés de Michel Lévesque en 2009. La nisine était le peptide antimicrobien de choix pour ce projet étant donné que cette dernière est utilisée comme peptides antimicrobiens dans le développement des emballages spéciaux (Dortu et al., 2008).

## **2.1 Les peptides antimicrobiens**

Les peptides antimicrobiens sont souvent comme les antibiotiques de l'avenir. En effet, ce sont des peptides qui possèdent des séquences conservées de l'immunité innée (ARN messager), chez toutes les formes de vie, et qui ont un fort potentiel comme agent thérapeutique. Ils peuvent être antibactériens, antiparasitaires, antiviraux et antifongiques. Le corps humain produit des peptides antimicrobiens de façon localisée par différents types de cellules (cellules phagocytaires, épithélium, tractus) et dans les sécrétions. Chez les plantes, les peptides antimicrobiens sont produits au niveau des graines, des racines et des feuilles, chez les insectes, la production est systémique. Les recherches actuelles permettent la production de ces types de peptides par les technologies de biologie moléculaire. Le terme peptides antimicrobiens englobe également les bactériocines soit des peptides antimicrobiens produits par des bactéries pour se protéger (Hancock et Chapple, 1999). Les bactériocines sont constituées en général de 12 à 50 acides aminés. Il en existe trois types catégorisés selon leurs caractéristiques structurales et de leur composition en acides aminés, incluant leur charge qui peut être soit anionique, cationique ou neutre (Yeaman et Yount, 2003).

Les trois types de bactériocine sont les suivantes :

- 1) les peptides linéaires formant des hélices alpha;
- 2) les peptides riches en cystéine avec un ou plusieurs ponts disulfure;
- 3) les peptides contenant un pourcentage élevé d'un même acides aminés.

Le mode d'action des bactériocines contre les pathogènes est principalement lié à la déstabilisation des membranes ainsi qu'à la perturbation de la cellule par une action intracellulaire. Dans le premier cas, le mécanisme impliqué est la formation de pores membranaires générant ainsi la fuite du matériel cellulaire. Le second mécanisme quant à lui induit l'entrée du peptide antimicrobien à l'intérieur de la cellule, il agit alors comme inhibiteur de la synthèse d'ADN, d'ARN ou de protéines. Les peptides antimicrobiens ciblent les virus en s'attaquant aux lipoprotéines de l'enveloppe virale ou par adsorption sur le virus. Les peptides antimicrobiens de grandes tailles (>100 acides aminés) ont souvent comme cible les molécules qui lient les nutriments essentiels des bactéries ou visent des macromolécules spécifiques à certaines bactéries (Andrès et Dimarcq, 2006).

Les peptides antimicrobiens sont des déterminants importants au niveau de la défense immune de l'être humain. Il en existe une large variété, et ils ont des capacités différentes au niveau de leur fonction antimicrobienne. Ils jouent le rôle d'antibiotiques endogènes en plus d'avoir des fonctions au delà de la réponse inflammatoire et de la réparation des tissus. Ils sont impliqués dans la régulation de l'immunité adaptative. En effet, à titre d'exemple, un déficit de l'expression de la psoriasine (un peptide antimicrobien) au niveau de la peau peut être expliqué par la susceptibilité aux infections à *Staphylocoque aureus* des patients atteint de psoriasis.

Sa surexpression n'est toutefois pas avantageuse. En effet, la surabondance de la psoriasine peut engendrer le psoriasis (Peck, Ong et al, 2002). Cela indique que les peptides antimicrobiens peuvent avoir des effets secondaires indésirables sur la peau, même s'ils sont déjà endogènes chez l'être humain. Cela doit être pris en considération quant à l'utilisation potentielle de ces molécules sur la peau lors du développement de produits comme des pansements ou des semelles qui utilisent ce type de molécules en contact avec la peau (Dridet et Rebuffat, 2012). Les sous-sections suivantes présentent certains peptides antimicrobiens d'intérêt pour le présent projet et qui sont suffisamment documentés dans la littérature.

#### 2.1.1 Gramicidine D

La gramicidine est un groupe de peptides antibiotiques linéaires (sauf la gramicidine S qui est cyclique) qui est produit par plusieurs souches de *Bacillus brevis*. L'ensemble de ces peptides forme la gramicidine D. La gramicidine est déjà utilisée sur le marché en conjugaison avec d'autres molécules. Par exemple, la gramicidine D jumelée à la polymyxine A et la néomycine constituent les ingrédients bioactifs du *Polysporin*, crème ou onguent antibactérien en vente libre au Canada, pour le traitement topique des infections cutanées ou ophtalmologiques (Medlineplus, 2013). Ce type d'utilisation indique que la gramicidine pourrait avoir du potentiel dans le cadre des expérimentations du présent projet. La gramicidine est efficace envers un large spectre de microorganismes *cocci* GRAM+, GRAM- et champignons. Cependant, elle est toxique pour les érythrocytes humains (Jakubke et Sewald, 2008). Son mode d'action s'explique par l'accroissement de la perméabilité membranaire de

la bactérie occasionnant la pénétration d'ions monovalents cationiques. À titre d'exemple, les protons peuvent déséquilibrer le gradient ionique entre le cytoplasme et l'environnement extérieur lorsque le peptide antimicrobien forme un pore et provoque un flux d'ions aqueux. Ce pore sélectif et semi-perméable possède des sites qui lient des cations particuliers (Hladky et Haydon, 1972).

### 2.1.2 Lactoferricin

La lactoferricine est un peptide antimicrobien à caractère amphiphile et fortement cationique. Elle provient du tractus gastro-intestinal. Cette dernière est une glycoprotéine qui lie les ions ferriques dans le lait chez les bovins. (Hwang Zhou, Shan et al., 1998). La lactoferricine a plusieurs fonctions immunologiques dont antimicrobienne, antivirale et antitumorale. La lactoferricine bovine (LfcinB) et lactoferrinine humaine (LfcinH) ne sont pas identiques et leurs différences majeures se situent au niveau de la grosseur du peptide et en sa séquence d'acides aminés (Jakubke et Sewald, 2008). La molécule le LfcinB est dépourvue des résidus d'histidines et de tyrosines ce qui le confère plus la possibilité de lier le fer. La LfcinB est plus antimicrobienne que la LfcinH. Elle est aussi plus abordable ce qui en fait un candidat de choix dans le présent projet. LfcinB est actif contre un large spectre de microorganismes GRAM- et également de bactéries GRAM + puisque le tractus gastro-intestinal contient majoritairement des bactéries GRAM+ opportunistes. La LfcinB a également des capacités antivirales (VIH-1) et antiparasitaires (*Giardia lamblia*) Son mode d'action résulte de son pouvoir liant envers les lipopolysaccharides des membranes qui sont libérés. (Hladky et Haydon, 1972). Il s'agit d'une action qui

est lente et qui détruit l'intégrité de la membrane, amenant la lyse de la cellule bactérienne. La lactoferricine est plus active dans un pH légèrement alcalin. *Pseudomonas fluorescens*, *Enterococcus faecalis*, *Bifidobacterium bifidum* sont très résistants à ce peptide (Belamy, Takase et al., 1992)

Étant donné que la lactoferricine bovine est un dérivé de la lactoferrine qui est une protéine allergisante présente dans le petit-lait (Host, Hu, Gjesing et al., 1992), l'utilisation de ce peptide antimicrobien pourrait également provoquer également des allergies cutanées. Son utilisation sur un pansement bioactif pourrait donc comporter certains risques.

### 2.1.3 Magainine

La magainine est un peptide antimicrobien isolé des glandes dermiques d'amphibiens tel *Xenopus laevis*, une grenouille africaine. La magainine 1 et la magainine 2 ne se différencient que par deux substitutions au niveau des résidus 10 et 22. Elles sont actives in vitro contre plusieurs variétés de bactéries, champignons et protozoaires. Amphiphile, elle interagit fortement avec les phospholipides membranaires. Le gradient ionique en est perturbé et cela cause une lyse de membrane. Elle interagit également avec les lipopolysaccharides et le lipide A des bactéries GRAM-. C'est un peptide qui forme un pore dû à la possibilité du peptide d'adopter une structure en hélice alpha (Jakubke et Sewald, 2008). La magainine 2 et ses analogues synthétiques sont capables de provoquer rapidement les tumeurs hématopoïétiques et solides dû à leur potentielle cytotoxique en parallèle avec leur activité antimicrobienne et ce, même si elles ne sont pas hémolytiques. Cependant, la dose létale est d'un mg/mL de magainine pour toutes les cellules d'un mammifère. Plusieurs centres de recherche cherchent à développer des substances actives et des dérivés des magainines contre des infections à bactéries GRAM+ pour application topique. Le *Pexiganan* développé par *Ganaera Corporation*, est un dérivé de la magainine 2, qui a échoué en phase clinique dû au manque de connaissances sur les peptides antimicrobiens. Ce produit amélioré pourrait bien revenir sur le marché parce qu'il pourrait être efficace pour traiter des ulcères de pieds diabétiques (Ge, Macdonald, Henry et al., 1999) et (Tasseau, 2005). De nouvelles études sont présentement en cours.

#### 2.1.4 Nisine

La nisine est un peptide antimicrobien amphiphile cationique de 34 acides aminés produit par fermentation par la bactérie *Lactococcus lactis*. Ce peptide, faisant partie des lantibiotiques, possède plusieurs acides aminés rares, dont une lanthionine et quatre 3-méthyllanthionine. La nisine possède aussi trois acides aminés insaturés, soit un 2,3-didehydroalanine (DHA) et deux 2,3-didehydrobutyrine (DHB). Ces acides aminés inhabituels sont le fruit de modifications post-traductionnelles du précurseur peptidique et permettent une structure hétérocyclique. Ces acides aminés sont liés fortement ensemble donnant à la nisine une stabilité thermique au-delà de 100 °C. Il y a deux types de nisine produites : la plus étudiée est la nisine A, qui possède une histidine au résidu 27, alors que la nisine Z, possède une asparagine à cette position. Cette nisine Z est une variante naturelle du peptide (Jakubke et Sewald, 2008).

La nisine fut découverte en 1928 lorsqu'un métabolite produit par plusieurs souches de *Lactococcus lactis* ayant un pouvoir inhibiteur sur plusieurs bactéries Gram+. La nisine est une bactériocine puisqu'elle inhibe des bactéries apparentées à celle qui la produit, donc elle inhibe plusieurs bactéries lactiques. Elle peut en fait inhiber des souches de *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* et des spores de *Clostridium* et *Bacillus*. En général, une bactériocine produite par une bactérie GRAM+ ne fonctionne que contre les bactéries GRAM+ et n'a aucun effet sur les bactéries GRAM-. Cependant, la nisine, en présence d'un chélateur tel que l'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA), peut inhiber des souches d'*Helicobacter pylori*, de *Neisseria* et de *Salmonella*. L'EDTA déstabilise la paroi et la membrane

bactérienne facilitant ainsi l'action de la nisine. En raison de son large spectre d'action, la nisine est un agent de conservation utilisée depuis plus de 30 ans, et ce, dans plus de 50 pays, dans l'industrie agroalimentaire. Elle est homologuée par la Food and Drug Agency USA (FDA) et approuvée par Santé Canada (Santé Canada, 2013). Elle est utilisée dans la conservation du fromage, du lait, des viandes, des boissons, des conserves, etc. Elle empêche la détérioration des aliments en inhibant la croissance des bactéries pathogènes qui pourraient s'y développer. Dans ces aliments, il est courant de l'utiliser à des niveaux variant de 1 à 25 parties par million, selon le type de nourriture et selon la réglementation alimentaire (OMS, 1968 et Santé Canada, 2013). De plus, elle n'est pas toxique pour l'humain. Il est donc possible d'en consommer sans risque.

Le mécanisme d'action de la nisine réside dans la liaison des têtes phospholipidiques de la membrane bactérienne, chargées négativement, avec des résidus de lysine de la partie C-terminale de la nisine, chargés positivement. Cette liaison permet à la nisine de pouvoir adhérer à la membrane bactérienne. Comme la nisine est amphiphile, elle peut ensuite entrer à l'intérieur de la membrane bactérienne, pour ultimement former un pore dans celle-ci comme démontré dans la figure 4, ci-dessous. L'accumulation de nisine à l'intérieur de la membrane est alors fatale pour la bactérie. La nisine peut aussi agir en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne en se fixant sur le précurseur du peptidoglycane. Il est alors possible pour la nisine de former des pores dans la membrane cytoplasmique et provoquer un efflux ionique des composantes du cytoplasme (acides aminés, phosphore inorganique, potassium, ATP), ce qui entraîne la mort cellulaire (Bauer et Dicks, 2005).



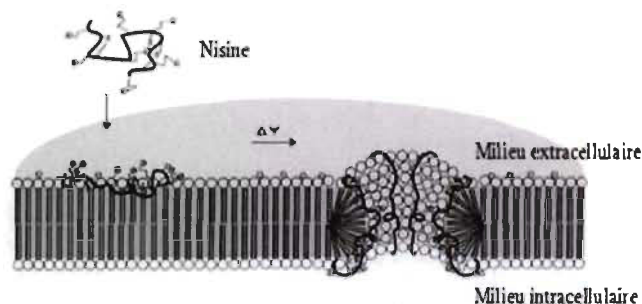


Figure 4. Modèle de formation d'un pore transmembranaire par la nisine  
(Source : Brotz et al. adapté de Sahl, 1998)

De plus, la nisine est influencée par certains paramètres. Elle conserve son effet inhibiteur et sa stabilité à des températures jusqu' à 100°C. Elle est aussi influencée par le pH, qui doit préférentiellement être inférieur à 5, ainsi que la teneur en NaCl. En effet, étant donné la nature hydrophobe de la nisine, elle perd son efficacité à des pH supérieurs à 5 (Pol et Smid, 1999).

Des essais d'immobilisation de la nisine sur un gel d'alginate ont été faits dans le domaine de l'alimentation. Cela suggère la possibilité d'immobiliser de la nisine sur un film de NC

(Milette, Le tien, Smoragiedwicz et Lacroix, 2006; Nguyen, Gidley et Dykes, 2008 et Guiya, Sweis et al., 2010). L'alginate est une matière première très utilisée dans le secteur du développement des nouveaux pansements. Avec ses différentes propriétés, la NCO pourrait peut-être donner de nouvelles fonctionnalités à des pansements et élargir les applications.

## 2.2 Peptides antimicrobiens et la résistance

Une grande problématique dans le domaine médical est l'apparition de souches bactériennes résistantes à certains antibiotiques. Cela peut être attribuable à une mauvaise gestion de leur attribution qui résulte de leur surutilisation. Plusieurs bactéries ont trouvé une méthode pour résister à un ou même à plusieurs antibiotiques, rendant plus difficiles les traitements et limitant la prise en charge des infections (OMS, 2013). L'arrivée des peptides antimicrobiens dans le domaine de la santé pourrait bien être une alternative pour freiner l'expansion de cette problématique. En effet, un des principaux avantages des peptides antimicrobiens réside dans leur action sur des bactéries déjà résistantes aux antibiotiques. Par exemple, la nisine est efficace contre *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline et même parfois à la vancomycine. Il est aussi peu probable qu'une bactérie acquière une résistance aux peptides antimicrobiens puisque le peptide possède plusieurs cibles sur la bactérie et agit très rapidement (Kindt, Glodsby et Osborne, 2006; Nizet, 2006). Toutefois, il y a quelques exceptions où des bactéries ont réussi à développer une résistance à un peptide antimicrobien. Cette résistance peut être acquise en modifiant la structure ou la charge de leur membrane et leur paroi bactérienne ou en formant une capsule anionique, qui emprisonne les peptides antimicrobiens cationiques, les empêchant d'agir sur leur cible initiale. C'est le cas, entre autres, des Streptocoques, qui possèdent un enzyme impliqué dans la synthèse du peptidoglycane située entre la membrane plasmique et la couche de peptidoglycane. Certaines bactéries peuvent aussi contrôler l'efflux, éliminant les substances toxiques ayant pénétré la membrane. Il s'agit de pompes pouvant transporter à l'extérieur de la bactérie des structures telles que les

peptides antimicrobiens et les antibiotiques. Diverses pompes de ce genre sont retrouvées chez les *Vibrio*, *Enterobacter aerogenes* et chez *E.coli* (Sang et Blecha, 2008; Riley et Wertz, 2002).

### SECTION 3

Cette section traite de la flore commensale normale de l'homme et des bactéries qui peuvent être pathogènes. Les peptides antimicrobiens doivent être efficaces contre ces pathogènes, agent causal de certains problèmes au niveau des pieds. *Staphylococcus aureus* et *Corynebacterium minutissimum* sont présentés plus en profondeur étant donné que les expérimentations principales ont été effectuées avec ces souches.

#### 3.1 Flore commensale humaine

La flore commensale désigne l'ensemble des organismes, telles les bactéries et les levures, vivant sur la peau et les muqueuses de l'homme. La peau est composée de cellules épithéliales kératinisées et procure à la base un milieu non propice au développement des microorganismes. En effet, elle constitue un environnement sec et squameux, pauvre en nutriments. Ces caractéristiques lui permettent de bien remplir son rôle qui est d'être la première barrière mécanique des défenses immunitaires chez l'homme. Malgré cela, elle est colonisée par environ 102 types de bactéries dans une relation de commensalisme. Cela veut dire que l'organisme parasite profite de cette relation sans nuire à l'humain. Les bactéries qui réussissent à se fixer et à coloniser la peau constituent la flore résidente. Cette flore n'apporte aucun préjudice à l'hôte tant qu'il est en bonne santé et que la barrière que constitue la peau n'est pas altérée. Il existe aussi une flore transitoire composée de microorganismes capables de se fixer à la peau pour une courte durée, mais qui ne la colonisent pas en temps normal. Lorsque

la peau est altérée par une brûlure, une plaie, ou lorsque que l'hôte est immunodéprimée, ou qu'il subit une antibiothérapie, ces microorganismes auront un avantage sélectif et peuvent ainsi créer des infections. Ceci représente les pathogènes opportunistes tel le staphylocoque. (Baron, 1996; Prescott, 2010).

### 3.2 *Staphylococcus* sp.

Les staphylocoques sont des bactéries GRAM + et catalase positive en forme de petites sphères. Il est reconnu qu'une dizaine de souches différentes colonisent la peau des humains. Parmi ceux-ci se trouve le *Staphylococcus aureus* qui est responsable du plus grand nombre d'infections de l'ensemble des bactéries commensales. Le *S. aureus* est de forme sphérique de 0.8 à 1.0  $\mu\text{m}$  regroupé en larges grappes communément appelé amas. Cette conformation est visible au microscope optique. Il s'agit d'une bactérie mésophile pouvant croître à des températures variant entre 6°C et 48°C, avec une température optimale de 35-37°C. De plus, il s'agit d'une bactérie thermosensible pouvant être détruite en 4 à 24 minutes à 54-60°C. *S. aureus* peut croître à un pH variant entre 4.2 et 9.3, avec un pH optimal de 7-7.5. De plus, cette bactérie produit des toxines à 10-48°C qui, quant à elles, sont thermorésistantes. En effet, des températures supérieures à 100°C sont nécessaires pour détruire certaines toxines, dont la toxine de type A et de type B.

Sur gélose, les colonies sont lisses, bombées et de couleur jaune, d'où son surnom de staphylocoque doré. Elle est positive aux tests de la catalase, de la DNase et de la coagulase. C'est ce dernier test qui permet de différencier *S. aureus* des autres

staphylocoques, puisqu'il s'agit de la seule espèce positive à ce test. Un résultat positif au test de la coagulase indique que la bactérie possède cette exoenzyme, qui a pour but de transformer le fibrinogène en fibrine afin de coaguler le plasma sanguin. Il s'agit d'une protection pour la bactérie contre les défenses de l'organisme. Cette caractéristique fait d'elle l'une des bactéries commensales les plus pathogènes pour l'homme et c'est pourquoi il est important de développer des méthodes pour la maîtriser.

*S. aureus* est trouvé en permanence chez un tiers des humains et chez les animaux. On la retrouve sur la peau et dans les muqueuses. Par contre, elle peut survivre longtemps dans l'environnement. Une infection à *S. aureus* peut se produire lors d'une baisse des défenses immunitaires de l'hôte ou lors d'une rupture de la barrière physique de la peau. Cette bactérie peut être la cause de plusieurs maladies. Par exemple, elle peut causer des infections cutanées, comme un impétigo si l'infection est superficielle ou un abcès si elle est plus profonde. Elle est l'agent causal numéro un des ostéites d'où l'importance de la contrôler lors de la surinfection de plaies chroniques. Cette bactérie peut aussi surinfecter les plaies négligées et est souvent la cause d'infections nosocomiales (Leshner, 2000; Lowy, 1998).

Le traitement de *S. aureus* réside dans l'utilisation d'antibiotiques bactéricides. Or, près de 90% des souches de staphylocoques sont résistantes à la pénicilline G puisqu'elles produisent une enzyme, la pénicillinase, inactivant l'antibiotique. De plus, certaines souches possèdent une résistance à la méticilline et ont une résistance à tous les  $\beta$ -lactamines, dont les céphalosporines de troisième génération et

l'imipénème. Cette résistance est due à une modification de leur paroi bactérienne. En effet, la pénicilline possède normalement au moins quatre sites de liaisons sur le microorganisme. Or, on retrouve ces sites diminués chez une bactérie résistante. Aussi, certaines souches de *S. aureus* peuvent être résistantes à la gentamicine et à la kanamycine, ainsi qu'à plusieurs autres aminosides (Casgrouve et al, 2003). Afin de vaincre l'infection, le traitement doit donc être constitué d'une association d'antibiotiques.

La découverte et le développement de peptides antimicrobiens efficaces contre *S. aureus* semble donc très prometteur étant donné le nombre grandissant de résistances aux traitements par antibiotiques ainsi qu'au nombre très élevé d'infections dues à ce microorganisme. Le développement de semelles ou de pansements contenant un peptide antimicrobien agissant contre *S. aureus* semble donc être une voie à envisager afin d'améliorer les traitements des diverses infections causées par ce pathogène. Il faut aussi noter que *S. aureus* est le pathogène numéro un causant les infections au niveau du pied (Brogden, 2005).

### 3.3 Diphtéroïdes

Les diphtéroïdes sont un type de bactéries qui comprend les *Propionibacterium* ainsi que les *Corynebacterium*. Les propionibactéries sont souvent associées aux régions riches en glandes sébacées, car le sébum y étant sécrété constitue un milieu parfait pour ces bactéries lipophiles. Ce sont des bacilles pléiomorphes GRAM + et catalase positive dont la taille varie entre 0.5 et 2.0 µm. Trois espèces de propionibactéries sont

retrouvées communément à la surface de la peau. La première est *Propionibacterium acnes* qui, comme son nom le dit, est impliqué dans les lésions acnéiques. Les lipases qu'elle sécrète transforment les triglycérides du sébum en acides gras qui irritent la peau et qui peuvent créer une réaction inflammatoire. Les deux autres espèces colonisant la peau sont le *Propionibacteriu. granulosum* et le *Propionibacterium avidum* retrouvé plus particulièrement dans les plis axillaires (Riegel, 1998). Les corynebactéries quant à elles, peuvent être retrouvées chez les plantes, les animaux et dans la flore commensale de l'humain. Elles font partie de l'ordre des actinomycètes, tout comme les mycobactéries, et incluent 16 espèces très similaires. Leurs membranes cellulaires contiennent des acides méso-diaminopimélique et de courts acides gras mono-insaturés. Du côté de leurs ADN, elles font partie des bacilles GRAM + riches en GC. Morphologiquement, ces bacilles mesurent entre 0.3 et 0.8  $\mu\text{m}$ . Elles sont immobiles et possèdent une forme appelée «club shape». Ceci est dû au fait que la membrane cellulaire de certaines espèces est plus faible à une extrémité qu'à l'autre. De plus, cette caractéristique fait en sorte que, durant la division cellulaire, les deux cellules filles peuvent rester attachées, créant ainsi l'arrangement connu sous le nom de «lettre chinoise» ou «en palissade».

### 3.3.1 *Corynebacterium minutissimum*

*Corynebacterium minutissimum* est émergente dans le monde de la microbiologie par son aspect et par sa présence chez l'homme. Cette bactérie pousse à des températures variant entre 15 et 40°C, sa température optimale se situant entre 35 et 37°C. Une étude a démontré qu'elle peut croître en présence d'une concentration de 6.5% de sel (NaCl). Cette bactérie est saprophyte, c'est-à-dire qu'elle vit sur



l'homme sans être pathogène. Sur gélose, elle forme de petites colonies blanches et convexes au contour régulier. Sur gélose au sang, on peut y observer une hémolyse alpha. *C. minutissimum* est responsable d'une infection cutanée au niveau des pieds appelée érythrasme et peut parfois être la cause de certains cas de kératolyse ponctuée superficielle plantaire. Comme *C. minutissimum* est une bactérie commensale, l'érythrasme apparaît lors d'un déséquilibre de la peau, comme en présence de chaleur et d'humidité ou d'une mauvaise hygiène corporelle et peut être favorisé par l'obésité et le diabète. On la retrouve surtout dans les replis cutanés, comme les creux axillaires et inguinaux, sous les seins et entre les orteils. L'infection peut par contre se propager et infecter la surface plane de la peau. Le diagnostic d'une infection à *Corynebacterium minutissimum* peut se faire visuellement et par observation au microscope d'un prélèvement de la lésion. Il peut aussi être accompagné d'un examen à la lampe de Wood, produisant des rayons ultraviolets (UV) d'une longueur d'onde de 365nm. En effet, la bactérie engendre sous cette lampe une fluorescence de couleur rose-corail. Cette fluorescence est due à une porphyrine produite par la bactérie. Les porphyrines sont des molécules impliquées dans le transport de l'oxygène lorsqu'elles possèdent un atome de fer et entrent dans la composition de l'hémoglobine (Leshner, 2000) (Rizvi, Sherwani, et al, 2011).

### 3.4 Autres bactéries

Parmi les autres colonisateurs de la peau, on retrouve les *Streptococcus*, colonisant la plupart du temps l'intérieur de la bouche. Il arrive parfois qu'elles envahissent la peau dans les conditions où le manque d'hygiène existe. Il y a aussi les

*Mycobacterium* et la famille des Enterobacterobactéries qui colonisent principalement l'intestin comme *E. coli*. Ces derniers sont reconnus pour être responsable d'infection sévère et persistante au niveau de la peau, souvent retrouvés en cas de plaies, d'ulcères, de gangrène humide ou gazeuse (Leshner, 2000). Dans le présent projet, l'emphasis sera mise sur *S. aureus* et *C. minutissimum*.

## SECTION 4

Le présent projet de recherche vise le développement de nouveaux produits bioactifs notamment pour le secteur podiatrique. La présente section traitera de la problématique des plaies et le besoin de développer des produits plus performants pour le contrôle des infections au niveau des pieds. Cette section comprend le cadre théorique au niveau des plaies et le secteur du développement des nouveaux pansements.

### 4.1 Les plaies

Une plaie est une rupture de la barrière cutanée. Lors d'un traumatisme dermique, il se peut qu'il y ait une lésion d'organes sous-jacents. La plaie permet la pénétration de bactéries pathogènes de l'organisme ou de l'extérieur. Cela peut provoquer une infection localisée ou systémique. En effets, les bactéries commensales de l'homme peuvent souvent causer l'infection si celles-ci ne sont pas contrôlées. Ces dernières sont présentes à la surface de la peau en quantité de l'ordre de  $10^6$  bactéries par  $\text{cm}^2$  de peau, et le type d'espèces bactériennes change en fonction du stade de plaie (Edwards et Harding, 2004). En effet, la plaie peut être aiguë ou chronique, et selon certains critères (durée, prise d'antibiotiques, emplacement, etc.), il est possible de viser des espèces microbiennes en particulier. Le *Streptococcus  $\beta$ -hémolytique* et le *Staphylococcus aureus* sont habituellement les premiers à infecter les plaies qui perdurent. Lorsqu'il y a une certaine chronicité qui s'installe (plus d'un mois sans

guérison), les entérocoques font partie des espèces répertoriées. Dans le cas d'une plaie macérée, il y a la présence de *Corynebactéries* et *Pseudomonas* (Wysocki, 2002).

Il existe différentes formes de plaies : les escarres, les ulcères, les plaies cancéreuses, les plaies chirurgicales, la greffe de peau, l'éraflure, les brûlures, etc.; et plusieurs types de plaies : vasculaire, pression, diabétique, atypique. Plusieurs ne nécessitent aucun traitement puisque la guérison se fait naturellement selon le processus de cicatrisation normale de la peau. Toutefois, il faut fréquemment favoriser la guérison en plaçant la plaie dans les meilleures conditions (voir section 4.2 ci-dessous). Pour ce faire, les pansements sont un bon moyen de contribuer à la guérison (Butcher et White, 2013).

#### **4.2 Propriétés recherchées**

Un pansement varie selon la nature de la plaie à laquelle il doit servir. Le pansement approprié est déterminé en fonction de la quantité et la qualité d'exsudat (Canadian Association of Wound Care, 2013). Il existe une grande variété de pansements déjà sur le marché qui seront abordés à la section 4.3, mais tous les pansements modernes doivent suivre les principes thérapeutiques énumérés ci-dessous. Dans le développement des nouveaux dispositifs médicaux, les chercheurs doivent tenir en considération ces propriétés dans la mesure du possible.

- 1) Favoriser la cicatrisation en créant un milieu humide et une température stable proche des conditions physiologiques (37°C);
- 2) Maintenir l'exsudat in situ (milieu riche en cellules, bactéries, enzymes);

3) Diminuer localement la pression partielle d'oxygène (pansements occlusifs qui stimulent la formation des vaisseaux sanguins) (Moura, Dias, et al, 2013).

Les nouvelles tendances sont de se servir des biotechnologies avoir recours à une guérison en milieu humide par des pansements interactifs avec la plaie et bioactifs (Canadian Association of Wound Care, 2013). Les nouveaux dispositifs médicaux doivent satisfaire à plusieurs des caractéristiques de base des nouveaux pansements développés :

- 1) Exempt d'agents de contamination, non toxique et non-allergène, et stérile;
- 2) Permettant les échanges gazeux tout en restant imperméable à la pénétration des microorganismes;
- 3) Favorisant au moins une des étapes de cicatrisations (production de collagène, formation du nouvel épithélium);
- 4) Facile d'application et d'enlèvement;
- 5) Adaptable aux contours du corps, protégeant mécaniquement les plaies;
- 6) À remplacer peu souvent et être confortable pour le patient;
- 7) Permettent un contrôle de l'état de la plaie, sans contact;
- 8) Acceptable au niveau du prix
- 9) Ne laissent pas de débris dans la plaie;
- 10) Prévenant la surinfection (Moura, Dias, et al, 2013).

### 4.3 Les pansements

Les pansements étaient anciennement que de simples interfaces recouvrant les plaies, et à la fin de 20<sup>e</sup> siècle, avec les progrès de la médecine, ils seront considérés comme des médicaments agissant intimement avec les mécanismes mis en place lors de la guérison. Actuellement, le marché des pansements thérapeutiques est en pleine évolution. Avec l'avancée de l'ingénierie tissulaire, comme les épidermes de culture, les dermes de synthèse, voire même l'utilisation de cellules souches, les possibilités sont immenses (Boateng, Matthews Stevens, Gillan et Eccleston, 2007). Dans cet ordre d'idée, le secteur des dispositifs médicaux dans le soin de plaies fait l'objet de recherches pour le développement de produits/pansements plus performants. Le marché des pansements est en essor, représentant 12.8 milliards de dollars américains en 2011 et augmentera à 21.6 milliards de dollars américains jusqu'en 2018, soit une augmentation de 7.8%, selon les prédictions économiques (TMR, 2011).

Il y a différentes classes de pansements sur le marché : les hydrocolloïdes, les hydrocellulaires, les hydrogels, les alginates et chitosan, les tulles et interfaces, les charbons et les pansements à l'argent. Chacun a des caractéristiques particulières. La cellulose rentre dans la composition de plusieurs d'entre eux (HAS, 2011).

#### 4.3.1 Les hydrocolloïdes

Les hydrocolloïdes sont dérivés d'un polymère absorbant, la carboxyméthylcellulose. Ils se caractérisent par leur grande capacité d'absorption. Ils ont été les premiers pansements modernes mis sur le marché. Les hydrocolloïdes existent sous

plusieurs formes : mince, épais ou sous forme de pâte. Cette versatilité leur confère la capacité de s'adapter à chaque type de plaie et à chaque patient. Leur utilisation est simple et ils maintiennent leur propriété pendant au moins 2 jours (en fonction de l'exsudat), ce qui les rend très intéressants comme produit. L'inconvénient est qu'ils se transforment au contact de la plaie pour former un gel malodorant. Ce gel peut couler hors du pansement irritant la peau autour, ce qui peut inquiéter le patient. Cela peut entraîner une macération, et dans des cas beaucoup plus rares, un eczéma de contact. Les chercheurs qui travaillent à développer des hydrocolloïdes de "nouvelle génération" cherchent à diminuer cet écoulement (Queen, 2009). Les hydrocolloïdes peuvent être antimicrobiens s'ils sont jumelés à des particules d'argent (Schaller, Bodewaldt, Hamm et Korking, 2004; Moura, Dias, et al, 2013).

#### **4.3.2 Les hydrocellulaires**

Les hydrocellulaires sont à base de polyuréthane et ils ont été mis plus récemment sur le marché et leur utilisation n'engendre pas l'inconvénient d'écoulement hors du pansement. Ils sont absorbants et maintiennent un milieu humide. Ils sont constitués de 3 couches : un film semi-perméable à l'extérieur, adhésif ou non, une couche de transfert en contact avec la plaie, et une mousse de polyuréthane très absorbante qui joue un rôle de coussinet entre les deux couches (Seeley, Jensen et Hutcherson, 1999; Moura, Dias, et al, 2013).

### 4.3.3 Les hydrogels

Les hydrogels sont composés à 80% d'eau et sont destinés aux plaies sèches et nécrotiques. Ils sont en fait plus « humidifiant » qu'absorbants et ils nécessitent un pansement secondaire peu absorbant, comme un film ou un hydrocellulaire. Ils n'adhèrent pas à la plaie (Dumville, O'Meara, Deshpande et Speak, 2013; Moura, Dias, et al, 2013). L'hydrogel peut être jumelé à de l'iode pour obtenir un pouvoir antimicrobien (Wood, Wood, Davis et Wilkins, 2010).

### 4.3.4 Les alginates et chitosan

Les alginates sont des extraits d'algues marines très absorbants (10 à 15 fois leur poids) et ont des capacités hémostatiques. Ils nettoient la plaie (débris captés par le gel) et contrôlent la prolifération bactérienne par piégeage physique. Le retrait du pansement n'est pas douloureux. Ils sont recommandés lors de plaies exsudatives, infectées ou hémorragiques. Ces pansements se présentent sous forme de compresses ou de mèches, qui se transforment en gel au contact des exsudats (Dumville, O'Meara, Deshpande et Speak, 2013; Moura, Dias, et al, 2013). Ils sont souvent couplés avec des ions d'argent (Qin, 2005). Le chitosan, provenant de la chitine, est extrait des carapaces des petits crustacés. Ce matériel a des bonnes propriétés hémostatiques, et a également une influence dans les processus biologiques de la cicatrisation tels le soutien de la fonction des macrophages, la stimulation de la prolifération cellulaire et l'organisation du tissu. Il a également des propriétés naturelles antifongiques et antibactériennes (Paul et Charma, 2004).



#### 4.3.5 Les interfaces et les films

Cette catégorie de pansements comprend les interfaces (compresses, bandes, gaze), le tulle et les films (tous dérivé de la cellulose comme le coton). Ce sont des pansements en contact direct avec la plaie. Ils diffèrent tous par la grosseur de maillage, le forme et leur niveau d'adhérence à la plaie. En effet, les interfaces sont en général moins adhérente que le tulle et leur maillage est plus fin. Ils peuvent rester en place jusqu'à sept jours, alors que le tulle, il est recommandé de changer le pansement aux deux jours. De plus, au niveau des tulles, il y a le tulle que l'on nomme gras, car ils sont dérivé du pétrole comme la vaseline, paraffine ou le silicone. Ils sont peu coûteux, mais ne sont pas absorbants. Les interfaces ont, en général, une légère capacité d'absorption. De plus, les tulles risquent d'arracher les bourgeons dermiques, car ils sont adhérent à la plaie, aggravant ainsi la plaie. Les tulles de fibres naturelles ou synthétiques sont encore très employés, mais ils sont généralement déconseillés. Les tulles de nouvelle génération sont plus neutres, mais leur retrait est parfois douloureux et hémorragique. Les films sont composés de polyuréthane semi-perméable. Ils ne sont ni absorbants, ni adhérents à la plaie. Transparents, ils permettent un contrôle visuel de la plaie : ils sont indiqués au stade d'épidémisation ou pour recouvrir les sutures (Moura, Dias, et al, 2013).

#### **4.3.6 Les pansements au charbon**

Les pansements au charbon sont formés d'un feuillet de charbon. Ils limitent la prolifération bactérienne et principalement les odeurs, mais sont peu absorbants. Ils sont indiqués pour les plaies fibrineuses, infectées, malodorantes; par exemple, les plaies cancéreuses. Puisqu'ils sont peu adhérents et modérément absorbants, il faut un pansement secondaire pour assurer l'absorption (Moura, Dias, et al, 2013; Kerihuel, 2010).

#### **4.3.7 Pansements à l'argent**

Les pansements à l'argent sont constitués avec d'ions d'argent pur ou non pur et ils sont généralement utilisés au niveau des brûlures, des fractures ouvertes, des plaies surinfectées et cancéreuses. L'argent est un agent antimicrobien à large spectre qui a une faible propension des bactéries à développer des résistances. Ils sont faciles d'emploi quoiqu'il faille les humidifier à tous les jours. Ce sont des pansements très utilisés actuellement et ils sont souvent jumelés à d'autres classes pour accroître les fonctions (Moura, Dias, et al, 2013; Lo, Hayter et Chang, 2008).

#### **4.4 La nanocellulose : un bon candidat?**

La nanocellulose semble être une bonne candidate pour le développement des pansements ou des semelles. Elle possède un bon nombre des propriétés recherchées. Elle provient d'une matière naturelle, abondante et peu coûteuse, et elle est

biocompatible et biodégradable. Elle a une bonne capacité d'absorption qui pourrait lui permettre de concurrencer les pansements faits pour les plaies dont l'exsudat abondant. Formant soit un gel, soit un film tout dépendant de sa concentration, elle constitue un matériel très versatile. La possibilité de lui donner une bioactivité en ajoutant des agents antimicrobiens, lui confère le potentiel de rivaliser avec bon nombre de pansements déjà sur le marché. Actuellement, les chercheurs trouvent plusieurs applications de la nanocellulose bactérienne (Czaja, Krystynowicz, Bielecki et Brown, 2006). Cela dit, il est important de mentionner que la production de nanocellulose est encore très coûteuse à grande échelle. Les nanotechnologies basées sur la nanocellulose et les produits qui en découlent pourraient être dispendieux, ce qui nuirait à leur mise en marché alors que leur acceptabilité sociale pourrait temporairement freiner leur application (Rebouillat et Pla, 2013).

La cellulose, tant qu'à elle, est déjà une matière première utilisée dans le monde des pansements et des semelles anti-odorantes. Dans le développement de produits à base de fibres de bois, il est normal de vérifier avant tout si la cellulose, utilisée normalement pour la fabrication de papiers ou de cartons réguliers, peut servir de support cellulosique à l'obtention de produits bioactifs. Si ce type de support cellulosique s'avérait efficace pour lier des peptides antimicrobiens et maintenir les propriétés désirées pour l'activité antimicrobienne recherchée, il deviendra le matériel de choix pour concevoir des produits bioactifs plutôt que la nanocellulose.

## SECTION 5

La section 5 traite des méthodes d'analyse reliées au couplage de peptides antimicrobiens afin de vérifier si le peptide antimicrobien est lié de façon covalente à la surface de la NCO. La méthode avec la spectroscopie de photoélectron X sera d'abord présentée. Ensuite, une méthode de détection de la nisine libre (non couplée de façon covalente) fut développée via le Luminotox en conjonction avec le dosage de la concentration totale en protéine d'une solution avec l'acide bicinchoninique (BCA). Finalement, le pouvoir antimicrobien de la NCO et du support cellulosique, ont été évalué par des essais antimicrobiens basés sur le dénombrement bactérien, soit par compte direct des colonies bactériennes avec une dilution appropriée (Prescott, 2003).

### 5.1 Spectroscopie de photoélectron X (XPS)

Le XPS permet l'étude et la caractérisation chimique de la surface de matériaux et de polymères sur une profondeur variant de 1 à 20 nm. Elle est l'un des outils principaux pour la caractérisation de surfaces. La technique XPS est basée sur l'énergie de liaisons soit le fait que chaque type d'atome contient des électrons et l'énergie de liaisons avec le noyau est spécifique. C'est cette spécificité qui permet au détecteur de trouver de quel atome ils proviennent. Seules exceptions à la règle est l'atome d'hydrogène et d'hélium qui ne peut être détecté. Au départ, les électrons

doivent être séparés de l'attraction que leur atome a sur eux. Pour ce faire, des rayons X sont dirigés sur l'échantillon afin de les exciter et de leur donner l'énergie nécessaire à leur libération. Une fois libres, ils atteignent la surface de la matière et peuvent se rendre dans le vide s'ils ont assez d'énergie. Ils se déplacent ensuite dans le vide avec une certaine énergie cinétique qui sera captée par le champ électrique de l'analyseur. Le spectre est obtenu suite à l'analyse des énergies de liaisons, l'aire des pics s'y situant constitue la composition atomique de l'échantillon. Plus l'aire d'un pic est grande, plus l'échantillon contient de cet atome. Puisque la cellulose est composée d'oxygène, d'hydrogène et de carbone, la détection d'azote (composé typique d'un peptide) peut indiquer la présence d'un peptide antimicrobien. Les lavages lors de la procédure de couplage servent à éviter tout contaminant à la surface des fibres pour que le spectre représente la réalité à la surface de la NC (Barazzouk et Daneault, 2012, Belgacem, Czeremuszkina, Sapiedha et Gandini, 1995; Watts et Wolstenholme, 2003).

## 5.2 Acide bicinchoninique

L'acide bicinchoninique (BCA) est une méthode standard quantitative pour doser la concentration totale en protéine d'une solution. Quatre acides aminés et leur liens peptidiques sont impliqués dans le processus de détection. Ces acides aminés sont non polaires et interagissent avec les ions de cuivre ( $\text{Cu}^{++}$ ) (réactif de Gornall utilisé pour la méthode de Biuret) pour le réduire en  $\text{Cu}^{+}$ . Le nombre de réductions est proportionnel à la quantité de protéines présentes dans le milieu (Garrett, Grisham et Lubochinsky, 2000). Cet  $\text{Cu}^{+}$  forme un complexe avec le BCA présent dans le milieu qui passe du vert au mauve. La courbe standard est préparée avec une concentration

connue (200-1000 $\mu$ g/ml) d'albumine du sérum bovin (ASB). Un spectrophotomètre réglé à 562 nm en absorbance après une incubation (30 minutes à 37°C), permet la lecture. Cette méthode ressemble à la méthode de Biuret pour le dosage protéique. Celle-ci possède l'avantage d'être peu sensible aux détergents (SDS, le saccharose, le tampon TRIS et le glycérol). Le test permet de détecter entre 200 $\mu$ g/ml et 1000 $\mu$ g/ml de protéines (Gornall, Bardawill et David, 1949; Karam, Charafedine, Dhulster et Chihib, 2013).

### 5.3 Le Luminotox™

La compagnie Lab\_Bell inc., située à Shawinigan, développe des tests permettant de connaître le niveau de toxicité des eaux potables et usées. Depuis 1999, le Dr. François Bellemare, responsable en recherches et du développement, vise la commercialisation des appareils de mesure dont les caractéristiques principales sont d'être rapides, sensibles et portatifs. Soucieuse de l'environnement, l'entreprise spécialisée en biotechnologies produit plusieurs appareils d'analyse tels le *Luminos*, le *Luminotox*, le *Lab-On-Line*, l'*AquaEXPERT* et le *Robot LuminoTox*. L'origine de la toxicité des eaux peut être reliée à la présence de molécules chimiques, bactériologiques ou biochimiques. Le *Luminotox* est un appareil visant la détection de ce type de molécule et utilise des réactifs organiques: le CEP (membrane de l'épinard contenant les protéines impliquées dans la photosynthèse) et les SAPS (algues). La compagnie offre différents réactifs avec différentes spécificités pour les molécules à détecter. D'abord exposé à une lumière spécifique, le réactif organique va, en premier, transformer l'énergie lumineuse en énergie chimique et ensuite, le surplus d'électrons

sera réémis sous forme de fluorescence. Toutefois, les protéines membranaires des réactifs sont sensibles aux molécules toxiques dans le milieu et la fluorescence peut en être inhibée. La présence de peptides antimicrobien peut donc être détectée, occasionnant ainsi une baisse de la fluorescence. (Gouvernement du Canada, 2005).

Le principe de fonctionnement du *Luminotox* est donc étroitement lié au mécanisme de photosynthèse. La lumière blanche est responsable du déclenchement des photosystèmes. L'échelle de la lumière visible se situe entre 380 nm et 720 nm. Les pigments sont responsables d'absorber certaines longueurs d'onde de la lumière (fraction absorbée), et certaines sont relâchées (fraction diffusée). Les plantes absorbent principalement dans le bleu (475-500 nm) et le rouge (650-720 nm), mais la couleur verte est diffusée. Dans le chloroplaste (environ 100 par cellule), les pigments sont situés sur des thylakoïdes. Ils sont responsables de l'absorption de la lumière et de la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique (Campbell et Reece, 2004).

Il existe plusieurs types de pigments regroupés dans la membrane des thylakoïdes permettant un plus large spectre d'absorption. Chaque pigment est spécifique à une longueur d'onde : la chlorophylle *a* (en majorité) absorbant le bleu et le vert et la chlorophylle *b* pour la couleur jaune, ainsi que le caroténoïde dont le spectre d'absorption est dans le jaune et l'orange. Les pigments s'associent avec des protéines membranaires pour former le système photochimique de la photosynthèse. Le mécanisme est le suivant : un photon permet à la chlorophylle de passer de l'état fondamental à l'état excité, donc de propulser l'électron sur une autre couche orbitale. L'augmentation de l'énergie potentielle de l'électron a besoin d'être dissipée pour





chaleur et en énergie fluorescente. La compagnie Lab\_Bell inc. exploite le potentiel de la fluorescence puisque celle-ci est un bon indicateur de la bioactivité de la plante et donc de la toxicité de l'échantillon à analyser. Les protéines membranaires sont responsables du fonctionnement des photosystèmes et du transport d'électrons. Ils sont sensibles aux molécules toxiques ; la perturbation qui s'en suit entraîne une altération de la fabrication des substrats essentiels. Il y aura donc une baisse de l'émission de la fluorescence.



Figure 6. Prototype LuminoTox de l'entreprise Lab\_Bell inc.

L'appareil (Figure 6 ci-dessus) détecte les niveaux de fluorescence en exposant l'échantillon à une lumière spécifique. Le paramètre  $F_0$  correspond au niveau de la faible intensité de fluorescence à 470 nm. Le paramètre  $F_m$  correspond au niveau de la forte intensité de fluorescence à 700 nm. Ces deux valeurs permettent de calculer le taux de toxicité d'un échantillon selon les calculs suivants (Gouvernement du Canada, 2005).

Le calcul de l'efficacité photochimique (eff) est basé sur une comparaison avec un témoin d'eau déminéralisée. Elle est calculée selon l'équation 1.

$$Eff_{\text{échantillon}} = \frac{(Fm_{\text{échantillon}} - F0_{\text{échantillon}})}{Fm_{\text{échantillon}}} \quad (\text{Équation 1})$$

L'inhibition (Inh) de la fluorescence est ensuite calculée selon l'équation 2. L'efficacité photochimique étant plus faible lorsqu'un éclairage est inhibé par la présence de molécules toxiques.

$$Inh_{\text{échantillon}} = \frac{(Eff_{\text{échantillon}} - Eff_{\text{témoin}})}{Eff_{\text{témoin}}} \times 100 \quad (\text{Équation 2})$$

Un fort pourcentage d'inhibition indique donc qu'une forte concentration de toxine dans l'échantillon.

### 5.3.1 Réactifs (SAPS)

Pour détecter la toxine, le LuminoTox est combiné avec un réactif tels le complexe enzymatique protéique (CEP) ou les systèmes aqueux photosynthétiques stabilisés (SAPS). Les SAPS utilisés pour les expériences sont « SAPS I » pour *Chlorella vulgaris*, « SAPS II » pour *Chlamydomonas* et « SAPS III » pour *Anabaena flos aquae*.

## CHAPITRE II :

### BUTS, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Le présent projet de maîtrise a pour but d'utiliser deux matériaux issus de la cellulose (la nanocellulose oxydée et un échantillon de carton fourni par Cascades) et d'explorer la possibilité de les jumeler avec un peptide antimicrobien. Ultimement, la production d'un papier antimicrobien bioactif efficace contre des pathogènes des pieds est envisagé.

Hypothétiquement, ces deux matériaux ont un fort potentiel de devenir antimicrobien si la technique de couplage de la NCO fonctionne avec un peptide antimicrobien ou bien si l'échantillon de carton de Cascades est associé avec un peptide antimicrobien. La preuve de concept qui est la plus avantageuse, la plus économique, la plus stable, la moins complexe à produire et celle qui aura plus de potentielle sera envisagée pour des travaux futurs dans la CRIEB. Plusieurs objectifs de base ont orienté les travaux. Tout d'abord, avant d'avoir sélectionner le peptide antimicrobien à joindre à la matrice cellulosique, la cellose, sous ces deux formes, a été testé vis-à-vis la croissance microbienne. Ensuite, des tentatives de couplage, indépendamment de la matière utilisée, sont réalisés. Certaines techniques ont été utilisés pour la quantification de la fonction antimicrobienne. Finalement, l'impact de certains paramètre a été évalué pour connaître l'applicabilité d'un tel papier en fonction du peptide antimicrobien.

## CHAPITRE III

### MATÉRIEL ET MÉTHODE

#### 3.1 Préparation des échantillons pour les expérimentations

##### 3.1.1 Support cellulosique : solution et films de nanocellulose oxydée

La nanocellulose oxydée utilisée pour le présent projet a été fournie par la Chaire de recherche du Canada sur la fabrication de papier à valeur ajoutée sous la direction de Monsieur Claude Daneault. La teneur en matière sèche de l'échantillon fourni a été évaluée à une concentration de 23,05 % p/p soit 23,05 g de pâte sèche par 100 g de pâte humide. Les films expérimentaux ont été préparés à partir de cette pâte. Il a d'abord fallu déterminer le pourcentage auquel la solution de NCO était obtenue plutôt qu'un gel, ce qui permet la filtration sous vide. Selon la littérature, une concentration d'environ 0,25% p/p est adéquate (Lévesque, 2009). De plus, la même concentration de NCO est utilisée pour les expérimentations de couplage en phase aqueuse.

À partir de la pâte fournie, un film de NCO devrait être préparé. Il faut d'abord sélectionner un matériau support pour le séchage du film de NCO. Le matériau choisi doit être de faible adhérence et permettre la resuspension du film. Des essais furent effectués sur verre de montre, plaque de céramique, nacelle de plastique, nacelle d'aluminium et fond de boîte de pétri en plastique. Afin d'accélérer le processus de séchage du film, la boîte de pétri est placée à l'étuve à 37 °C. Ensuite, des essais de filtration sous vide ont été réalisés pour établir le type de membrane filtrante adéquate

pour les fibres de NCO. Les filtres de différentes porosités (de 0,22  $\mu\text{m}$  et 0,45  $\mu\text{m}$ ), et de composition différente (cellulose régénérée, nylon et téflon) ont été utilisés. Finalement, il a fallu déterminer la quantité de solution de NCO à utiliser pour avoir un film contenant suffisamment de fibres pour effectuer le couplage tout en permettant une filtration adéquate. La visualisation de l'organisation des films filtrés et non filtré sera effectuée par microscopie à fluorescence inversée (Modèle : Axio observer de Zeiss).

### 3.1.2 Préparation des échantillons de carton fourni par Cascades inc.

L'échantillon de carton mince de 19 points d'épaisseur est fourni par Cascade inc. (figure 7). Le carton a été coupé en morceau de 1.0 cm X 1.0 cm et fut stérilisé à l'autoclave pendant 15 minutes à 121°C.



Figure 7. Échantillon de carton mince fourni par Cascades

### 3.1.3 Préparation échantillon pour la spectroscopie

Au départ, la NCO est sous la forme aqueuse due à sa faible concentration. Afin d'effectuer la technique avec XPS, former un film très fin et le plus régulier possible. Pour ce faire, 200  $\mu\text{L}$  du produit de couplage est déposé à coup de 50  $\mu\text{L}$  à la fois dans une nacelle d'aluminium. Le tout est séché au four pasteur à 50°C. Il est préférable de parfaire l'assèchement en mettant la nacelle dans le dessiccateur pendant au moins 12 heures. Ensuite, les échantillons sont prêts à l'évaluation au microscope XPS.

### 3.1.4 Préparation échantillon pour le Luminotox

#### 3.1.4.1 Préparation des échantillons de nisine

Des solutions de nisine à 100  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$  et 1  $\mu\text{g/ml}$  ont été préparées pour le LuminoTox. L'eau utilisée pour les dilutions et les expériences au LuminoTox est de l'eau déminéralisée stérile.

#### 3.1.4.2 Sélection du SAPS pour détection de la nisine

La compagnie Lab\_Bell inc. commercialise différents réactifs SAPS pour la lecture au *LuminoTox*. Il faut savoir lequel sera plus sensible à la nisine. Étant donné les caractéristiques de *Chlamydomonas*, dont la paroi est semblable à celle des bactéries Gram+, cet organisme sera possiblement le candidat idéal pour la détection

de la nisine. Les trois spécimens seront toutefois testés soit *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas sp*, *Anabaena flos aquae*.

#### **3.1.4.3 Activation du SAPS**

Les photosystèmes des SAPS doivent être d'abord activés en les exposant à la lumière afin d'éviter que le faisceau de lumière de l'appareil ne serve d'énergie pour les besoins en ATP, en NADPH<sup>+</sup> et en amidon. La fluorescence ne sera observée qu'une fois les besoins énergétiques de la cellule comblés. Puisque les tubes fluorescents ne permettent une exposition suffisante pour activer les photosystèmes et que le temps d'exposition à la lumière naturelle est variable avec les conditions météorologiques, des conditions plus contrôlées ont été sélectionnées. Les cellules du SAPS sont donc exposées pour une durée maximale de trois heures sous une ampoule *Outlite Natural Light 20W* (pour la croissance de plantes), et à la même température ambiante. Toutes les solutions utilisées au cours de l'expérience doivent aussi être à la même température pour éviter de mettre les cellules dans un état de stress, ce qui entraînerait une baisse de la fluorescence.

#### **3.1.4.4 Ajustement de la quantité de SAPS pour analyse au LuminoTox**

Cette étape n'est pas essentielle pour les calculs de l'inhibition, mais elle permet d'ajuster la dilution appropriée pour les expériences. La concentration du SAPS dans chaque échantillon testé doit être de 5 µg/ml (100µl de SAPS dans 2 ml d'échantillon).

Le *LuminoTox* offre différentes types de lectures, dont l'absorbance (Abs) pour 100µl de SAPS dilué dans 2 ml d'eau déminéralisée stérile. Une lecture lue comprise entre 0.1 et 0.2 indique un nombre adéquat de SAPS. Si cette valeur est faible (< que 0,1), il faut ajouter du SAPS directement dans la cuvette. Un minimum de 1,5 ml de liquide est exigé pour la lecture dans l'appareil. De l'eau déminéralisée stérile est utilisée pour le contrôle négatif. Les lectures d'absorbance se font à 470 nm. Le tableau I ci-dessous contient les dilutions appropriées pour les différents SAPS.

Tableau I. Quantité\* appropriée de SAPS à 470 nm à partir de la solution-mère fournie par la compagnie (Chaque bouteille a une concentration spécifique)

Type cellulaire	Absorbance à 470 nm	Quantité (µl)
<i>Chlorella</i> <i>vulgaris</i>	0.105	200
<i>Chlamydomonas</i>	0.100	250
<i>Anabaena</i> <i>flos aquae</i>	0.115	100

\*Pour 2 mL d'eau stérile déminéralisée

#### 3.1.4.5 Paramètre du Luminotox

Il faut modifier le mode à « flux » et changer les paramètres sur le LuminoTox dépendamment si le SAPS est de type chlorophycé (*Chlorella vulgaris* et *Chlamydomonas*) ou cyanophycé (*Anabaena flos aquae*).



Tableau II. Paramètres du LuminoTox proposé par Lab\_Bell selon le type cellulaire

Type cellulaire	Délai	forte	faible	Gain	Longueur d'onde
Chlorophycée	10	22	0.8	64	470 nm
Cyanophycée	100	12	0.6	128	605 nm

### 3.1.4.6 Mesure de l'efficacité photochimique

Afin d'éviter les contaminations cellulaires, toutes les mesures sont effectuées de façon groupée. La même cuvette est utilisée pour l'ensemble des manipulations et l'homogénéité des solutions est assurée par un brassage au vortex. Aussi, les échantillons sont analysés en ordre croissant de concentration. La figure 8 ci-dessous schématise l'ordre des lectures qui doivent être de gauche à droite et de haut en bas. Les points noirs représentent les cuvettes.

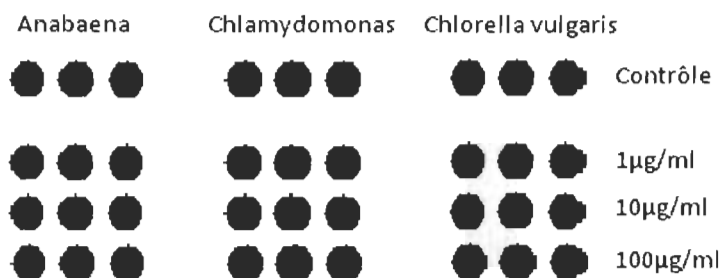


Figure 8. Ordre de lecture des échantillons au LuminoTox

De façon générale, la méthode à suivre est la suivante. Tout d'abord, il y a l'ajout du SAPS en prenant en note l'heure. Lorsque 100 µg/ml de SAPS est ajouté dans l'éprouvette #1, il faut attendre à la 30e seconde avant d'ajouter 100µg/ml dans l'éprouvette suivante (#2). Il faut agiter avant les lectures pour éviter la sédimentation



laboratoire d'enseignement de microbiologie de l'Université du Québec à Trois-Rivières (Conservation  $-80^{\circ}\text{C}$  en milieu 80% glycérine). Il s'agit des souches d'*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus B-Hémolytique* (Type *S. agalactiae*) et *Pseudomonas aeruginosa* 27853 (Annexe B). En ce qui a trait à *Corynebacterium minutissimum*, la souche fut commandée d'un laboratoire allemand *Leibniz Institute DSMZ*. Différentes solutions de peptides antimicrobiens ont été effectuées à partir de Magainin 1 (Anaspect Inc, 1 mg à 95% pureté), de Lactoferricine Bovine (Sigma-Aldrich 85% pureté), de Nisine (Sigma-Aldrich 5 g à 2,5% de pureté) et la nisine à 99% de pureté fut fournie gracieusement par le Centre national de Électrochimie et technologies environnementales (CNETE) de Shawinigan, et finalement de la Gramicidin D (Sigma-Aldrich, 99% pureté).

Trois méthodes différentes ont été appliquées pour évaluer l'efficacité des peptides sur les souches bactériennes. La première est basée sur la méthode Kirby-Bauer (Bauer et Kirby, 1966), c'est-à-dire, la diffusion de disque d'antibiotiques sur gélose. La solution de peptides antimicrobiens est déposée à l'aide d'une pipette sur un disque de papier buvard stérile de dimension standard. Le disque imbibé de la solution est ensuite déposé sur un tapis bactérien uniforme étendu à l'aide d'un rateau (à partir d'une solution mère d'un bouillon bactérien de concentration de  $10^8$  bactéries) sur la gélose nutritive d'un plat de pétri. Après une incubation de 24 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ , il est possible d'apercevoir des zones absences de croissance au pourtour des disques. Selon le diamètre de ces zones, il est possible d'évaluer à quel point la bactérie est sensible ou résistante à la solution contenue dans le disque (Bauer, Sherris et Turck, 1966).

La deuxième méthode est basée sur un principe similaire, cependant une goutte de peptide antimicrobien est directement déposée sur la gélose (10µL). Des zones d'inhibitions seront donc observables si la souche bactérienne est sensible au peptide antimicrobien déposé. Si la souche bactérienne est résistante à l'efficacité du produit, le tapis bactérien ne s'avère pas affecté par la présence de la solution antimicrobienne. Cette méthode a pour avantage de tester la molécule sans avoir d'influence du support.

La troisième méthode est effectuée en bouillon mueller-Hinton (MH), suivant une méthode de dilution en série. Il s'agit alors de trouver la concentration minimale inhibitrice de la croissance bactérienne et la concentration minimale bactéricide pour les souches sensibles au peptide antimicrobien. Pour se faire, la solution de peptides antimicrobiens a été diluée dans dix tubes contenant un millilitre de bouillon Mueller-Hinton et un ml d'une solution contenant  $10^8$  bactéries. Les tubes qui semblent stériles à l'œil nu seront alors étalés sur un plat de pétri pour observer la croissance bactérienne ou son absence (Andrews, 2001).

Les trois méthodes ont été utilisées par toutes les bactéries étudiées, excepté pour *Corynebacterium minutissimum*. Dans ce cas, l'apprivoisement était limité seule la méthode de dilution en série fut appliquée, car elle est la plus efficace. Aussi, seul l'effet de la nisine a été étudié sur cette bactérie puisque ce peptide avait le plus de potentiel..

### 3.3 Évaluation de l'utilisation de la NCO et de la cellulose comme source de carbone pour les microorganismes auxanogramme du carbone

La NCO peut-être une source de nourriture pour les souches bactériennes (Annexe B) et ce, sous la forme aqueuse, de film et de la cellulose fournie par Cascades, et ainsi favoriser la croissance. Toutefois, il semble peu probable que la NCO influence la croissance bactérienne. En effet, les bactéries devraient dégrader ce sucre en dernier recours puisqu'il est considéré comme un sucre complexe. En effet, la cellulose est un polymère de sucres constituée de chaînes longues d'unités structurales d'anhydroglucose reliés par des liens  $\beta$ -glycosidiques et qu'il faut absolument que les microorganismes possèdent les enzymes cellulolytiques adéquates, tels des cellulases, pour le dégrader (Lapointe, 1989). De plus, les bactéries commensales de l'homme ne sont habituellement pas cellulolytiques. S'il est possible d'en retrouver quelques espèces chez certains individus qui se logent plutôt au niveau de l'intestin, et non à la surface de la peau (Rainaud , Buts et al., 2004).

Pour évaluer s'il y a l'utilisation de la NCO ou de la cellulose comme source de nourriture chez les espèces bactériennes, il faut faire un auxanogramme du carbone. Cela consiste à déterminer précisément si les bactéries choisies sont capables de croître dans un milieu complètement dépourvu d'éléments nutritifs hormis celui à l'étude, soit la NCO ou de la cellulose. Pour ce faire, il faut :

- Préparer des suspensions pour chaque microorganisme à la concentration de  $10^9$  bactéries, par la technique de dilution en série en bouteille d'eau physiologique et en faire le dénombrement bactérien (( $T_0$ ) initial).

- Laisser croître 24 heures à 37°C, en eau physiologique en absence de ces bactéries (témoin négatif), ainsi qu'en présence de NCO en solution, et NCO sous forme de film ou de cellulose sous forme de carton. Ensuite, un second dénombrement bactérien est alors réalisé ( $T_{24}$ )

### **3.4 Utilisation de la nanocellulose comme source de nutriment pour les microorganismes par milieu de culture à la nanocellulose**

Les bactéries utilisent les nutriments et éléments essentiels à leur croissance contenus dans le milieu de culture sur lequel ils croient. Afin d'observer qualitativement si la NCO permet la croissance bactérienne, un milieu incluant de la NCO fut préparé, ainsi qu'un milieu contenant d'autres éléments nutritifs. Cette expérimentation permet de conclure si les microorganismes sélectionnés se servent de la NCO comme source de nutriments à leur croissance.

Un milieu de culture sous forme de gélose, constituée d'agar, auquel un gramme de NCO à 20% a été ajouté. Sachant que l'agar très peu fermentable pour les bactéries et l'homme, il ne sera une source de carbone aux bactéries mais servira de soutien à la NCO dissoute (Campbell, 2006). À des fins de comparaison, un contrôle positif est nécessaire soit un milieu d'agar nutritif contenant également un gramme de nanocellulose oxydée à 20%. Les milieux, après stérilisation, un inoculum de chaque bactéries est fait en plein centre de la gélose. Les observations ont été faites après 18 heures d'incubation à 37°C.

### 3.5 Méthode de fonctionnalisation

#### 3.5.1 Couplage du peptide antimicrobien sur film de NCO

Afin d'élaborer la méthode et d'en déterminer l'efficacité, les premiers essais de couplage ont été réalisés avec la nisine puisque cette dernière était très efficace envers les organismes GRAM+. Considérant le couplage de la NCO se fait avec une amine contenue dans la nisine, la solution de nisine doit être caractérisée (pureté et concentration). L'évaluation des mécanismes de couplage et de l'impact des impuretés ne font pas partis du présent travail. La solution de nisine fut effectuée dix fois plus élevée de la CMI de la nisine envers la bactérie, *S. Aureus*. Prendre note que la réalisation de cette solution a été effectuée sous de conditions stériles et conservée huit heures au réfrigérateur à 4°C.

À chaque jour d'expérimentation, une solution d'EDAC et de NHS ont été préparée. L'ajout de l'EDAC et NHS se fait dans l'eau stérile déminéralisée. Selon les travaux non publiés de Michel Lévesque (Lévesque, 2009), les proportions molaires adéquates de NHS : EDAC par rapport au nombre d'acide glucorinique contenu dans la cellulose est de 1 : 1,5 : 1. Tout juste avant le couplage, le film de NCO est saturé par l'ajout de 10 ml de tampon PBS 1X stérile. Le film est laissé au repos pendant 30 minutes et un gonfflement est observable. Ensuite, la solution de nisine (10 fois la CMI de la bactérie sélectionnée) est ajoutée à la surface de la nanocellulose contenue dans un plat de pétri de verre stérile. La solution d'EDAC et de NHS est également ajoutée. La solution est agitée durant quatre heures à 37°C dans un incubateur-agitateur. Une fois le temps de réaction écoulé, deux lavages avec de l'éthanol 70 % sont effectués

pour arrêter la réaction puis l'éthanol est retiré par lavage à l'eau stérile déminéralisée. Trois lavages subséquents de la membrane sont effectués avec dix millilitres de PBS 1X, en laissant et reposer les films dix minutes entre chaque lavage. Un dernier lavage à l'eau stérile est effectué, puis la membrane est séchée à température pièce. Tous les lavages sont nécessaires pour retirer le maximum des résidus de peptides antimicrobiens non-liés et des produits de couplage.

La réussite du couplage est évaluée par la mesure du pouvoir antimicrobien du film créée. La mesure est aussi effectuée sur un film non-couplé pour des fins de comparaison. Dans des éprouvettes, 25 ml d'eau physiologique ou de bouillon MH est déposé avec un inoculum de  $10^8$  d'une bactérie comme *S. aureus* issu d'une solution-mère. La quantité dans les éprouvettes a été déterminée pour submerger la membrane. Cela est agité dans un incubateur avec plaque agitatrice pendant 24 heures à 37 °C avec une agitation de 60 RPM. Ensuite, un prélèvement d'un millilitre de chaque tube est étendu en boîte de Pétri (en triplicata) à des fins de dénombrement bactérien. Au besoin, le surnageant peut être dilué avec des bouteilles à dilution pour s'assurer que le dénombrement soit possible.

### **3.5.2 Test de couplage entre la NCO aqueuse et nisine**

Des essais de couplage ont été effectués avec une solution de NCO, plutôt qu'un film, à 0,25%. Un témoin positif et négatif font parti de l'expérimentation. Pour se faire, 20 cm de membrane standard à dialyse est stérilisée aux UVs pendant cinq minutes de chaque côté. Cette membrane servira de récipient pour la réaction et permettra au lavage des produits de couplage. Ensuite, elle est imbibée avec de l'eau



stérile jusqu'à ce que la souplesse soit revenue, cela permet de faire un nœud à une extrémité et de s'en servir comme récipient. L'étanchéité du récipient peut être vérifiée avec de l'eau stérile déminéralisée. Une fois la membrane à dialyse prête, 20 millilitres de NCO stérile est prélevé et déposé dans le récipient. Peser environ précisément 71 g de NHS (catalyseur) et l'incorporer aux 20 millilitres de NCO. L'autre extrémité de la membrane à dialyse est clampée avec une pince hémostatique puis déposée dans un bécher contenant un agitateur magnétique et de l'eau stérile déminéralisée. Le tout est agité pendant 30 minutes et ensuite, après avoir pesé environ précisément 177 g d'EDAC (agent couplant), ils sont incorporés au 20 millilitres de NCO et NHS déjà présenté dans le récipient. Un délai de 30 minutes est encore nécessaire pour laisser le temps à la réaction nucléopile de se produire. Le pH, la température et la conductivité sont des données prises au 30 minutes. Si nécessaire, le pH est ajusté à pH 8 avec du NaOH. Neuf lavages par la suite sont nécessaires pour enlever l'excès d'EDAC et de NHS. La conductivité de l'eau dans le milieu externe de la membrane sert de référence pour assurer les changements d'eau stérile déminéralisée à tous les heures environs. Plus la conductivité de l'eau s'élève, plus il y a des résidus dans le milieu externe de la membrane à dialyse. Lorsque la conductivité ne change plus, la période de lavage est complétée. Ensuite, après avoir préparé dix millilitres de la solution de nisine pure à 99% (dix fois plus élevé que la CMI), deux millilitres sont incorporés à la solution contenue dans le récipient que forme la membrane à dialyse. Cette solution est sous agitation, pendant 14 heures. Finalement, cette solution sera lavée de la même manière que pour les produits de couplages pour retrier l'excès décrite dans les lignes précédentes. Le produit contenu dans la membrane à dialyse sera alors utilisé pour les

expérimentations d'essais antimicrobiens ainsi que pour la fabrication d'échantillon pour l'analyse au XPS.

Pour ce qui est de la nisine, une solution de 100 µg/mL est utilisée pour *S. aureus*. Lorsque le couplage est effectué, il est primordial de déterminer si la greffe a bien fonctionné et si la nisine est toujours efficace, car elle pourrait perdre sa fonctionnalisation durant la procédure. La visualisation de la surface des échantillons par microscopie XPS a permis de savoir s'il y a présence de nisine sur les fibres de bois. Effectivement, la NCO ne contient que des atomes de carbone (C) et d'oxygène (O) retenus ensemble par différents liens covalents, et aucun atome d'azote tandis que pour les essais, de l'azote (N) provenant du groupement amine de la nisine et de ses acides aminés devaient être détectés comme signe que le couplage a fonctionné.

### **3.6 Quantification de la fonctionnalisation**

#### **3.6.1 Spectroscopie à photoélectron X**

En ce qui concerne l'efficacité de la nisine issu de la réaction de couplage, des tests évaluant l'aspect antimicrobien des essais sont faits. Dans neuf éprouvettes contenant neuf millilitres d'eau stérile, un millilitre de bouillon bactérien (issu d'une solution-mère) dans le premier tube. Ensuite, un millilitre de l'éprouvette numéro 1 est déposé dans l'éprouvette numéro 2. Cette technique de dilution est réalisée pour toutes les éprouvettes afin d'obtenir des concentrations bactériennes entre  $10^{-1}$  à  $10^{-9}$ . Lorsque les concentrations désirées sont obtenues, deux millilitres de chaque

concentration sont prélevés et déposés dans une nouvelle éprouvette et deux millilitres de la solution issue du couplage y sont également déposés. Ces éprouvettes sont incubées à 37°C sous agitation durant 24h. Après ce délai, un millilitre de chaque éprouvette des concentrations bactériennes  $10^{-1}$  à  $10^{-9}$  sont étalés sur des géloses en triplicata. Cela servira de témoin  $T_0$ . Après une ré-incubation de 24h à 37°C, un autre millilitre est étalé en triplicata ( $T_{24}$ ). Le dénombrement de toutes ces géloses est réalisé.

### **3.6.2 Détection des protéines avec la trousse à l'acide Bicinchiniquique**

La trousse BCA indique que le test est efficace pour la détection de protéines à une concentration de 200-1000µg/ml. Une concentration de 500µg/ml de nisine a été utilisée pour le couplage du peptide sur film de nanocellulose. Les analyses sont en triplicata (Sigma-Aldrich, 2013). Les échantillons peuvent être incubés à la température pièce pendant deux heures minimum, 30 minutes à 37°C ou 15 minutes à 65°C. La méthode sélectionnée pour son efficacité et sa simplicité consiste à incuber les échantillons pendant 30 minutes à l'étuve (37 °C).

## **3.7 Impact de paramètres sur l'efficacité de la nisine**

### **3.7.1 Impact de la température**

Une fois la CMI de la nisine déterminée pour une bactérie sélectionnée, l'efficacité de la nisine a été expérimentée à différentes températures afin de déterminer si ce paramètre peut optimiser l'efficacité de la nisine, avec et sans le support cellulosique. De plus, cela permet de vérifier l'applicabilité à différentes

températures. Le support cellulosique fourni par l'industrie Cascades Inc. sous forme de carton très mince fut utilisé pour cette expérimentation.

L'expérimentation a testé des températures variant entre 20 et 40°C puisque ces températures se rapprochent de celle du corps humain. En effet, 20°C correspond à la température ambiante alors que 40°C correspond à la température du corps fiévreux. Plus précisément, les essais sont réalisés à intervalles de 5°C. Pour chaque température, deux tests est réalisés en triplicata, soit un avec la nisine déposée, puis absorbée par la membrane de cellulose, et un sans la nisine. Ce témoin permettra de déterminer si le carton a un quelconque effet sur la nisine et sur les bactéries. Les concentrations de nisine utilisées correspondent à la CMI déterminée pour chaque bactérie.

Les solutions de nisine à chaque température sont déposées dans un bain-marie, où un thermomètre mesure la température désirée pendant 24h. Dans une série de tubes, 960µL bouillon bactérien pour *S. aureus* et de 860µL de bouillon pour *C. minutissimum* sont déposés. Comme *C. minutissimum* croît difficilement, il faut lui ajouter 100µL de milieu TSB au bouillon bactérien. Ensuite, à chaque température, un échantillon de nisine est déposée dans les éprouvettes correspondantes. Pour les tests avec le carton, 20µL d'eau physiologique stérile sont tout d'abord déposés sur le carton, permettant la pénétration de la nisine plus facilement. Une fois cette quantité d'eau absorbée par le carton, 20µL de nisine à chaque température sont déposés sur le carton. Ce dernier est alors déposé dans un bouillon bactérien. Pour ce qui est de l'expérience sans carton, 20µL d'eau physiologique stérile est directement déposé

dans le tube, afin de respecter les mêmes dilutions que pour le test avec carton. 20 $\mu$ L de nisine sont alors ensuite déposés dans le bouillon bactérien. Les éprouvettes sont incubées 24h pour *S. aureus* et 48h pour *C. minutissimum*, aux températures sélectionnées, en triplicata.

Pour chaque température, il y a donc quatre éprouvettes, un correspondant à la CMI avec carton, et un autre sans carton avec leur témoin correspondant, et cela se réalise en triplicata. Pour chaque organisme et chaque température, un contrôle négatif est effectué. Une fois l'incubation terminée, chaque éprouvette est étalée en triplicata sur gélose sang pour *C. minutissimum* et sur gélose TSA pour *S. aureus*. Ces géloses sont, par la suite, incubées pendant 48h pour *C. minutissimum* et 24h pour *S. aureus*, à 37°C. Par la suite, le dénombrement bactérien de ces géloses est effectué, la moyenne des triplicata est considérée.

### 3.7.2 Impact du pH

Les expérimentations ont été réalisées pour évaluer l'influence du pH sur le pouvoir antimicrobien de la nisine. Les pH ont été mesurés avec un pHmètre (Symphony pH Meter SP70P). L'étendue de pH choisie se rapproche du pH de la peau afin d'éviter des blessures cutanées et modifier les processus physiologiques impliqués dans la cicatrisation ou de l'inflammation par exemple. Puisque la peau possède un pH d'environ 5.5 (Schreml et al., 2010), les pH testés sont donc 3.5 - 4.5 - 5.5 - 6.5 et ces essais ont été réalisés en triplicata. La nisine est plus efficace en pH acide (Davies et al., 1998).

Ces essais ont été réalisés selon une procédure similaire à celle appliquée pour évaluer différentes températures sur la nisine. Les bouillons bactériens sont testés avec et sans la présence de carton, afin de déterminer si celui-ci a une influence sur la croissance bactérienne. Il s'agit de déposer dans une série de tubes 960µL de bouillon bactérien de *S. aureus* et, dans une autre série de tubes, 860µL de bouillon bactérien de *C. minutissimum*. Pour *C. minutissimum*, 100µL de bouillon TSB a été ajouté de milieu pour stimuler sa croissance. Le pH de la solution de nisine a été ajusté par l'ajout d'acide acétique 50% (acide faible) et de d'acétate de sodium 1M (base faible). Des acides et bases faibles furent utilisés pour limiter les erreurs engendrées par leur dissociation en milieu aqueux ainsi que le fait que la nisine est fortement protonée à bas pH (Liu et Hansen, 1990). 20µL d'eau physiologique stérile ont été déposée sur un carton afin de favoriser la pénétration de la solution de nisine. Par la suite, 20µL de solution de nisine a été déposée sur le carton qui a alors été introduit dans le bouillon bactérien. Pour le contrôle dans carton, 20µL d'eau physiologique stérile est déposé directement dans le bouillon bactérien, puis 20µL de nisine y est déposé, afin d'obtenir les mêmes dilutions pour chaque test.

Les éprouvettes (en triplicata pour chaque essai) ont été incubées 24h pour *S. aureus* et 48h pour *C. minutissimum*, à 37°C. Après incubation, chaque éprouvette est ensemencée, puis incubée sur gélose TSA pendant 24h pour *S. aureus* et sur gélose au sang pendant 48h pour *C. minutissimum*, à 37°C, en triplicata. Le décompte des colonies sur géloses a alors été réalisé et la moyenne des trois géloses a été considérée. Des contrôles ont été effectués pour chaque pH testé, ainsi que pour les tests avec et

sans présence de carton, afin de confirmer la viabilité du bouillon bactérien. De plus, le pH de départ du carton (pH 5,3) fut pris en compte, même si cela a pu faire varier les résultats, car il a pu acidifier ou baséifier la solution de nisine déposer à sa surface.

## CHAPITRE III

### RÉSULTATS ET ANALYSES

#### 4.1 Fabrication d'un film de nanocellulose oxydé

##### 4.1.1 Sélection du matériau pour la fabrication des films

Un film non filtré qui adhère le moins possible à la surface du contenant et qui est facilement décollable en le suspendant dans de l'eau ou de la solution tampon, est obtenu dans le fond d'une boîte de pétri en plastique standard. La boîte de pétri en verre, le verre de montre, la céramique, la nacelle d'aluminium et la nacelle de plastique sont des contenants qui ne permettent pas la suspension du film une fois séché. Toute surface trop poreuse n'est pas recommandée pour la fabrication du film, puisqu'une quantité supérieure de liquide est requise pour suspendre le film, et ce dernier forme un gel. De plus, la porosité augmente l'adhérence et un râclage des bords est nécessaire pour provoquer le décollement. Ceci abîme alors le film et augmente le risque de bris de stérilité.

##### 4.1.2 Sélection de la membrane filtrante

En ce qui a trait au choix de la membrane filtrante, la membrane de téflon (PTFE) de 0,45  $\mu\text{m}$  offre le meilleur potentiel. Puisque la membrane de PTFE est une matière inerte et que le film n'y adhère pas de façon significative, son utilisation à l'avantage de pouvoir permettre les lavages en ayant un soutien. En effet, le filtre rigidifie le film et le rend moins fragile au force mécanique de manipulation. Toutes



les expériences de filtration pour la fabrication des films de NCO ont été réalisés sur des membrane de PTFE, par huit millilitres de solution de NCO à environ 0,23% (Annexe A).

#### 4.1.3 Impact de la filtration sur le film de NCO

Les figures 11 et 12 ci-dessous démontrent la différence d'organisation des films de NCO avec les deux modes de fabrication soit séché ou filtré. Les films sont observés par microscopie à fluorescence inversée. Lorsqu'un film de NCO n'est pas filtré (séché dans la boîte de pétri), les fibres sont plus lâches et désorganisées (figure 10). Le film est beaucoup plus organisé et dense lorsqu'il est filtré (figure 11). Le maillage « dense » d'un film filtré pourrait avoir des incidences sur la déposition de la nisine ou n'importe quelle substance à sa surface. Lorsque le film est filtré, il a donc plus de groupements carboxyles disponibles pour le couplage considérant qu'il a plus de fibres.

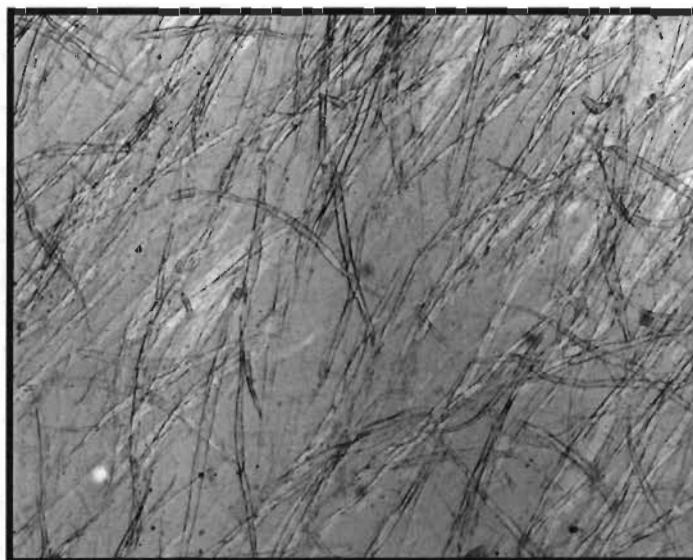


Figure 10. Film de NCO et de cellulose non filtré, dans du PBS (Grossissement 5X)

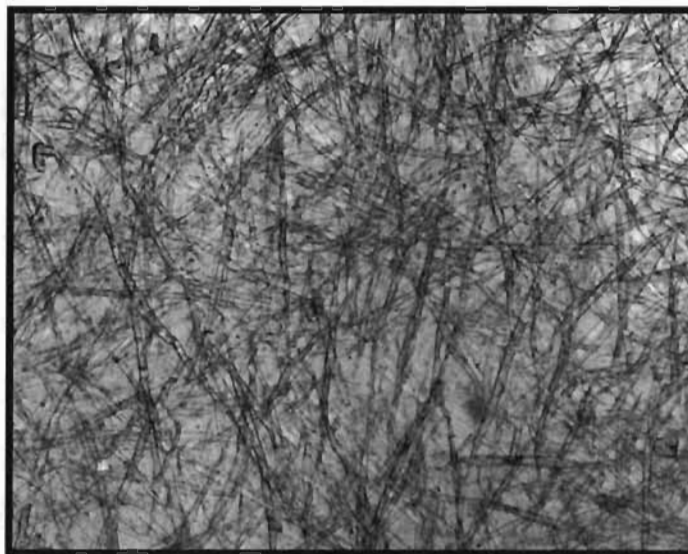


Figure 11. Film de NCO et cellulose, après filtration, dans du PBS (grossissement 5X)

## 4.2 Effet des peptides antimicrobiens sur la croissance des souches bactériennes

### 4.2.1 Application de la méthode Kirby-Bauer par diffusion sur disque

Lors de l'évaluation de l'effet des peptides antimicrobiens par la technique de diffusion du peptide antimicrobien imbibé sur un disque de papier appliqué sur un tapis bactérien, aucune inhibition est observée (figure 12). En effet, aucun halo stérile n'est présent au pourtour des disques contenant la solution de peptides antimicrobiens (nisine, lactoferricine bovine, magainine 1, gramicidine D) et ce, pour toutes les souches bactériennes sélectionnées. Cette absence d'efficacité suggère qu'il n'y pas de diffusion de la solution de peptides antimicrobiens du disque à la surface de la

gélose, l'ingrédient actif demeurant emprisonné sur le papier buvard. L'inhibition de la croissance bactérienne ne peut être effectuée avec précision sous la surface du papier, ce qui rends cette méthode inadéquate dans le cadre du présent projet. Il serait peut-être intéressant lors d'expérimentations futures d'utiliser les milieux différentiels sélectifs pour voir ce qui se passe sous le papier. Par exemple, un milieu mannitol-sel pour *Staphylococcus aureus*. De plus, cela évoquera la possibilité d'un effet local plutôt que de la diffusion dans le milieu. Le support cellulosique ne doit pas emprisonner la molécule bioactive.

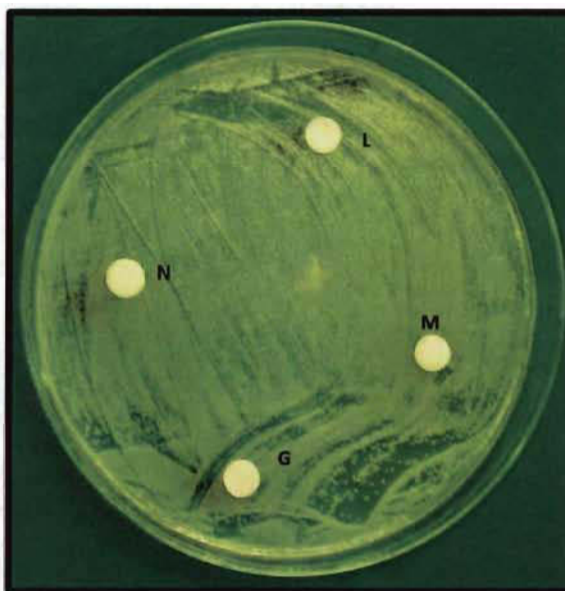


Figure 12. Effet de quatre peptides antimicrobiens sur la croissance de *S. aureus* selon la méthode Kirby-Bauer avec disques (N : nisine, M : magainine, L : lactoferricine, G :gramicidine D)

#### 4.2.2 Application de la méthode Kirby-Bauer par dépôt direct

Contrairement à la méthode précédente par diffusion sur disque de la section précédente, le peptide antimicrobien est appliqué sur le tapis bactérien par la déposition direct de la solution. Cela permet d'évaluer directement l'activité antimicrobienne des solutions. La nisine s'est révélée efficace pour inhiber la croissance de *Streptococcus* (figure 13) et le *Staphylococcus* (figure 14), ce qui est indiqué par la présence de zones de stérilité sur la gélose.

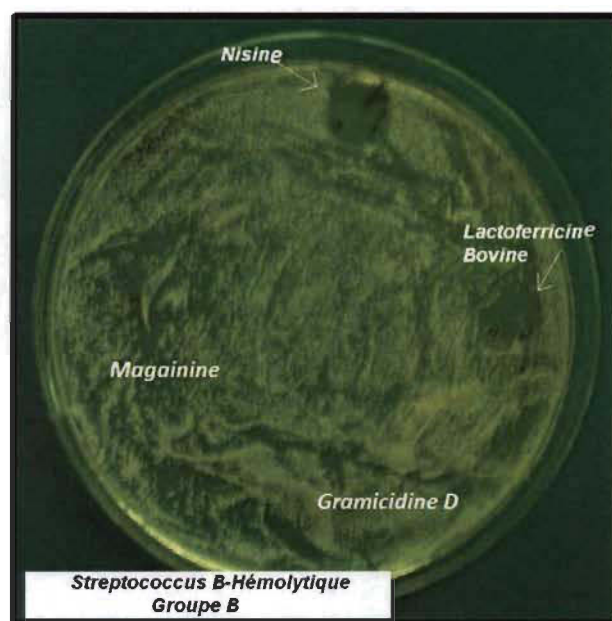


Figure 13. Antibiogramme des peptides antimicrobien sur culture de *Streptococcus*

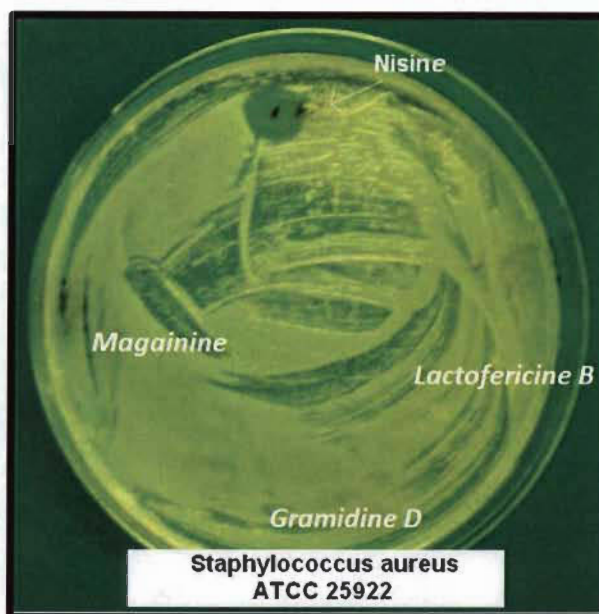


Figure 14. Antibiogramme des peptides antimicrobiens sur culture de *Staphylococcus aureus*

Pour ce qui est de *Pseudomonas aeruginosa*, aucun des quatre peptides antimicrobiens utilisés n'ont permis une inhibition complète de la croissance bactérienne (figure 15). La nisine a toutefois eu un certain effet inhibiteur partiel sur la croissance sans l'empêcher complètement (Giacometti et al., 1999).

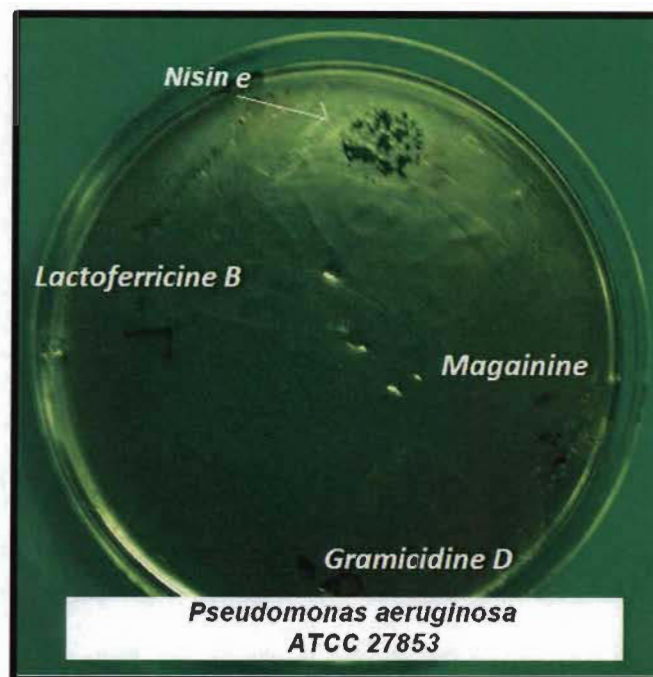


Figure 15. Antibiogramme de peptides antimicrobiens sur culture de *Pseudomonas*

#### 4.3.3 Application de la méthode par dilution en série pour la détermination de la CMI

La concentration effective de nisine pour inhiber la croissance des deux souches bactériennes préalablement identifiées comme étant réactives (*Staphylococcus aureus* et *Streptococcus agalactiae*) a été déterminée par une méthode de dilution en série visant l'identification de la CMI. De plus, l'expérimentation a été réalisée avec le *C. minutissimum* et la nisine. Le caractère non-inhibiteur des autres peptides antimicrobiens a été confirmé par la méthode de dilution en série. Cette absence d'efficacité des peptides antimicrobiens (gramicidine D, magainine et lactoferricine B) sur les bactéries testées va à l'encontre des résultats publiés dans la littérature (voir section 2.1 du cadre théorique). Cette divergence n'a plus être

expliquée que par une problématique intrinsèque de la qualité des produits ou d'une altération lors du transport jusqu'à la livraison.

Tableau III. CMI\* de la nisine chez les bactéries sensibles

Souches	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>S. agalactiae</i>	17
<i>S. aureus</i>	33
<i>C. minutissimum</i>	250

\*Les CMI ont été effectués en triplicata

#### 4.3.4 Sélection du peptide antimicrobien

Selon les résultats obtenus préalablement, seule la nisine démontre une efficacité suffisante pour la poursuite du projet (couplage de la NCO-peptide et cartin-peptide). De plus, la nisine est efficace à des concentrations relativement faibles pour au moins deux bactéries, c'est-à-dire *S. aureus* et *S. agalactiae*, avec des CMI de 17 et 33  $\mu\text{g/mL}$ , respectivement. La conception d'un papier antimicrobien efficace n'en sera que facilitée.

#### 4.4 Évaluation de l'utilisation de la NCO et de la cellulose comme source de carbone pour les microorganismes par auxanogramme du carbone

Afin de vérifier si les supports cellulotiques choisis pourraient favoriser la croissance bactérienne qui ne serait pas souhaitable, un dénombrement bactérien a été effectué sur *Staphylococcus aureus* et *Corynebacterium minutissimum* en présence du support et d'eau physiologique, sans aucun autre apport nutritif. La bactérie pourrait

utiliser la présence du support cellulosique comme source de carbone pour favoriser sa croissance.

Les résultats obtenus (figure 16 et 17) en présence de NCO (en solution ou en film) démontrent que la population bactérienne de tous les échantillons est fortement réduite après 24h, de façon comparable au témoin (eau physiologique seulement).

Pour ce qui est des résultats obtenus en présence du carton mince Cascades, la réduction de la population bactérienne n'est pas aussi importante comparativement au témoin (eau physiologique). Toutefois, une réduction à moins de 50% de la population initiale est observée après 24h (*S. aureus*) et après 48h (*C. minutissimum*), ce qui indique que la présence de carton ne permet pas à la population microbienne de se développer, ni de se maintenir. Cependant, même si la surface du carton de Cascades a été stérilisé aux UVs, la population intrinsèque du carton devra être considérée dans les expérimentations futures. Cette population du carton devrait être prise en compte dans le compte initial. Les résultats de la présence expérimentation ne reflète donc pas la réalité.



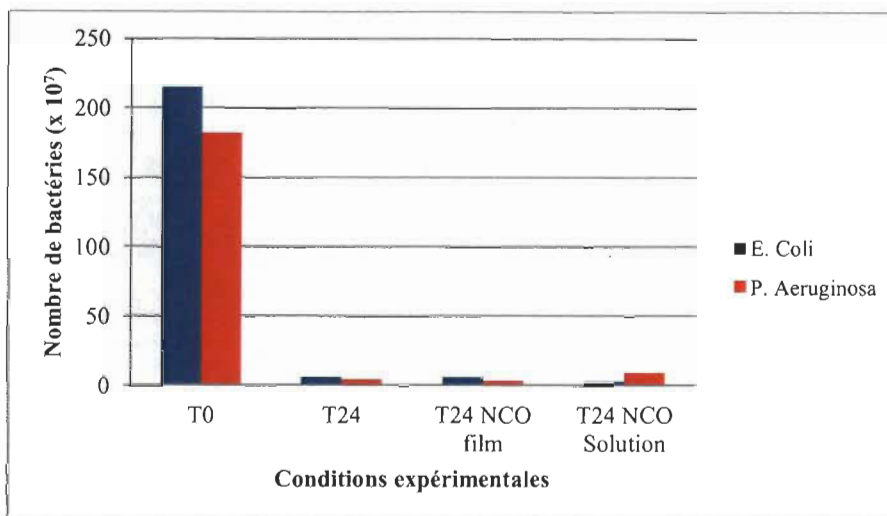


Figure 16. Dénombrement bactérien initial (T0) et après 24h (T24) selon différentes conditions (avec NCO solution, NCO film, sans NCO) Contrôle :  $2.0 \times 10^8$  bactéries avec solution nutritive)

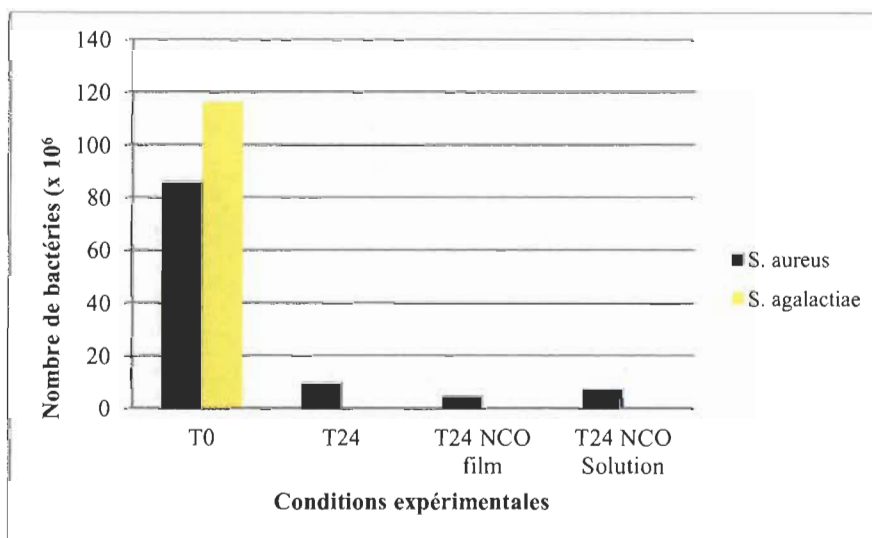


Figure 17. Dénombrement bactérien initial (T0) et après 24H (T24) selon différentes conditions (avec NCO film, NCO solution, sans NCO) Contrôle :  $1.8 \times 10^8$  bactéries avec solution nutritive)



Les deux supports, la NCO et le carton, semblent donc adéquats pour la conception de films antiicrobiens. De ce fait, cela indique que les souches bactériennes ne se servent pas de la matrice cellulosique pour croître, ce qui est idéal étant donné que la fonction antimicrobienne est visée. Le compte bactérien intrinsèque du carton fourni par Cascades sera disponible dans les échantillons futurs par le biais des microbiologistes de la compagnie.

#### **4.5 Utilisation de la nanocellulose comme source de nutriment pour les microorganismes par milieu de culture à la nanocellulose**

Les résultats précédents ont été confirmés en réalisant des milieux de culture contenant de la NCO. À la figure 18 ci-dessous, il est possible d’observer que les bactéries n’utilisent pas la NCO pour croître. En effet, à gauche de cette figure, il y a les photographies de la gélose nutritive mélangée avec un gramme de NCO. L’inoculum fut mis en évidence par des cercles rouges. Chez toutes les bactéries (sauf *C. minutissimum* qui ne croit pas sur ce type de gélose), il y a eu croissance. En comparaison aux photographies de droite, une gélose contenant que de l’agar et un gramme NCO, où l’inoculum n’est même pas décelable. Les marques visibles sur les géloses contenant la NCO sont des particules non-dissoutes plutôt que des colonies bactériennes. La NCO n’est pas très soluble dans l’agar et a eu de la difficulté à se disperser.

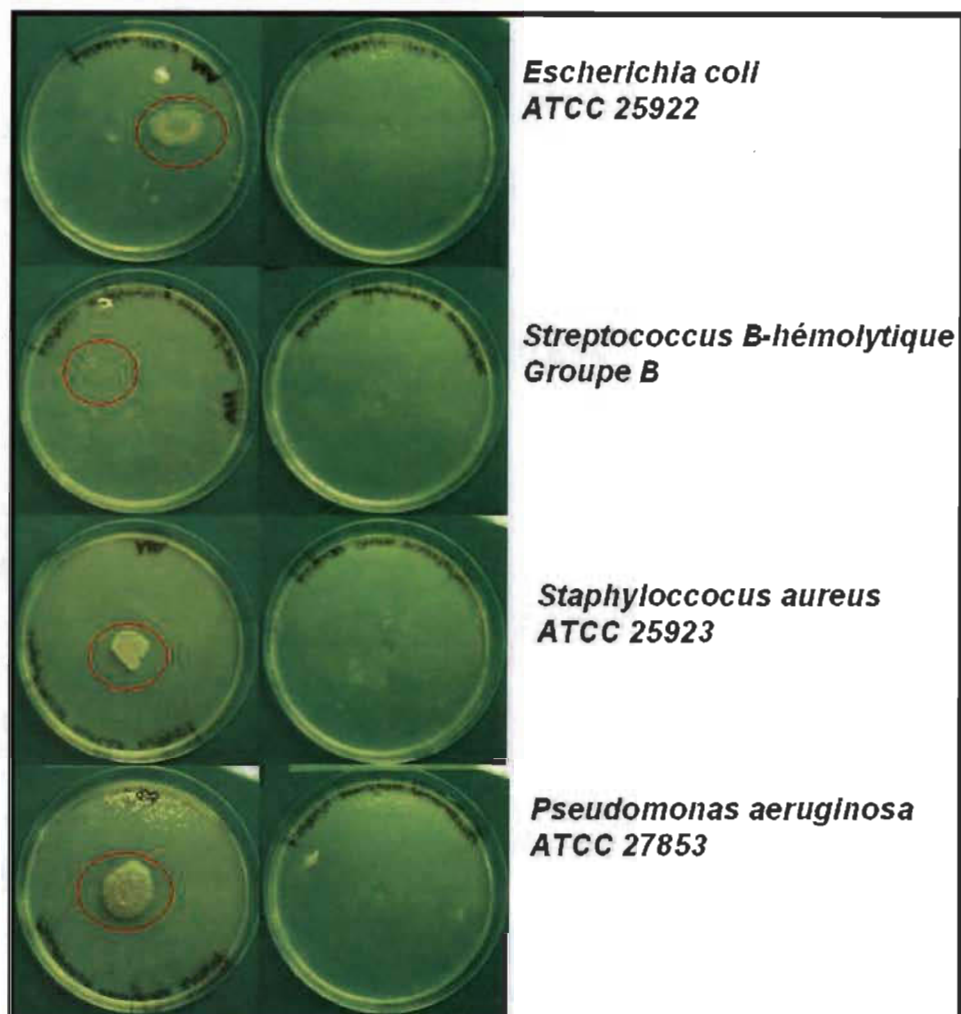


Figure 18. Photographie des milieux de culture avec des inocula bactériens (en rouge)

(Agar nutritive + 1 g de nanocellulose oxydée à gauche, Agar + 1 g de nanocellulose oxydée à droite)

En effet, il est possible de conclure qualitativement que chez les souches bactériennes choisies, la présence de NCO ne peut suffire à la croissance bactérienne.

#### 4.6 Couplage du peptide antimicrobien sur film de NCO et essais antimicrobiens

L'expérimentation fut réalisée préliminairement pour évaluer certaines conditions de base. Huit films furent réalisés et placés sous diverses conditions. Le tableau IV ci-dessous résume les différences entre les films ainsi que les résultats obtenus par rapport à l'essai antibactérien de la greffe. Il faut prendre note que dans chaque tube pour l'essai antimicrobien, il y avait une concentration bactérienne de  $1 \times 10^9$  UFC de *Staphylococcus aureus* et qu'il y a un film de nanocellulose. Il est sous-entendu également que les produits sont déposés sur le film nanocellulose + filtre de téflon pour le couplage et pour les lavages.

Tableau IV. Résultats obtenus pour les huit premiers films de NCO selon certaines conditions

Type	Conditions du film de nanocellulose	Remarques	Milieu pour l'essai antimicrobien	Dénombrement bactérien
Contrôle 1	EDAC + NHS Lavage: PBS, Éthanol et Eau	Vérifier si les produits de couplage ont un effet sur la concentration bactérienne	Eau physiologique	Croissance ++++
Contrôle 2	Lavage : PBS, Éthanol et Eau	Vérifier l'efficacité des lavages	Eau physiologique	Stérile
Contrôle 3	Lavage : PBS, Éthanol et Eau	Comparer la croissance avec l'eau physiologique comme milieu	Bouillon Mueller-Hinton	Croissance ++++
Contrôle 4	Lavage : PBS et Eau	Vérifier s'il y a des résidus d'éthanol	Eau physiologique	Stérile
Essai 1	Nisin + EDAC +NHS Lavage : PBS, Éthanol et Eau	Essai de couplage 1	Eau physiologique	Stérile
Essai 2	Nisin + EDAC +NHS Lavage : PBS, Éthanol et Eau	Comparer la croissance avec l'eau physiologique comme milieu	Bouillon Mueller-Hinton	Croissance ++++
Essai 3	Nisin + EDAC +NHS Lavage : PBS, Éthanol et Eau	Restériliser le film à l'UV pendant 3 minutes pour voir s'il y a des effets sur la nisine lorsque fixée (détérioration de la capacité du peptide antimicrobien) et essai de couplage 2	Eau physiologique	Stérile
Essai 4	Nisin + EDAC +NHS Lavage : PBS, Éthanol et Eau	Essai de couplage 3	Eau physiologique	Stérile

En regardant de plus près le tableau précédent, il est possible de remarquer que les contrôles deux et quatre sont stériles alors qu'ils ne devraient pas l'être. Il devrait y avoir croissance, puisqu'il n'y a pas de présence de nisine. Or, cela suggère l'inefficacité des lavages. Il faut alors procéder autrement puisqu'il y a une faille méthodologique importante. Le cas échéant, la méthode d'analyse sélectionnées (XPS, acide bicinchininique, luminoTox) ne permettant pas de distinguer la nisine des produits des résidus de lavage, une autre procédure devra être envisager.. L'on sait

également que les produits de couplage ont été testés chez la croissance de *Staphylococcus aureus*, et ils inhibent la croissance par leur cytotoxicité.

#### 4.7 Test de couplage entre la NCO aqueuse et nisine

Pour évaluer l'effet antimicrobien de la nisine couplée à la cellulose suite à l'expérimentation, il y a eu déposition du produit de couplage (NCO+nisine) à la surface d'un tapis bactérien (*C. minutissimum*) selon la méthode de dépôt direct décrite dans la section 2.2 du présent ouvrage. La greffe de nisine sur la nanocellulose oxydée est efficace puisqu'il y a la présence de cercle d'inhibition (figure 19). Cependant, il est difficile de quantifier cette greffe. En effet, la population microbienne par dilution en série n'était pas tuée en présence de la nisine avec la NCO comme elle se doit à la CMI. Cela met en doute l'efficacité de la greffe, puisqu'il y a une diminution d'efficacité de la nisine. Il a possiblement une perte de la fraction réactive de la nisine lors de la greffe ou une diminution de la population bactérienne liée à l'effet toxique des produits du couplage sur *C. minutissimum*, cette dernière étant plus fragile que *S. aureus*. Selon ces données, préliminaires, le contrôle étant non valide, il est impossible de conclure l'efficacité de la méthode de couplage.

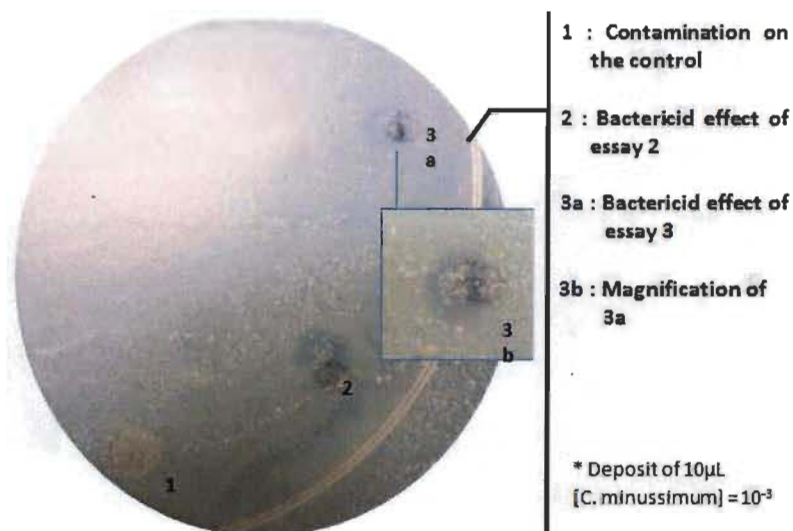


Figure 19. Dépôt direct du produit de couplage à la surface d'un lit bactérien de *C. minutissimum*

#### 4.7.1 Effet du couplage NCO + nisine au XPS

Le succès du couplage NCO + nisine a été évalué par XPS, technique expliquée dans le chapitre deux du présent document section cinq. Cette méthode permet la détection d'azote sur la NCO. En l'absence de nisine, le spectre ne devrait montrer que des atomes de carbone et d'oxygène. Cela explique la présence d'azote et démontre théoriquement la présence de la nisine ou d'un autre contaminant. La figure 21 ci-dessous démontre le spectre d'un témoin (NCO ayant subi le couplage sans présence de nisine) et d'un essai de couplage (avec nisine). Les spectres étaient les mêmes pour les autres essais de couplage, cet essai (numéro deux) a été choisi pour exemple.

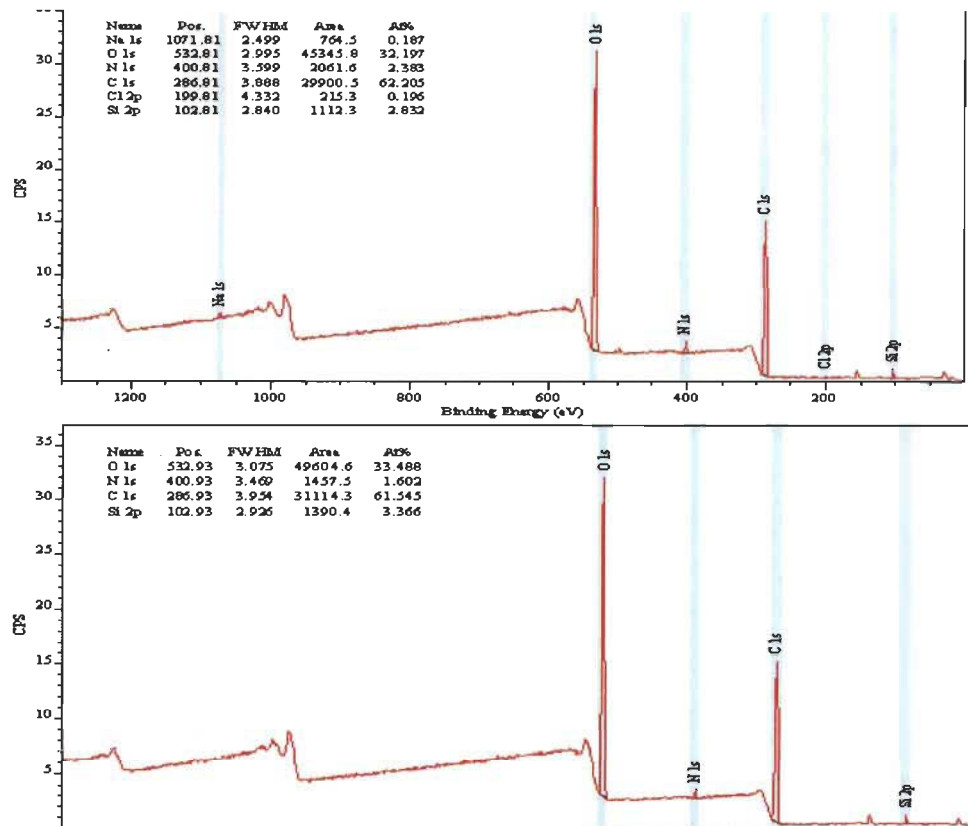


Figure 20. Spectre du témoin (en haut) et spectre de l'essai 2 (en bas)

Selon la figure 20 ci-dessus, cela indique que le témoin et l'essai numéro deux donnent des spectres très similaires. Cela démontre, la présence d'azote couplée dans les deux échantillons analysés au XPS. Une analyse quantitative du taux d'azote dans les échantillons a alors été exécutée. Comme démontre la figure 21, la quantité d'azote détecté dans tous les échantillons est très similaire. Cette donnée suggère que la contamination (présence d'azote), proviendrait plutôt des résidus des produits de couplage.



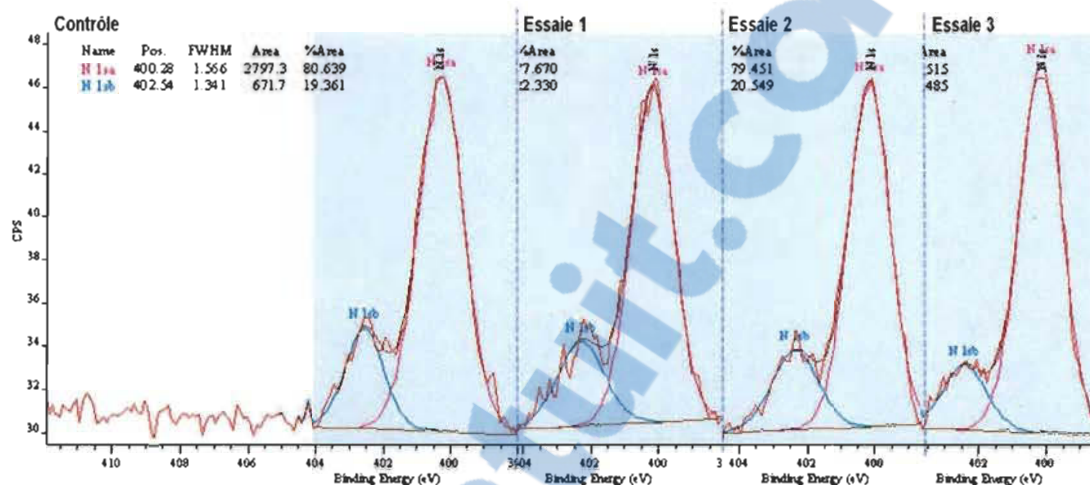


Figure 21. Grossissement du spectre vis-à-vis l'azote- comparaison des 4 échantillons

En effet, la source d'azote doit donc venir d'une substance commune qui a été mise dans les quatre échantillons. La présence de résidus de NHS ou d'EDAC qui n'aurait pas été suffisamment enlevés au lavage, pourrait être une source d'azote. Aussi, il est répertorié que la technique TEMPO servant à oxyder la nanocellulose, comprend des molécules d'azote, il est donc possible que ce soit la provenance de celle-ci, le spectre du témoin NCO seul aurait été fort pratique pour mieux analyser le résultat obtenu. Pour ce qui est de la nisine non liée, elle aurait été lavée en totalité durant le deuxième lavage et ne devrait pas contribuer aux résidus d'azote. Il est possible de conclure que la technique de couplage n'ait pas fonctionnée. Elle devrait être revue (Barrazouk, Daneault, 2012) et la faisabilité du couplage devrait être réévaluée par de nouvelles expériences qui n'entrent pas dans le cadre du présent projet de maîtrise. En effet, la méthode de Barrazouk utilisait des acides aminés, et même si la nisine est un petit peptide, il est possible que l'encombrement sphérique de la molécule et la

conformation native empêche l'amine d'être disponible. Afin de déterminer la source de contaminants la plus plausible, le contenu en protéines de la NCO, avant couplage a été déterminé.

#### 4.8 Analyse des protéines solubles dans la NCO par la méthode à l'acide bicinchoninique

Le contenu en protéines des échantillons de NCO, avant le couplage avec la nisine, a été déterminé afin d'évaluer la possibilité qu'il s'agisse de la source de contamination en azote décelée précédemment (section 3.7.1). Le tableau V ci-dessous, présente les résultats pour la courbe standard avec le sérum d'albumine bovine (BSA) et le tableau VI à la page suivante, la moyenne des concentrations protéiques des échantillons. Cette technique n'est cependant pas spécifique à la détection de nisine. Les échantillons de NCO proviennent de la dilution de la solution mère à 0,26% qui a servi pour la fabrication de films.

Tableau V. Courbe standard avec le BSA

Absorbance (nm)	Concentration de protéine (µg/ml)
0	0,0012
200	0,1069
400	0,2034
600	0,3003
800	0,3787
1000	0,4957

Tableau VI. Moyenne des concentrations protéiques des échantillons de NCO à différentes concentrations

Nanocellulose (%)	Absorbance	Concentration (µg/ml)	Moyenne	Écart-type
0,000026	0,0022	4,4	7,4	2,6
	0,0044	8,9		
	0,0044	9,0		
0,00026	0,0037	7,6	8,4	7,4
	0,0007	1,5		
	0,0080	16,2		
0,0026	0,0029	6,0	4,5	1,6
	0,0014	2,9		
	0,0022	4,6		
0,026	0,0068	13,8	15,0	1,2
	0,0075	15,2		
	0,0079	16,1		
0,26	0,0889	180,9	176,8	23,5
	0,0959	198,0		
	0,0745	151,5		

Les résultats indiquent que la concentration de protéines augmente avec la concentration de NCO (voir tableau VI ci-dessus). En valeur absolue, il y a une augmentation de protéines avec l'augmentation de la concentration de NCO. Ces protéines détectés à 0,26% proviennent de résidus de micro-organismes détruits lors de la stérilisation de la NCO ou de traces de produits laissés après l'oxydation par la méthode TEMPO puisque le test détecte aussi bien les protéines dénaturées que dans leur état de conformation native. Cette méthode n'est donc pas assez spécifique pour la détection de nisine strictement. Cependant, cela vient confirmer la présence de protéines contenue dans la NCO notée à la section 3.7.1. Les pics d'azote observés seraient donc expliqué par la contamination initiale de l'échantillon de NCO et non

par la présence de nisine à la surface des fibres. À des concentrations inférieures à 0,10 µg/ml, il est impossible de détecter la quantité de protéines étant en dehors des capacités du test par rapport à la concentration. Pour les concentrations 0,026 à 0,000026% en NCO, les valeurs en concentration protéique sont indétectables et non significatives.

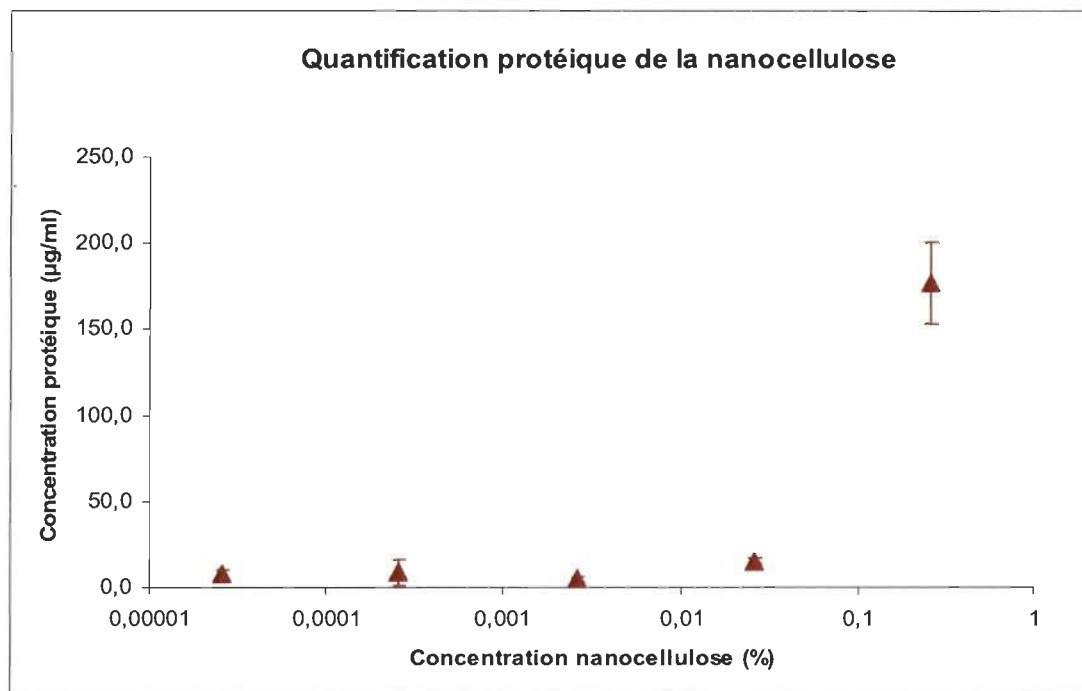


Figure 22. Moyenne des concentrations protéiques des échantillons

#### 4.9 Luminotox

Le luminotox peut servir à quantifier le pourcentage d'efficacité de la nisine sur une population bactérienne et ce, dans le temps. Cependant, avant d'utiliser le LuminoTox pour des études sur la nisine jumelée à la cellulose, il est essentiel d'identifier le SAPS le plus sensible à la protéine et de vérifier l'influence de la

nanocellulose sur les lectures. Le résultat escompté est que la nanocellulose n'a aucun effet sur le SAPS.

#### 4.9.1 Évaluation du SAPS pour le LuminoTox

Afin d'assurer une sensibilité suffisante de la méthode, le SAPS étant le plus inhibé en présence de nisine doit être sélectionnés. Le SAPS adéquat a donc un pourcentage d'inhibition et sera plus élevé. Un pourcentage d'inhibition négatif indique une fluorescence. Les valeurs de  $F_0$  et  $F_m$  après 6 minutes et 1 heure d'incubation sont utilisés pour calculer le pourcentage d'inhibition. Le pourcentage d'inhibition des trois SAPS (*Chlorella vulgaris* et *Chlamydomonas* et *Anabaena flos aquae*) sont en Annexe D. Les résultats sont présentés dans les figures 23 et 24 représentant l'inhibition après six minutes et après 60 minutes pour les trois spécimens sélectionnés.

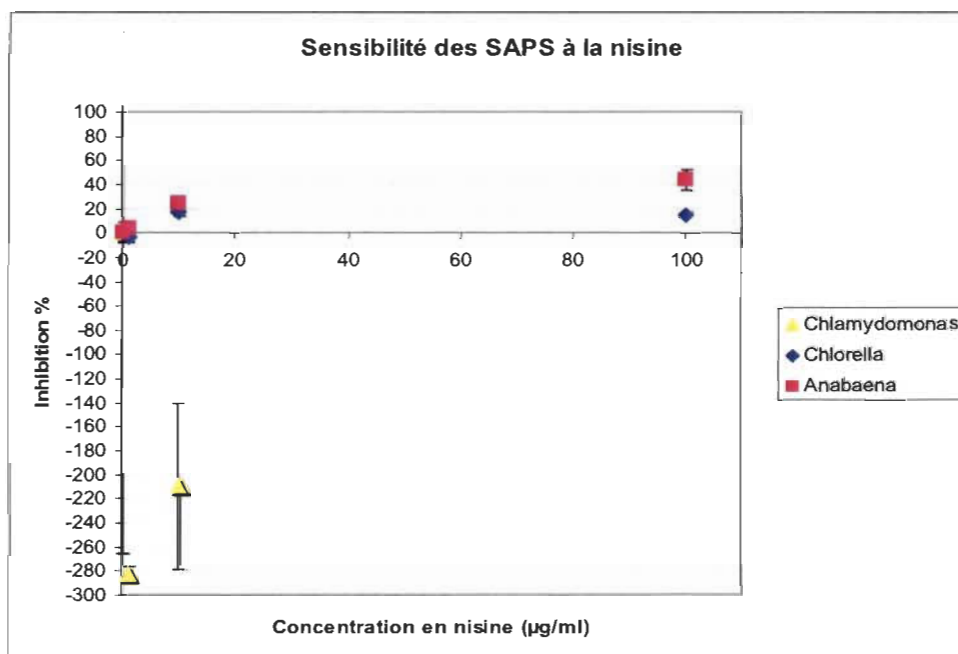


Figure 23. Inhibition des SAPS après 6 minutes d'incubation

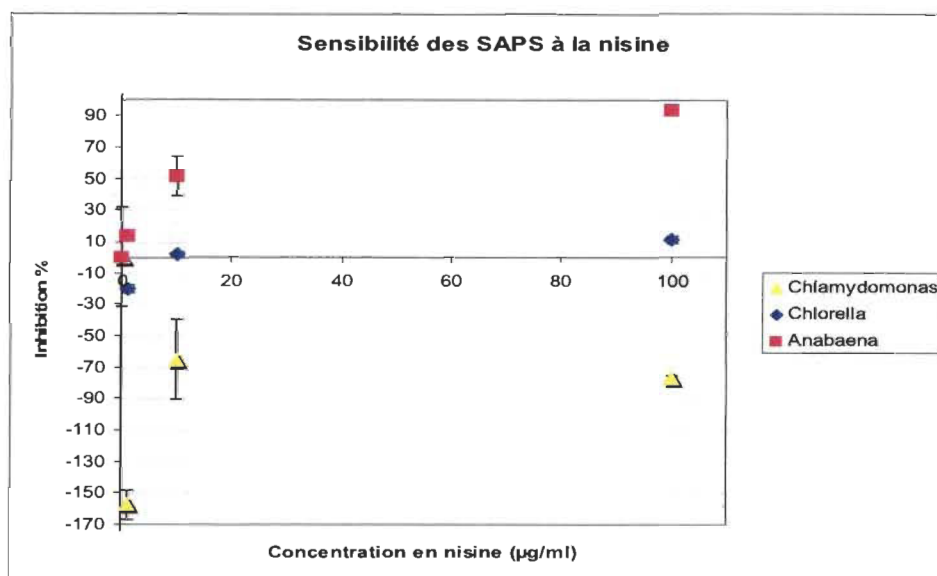


Figure 24. Inhibition des SAPS après 1 heure d'incubation.

Les résultats indiquent *Chlamydomonas* n'est pas très sensible à la nisine même si sa paroi est semblable au Gram<sup>+</sup>. Au contraire, elle semble plutôt profiter du milieu pour proliférer, car elle émet de la fluorescence (% inhibition négatif) comparativement au témoin. Par contre, les organismes *Anabaena flos aquae* et *Chlorella vulgaris* sont deux candidats idéaux pour les tests avec la nisine, car il est possible de voir un pourcentage d'inhibition positif. Cependant *Anabaena flos aquae* est sensible et l'effet inhibiteur est observé à des concentrations plus faibles évalués à 1 µg/ml. Par conséquent, *Anabaena flos aquae* qui sera le SAPS employé lors des analyses. Il sera employé pour tous les tests d'évaluation du relargage de la nisine greffée à la nanocellulose si cette dernière n'est pas influencée par la présence de NCO.

#### 4.9.2 Ajustement des cellules du SAPS et échantillon de NCO

La solution stérile de nanocellulose pour cette expérience est celle utilisée pour la fabrication des films. Le pH de la nanocellulose est de 5.85. L'expérimentation a permis d'ajuster le SAPS d'*Anabaena flos aquae* et la dilution appropriée est de 250 µl de la solution mère de Lab\_bell, dans deux millilitres d'eau. Cela permet d'avoir une valeur d'absorbance de 0,108 à 605 nm.

#### 4.9.3 Mesure de l'efficacité photochimique avec *Anabaena flos aquae*

Les lectures avec le LuminoTox sont faites après 1h, 6h et 24h d'incubation d'*Anabaena* dans le surnageant à analyser. Les valeurs  $F_0$  et  $F_m$  sont en Annexe E. Les résultats sur l'inhibition du SAPS avec la nanocellulose sont présentés dans les figures 25, 26 et 27 suivantes.

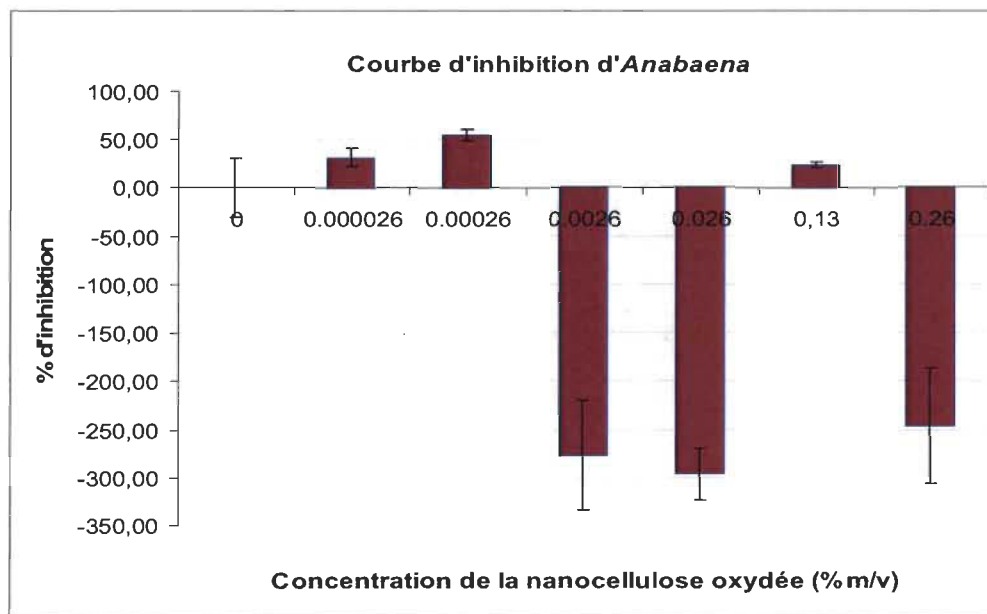


Figure 25. Inhibition d'*Anabaena* après 1 heure d'incubation.

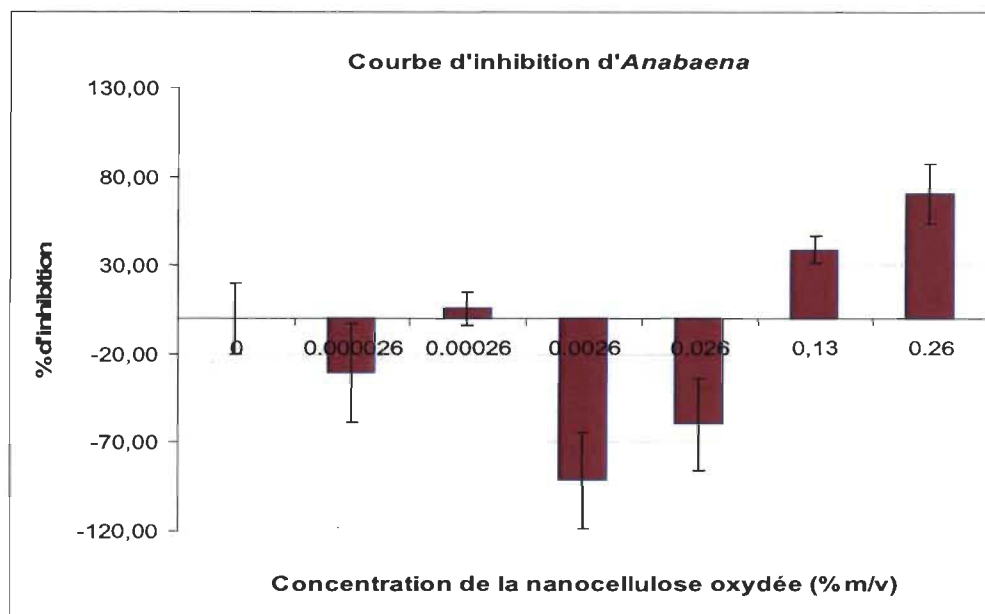


Figure 26. Inhibition d'*Anabaena* après 6 heures d'incubation.

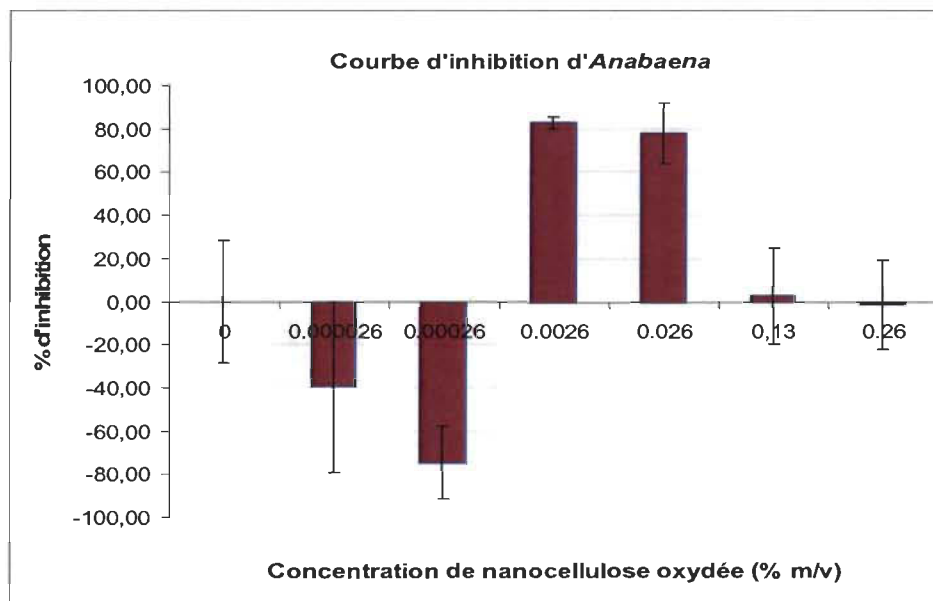


Figure 27. Inhibition d'*Anabaena* après 24 heures d'incubation

Les résultats n'indiquent aucune tendance précise sur l'impact de la NCO sur la croissance d'*Anabaena*. En effet, chaque concentration en NCO agit sur l'inhibition



ou la prolifération d'*Anabaena* de façon différente et variable en fonction du temps d'exposition. En présence de faible concentration de NCO, une certaine inhibition d'*Anabaena* est observée dans la première heure, puis le milieu devient propice à sa prolifération. Une hypothèse pour expliquer ces résultats est que l'eau déminéralisée stérile n'est pas un milieu favorable pour *Anabaena*, alors que la NCO, à certaines concentrations, favoriserait l'équilibre osmotique chez la cellule, et que les molécules de NCO en suspension aident le SAPS à ne pas précipiter. Cette hypothèse est supportée par l'aspect visuel de la turbidité de la NCO en présence d'*Anabaena* dans les éprouvettes (figure 28). Sur cette figure, *Anabaena* précipite au fond de l'éprouvette puisqu'il n'y a pas suffisamment de nanocellulose pour agir comme un support. Dans le tube #2 et #3, la turbidité est plus forte puisqu'*Anabaena* est suspendue dans la nanocellulose. De plus, les produits utilisés pour la méthode TEMPO (oxydation de la nanocellulose) contiennent des molécules toxiques tout comme les phénols, sulfites, herbicides, hydrocarbures, hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), solvants organiques et métaux lourds) qui pourraient potentiellement agir sur les photosystèmes si elle est présente en trop forte concentration (Environnement Canada, 2005) (Biluota, 2011).



Figure 28. Mesure qualitative de la turbidité d'*Anabaena* dans de la NCO\*

\*Aspect de la NCO à 0.026% (tube #1), à 0.13% (tube #2) et à 0.26% (tube #3).

Le résultat espéré était que la NCO ne vienne ni interférer avec l'inhibition, ni avec la prolifération du SAPS. Cependant la NCO a vraisemblablement un effet. La lecture avec le LuminoTox devient plus complexe puisque l'inhibition varie selon la concentration et le temps d'exposition. Dans ce cas, les résultats des tests de relargage ne seront pas représentatifs de l'inhibition par la nisine seule et le paramètre de la nanocellulose devra être considéré. Il devient alors difficile de quantifier la nisine dans les tests de relargage. Le luminotox ne s'avère donc pas un appareil de choix pour détecter le relargage de la nisine avec la NCO.

#### 4.10 Effet du carton mince de Cascade jumelé avec la nisine

Puisque le complexe NCO avec nisine comportait certaines difficultés quant à la quantification, l'effet d'une concentration de nisine adsorbé sur le carton de Cascades a été expérimenté tel que décrit dans le tableau VII ci-dessous.

Tableau VII. Effet de la nisine adsorbée sur le carton mince de *Cascade* sur *S. aureus*

Concentration de nisine (ug/mL)		
Contrôle (CFU)	CMI (CFU)	1/2 CMI (CFU)
$7,6 \times 10^8$	no growth	$2,3 \times 10^8$

Il est possible de constater que la simple déposition de la solution de nisine à la CMI de nisine sur une population, il y a effet létal sur les bactéries. Une observation intéressante est qu'il n'est pas nécessaire d'utiliser de la NCO pour conceptualiser un papier antimicrobien à partir de cellulose et de peptides antimicrobiens. De plus, le papier *Cascades* est intéressant dans le fait qu'il ne semble pas emprisonner la solution de peptides antimicrobiens à l'intérieur. La nisine reste libre et fonctionnelle pour effectuer sa fonction.

#### 4.11 Évaluation de l'impact de la température sur la nisine avec le carton de Cascades

Afin d'évaluer l'impact de différentes températures sur l'efficacité de la nisine, des tests avec et sans le carton de Cascades ont été effectués en faisant subir différentes températures à la solution de peptides antimicrobiens. De plus, cela permet de vérifier l'applicabilité à différentes températures du carton avec la nisine. La population bactérienne pour *S. aureus* était de  $4,5 \times 10^7$  CFU et de  $4,3 \times 10^9$  CFU + facteur dilution de 100 chez *C. minutissimum*.

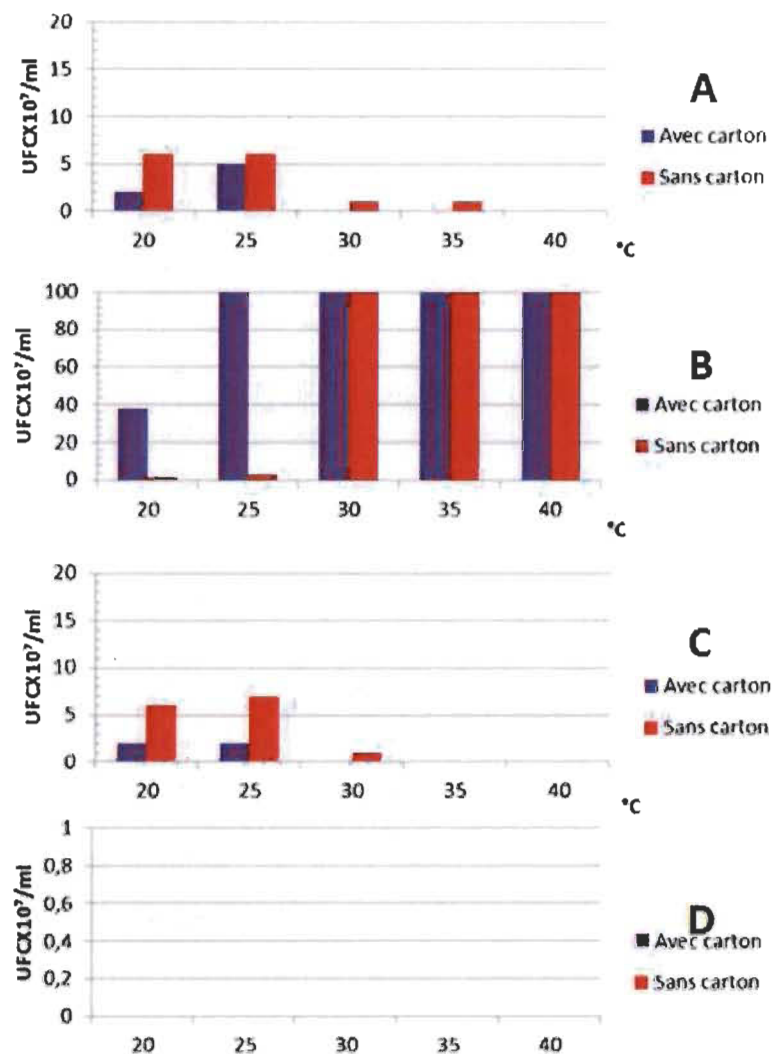


Figure 29. Effet de la température entre 20 et 40°C A. Essai contrôle (sans nisine) avec et sans carton pour *S. Aureus* B. Essai contrôle (sans nisine) avec et sans carton pour *C. minutissimum* C. Essai avec nisine à une concentration de 32 µg/ml avec et sans carton sur *S. Aureus* D. Essai avec nisine à une concentration de 250 µg/ml avec et sans carton pour *C. minutissimum*

Tout d'abord, des contrôles négatifs ont été faits pour s'assurer de la croissance microbiennes des deux souches bactériennes. Ceux-ci ne sont pas présents dans la figure ci-dessus, mais il était adéquat (croissance positive) pour interpréter les résultats obtenus. Au niveau des essais contrôles (figure 29A et 29B), la présence de carton

semble avoir un effet d'inhibition sur la croissance de *S. Aureus*. La bactérie devrait proliférer dans les températures avoisinant 35°C. En effet, l'effet contraire est démontré, car il n'y avait plus de croissance bactérienne à partir de 30°C. Pour *C. minutissimum*, la présence du carton ne dérange en rien la croissance bactérienne pour toute les températures, car cette dernière croît au maximum entre 25 et 40°C (figure 29 D). Cependant, sans carton, aux température de 20 et 25°C, il y a une baisse dans le dénombrement bactérien.

Lorsqu'il y a présence de nisine avec le carton (figure 29 C), il semble y avoir une diminution de la population microbienne chez *S. aureus*, cependant cela ne peut être significatif, car le contrôle pour les température 30, 35 et 40 °C n'est pas valable. Pour pouvoir en tirer des conclusions, il aurait fallu observer une croissance dans le contrôle (figure 29 A) et aucune croissance à la figure 32 C. Chez *C. minutissimum*, rien ne croit en présence de nisine avec ou sans carton (Figure 29 D). Il est donc impossible de conclure sur l'influence de l'utilisation du carton chez cette souche. La nisine ayant fait son travail dans les deux cas.

Ces résultats démontrent qu'aucune des températures testées n'améliore ou défavorise l'effet bactéricide de la nisine sur *S. aureus* et *C. minutissimum*. Par contre, la température influence directement la croissance bactérienne. En effet, *S. aureus* semble croître aux températures se situant entre 20 et 35°C. Pour *C. minutissimum*, sa température optimale se situe entre 30 et 40°C, alors qu'elle croit moins à 20 et 25°C. Les résultats des tests sur carton démontrent que le carton n'a pas le même effet sur la croissance chez *S. aureus*. En effet, la présence de carton dans un bouillon bactérien

de *S. aureus* semble nuire à sa croissance. Plusieurs tests futurs dans le cadre d'un autre projet devront être refaits pour être capable d'expliquer l'effet du carton sur la croissances des souches. Il serait intéressant de recommencer l'expérimentation avec une population bactérienne inférieure pour permettre le dénombrement de *C. minutissimum*.

#### **4.12 Évaluation de l'impact du pH sur la nisine avec le carton de Cascades**

Les expérimentations ont été réalisées pour évaluer l'influence du pH sur le pouvoir antimicrobien de la nisine. L'étendue de pH se rapproche du pH de la peau afin d'éviter des blessures cutanées et de vérifier l'applicabilité à différents pH de la nisine avec le carton. Le contrôle négatif de *S. aureus* est valable (croissance positive). Les résultats sont obtenus strictement avec cette bactérie puisque la solution acide servant à ajuster le pH provoque la mort de *C. minutissimum* sur les essais contrôles. Donc, il est certain qu'il est impossible d'obtenir des résultats valables dans ce contexte. Le dénombrement aurait été faussé. La figure 30 ci-dessous représente le résultats pour la variation de pH de la solution de nisine pour *S. aureus* avec la présente de carton et sans celui-ci.

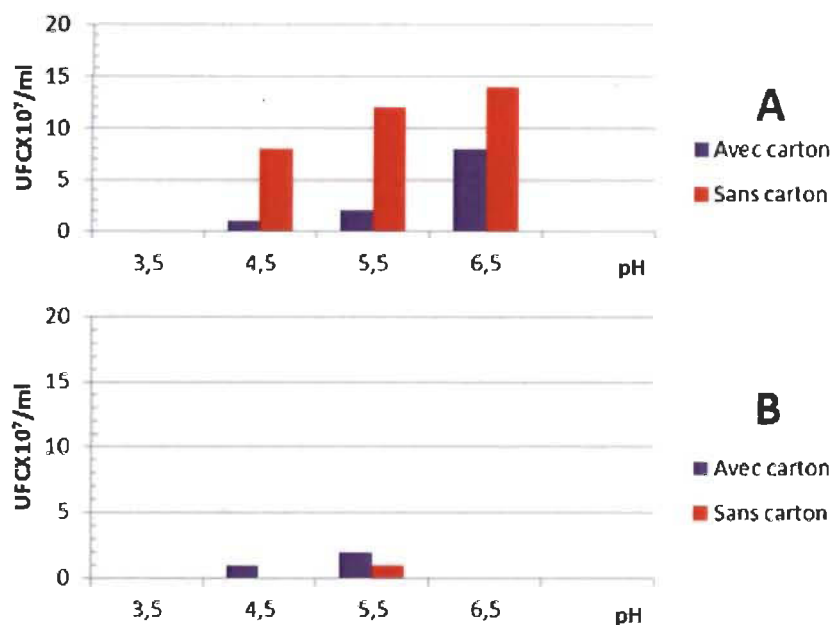


Figure 30. Effet du pH entre 3,5 et 6,5 A. Essai contrôle (sans nisine) avec et sans carton sur *S. Aureus* B.Essai avec nisine avec et sans carton sur *S. Aureus*

Ces résultats démontrent dans un premier temps que peu importe le pH, *S.aureus* prolifère particulièrement quand le carton est absent aux pH 4,5 , 5,5 et 6,5. La présence de carton au niveau du témoin semble réduire la population bactérienne. Cela semble marqué à bas pH (4,5 et 5,5), soit les pH semblables aux pH du carton au départ. Pour ce qui est des essais avec la nisine, la population bactérienne est pratiquement disparue sans carton. Cependant, au pH 4,5 et 5,5, elle demeure pratiquement la même pour le témoin avec le carton. Cela suggère que l'effet observé soit non significatif. Il existe des déficiences majeures au niveau de la méthodologie de cette expérimentation, car il est impossible de conclure si les variations de pH favorise l'effet de la nisine avec et sans carton. L'expérimentation n'a pu être effectué

chez *C. minutissimum*, car la variation de pH tue la souche bactérienne. Le contrôle n'étant pas valide également, il fut impossible de vérifier l'effet du carton chez la souche. Pour vérifier l'effet du pH, il faudrait avoir à la base des échantillons de carton avec ces pH, donc il n'y aurait pas de variations à ce niveau suite à la déposition de nisine à sa surface. Cette expérimentation n'est donc pas concluante.



## CONCLUSION

Ce projet de maîtrise avait pour but d'étudier deux types de support cellulosique et d'en évaluer les possibilités antimicrobiennes chez des souches bactériennes pouvant engendrer des problèmes au niveau des pieds comme *S. aureus* et *C. minutissimum*. Le peptide antimicrobien sélectionné fut la nisine, efficace principalement contre les bactéries GRAM+ et homologuée par Santé Canada.

Dans un premier temps, il est possible de conclure que bien que la NCO soit un produit très intéressant, il s'avère que de la jumeler à un peptide antimicrobien fut un échec. Le XPS a bel et bien détecté de l'azote, mais cela semble plus être le fruit des résidus de la méthode de couplage ou d'autres contaminants. La méthode de couplage nécessite de l'amélioration et une meilleure compréhension de la façon dont la nisine se jumèle et tenir compte de l'encombrement stérique de la nisine qui pourrait nuire à cette greffe. De ce fait, cela a permis d'orienter davantage les travaux vers la cellulose contenue dans le carton mince de Cascades. Bien moins coûteuse et plus accessible que la NCO, son couplage avec la nisine a été démontré contre *S. Aureus* et *C. minutissimum* à des CMI respectives de 32 µg/ml et 250 µg/ml. L'utilisation de ce peptide antimicrobien dans la fabrication de papiers bioactifs contre ces pathogènes est donc à privilégier.

Dans un deuxième temps, il a été démontré qu'il est possible de détecter la nisine avec le LuminoTox, en utilisant *Anabaena* comme SAPS. Cependant, il y avait des

réactions de l'organisme avec la NCO, et cette technique ne devrait être utilisée que pour détecter la présence de nisine dans le surnageant par exemple. Cela pourrait être utile pour des expérimentation ultérieures, dans le cadre d'un projet avec Cascades. La méthodologie devra être optimisée et l'expérimentation refaite pour observer les effets du pH et de la température sur l'efficacité de la nisine chez les souches sélectionnées. Il pourrait être intéressant de baséifier intrinsèquement le carton de Cascade pour éviter des variations de pH.

Somme toute, l'utilisation de carton mince de Cascades avec la nisine semble très prometteur. Cette matrice cellulosique devra être évaluée et une sauce d'encollage à base de nisine préparée pour pouvoir quantifier et permettre un relargage de la molécule bioactive de la surface de la cellulose. La poursuite des travaux mise sur trois modes principaux d'immobilisation de la nisine sur le carton soit l'adsorption sur des agents liants, l'immobilisation mécanique par un gel et l'adsorption sur un film plastique. Cela fera appel aux équipements conventionnels de l'industrie papetière. L'efficacité antimicrobienne de cette immobilisation sera évalué par des techniques d'étalement sur gélose ainsi que par analyse du surnageant suite à une frottement mécanique. Le Luminotox ainsi que le XPS seront des outils utiles.

Étant donné l'efficacité de la nisine pour *S.aureus* et cette dernière étant l'agent numéro 1 des infections des ulcères du pied diabétique, il sera très intéressant de miser vers un produit pour le pied diabétique dans la poursuite des travaux. En effet, actuellement, 2,3 millions de Canadiens sont atteints de diabète et environ 345 000 développeront un ulcère diabétique au niveau des pieds. La prise en charge du pied

diabétique coûte extrêmement cher au système de santé, et malgré tous les moyens de soins de plaies et de décharge de pression, cela peut mener le patient à l'amputation (Canadian Association of Wound Care, 2013). Plus de la moitié des amputations faites au Canada est attribuable au diabète (7 de 10 amputations non traumatiques du membre inférieur sont causées par le diabète). En août dernier, l'Institut canadien d'information sur la santé (ICIS, 2013) a publié sur le sujet et ont mis en évidence l'urgence de la situation. Dans ce contexte, il y a un besoin criant de réduire les complications du diabète au niveau des pieds. Pour se faire, il est impératif de développer des moyens des plus innovateurs pour éviter l'infection et la surinfection qui favorisent le développement de complications. Les produits à base de cellulose visant le contrôle de l'infection par des pathogènes des pieds cadre bien avec cette problématique. Cela semble très prometteur et les résultats avec le carton Cascade avec la nisine en démontrent la faisabilité. Les propriétés antibactériennes d'un tel «papier» pourraient être à la base de plusieurs produits dans le secteur podiatrique tels des pansements, des semelles et des revêtements pour orthèses. En ciblant plus spécifiquement la prévention et la guérison des plaies et des ulcères du pied diabétique, les patients diabétiques et le réseau de santé public bénéficieront grandement de ces nouveaux produits.

## RÉFÉRENCES

- Adamson JW (1982) Physical Chemistry of surfaces, Interscience
- Andrès E et Dimarcq JL (2006) Cationic antimicrobial peptides: from innate immunity study to drug development, *Journal Internal Medecine* 255, 519–520
- Andrews J (2001) Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48 (1), 5-16.
- Barazzouk S et Daneault C (2012) Amino Acid and Peptide Immobilization on Oxidized Nanocellulose: Spectroscopic Characterization, *Nanomaterials*, 2(2), 187-205
- Baron S (1996) Medical Microbiology. 4ième édition, *The university of Texas Medical branch at Galveston*. (En ligne)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7627/>
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC et Turck M (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45,493-496
- Bauer R et Dicks LM (2005) Mode of action of lipid II-targeting antibiotics. *International journal of Food Microbiology*, 101, 201-216
- Belamy W, Takase M Wakabayashi H, Kawase K et Tomita M (1992) Antimicrobial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derided from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *The journal of applied bacteriology*, 73(6),472-9
- Belgacem MN, Czeremuskin G, Sapiha S et Gandini A (1995) Surface characterization of cellulose fibres by XPS and inverse gas chromatography. *Cellulose*, 2 (3), 145-157
- Biliuta L, Fras V, Harabagiu S et Coseri S (2011) Mild oxydation of cellulose fibers using dioxygen as ultimate oxiditing agent. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 6 (1), 291- 297
- Boateng JH, Matthews KH, Stevens HNE, GILLIAN M et Eccleston GM (2007) Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. *Wiley InterScience*
- Brogden KA (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology* 3, 238-250

Bold H et. Wynne MJ (1978) Reproduction to the algae. Structure and reproduction. Prentice hall biological science series, Page 38-39;6-65; 133

Brotz H, Bierbaum G, Leopold K, Reynolds PE, et Sahl HG (1998) The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan biosynthesis by targeting lipid II. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 42, 154–160

Butcher M et White R (2013) Reviewing the evidence for advanced dressings. *Nursing Standard*, 27, 45, 51-62

Canadian Association of Wound Care (2013) (En ligne) <http://cawc.net/>

Campbell N et Reece JB (2004) Biologie. 2ième edition, *ERP*, page 190 à 206, p580

Choong ET, Choong FO et F Tesoro (1989) Relationship of capillary pressure and water saturation in wood. *Wood Science and Technology*, 23(2), 139-150

Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW et Carmeli Y (2003) Comparison of Mortality Associated with Methicillin-Resistant and Methicillin Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia: A Meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*, 36, 53–9

CSST (2007) Service de répertoire toxicologique : Cellulose microcristalline (En ligne) [http://www.reptox.csst.qc.ca/Produit.asp?no\\_produit=9068](http://www.reptox.csst.qc.ca/Produit.asp?no_produit=9068)

Czaja W ZAJA, Krystynowicz A, Bielecki S et Malcolm Brown RJr (2006) Microbial cellulose : the natural power to heal wounds. *Biomaterials*, 27(2), 145–151

Davies EA, Bevis HE, Potter J, Harris J, William GC et Broughton JD (1998) Research note : The effect of pH on the stability of nisin solution during autoclaving. *Letters in Applied Microbiology*, 27, 186–187

Domtar (2013) CelluForce (En ligne) <http://www.celluforce.com/fr/index.php>

Drider D et Rebuffat S (2012) Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications, *Springer, New York*

Dortu, Carine et Philippe Thonart (2009) *Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires*, Biotechnol. Agron. Soc. Environ. Infectious Disease, 17(2), 91-6.

Edwards R, Harding KG (2004) Bacteria and wound healing. *Current Opinion on* (1), 143-154

Environnement Canada (2005) Environnement et évolutions technologiques : le luminotox (En ligne) <http://publications.gc.ca/collections/Collection/En153-113-56-2005F.pdf>

FPI innovations (2013) (En ligne) [www.fpinnovations.ca](http://www.fpinnovations.ca)

Garett RH, Grisham M et Lubochinsky B (2000) Biochimie, 2e édition, *DeBoeck Université*

GRAHAM LE et WilcoxLW (2000) *Algae*. Prentice hall, page 445; 470-473

Gardner DJ, Oporto GS, Mills R et Sami MASA (2008) Adhesion and Surface Issues in Cellulose and Nanocellulose. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 22, 545-567

Ge Y, Macdonald D, Henry M, Hait HI, Nelson KA, Lipsky BA, Zasloff MA et Holroyd KJ (1999) In Vitro Susceptibility to Pexiganan of Bacteria Isolated from Infected Diabetic Foot Ulcers. *Diagnostic microbiology and Infectious Disease*, 35,45-53

Giacometti A, Cirioni O, Barchiesi F, Fortuna M et Scalise G (1999) In-vitro activity of cationic peptides alone and in combination with clinically used antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 44 (5), 641-645.

Gornall AG, Bardawill CJ et David MM (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 177, 751-66.

Guiya W, Sweis S, Galland E, Peyrol P, Degraeve I et Sebti I (2010) Innovative multilayer antimicrobial films made with Nisaplin or nisin and cellulosic ethers: Physico-chemical characterization, bioactivity and nisin desorption kinetics. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 352-360

Hancock WR et Chapple DS (1999) Minireview : peptide antibiotics. Antimicrobial agents and chemotherapy. *American society for microbiology*, 06, 1317- 1323

Haute Autorité en Santé (HAS) (2011) Les différentes classes de pansements : utilisation et indications recommandés (En ligne) [http://www.hassante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/200901/pansements\\_synt\\_hese\\_rapport.pdf](http://www.hassante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/200901/pansements_synt_hese_rapport.pdf)

Hladky SB et Haydon DA (1972) Ion transfer across lipid membranes in the presence of gramicidin A : Studies of the unit conductance channel. *University of Cambridge, Physiological Laboratory*

Host A, Hu SS, Gjesing B, Larsen JN et Lowenstein H (1992) Prospective stimulation of IgG, IgG subclass and IgE antibodies to dietary proteins in infants

with cow milk allergy. Levels of antibodies to whole milk protein, BLG and ovalbumin in relation to repeated milk challenge and clinical course of cow milk allergy. *Allergy*, 47, 218-229

Hwang PM, Zhou N, Shan X, Arrosmith CH et Vogel HJ (1998) Three dimensional solution structure of lactoferricin B, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin. *Biochemistry* 37, 4288-4298

Institution canadienne de l'informations sur la santé (ICIS) (2013). Les plaies difficiles au Canada. *Santé Canada, édition du mois d'août*, 27 p

Jakubke HD et Sewald N (2008) Peptides from A to Z : A concise Encyclopedia. *Edition Wiley-VCH*. 413 p.

Jaetez E, Melnick LJ et Aldelberg EA (1973) Microbiologie médicale. Presses Université Laval, 629p

Jouan P (2002) Lactoprotéine et lactopeptides. *Institut national de recherche agronomique*, 128p.

Karam L, Charafedine J, Dhulster P et Chihib NE (2013) Study of surface interactions between peptides, materials and bacteria for setting up antimicrobial surfaces and active food packaging. *Journal of Material and Environmental Science*, 4(5), 798-821

Kerihuel JC (2010) Effect of activated charcoal dressings on healing outcomes of chronic wounds. *Journal of Wound Care*, 19(5), 208, 210-2, 214-5.

Kindt T, Glodsby T Osborne B et Kuby J (2006) Immunologie. Macmillan Higher Education

Kovacs T, Naish V, O'Connor B, Blaise C, Gagné F, Hall L, Trudau V et Martel P (2011) An ecotoxicological characterization of nanocrystalline cellulose *Applied Microbiology and Biotechnologies*. 91(5):1277-86

Lapointe PR (1989) Précis de chimie de la cellulose. *Cégep de Trois-Rivières*, Trois-Rivières, 179 p.

Leshner JL (2000) An atlas of microbiology of the skin. *The Parthenon publishing group*. P. 15-39.

Lévesque M (2009) La nanotechnologie au secours des papiers bioactifs. Partie I : Utilisation potentielle de la nanocellulose oxydée avec le système TEMPO, Revue de littérature inédite, *Université du Québec à Trois-Rivières*

- Lévesque M (2009) La nanotechnologie au secours des papiers bioactifs. Partie II : Moyens de biodétection et biocapteurs, Revue de littérature inédite, *Université du Québec à Trois Rivières*
- Liu W et Hansen JN (1990) Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Applied Environmental Microbiology*, 56(8), 2551–2558.
- Lo SF, Hayter M, Chang CJ (2008) A systematic review of silver-releasing dressings in the management of infected chronic wounds. *Journal of Clinical Nursing*, 17, 1973-85
- Lowy FD (1998) *Staphylococcus aureus* Infections. *New England Journal of medicine*, 339, 520-532
- Medlineplus (2013) Neomycin, Polymyxin, and Bacitracin Topical (En ligne) <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/meds/a601098.html>
- Milette M, Le tien C, Smoragiewicz W et Lacroix M (2006) Inhibition of *Staphylococcus aureus* on beef by nisin-containing modified alginate films and beads. *Food Control*, 18, 878–884
- Moon RJ, Frihart CR et Wegner T (2006) Nanotechnology applications in the forest products industry. *Forest products journal*, 56, 4-10
- Moura LI, Dias AM, Carvalho et de Sousa HC (2013) Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment, a review. *Acta Biomateria*, 9(7), 7093-114
- Miyalmolto T, Takahashi ST, Ito H, Inagaki H et Noishiki Y (1989) Biocompatibility of cellulose and its derivatives. *Journal biomedical material Research*, 23(1), 125-33.
- Nguyen VT, Gidley MJ et Dykes GA (2008) Potential of a nisin-containing bacterial cellulose film to inhibit *Listeria monocytogenes* on processed meats. *Food Microbiology*, 25(3), 471-8
- Nizet V (2006) Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Current Issues in Molecular Biology*, 8(1), 11-26.
- Occupational Safety and health administration des États-Unis (2009) Health Effects and Workplace Assessments and Controls (En ligne) [http://www.osha.gov/dsg/nanotechnology/nanotech\\_healtheffects.html](http://www.osha.gov/dsg/nanotechnology/nanotech_healtheffects.html)
- Organisation mondiale de la santé (OMS) (1968) Normes d'identités et de pureté et évaluations toxicologiques des additifs alimentaires : divers antibiotiques. 12 ième rapport de OMS par des experts en additifs alimentaires



Organisation mondial de la santé (OMS) (2013) Résistances aux antimicrobien (En ligne) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/fr/>

Parada JL, Caron CR, Medeiros ABP et Soccol CR (2007) Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazil archives of biology and technology*, 50(3)

Paul, W et Charma CP (2004) Chitosan and alginate wound dressings : a short review. *Biomaterials and Artificial Organs*, 18(1), 18-23

Peck Y, Takaaki O, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, Gallo RL et Leung DYM (2002) Peptides antimicrobiens endogènes et infection cutanée dans la dermatite atopique. *New England Journal of Medicine*, 347, 1151-1160

Pelton, R (2009) Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics, *Analytical Chemistry* 28(8), 925-942

Peterson N et Gatenholm P (2011) Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(5), 1277-1286

Pol IE et Smid ED (1999) Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogene*. *Letters in applied microbiology*, 29, 166-170

Prescott, Harley, Klein, Wiley, Sherwood, Woolverton (2010). Microbiologie, 3e édition. *Groupe De Boeck*

Queen D (2009) Technology update: Understanding hydrocolloids. *Wounds International* 2009, 1(1)

Qin Y (2005) Silver-containing alginate fibres and dressings. *International Wound Journal*, 2, 172-176

Qvintus-Leino P (2008) The Finnish Centre for Nanocellulosic Technologies. Application possibilities for nanocellulose. VTT Technical Research Centre of Finland (En ligne) [www.vtt.fi/kuvat/uutta/Nanoselluloosakeskus\\_Qvintus\\_LeinoVTT.pdf](http://www.vtt.fi/kuvat/uutta/Nanoselluloosakeskus_Qvintus_LeinoVTT.pdf)

Rainaud JC, Buts JP, Corthier G et Flourié B (2004) Flore microbienne intestinale : physiologie et pathologie digestive. Edition John Libbey, 264 p

Rebaï M, Drolet F, Vidal D, Vadeiko I, Bertrand F et Boltzmann AL (2011) Approach for Predicting the Capture Efficiency of Random Fibrous Media. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 6(1), 29-37

Rebouillat S et Pla F (2013) State of the Art Manufacturing and Engineering of Nanocellulose: A Review of Available Data and Industrial Applications. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 4, 165-188

Réseau Sentinel (2013) Bioactive paper (En ligne) <http://www.bioactivepaper.ca/>  
 Roumani M (2004) Modification chimique de surface de cristaux de cellulose : oxydation TEMPO et couplage avec des amines, Thèse inédite, *Université Joseph Fourier - Grenoble I*

Riegel P (1998) Les Corynebactéries, aspects bactériologiques et cliniques. *Annales de biologie clinique* 56(3), 285-296

Riley MA et Wertz JE (2002) BACTERIOCINS: Evolution, Ecology, and Application. *Annual Review of Microbiology*, 56, 117-37

Rizvi M, Sherwani MK, Afzal K et Hasan SA (2011) Coryneforms the Opportunistic Pathogens : An Emerging Challenge for Immunocompetent Individuals. *American-Eurasian Journal of Scientific Research* 6 (3), 165-171

Santé Canada (2013) Nisine (en ligne)  
<http://webprod.hc-sc.gc.ca/nhpdbdipsn/ingredReq.do?id=874&lang=eng> 2013

Saito T, Kimura S, Nishiyama Y et Isogali A (2007) Cellulose nanofibres prepared by TEMPO-mediated oxidation of native cellulose. *Biomacromolecules*, 8(8), 2485-2491

Sang Y et Blecha F (2008) Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. *Animal Health Research Review*, 9(2), 227-35

Schaller M, Laude J, Brodewaldt H, Hamm G et Korking HC (2004) Toxicity and antimicrobial activity of a hydrocolloid dressing containing silver particles in an ex vivo model of cutaneous infection. *Skin Pharmacology and Physiology*, 17(1), 31-6

Schreml S, Szeimies RM, Karrer S, Heinlin J, Landthaler M et Babilas P (2010) The impact of the pH value on skin integrity and cutaneous wound healing. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 24(4), 373-8

Seeley J, Jensen JL et Hutcherson J (1999) A randomized clinical study comparing a hydrocellular dressing to a hydrocolloid dressing in the management of pressure ulcers. *Ostomy Wound Management*, 45(6), 39-44, 46-7

Sigma-Aldrich (2013) Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination for 200-1000 µg/ml protein (En ligne)  
[http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=fr&N4=BCA1|SIGMA&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO|BRAND\\_KEY&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=fr&N4=BCA1|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC)

Singhal GS, Renger G, Sopory SK et Irrgang KD (2013) The photosynthetic process : Concepts in Photobiology: Photosynthesis and Photomorphogenesis (En ligne) <http://www.life.illinois.edu/govindjee/paper/gov.html>

Tasseau O (2005) Magainines : pionniers pour de nouveaux agents anti-infectieux. *École Nationale Supérieure de Chimie de Rennes*

The Royal Society et Royal Academy of Engineering (2004) Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties (En ligne) [www.raeng.org.uk](http://www.raeng.org.uk)

Transperancy market research (TMR) (2011) Wound Dressings Market - Global Industry Size, Market Share, Trends, Analysis, and Forecast 2012 – 2018

Watts JF, et Wolstenholme J (2003) An Introduction to Surface Analysis by XPS and AES. pp. 224. *Wiley-VCH, Watts et Wolstenholme*

Wood L, Wood J, Davis P et Wilkins J (2010) Clinical experience with an antimicrobial hydrogel dressing on recalcitrant wounds. *Wound Care*, 19(7), 287-8, 290-3.

Wysocki AB (2002) Evaluating and managing open skin wounds: colonization versus infection. *American Association of Critical-Care Nurses*, 13(3), 382-97

Yeaman MR et Yount NY (2003) Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological reviews* 55 (1), 27–55

Zoppe JO (2011) Surface Modification of Nanocellulose Substrates. Thèse inédite, *University of North Carolina*

## ANNEXE A

### Fabrication de la solution de nanocellulose pour la fabrication de films

1. Peser exactement environ 2,5 g sec de nanocellulose oxydée dont la concentration aura été estimée (par la moyenne de trois mesures de concentration). La concentration réelle dans le sac sera recalculée après dilution finale de la nanocellulose préparée, ce qui facilitera la reproductibilité.
2. Diluer la nanocellulose oxydée à 500 mL dans le récipient du mélangeur domestique.
3. Mélanger à la position maximale ou « glace-broyée » pendant 20 minutes. Surveiller si la formation de gel à lieu (la quantité de départ a été réduite de 5 g à 2,5 g afin de réduire cet inconvénient).
4. Effectuer la dilution finale dans environ 500 mL d'eau dans une fiole volumétrique de 2 L.
5. Répéter depuis le début pour doubler la quantité de nanocellulose oxydée préparée.
6. Finaliser la solution en combinant la deuxième préparation à la première et diluer à 2 L.

Note : Pour une concentration de pâte dans le sac d'environ 20 %, une solution finale d'environ 0,2 % sera obtenue.

## ANNEXE B

### Sélection de microorganismes

Lorsque le choix des microorganismes est fait pour l'expérimentation, il faut choisir les types de souches utilisées à partir des différentes souches mères disponibles (Banque du laboratoire de microbiologie de l'UQTR) et en vérifier quelques propriétés de bases pour s'assurer de la viabilité du microorganisme.

Les souches mères sont des microorganismes qui sont conservés à -80 °C dans un milieu glycérine dans des petits eppendorfs. Dans le cadre de cette expérimentation, deux types de *Pseudomonas aeruginosa* furent testés soit l'ATCC 27853 et le 10145, le *Staphylococcus aureus* de type 25923, le *Streptococcus*  $\beta$ -hémolytique du groupe B du type *agalactiae* et *Escherichia coli* de l'ATCC 35218 et 25922.

Voici la façon de faire pour obtenir les bactéries :

1. Identification des milieux de culture judicieusement.
2. Faire dégeler les souches mères environ deux minutes à la température de la pièce.
3. À l'aide d'un coton-tige stérile, prélever la solution (tremper le bout dans le tube et enlever l'excédent) et étaler une strie au bord de la boîte en gardant une zone de stérilité.
4. Étendre par la méthode en stries avec un écouvillon stérile à la surface de la gélose (technique par épuisement).
5. Incuber 24 heures à 37 °C à l'étuve.
6. Après 24 heures, sélectionner une colonie isolée pour chaque souche et refaire les étapes 4 et 5.

*Pseudomonas aeruginosa :*

La souche 27853 est plus grosse, plus baveuse que la souche 10145. La pigmentation verte est présente dans les deux cas, mais accentuer et plus évidente chez l'ATTC 27853. Les deux souches présentent l'odeur caractéristique de cette bactérie. La souche 27853 semble être un meilleur candidat par rapport à sa croissance sur milieu TSA. Ce sera donc la souche choisie pour l'expérimentation.

*Streptococcus  $\beta$ -hémolytique du groupe B du type agalactiae :*

La souche a une croissance qui laisse à désirer sur milieu TSA. 48 heures à l'étuve sont nécessaires pour bien déceler les colonies. Le problème est vite résolu s'il y a utilisation du milieu BH pour faire croître cette bactérie. En prendre note pour toutes les expérimentations avec ce microorganisme. La particularité de cette bactérie est d'être  $\beta$ -hémolytique, donc il est de mise de vérifier son hémolyse sur gélose sang. Sur ce milieu, la croissance est commode et la  $\beta$ -hémolyse est apparente par la présence d'un halo blanchâtre (Jawetz, Melnick et Adelberg, 1973). Cela signifie que la souche peut être utilisée.

*Staphylococcus aureus :*

La souche a une bonne croissance sur milieu TSA. De plus, elle présente de couleur jaune sur le milieu mannitol-sel, ce qui est typique de ce microorganisme. La souche peut être utilisée pour les expérimentations.

*Escherichia coli :*

Au niveau de la croissance sur TSA, la souche 25922 est plus performante que la souche 35218 au niveau de la grosseur des colonies. Les souches ont été testées au niveau du milieu McConkey pour voir leur utilisation du lactose. Ce microorganisme est lactose + donc, il a la particularité de prendre la coloration rose rouge sur ce milieu. En effet, les deux souches présentent cet aspect de colonies. La souche 25922 fut celle sélectionnée par rapport à sa rigueur de croissance.

## ANNEXE C

Milieux de cultures utilisées

### Gélose Tryptic-Soy-Agar (TSA)

Ce milieu a été le plus utilisé pendant les expérimentations (dénombrement) et il a servi pour le repiquage et l'ensemencement. Les bactéries choisies y poussent très bien (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. Coli*), mais pour le *S. agalactiae*, il est nécessaire de laisser la gélose plus longtemps à l'étuve, soit 24 heures supplémentaires. Ce type de milieu ne permet pas la différenciation des colonies par des propriétés métaboliques quelconques. Voici la composition du milieu dans un litre d'eau.

- 15 g de tryptone (caséine digérée)
- 5 g de Soytone (soja digéré)
- 5 g de Chlorure de sodium (NaCl)
- 15 g d'agar-agar

Voici comme ce milieu est préparé. Prendre note que cette façon de faire compte pour les autres milieux de cultures.

1. Peser 40 grammes de poudre déjà préparée (EMB Chemicals Inc) à l'aide d'une nacelle et la mélanger avec un litre d'eau dans une grande tasse à mesurer allant au micro-ondes.
2. Chauffer pendant neuf minutes au micro-ondes en agitant de temps à autres à l'apparition de l'ébullition.
3. Verser dans un ballon de deux litres, mettre un bouchon de ouate couvert d'un papier d'aluminium
4. Autoclaver
5. Laisser refroidir quelques minutes le ballon avant de couler (environ un centimètre de liquide d'épaisseur) dans des boîtes de pétri stériles.
6. Laisser solidifier les géloses (environ 30 minutes) et inverser les boîtes.

7. Incuber les boîtes, inversées, pour 24 heures à l'étuve à 37°C pour vérifier la stérilité.
8. Remiser à 4°C jusqu'à l'utilisation des milieux (conservation d'environ un mois).

### **Bouillon nutritif tryptones-soja (TSB)**

Afin d'obtenir une croissance bactérienne liquide pour réaliser les expérimentations, il faut utiliser le TSB. C'est un bouillon de base composé de tryptones et de soja qui est nutritif et qui permet la bonne croissance des bactéries. Le bouillon contient (pour un litre d'eau) :

- 17 g de tryptone (caséine digérée)
- 3 g de Soytone (soja digéré)
- 2,5 g de glucose
- 5 g de Chlorure de sodium (NaCl)
- 2,5 g de Phosphate dipotassique

Sa composition ressemble en fait à la gélose TSA décrite ci-dessus.

#### **La préparation de ce bouillon**

1. Peser 30 grammes du produit commercial (EMB Chemicals Inc)
2. Mélanger avec un litre d'eau dans un ballon de deux litres.
3. Brasser la solution jusqu'à ce que la poudre soit dissoute complètement et que la solution soit homogène.
4. Distribuer en tube de verre (ayant des bouchons pouvant être autoclavés) selon une quantité quelconque désirée.
5. Autoclaver
6. Placer à l'étuve à 37°C pendant 24 heures afin de vérifier la stérilité.
7. Remiser à 4°C jusqu'à l'utilisation du bouillon



### Agar nutritive (NA)

Ce milieu est simple et fut principalement utilisé lors de la conception de la gélose à la nanocellulose comme témoin. Il permet la croissance des microorganismes non fastidieux principalement. Sa composition est la suivante (poudre préparée de Difco laboratories) :

- 3 g d'extraits de bœuf
- 5 g de peptones
- 15 g d'agar

et il faut simplement suspendre 23 g dans un litre d'eau et réaliser la méthode de préparation de milieu de culture décrite ci-dessus.

### Gélose sang

Ce milieu a permis de vérifier l'hémolyse de la souche de *S. agalactiae* et pour la croissance de *Corynebacterium minutissimum*. La composition de ce milieu enrichi est approximatif, car elle contient du sang. Voici approximativement le contenu de 40 g de poudre préparée de Difco laboratories par litre d'eau :

- 2 g d'infusion de muscles cardiaques
- 13 g caséine pancréatique digérée
- 5 g d'extrait de levures
- 5 g de chlorure de sodium (NaCl)
- 15 g d'agar

De plus, avant de couler les milieux, il faut ajouter à la solution 5% de sang stérile défibriné.

### Milieu McConkey

Ce milieu a servi principalement à confirmer la bonne activité métabolique quant à l'utilisation du lactose chez *E.Coli* lorsqu'il fallait déterminer quelle souches utilisées pour les expérimentations. En effet, ce milieu est tout d'abord sélectif pour les GRAM – car sa composition en sels biliaires inhibe les bactéries GRAM +. De

plus, il est différentiel pour l'utilisation du lactose en changeant la couleur des colonies. S'il y a utilisation du lactose (lactose +) les colonies deviennent rose-rouge alors que s'il ne l'utilise pas (lactose -) les colonies demeurent incolores sur la gélose.

Il faut prendre note que lorsqu'il y a fabrication de ce milieu de culture, il faut prendre des précautions supplémentaires parce que le milieu contient des sels biliaires nocifs pour la santé. Bien vouloir se protéger à l'inhalation en portant un masque. La composition de ce milieu selon la poudre préparée de Difco laboratories pour 50 g dans un litre d'eau est de :

- 17 g de peptones
- 3 g de peptones proteosico
- 10 g de lactose
- 1,5 g de sels biliaires #3
- 5 g de chlorure de sodium NaCl)
- 13,5 g d'agar
- 0,03 g de rouge neutre
- 0,001 de crystal violet

### **Milieu Brain-Heart (BH)**

Étant donné que la bactérie *S. agalactiae* croît moins bien que les trois autres en milieu TSA puisque cette bactérie est plus fastidieuse que les autres, il a fallu trouver le moyen de contrer le fait qu'elle avait un délai de croissance supérieur que les autres. Ce petit pépin était plutôt dérangerant puisqu'il retardait les expérimentations. Donc, la solution fut d'utiliser le milieu BH pour toute croissance de *S. agalactiae*. Ce milieu contenant plus d'éléments plus d'élément nutritif que le TSA a permis de favoriser sa croissance. Voici le contenu du milieu BH pour 52 g dans un litre d'eau selon la poudre préparée de Difco laboratories :

- 7,7 g d'infusion de cerveau de veau
- 9,8 g d'infusion de cœur de bœuf
- 10 g de peptones
- 5 g de chlorure de sodium (NaCl)
- 2,5 g de Phosphate dipotassique

- 15 g d'agar

### **Milieu Mueller-Hinton (MH)**

Selon la littérature, le milieu Mueller-Hinton est le milieu par excellence pour faire des antibiogrammes pour tester la sensibilité des souches aux antibiotiques. Cela s'explique par le fait que le milieu comprend une très faible quantité de thymine et de thymidine qui sont des substances connues pour inhiber l'activité antibactérienne de certains antibiotiques (Biokar diagnostics, 2009) Or, il n'y a rien qui indique dans la littérature que les propriétés antibactériennes des peptides antimicrobiens pourraient être inhibées par ce type de substance. Il est donc de mise d'effectuer des antibiogrammes sur le milieu Mueller-Hinton pour en prendre la précaution dans le cas échéant. La composition du milieu est la suivante selon la poudre préparée de Difco laboratories et ce, pour 38 g dans un litre d'eau.

- 2,0 g d'extrait de bœuf
- 17,5 g de caséine acide digérée
- 1,5 g d'amidon
- 17,0 g d'agar

Prendre note que la composition pour le bouillon Mueller-Hinton est la même, mais ce dernier ne contient pas d'agar. Le bouillon a été utilisé lors de l'expérience de la CMI et CMB en tube par la technique de dilution en série.

## ANNEXE D

Choix du SAPS

*Chliorella vulgaris*

6 minutes d'incubation

Concentration nisine ( $\mu\text{g/ml}$ )	F <sub>I</sub> (u.a.)	F <sub>m</sub> (u.a.)	Rendement quantique	% Activité	% Inhibition
contrôle	224 192	897 334	0,753	100,85	-0,85
	226 278	913 308	0,768	102,93	-2,93
	229 374	871 603	0,718	96,22	3,78
1	235 560	935 210	0,783	104,82	-4,82
	233 027	916 917	0,765	102,46	-2,46
	231 542	918 973	0,769	102,99	-2,99
10	204 672	752 433	0,613	82,07	17,93
	204 868	779 763	0,643	86,13	13,87
	204 962	735 878	0,594	79,54	20,46
100	210 828	767 701	0,623	83,43	16,57
	213 959	792 761	0,647	86,72	13,28
	225 855	789 480	0,630	84,44	15,56

1 heure d'incubation

Concentration nisine ( $\mu\text{g/ml}$ )	F <sub>I</sub> (u.a.)	F <sub>m</sub> (u.a.)	Rendement quantique	% Activité	% Inhibition
contrôle	53 594	275 897	0,509	63,62	36,38
	102 988	515 615	0,944	118,09	-18,09
	105 966	519 252	0,946	118,28	-18,28
1	105 520	530 161	0,972	121,53	-21,53
	106 904	517 080	0,939	117,39	-17,39
	101 025	523 212	0,966	120,83	-20,83
10	82 975	418 396	0,768	96,00	4,00
	86 186	426 867	0,780	97,50	2,50
	89 335	434 618	0,790	98,82	1,18
100	89 365	388 495	0,685	85,61	14,39
	93 161	407 961	0,720	90,10	9,90
	94 676	404 657	0,709	88,72	11,28

*Chlamydomonas*

6 minutes d'incubation

Concentration nisine ( $\mu\text{g/ml}$ )	F1 (u.a.)	F <sub>m</sub> (u.a.)	Rendement quantique	% Activité	% Inhibition
contrôle			0,000	0,00	100,00
	1 822 311	1 508 720	-0,214	-100,89	200,89
	171 682	1 417 792	0,852	400,89	-300,89
1	192 455	1 359 115	0,797	375,33	-275,33
	178 473	1 370 920	0,815	383,62	-283,62
	195 348	1 399 496	0,823	387,39	-287,39
10	165 738	1 126 198	0,656	308,99	-208,99
	384 997	1 559 473	0,803	377,84	-277,84
	97 230	844 146	0,510	240,29	-140,29
100	214 852	1 925 530	1,169	550,34	-450,34
	212 544	1 882 990	1,142	537,40	-437,40
	223 076	1 930 372	1,167	549,25	-449,25

1 heure d'incubation

Concentration nisine ( $\mu\text{g/ml}$ )	F1 (u.a.)	F <sub>m</sub> (u.a.)	Rendement quantique	% Activité	% Inhibition
contrôle			0,000	0,00	100,00
	67 768		-0,074	-24,15	124,15
		909 648	1,000	324,15	-224,15
1	103 520	800 231	0,766	248,27	-148,27
	101 480	849 145	0,822	266,43	-166,43
	103 394	825 269	0,794	257,24	-157,24
10	61 885	453 316	0,430	139,48	-39,48
	86 443	620 717	0,587	190,39	-90,39
	81 652	546 589	0,511	165,68	-65,68
100	76 888	5 670 678	6,149	1993,32	-1893,32
	77 123	576 974	0,549	178,12	-78,12
	80 275	579 462	0,549	177,88	-77,88

*Anabaena flos aquae*

6 minutes d'incubation

Concentration nisine ( $\mu\text{g/ml}$ )	F <sub>I</sub> (u.a.)	F <sub>m</sub> (u.a.)	Rendement quantique	% Activité	% Inhibition
contrôle	76 520	1 541 454	0,951	99,79	0,21
	67 130	1 413 882	0,874	91,73	8,27
	73 329	1 665 912	1,034	108,48	-8,48
1	71 974	1 453 251	0,897	94,09	5,91
	101 363	1 527 601	0,926	97,15	2,85
	77 131	1 517 881	0,935	98,14	1,86
10	98 019	1 138 087	0,675	70,84	29,16
	89 983	1 174 499	0,704	73,87	26,13
	85 771	1 290 950	0,782	82,09	17,91
100	72 765	826 530	0,489	51,34	48,66
	75 390	849 048	0,502	52,70	47,30
	77 942	1 052 858	0,633	66,41	33,59

1 heure d'incubation

Concentration nisine ( $\mu\text{g/ml}$ )	F <sub>I</sub> (u.a.)	F <sub>m</sub> (u.a.)	Rendement quantique	% Activité	% Inhibition
contrôle	68 456	1 727 269	0,999	104,22	-4,22
	68 510	1 646 616	0,950	99,15	0,85
	69 409	1 607 598	0,926	96,64	3,36
1	73 645	1 499 462	0,859	89,58	10,42
	69 041	1 385 877	0,793	82,73	17,27
	74 425	1 418 666	0,810	84,45	15,55
10	119 568	662 984	0,327	34,14	65,86
	113 312	973 456	0,518	54,04	45,96
	114 142	1 028 214	0,550	57,43	42,57
100	181 890	277 536	0,058	6,01	93,99
	172 688	271 472	0,059	6,21	93,79
	197 944	312 786	0,069	7,22	92,78

## ANNEXE E

Essai LuminoTox et nanocellulose

1 heure d'incubation avec *Anabaena*

Nanocellulose	F <sub>I</sub> (u.a.)	F <sub>m</sub> (u.a.)	Rendement quantique	% Activité	% Inhibition
contrôle	52 647	144 017	0,497	67,30	32,70
	46 048	220 106	0,947	128,20	-28,20
	45 473	187 363	0,772	104,51	-4,51
0.000026	49 989	149 307	0,540	73,15	26,85
	47 518	147 467	0,544	73,61	26,39
	48 269	126 182	0,424	57,38	42,62
0.00026	39 471	96 142	0,308	41,74	58,26
	39 688	98 124	0,318	43,04	56,96
	46 246	116 757	0,384	51,93	48,07
0.0026	53 036	476 822	2,305	312,13	-212,13
	52 339	621 047	3,094	418,87	-318,87
	49 883	592 709	2,953	399,81	-299,81
0.026	54 116	616 297	3,058	414,06	-314,06
	54 819	550 914	2,699	365,39	-265,39
	49 989	607 195	3,031	410,40	-310,40
0.26	47 416	458 131	2,234	302,50	-202,50
	59 616	623 073	3,065	415,00	-315,00
	59 945	496 377	2,374	321,44	-221,44
0,13	55 946	504 756	0,670	73,17	26,83
	65 720	546 344	0,717	78,36	21,64
	57 435	533 766	0,711	77,66	22,34

6 heures d'incubation avec *Anabaena*

Nanocellulose	F <sub>I</sub> (u.a.)	F <sub>m</sub> (u.a.)	Rendement quantique	% Activité	% Inhibition
contrôle	52 317	455 538	0,870	97,87	2,13
	50 287	549 000	1,076	121,05	-21,05
	51 427	385 487	0,721	81,08	18,92
0.000026	57 034	494 803	0,945	106,26	-6,26
	49 590	711 839	1,429	160,74	-60,74
	48 929	565 247	1,114	125,32	-25,32
0.00026	45 721	422 155	0,812	91,37	8,63
	52 535	484 532	0,932	104,85	-4,85
	51 794	412 074	0,778	87,45	12,55
0.0026	54 024	864 949	1,750	196,83	-96,83
	54 535	942 180	1,916	215,45	-115,45
	51 794	718 943	1,440	161,93	-61,93
0.026	54 264	630 595	1,244	139,89	-39,89
	54 116	669 503	1,328	149,37	-49,37
	59 937	839 604	1,683	189,24	-89,24
0.26	59 211	264 417	0,443	49,81	50,19
	68 848	151 060	0,177	19,95	80,05
	66 328	148 437	0,177	19,93	80,07
0,13	53 399	488 451	0,638	69,11	30,89
	54 084	439 956	0,566	61,30	38,70
	55 104	393 700	0,496	53,79	46,21



24 heures d'incubation avec *Anabaena*

Nanocellulose	F <sub>I</sub> (u.a.)	F <sub>m</sub> (u.a.)	Rendement quantique	% Activité	% Inhibition
contrôle	51 879	288 511	0,713	84,03	15,97
	47 577	281 171	0,704	82,95	17,05
	51 618	426 173	1,128	133,01	-33,01
0.000026	44 254	322 845	0,839	98,93	1,07
	48 462	549 294	1,509	177,86	-77,86
	49 145	449 476	1,206	142,17	-42,17
0.00026	47 762	489 762	1,332	156,96	-56,96
	50 544	588 152	1,620	190,92	-90,92
	56 246	552 242	1,494	176,14	-76,14
0.0026	96 579	153 806	0,172	20,32	79,68
	91 796	136 557	0,135	15,90	84,10
	100 494	144 501	0,133	15,63	84,37
0.026	107 172	155 757	0,146	17,25	82,75
	107 759	137 742	0,090	10,65	89,35
	100 494	207 242	0,322	37,91	62,09
0.26	53 890	406 261	1,062	125,13	-25,13
	65 426	329 516	0,796	93,78	6,22
	65 916	307 377	0,727	85,75	14,25
0,13	54 534	404 766	0,857	97,73	2,27
	50 281	478 430	1,047	119,47	-19,47
	50 550	319 928	0,659	75,17	24,83