

Université du Québec  
INRS Institut Armand-Frappier

**UTILISATION DE DnaK COMME BIOMARQUEUR DE L'EFFICACITÉ DES  
TRAITEMENTS THERMIQUES, ET DE L'ADAPTATION AUX STRESS CHEZ  
*ESCHERICHIA COLI***

Par  
Karine Seyer

Mémoire présenté  
pour l'obtention  
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)  
en Microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Président du Jury et examinateur interne	M. François Shareck, INRS Institut Armand-Frappier
Examineur externe	M. Daniel Grenier, Centre de Recherche et Développement sur les Aliments
Directeur de recherche	Mme Monique Lacroix, INRS Institut Armand-Frappier
Codirecteur de recherche	Mme Linda Saucier, Centre de Recherche et Développement sur les Aliments

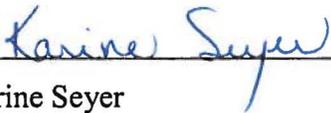
## RÉSUMÉ

Les méthodes utilisées jusqu'à présent en industrie, pour évaluer l'efficacité des cuissons sur les microorganismes, font appel au dénombrement cellulaire sur milieu gélosé. Étant donné que cette méthode ne permet pas de différencier les cellules blessées des cellules mortes, l'efficacité des traitements thermiques est souvent sous estimée. Dans cette étude, la protéine chaperonine DnaK est utilisée pour évaluer la sévérité des traitements thermiques, et la capacité d'adaptation des cellules de *Escherichia coli*, en fonction de différents traitements.

Dans un premier temps, une technique ELISA de type compétitif a été mise au point afin de doser, de façon reproductible, les concentrations intracellulaires en DnaK. Par la suite, des traitements thermiques en bouillon de culture ont été effectués, et le comportement des cellules soumises à un stress induit par la chaleur a été étudié. Les traitements thermiques ont été réalisés à des températures de 50, 55, 60 et 70°C, de façon à atteindre des valeurs pasteurisatrices ( $PV_{70}^{10}$ ) de 0.5, 1, 3 et 5. Aucune DnaK n'a été détectée ( $< 156$  ng/ml) suite à des traitements thermiques effectués à des températures de 60 et 70°C. Les concentrations en DnaK ont augmenté, lors de traitements à 50 et 55°C, pour atteindre des concentrations maximales supérieures à celles observées à la température optimale de croissance (37°C) soit 38 500 molécules/cellule. En effet, les concentrations maximales de 240 000 molécules/cellule et de 105 000 molécules/cellule ont été obtenues à 50°C,  $PV_{70}^{10}$  de 1, et 55°C,  $PV_{70}^{10}$  de 0.5, respectivement. Les concentrations de DnaK ont diminué graduellement en fonction de la sévérité des traitements thermiques. En théorie, pour des  $PV_{70}^{10}$  identiques, on devrait observer un même effet bactéricide. Toutefois, les résultats démontrent que, pour des températures situées entre 50 et 60°C, des  $PV_{70}^{10}$  identiques calculées à des températures différentes n'ont pas le même effet inhibiteur sur *E. coli* puisque la concentration de DnaK dosée et les comptes cellulaires obtenus étaient différents.

Parmi les nombreux traitements étudiés, on n'observe aucune croissance sur gélose ( $< 2.7$  log UFC/ml) à une  $PV_{70}^{10}$  de 3, obtenue à 55°C, alors que 10 000 molécules

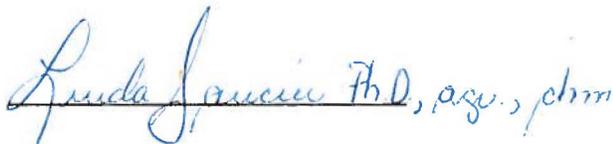
de DnaK/cellule ont été dosées immédiatement après le traitement thermique. En incubant la suspension cellulaire ainsi traitée à une température de 37°C pour une durée de 12 et 24 heures, on observe une reprise de la croissance des cellules, qui ont atteint des concentrations de l'ordre de  $10^8$  après 24 heures. Également, les concentrations en DnaK sont demeurées nettement supérieures à celles observées à 37°C; 51 000 molécules de DnaK/cellule ont été dosées après 24 heures d'incubation. Lors de traitement à une  $PV_{70}^{10}$  de 3, obtenue à 55°C, aucune reprise de croissance n'a été observée, même après une incubation de plus de 48 heures à 37°C. La présence de DnaK semble donc être un bon indicateur de la viabilité des cellules et de leur capacité de s'adapter à un stress thermique puisque sa présence correspond à une reprise de croissance des cellules blessées non dénombrables immédiatement après le traitement thermique.



Karine Seyer  
Étudiante

---

Dr Monique Lacroix  
Directrice de recherche



Dr Linda Saucier  
Codirectrice et  
Investigatrice principale

## AVANT PROPOS

Au cours des deux dernières années, deux institutions de renom ont permis à ce projet de maîtrise de prendre forme et d'être mené à terme.

L'Institut Armand-Frappier, de par la qualité et la compétence de ses professeurs-chercheurs, a contribué au développement des connaissances académiques via les cours requis pour l'obtention du diplôme de maîtrise.

Le Centre de Recherche et de Développement sur les Aliments a aussi tenu un rôle clé dans la démarche scientifique du projet de maîtrise. En effet, c'est dans les laboratoires d'Agriculture et Agroalimentaire Canada que les travaux de recherche ont été réalisés. De plus, l'expertise des gens formant l'équipe de la section de l'industrie des viandes a contribué à l'élargissement des connaissances dans les domaines de la microbiologie alimentaire et de la production des produits carnés.

## REMERCIEMENTS

Pour m'avoir donné la chance de m'accomplir tout au long de ce voyage débordant de défis, je tiens à remercier Mme Monique Lacroix.

Je remercie également Mme Linda Saucier pour sa confiance, son appui et toutes les discussions qui ont appris à l'étudiante, mais aussi à la jeune femme que je suis, à déposer sans crainte ses rêves dans les mains du Destin.

Merci à M. Gabriel Piette, pour son soutien financier, et à M. Martin Lessard et Mme Marie Dupuis pour leur expertise en immunologie.

Merci à Claudine et Marie-Josée pour avoir partagé avec moi leurs connaissances et de nombreux conseils.

Merci à David, Isabelle et Manon pour leur tendre amitié

Merci à Lucie pour les sourires plus qu'appréciés dans mes grandes périodes d'angoisse.

Merci finalement à tous ceux qui passent ici sous silence. Vous m'habitez à chaque instant.

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	i
AVANT-PROPOS.....	iii
REMERCIEMENTS.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
LISTE DES PRODUITS CHIMIQUES.....	xi
CHAPITRE 1: INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1. Cuisson en industrie : évaluation juste de son efficacité.....	1
2. Dénombrement cellulaire.....	3
3. Influence de la température sur la croissance et la synthèse protéique chez <i>Escherichia coli</i> .....	4
4. Constituants nécessaires à la réponse aux chocs thermiques chez les procaryotes.....	5
4.1 Gènes.....	5
4.2 Facteurs de transcription.....	5
4.3 Protéines.....	7
4.3.1 Chaperonines.....	7
4.1.2 Protéases.....	9
5. Régulation de la réponse au choc thermique : induction et répression.....	9
5.1 Stimuli et cycle de régulation.....	9
5.2 Transcription de <i>rpoH</i> ( $\sigma^{32}$ ).....	12
5.3 Traduction de l'ARNm de <i>ropH</i> .....	13
5.4 Transcription des gènes du choc thermique.....	15
6. Répression de la réponse au choc thermique.....	16
6.1 Réactivation de $\sigma^{70}$ .....	16

6.2 Niveau de la traduction de l'ARNm.....	16
6.3 Modulation du cycle par DnaK, DnaJ et GrpE.....	16
6.4 Dégénération de $\sigma^{32}$ .....	18
7. ELISA : un moyen rapide et efficace pour doser les protéines.....	18
8. Problématique et objectifs de la recherche.....	19
CHAPITRE 2: MÉTHODOLOGIE.....	22
1. Culture des bactéries.....	22
2. Détermination du milieu de culture optimal pour la croissance de <i>E. coli</i> .....	22
3. Technique ELISA de type compétitif.....	23
3.1 Préparation des microplaques.....	23
3.2 Réaction entre l'anticorps monoclonal purifié (anti-DnaK) et DnaK.....	23
3.3 Révélation colorimétrique.....	24
4. Lyse cellulaire de <i>E. coli</i> par sonication et libération de DnaK dans le surnageant.....	25
4.1 Préparation de la suspension bactérienne.....	25
4.2 Sonication.....	25
5. Dosage des protéines totales.....	25
6. Vérification de la sensibilité et de la reproductibilité de la technique ELISA.....	26
7. Traitement thermique en bouillon de culture.....	26
8. Reprise de croissance de <i>E. coli</i> suite à un traitement thermique.....	27
9. Dénombrement des cellules viables.....	27
9.1 Dénombrement des cellules sur milieu gélosé.....	27
9.2 Dénombrement par microscopie à fluorescence.....	28
10. Traitement thermique en milieu viande.....	28
10.1 Préparation de la viande.....	28
10.2 Préparation de l'émulsion de jambon.....	29
10.3 Inoculation de l'émulsion de jambon avec <i>E. coli</i> .....	29
10.4 Préparation des pastilles de jambon et traitement thermique.....	30

CHAPITRE 3: RÉSULTATS .....	31
1. Sélection du bouillon de culture approprié.....	31
2. Validation de la méthode ELISA pour le dosage de la DnaK.....	33
3. Concentration intracellulaire de DnaK suite à un traitement thermique.....	34
4. Adaptation de la cellule suite à un traitement thermique.....	39
5. Traitement thermique en milieu viande.....	40
CHAPITRE 4: DISCUSSION.....	42
1. Efficacité du test ELISA développé pour doser le biomarqueur sélectionné : DnaK .....	42
2. Efficacité des traitements thermiques pour contrôler <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	44
3. Adaptation et résistance des cellules de <i>E. coli</i> à différents traitements thermiques.....	47
4. Impact des résultats dans un contexte industriel.....	49
CHAPITRE 5: CONCLUSION.....	52
APPENDICE A : CONCEPT DE LA VALEUR PASTEURISATRICE .....	55
APPENDICE B : VALEURS PASTEURISATRICES PARTIELLES.....	59
APPENDICE C : CALCUL DE LA VALEUR PASTEURISATRICE TOTALE...	61
APPENDICE D : CALCUL DE LA CONCENTRATION DE DnaK.....	64
LISTE DES RÉFÉRENCES.....	66

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Concentrations intracellulaires de DnaK chez <i>E. coli</i> ATCC 25922, suite à une incubation en bouillon BHI à différentes températures jusqu'à l'obtention d'une D.O. de 0.5.....	35
Tableau 2.	Concentration de DnaK/cellule détectée suite à la croissance à 37°C de différentes souches de <i>E. coli</i> dans divers milieux de cultures.....	36
Tableau 3.	Temps nécessaire pour atteindre des valeurs pasteurisatrices de 0.5, 1, 3 et 5 à des températures de 50, 55, 60 et 70°C.....	37
Tableau 4.	Suivi de l'adaptation des cellules de <i>E. coli</i> ATCC 25922, suite à différents traitements thermiques, par dosage de DnaK, dénombrement cellulaire sur gélose et microscopie à fluorescence.....	42

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Cycle de régulation de la réponse au choc thermique.....	12
Figure 2.	Structure secondaire adoptée par l'ARN messager de <i>rpoH</i> lors de températures optimales de croissance.....	15
Figure 3.	Comparaison de la croissance de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 dans les bouillons de culture TBS, BHI et LB, à l'aide du dénombrement cellulaire sur milieu gélosé et de la densité optique.....	32
Figure 4.	Concentration intracellulaire en DnaK provenant de cellules exposées à différentes valeurs pasteurisatrices.....	37
Figure 5.	Corrélation entre le nombre de cellules viables et la concentration de DnaK dosée après divers traitements thermiques.....	48

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARNr	acide ribonucléique ribosomal
ATCC	american type culture collection
ATP	adénosine triphosphate
BHI	brain heart infusion
CRDA	Centre de recherche et de développement sur les aliments
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
HSP	heat shock protein
PV	pasteurization value
Pp	valeur pasteurisatrice partielle
TSB	trypticase soy broth
LB	Luria-Bertani

## LISTE DES PRODUITS CHIMIQUES

Agar purified	BBL
Anticorps anti IgG de souris conjugué à la peroxidase	Medicorp
Bouillon de culture BHI	Difco
Bouillon de culture LB	Difco
Bouillon de culture TSB	Difco
BCA (trousse de quantification de protéine)	Pierce
BSA (bovine serum albumin)	Sigma
DnaK purifiée (antigène et anticorps)	Stressgen Biotechnologies
LIVE/DEAD <i>BacLight</i>	Molecular Probe
NaHCO <sub>3</sub>	Sigma
Phosphate de sodium (monobasique)	Sigma
Phosphate de sodium (dibasique)	Sigma
Tétraméthylbenzene	Medicorp
Tween 20	Sigma

## CHAPITRE 1

### INTRODUCTION GÉNÉRALE

#### 1. Cuisson en industrie : évaluation juste de son efficacité

Les produits carnés sont reconnus comme un milieu favorable à la croissance de divers types de microorganismes étant donné leur pH voisin de la neutralité et leur contenu en eau et en nutriments (Saucier, 1999). La cuisson s'est avérée un outil efficace pour assurer une diminution du nombre total de bactéries et autres microorganismes présents dans les viandes (Marcotte, 1993). En effet, la cuisson est une forme de choc thermique définie comme un ensemble d'agressions subies par la cellule bactérienne et causées par une augmentation de température. L'augmentation de température a pour conséquence l'apparition de protéines dénaturées ou altérées chez les microorganismes. Pour être actives, les protéines adoptent une structure secondaire, tertiaire, et parfois quaternaire, qui leur est propre. La perte d'activité protéique découlant d'une dénaturation induite par la chaleur peut avoir un impact important sur la capacité de survie de la cellule selon que les protéines touchées soient impliquées dans la structure, dans le métabolisme ou dans la réponse de la cellule aux stress environnementaux.

Actuellement, au Canada, la cuisson des produits carnés est régie par l'atteinte d'une température à cœur, généralement fixée à 69°C, sans égard au cycle de cuisson utilisé (temps de cuisson et cycle de montée de la température; Marcotte, 1993). Il est important d'étudier l'effet des cycles de cuisson sur les microorganismes de façon à évaluer leur pouvoir inhibiteur sur les cellules microbiennes, ainsi que la capacité d'adaptation de ces cellules lors des différentes étapes du cycle.

Dans certains pays européens, l'effet de destruction des microorganismes obtenu par la chaleur est occasionnellement déterminé en fonction de la valeur pasteurisatrice ( $PV_{T^{\circ}C}^z$ ). La valeur pasteurisatrice est le temps, en minutes, qu'il faudrait chauffer le produit à une température de référence  $T^{\circ}C$  pour obtenir le même effet de destruction au cours de l'ensemble d'un cycle. Pour calculer la valeur pasteurisatrice obtenue lors de cuissons, il faut prendre en considération différents paramètres, soit la température de référence, qui est généralement fixée à 70°C, et les valeurs  $D_T$  et  $z$  associées à un organisme de référence *Enterococcus faecalis* (antérieurement *Streptococcus faecalis*). La valeur  $D_T$ , ou temps de réduction décimale, est le temps (en minutes) nécessaire pour diminuer de 10 fois la population de l'organisme de référence, à la température  $T$ . La valeur  $z$  est définie comme l'augmentation ou la diminution de température permettant de réduire ou augmenter la valeur de  $D_T$  par un facteur de 10. Ainsi, les valeurs  $D_T$  et  $z$  caractérisent la thermorésistance des microorganismes en fonction du temps du traitement thermique et de la température (Marcotte, 1993; Martin, 1984a).

Pour calculer la valeur pasteurisatrice  $PV_{70^{\circ}C}$ , on coupe le cycle en segments et on calcule une valeur pasteurisatrice partielle ( $P_p$ ) pour chacun de ces fragments. La valeur pasteurisatrice partielle est un outil théorique de calcul défini comme le temps de maintien de la température de référence (70°C) pour obtenir le même taux de destruction de la population bactérienne qu'en une minute à une température  $T$ .

$$P_p = 10^{(T-T_{ref})/z}$$

Habituellement, le calcul n'est effectué qu'à partir de 50°C, les températures inférieures ayant des  $P_p$  négligeables (Marcotte, 1993).

Les températures visées au centre des produits carnés lors de leur cuisson ne permettent pas d'assurer que les dommages subis chez les microorganismes sont létaux (Martin, 1984b), et encore moins d'évaluer leur capacité d'adaptation suite à un tel traitement thermique. De plus, les moyens utilisés jusqu'à maintenant pour évaluer l'efficacité de la chaleur sur les microorganismes emploient principalement le dénombrement cellulaire. Cette méthode ne rend pas nécessairement justice au nombre réel de bactéries ayant survécu si on tient compte du fait qu'une cellule peut être tout simplement trop blessée ou stressée pour croître et se multiplier sur un milieu gélosé.

## 2. Dénombrement cellulaire

La technique la plus fréquemment utilisée pour évaluer le nombre de microorganismes viables est le dénombrement des cellules sur un milieu gélosé contenant de l'agar. Il existe également d'autres méthodes permettant de déterminer la viabilité des cellules.

La technique offerte par la compagnie Molecular Probe fait appel à une coloration différentielle des cellules basée sur l'habileté des colorants à pénétrer dans les cellules et l'intégrité de leur membrane. Les cellules dont la structure est intacte, et qui sont par le fait même considérées comme viables, ont une coloration verte lorsqu'elles sont observées par la microscopie à fluorescence. Cette coloration est due au colorant SYTO 9. Quant aux cellules mortes, elles apparaissent rouges puisque leur membrane dénaturée laisse pénétrer l'iodure de propidium. La méthode de microscopie à fluorescence est utilisée à titre qualitatif plutôt que quantitatif, puisqu'il est possible que des cellules mortes possédant une membrane intacte soient détectées comme viables et que des cellules viables aient la couleur de cellules mortes (fiche technique du manufacturier). La technique de coloration différentielle est habituellement utilisée en parallèle avec les méthodes conventionnelles permettant de déterminer la viabilité des cellules lors des expériences.

### 3. Influence de la température sur la croissance et la synthèse protéique chez *Escherichia coli*

*Escherichia coli* est un microorganisme mésophile pouvant croître à des températures variant entre 10 et 49°C selon le milieu de croissance employé (Holt et al., 1994). À des températures situées entre 20 et 37°C, la croissance de *E. coli* varie principalement en fonction de la température et moins en fonction du milieu utilisé. En augmentant la température au-dessus de 40°C ou en l'abaissant au-dessous de 20°C, on observe une diminution de la croissance. Ceci est expliqué par le fait qu'à l'intérieur de la limite 20-37°C, la composition cellulaire en protéines ne change pas de façon notable et les réactions cellulaires sont coordonnées par une modification de l'activité enzymatique. Cette modification n'entraîne pas de changement majeur au niveau du fonctionnement de la cellule bactérienne (Herendeen, VanBogelen et Neidhardt, 1979). Par contre, une croissance à des températures de 13 ou 46°C implique un changement important dans la composition en protéines de l'organisme (Herendeen, VanBogelen et Neidhardt, 1979; Lemaux et al., 1978; Schaechter, Malloe et Kjeldgaard, 1958). Ces modifications ont lieu au niveau macromoléculaire (Schaechter, Malloe et Kjeldgaard, 1958) et impliquent la composition en acides gras de la membrane cellulaire (Marr et Ingraham, 1962) et la concentration cellulaire de diverses protéines (Herendeen, VanBogelen et Neidhardt, 1979). Ainsi, plusieurs protéines augmentent ou diminuent en quantité durant la croissance à haute ou basse température. En général, les protéines impliquées dans la transcription ou la traduction sont présentes à des niveaux réduits lors de conditions de croissance restrictives. Celles impliquées dans le métabolisme énergétique, dans la réparation et l'élimination des protéines dénaturées sont présentes en plus grande quantité comparativement aux conditions optimum de croissance (Yamamori et Yura 1980; Yamamori et al., 1978).

L'induction de protéines impliquées dans ce mécanisme de « réparation-élimination » suite à un choc thermique, est caractérisée dans un premier temps par une hyper induction passagère de ces protéines spécifiques à des températures de croissance supérieures à 42°C. Une inhibition de la production des protéines qui ne sont pas

impliquées dans la réponse au choc thermique, donc qui ne sont pas essentielles, est aussi observée. Ainsi, à des températures de 50°C et plus, on assiste à une synthèse presque exclusive des protéines du choc thermique (ou HSP pour heat shock protein). Suite à une exposition prolongée à une température de 60°C, l'effet létal de la dénaturation protéique devient significatif, (Woodcock et Grigg, 1972; Bridges, Ashwood-Smith et Munson, 1969) ce qui expliquerait pourquoi à des températures inférieures à celle-ci, une survie de la cellule serait encore possible.

#### 4. Constituants nécessaires à la réponse aux chocs thermiques chez les procaryotes

##### 4.1 Gènes

Jusqu'à maintenant, au moins 30 HSP ont été identifiées et quelques opérons des HSP sont représentés sur la figure 1. Parmi ceux-ci, il existe deux opérons polycistroniques soit *dnaKJ* et *groELS*. L'opéron *groELS* contient les gènes pour les polypeptides GroEL et GroES. Les informations recueillies jusqu'à maintenant indiquent que ces gènes forment une seule unité de transcription (Tilly et al., 1983). Les gènes codant pour les protéines DnaK et DnaJ constituent aussi un seul opéron, *dnaKJ* (Thomas et Baneyx, 1996), où le gène *dnaJ*, situé en aval de *dnaK*, a son propre promoteur. Pour ce qui est de *rpoD* ( $\sigma^{70}$ ), il est situé dans un opéron qui comporte les gènes pour les protéines ribosomiques S21 et l'ADN primase. Les gènes *lysU*, *lon*, *grpE* et *rpoH* ( $\sigma^{32}$ ) sont séparés les uns des autres mais il a été démontré qu'un point commun relie entre eux ces opérons indépendants; ils sont tous contrôlés par le produit du gène régulateur *rpoH* ( $\sigma^{32}$ ) (Blattner et al., 1997).

##### 4.2 Facteurs de transcription

Le facteur de transcription constitutif  $\sigma^{70}$ , produit du gène *rpoD*, est continuellement présent dans les cellules et est la sous-unité de l'ARN polymérase permettant de reconnaître la majorité des promoteurs chez *E. coli* et d'initier la

transcription de l'ensemble des gènes du chromosome (Lewin, 1994). Quoique présent lorsque la cellule ne subit aucun stress, ce facteur de transcription est aussi induit par la chaleur (Taylor et al., 1984). Une telle induction de  $\sigma^{70}$  relève davantage d'un système de survie après choc puisqu'elle assure à la cellule la possibilité d'échapper à une mort potentielle qui aurait lieu lors d'une synthèse exclusive des HSP. Ainsi, la cellule peut reprendre rapidement la synthèse des protéines exprimées lors d'un retour à des conditions de croissance optimales.

La reconnaissance des promoteurs des HSP est spécifique au facteur de transcription alternatif  $\sigma^{32}$  (sigma 32), produit du gène *htpR* (*rpoH*) exprimé à raison de 10 à 30 molécules/cellule lors de condition optimale de croissance (Craig et Gross, 1991). La mise en évidence que le facteur de transcription alternatif  $\sigma^{32}$  tient une telle fonction provient de sa similarité structurale avec son analogue, le facteur de transcription constitutif  $\sigma^{70}$  (Landick et al., 1984), de l'existence d'une étroite association avec le cœur de l'ARN polymérase (Bloom et al., 1984; Grossman, Erickson et Gross, 1984) et la capacité du complexe ARN polymérase- $\sigma^{32}$  de s'associer aux promoteurs des protéines du choc thermique et de transcrire les gènes qui y sont associés.

Lors d'un choc thermique, la concentration de  $\sigma^{32}$  augmente de façon significative (de 15 à 20 fois lors d'un passage de 30 à 42°C; Straus, Walter et Gross, 1987). La présence simultanée des facteurs de transcription  $\sigma^{32}$  et  $\sigma^{70}$  à des concentrations importantes entraîne une compétition entre ces deux facteurs pour l'ARN polymérase. Dans des conditions optimales de croissance, cette compétition n'est pas vraiment existante étant donné la faible concentration de  $\sigma^{32}$  et l'affinité de l'ARN polymérase pour  $\sigma^{70}$ , alors qu'un choc thermique inverse cette tendance. Lors d'un choc thermique, la répression de la transcription dépendante de  $\sigma^{70}$  ne peut être simplement expliquée par une augmentation des niveaux de  $\sigma^{32}$  puisque le nombre de molécules de  $\sigma^{70}$  présentes est supérieur (Straus, Walter et Gross, 1987). Toutefois, à des températures supérieures à 42°C,  $\sigma^{70}$  est inactivé, puisque les copies de ce facteur de transcription adhèrent les unes

aux autres lors d'une exposition à la chaleur (Blaszczak et al., 1999), et son affinité pour l'ARN polymérase est réduite, ce qui avantage alors l'association avec  $\sigma^{32}$ .

Un deuxième facteur de transcription  $\sigma^{24}$  est impliqué dans la réponse au choc thermique lorsque la température atteint les 50°C.  $\sigma^{24}$  est le produit du gène *rpoE* et il reconnaît spécifiquement l'un des 4 promoteurs du gène *rpoH* ( $\sigma^{32}$ ) lors de croissance à des températures élevées. Le signal qui module l'activité de ce facteur est lié à la production de protéines membranaires qui substitue les protéines de la membrane externe altérées par la chaleur, et à la présence de protéines périplasmiques endommagées ou déformées (Yura, Kanemori et Morita, 2000).

### 4.3 Protéines

#### 4.3.1 Chaperonines

Le repliement adéquat des protéines et l'assemblage des structures, *in vivo*, ne se font pas complètement de façon spontanée. L'exécution des étapes menant au repliement des protéines est facilitée par des protéines appelées chaperonines. Le rôle des chaperonines est donc de prévenir l'inactivation des protéines cellulaires, de réactiver les protéines qui ont perdu leur activité, et d'aider à la dégradation de protéines dénaturées non-réparables qui s'accumulent lors des conditions normales de croissance ou lors de stress (Georgopoulos et Welch, 1993; LaRossa et Van Dyk, 1991; Georgopoulos et al., 1990). Lorsque la cellule subit un stress, comme une exposition à une température élevée, les protéines thermosensibles en cours de synthèse ont de la difficulté à adopter une structure active, et celles qui sont déjà synthétisées ont tendance à perdre leur structure tertiaire et quaternaire, ce qui a comme conséquence la perte de leur activité. Pour retrouver leur activité, les protéines doivent reprendre leur forme tridimensionnelle, et pour cela, l'intervention des protéines chaperonines est nécessaire.

Chez *E. coli*, les protéines impliquées lors de chocs thermiques ont été mises en évidence par des gels d'électrophorèse en deux dimensions, c'est-à-dire des études

protéomiques (Neidhardt, Phillips et Lau, 1982; Yamamori et al., 1982; Neidhardt et VanBogelen, 1981). Jusqu'à maintenant, plus de 30 protéines ont été identifiées comme étant impliquées dans la réponse au choc thermique mais il est possible que certaines ne soient pas encore découvertes dû à leur faible concentration.

Les protéines du choc thermique les plus abondantes sont les produits des gènes *groEL* et *groES*. Leur principale fonction à des températures optimales de croissance est de prévenir l'agrégation des protéines et d'assurer un repliement adéquat des protéines natives (Gragerov et al., 1992). GroES et GroEL sont donc des chaperonines. À température optimale de croissance, ces protéines comptent pour 1.6% des protéines totales de la cellule. À des températures plus élevées (45-47°C), elles constituent 15% de la masse cellulaire (Herendeen, VanBogelen et Neidhardt, 1979), ce qui suppose qu'elles auraient des fonctions structurales, de réparation ou de protection (Minton et al., 1982).

La deuxième protéine du choc thermique en importance est DnaK (Georgopoulos et al., 1982) qui représente environ 1% des protéines totales en phase exponentielle lors de la croissance à température optimale (Herendeen, VanBogelen et Neidhardt, 1979). Elle se concentre dans le cytoplasme à la fois dans les cellules non stressées et celles qui ont subi un choc thermique (Bukau et al., 1993). Cette protéine soluble est celle qui est la plus conservée génétiquement à travers les espèces, et elle est capable d'autophosphorylation en plus de posséder une activité 5'-nucléotidase et une faible activité ATPase. Il est intéressant de souligner la nature hydrophobe du cœur de DnaK, où a lieu la liaison avec les peptides mal repliés. Cette caractéristique supporte le fait que la DnaK a plus d'affinité avec les régions hydrophobes des protéines dénaturées (Rüdiger, Buchberger et Bukau, 1997). Étant donné que les peptides ne possèdent pas de site spécifique de liaison à la DnaK, cette chaperonine reconnaît sa cible et s'y lie par liaisons hydrophobes, ponts hydrogènes et liaisons de van der Waals.

Deux HSP sont nécessaires pour former, avec DnaK, une chaperonine active et fonctionnelle, soit DnaJ et GrpE (Georgopoulos, 1992). En effet, ces deux co-chaperonines stimulent l'activité ATPase de DnaK : DnaJ accélère spécifiquement l'étape

d'hydrolyse menant à la formation du complexe [DnaK-ADP]-DnaJ-peptides, et GrpE stimule la libération des peptides par la formation d'ATP (Liberek et al., 1991; Rüdiger, Buchberger et Bukau, 1997) ce qui permet le recyclage efficace de DnaK. La proportion des chaperonines DnaK/J et GrpE est équivalente à un ratio 5 : 1 : 1 (Bardwell et al., 1986; Neidhardt et VanBogelen, 1987).

#### 4.3.2 Protéases

Les protéases ATP-dépendantes font aussi partie de l'ensemble des HPS. Les plus documentées sont les protéases HslUV, ClpAP et Lon, qui sont cytoplasmiques, et FtsH, qui est liée à la membrane. Toutes ont un rôle différent de celui rempli par les chaperonines. En effet, ClpAP et Lon sont principalement responsables de la dégradation de 70 à 80% des protéines endommagées suite à une élévation de température (Maurizi, 1992). FtsH, dont l'implication au niveau de la réponse au choc thermique est la plus connue, est codée par un gène sous la régulation de  $\sigma^{32}$ . La concentration de cette protéase est deux fois plus élevée lors de chocs thermiques que lors de la croissance optimale. La cellule est donc en mesure d'initier la dégradation de  $\sigma^{32}$  lors de la régulation négative de la réponse au stress, c'est-à-dire lorsque le microorganisme retrouve des conditions optimales de croissance, puisque FtsH est responsable de la dégradation de  $\sigma^{32}$  (Tomoyasu et al., 1995). Cela dit, d'autres études sont requises pour bien comprendre comment  $\sigma^{32}$  est reconnu par les protéases lors de la période d'adaptation post choc thermique. L'action conjointe des protéases HslUV, ClpAP et Lon contribuerait aussi à la dégradation de  $\sigma^{32}$  (Georgopoulos et al., 1990).

### 5. Régulation de la réponse au choc thermique : induction et répression

#### 5.1 Stimuli et cycle de régulation

Les protéines de chocs thermiques sont également induites par l'éthanol (Travers et Mace, 1982), et aussi en partie par certains agents qui endommagent la structure de l'ADN ou encore qui inhibent sa réplication comme les ultra-violets, l'acide nalidixique

(Krueger et Walker, 1984), la courmermycine (Travers et Mace, 1982), et par au moins un agent biologique, l'infection virale (Drahos et Hendrix, 1982; Kochan et Murialdo, 1982). Les cibles immédiates de ces inducteurs ne sont pas toutes connues, mais l'ADN et sa réplication, la membrane cytoplasmique et la synthèse protéique semblent des cibles potentielles (Neidhardt et VanBogelen, 1987). La synthèse des protéines HSP tient en fait un rôle central maintenant bien connu dans la réponse au choc thermique puisque la présence et la production de protéines déformées ou endommagées induisent cette réponse au choc thermique. Pour ce qui est des autres stimuli, on ne sait pas encore si plusieurs cibles sont impliquées, et si elles sont indépendantes les unes des autres, ou si elles font partie d'une cascade d'activation.

L'identification des protéines impliquées dans la transmission des signaux de stress environnementaux en une réponse au choc thermique permet l'établissement de modèles qui ont pour objet d'expliquer la modulation de la réponse au choc thermique via le facteur de transcription  $\sigma^{32}$ , DnaK, DnaJ, GrpE et les protéases.

Le modèle retenu suite à de nombreuses études indique que  $\sigma^{32}$  est au cœur même de la réponse au choc thermique (Yura, Kanemori et Morita, 2000). Le niveau d'expression des gènes du choc thermique est, dans un premier temps, déterminé par la traduction de l'ARN messager de *rpoH* ( $\sigma^{32}$ ) déjà présent dans la cellule. Lors d'un choc thermique, l'ARNm de *rpoH* adopte une structure linéaire favorisant sa traduction et ainsi, les niveaux de  $\sigma^{32}$  augmentent (figure 2). DnaK et ses co-chaperonines sont aussi impliquées dans cette expression puisqu'elles sont responsables de la stabilité de  $\sigma^{32}$ . Lors de conditions optimales de croissance, les molécules de DnaK retrouvées sous une forme libre s'associent à  $\sigma^{32}$ . Sigma 32 est alors lié et ne peut maintenir son activité dans la cellule puisqu'il est dirigé vers les systèmes de dégradation. Lorsque la cellule subit un choc thermique, DnaK s'associe de façon préférentielle aux protéines endommagées pour remplir son rôle de chaperonine, ce qui entraîne une chute du niveau de DnaK libre. Une telle séquestration de DnaK prévient, par le fait même, son interaction avec  $\sigma^{32}$ , auquel il est associé lors de conditions standards de croissance. Sigma 32 n'est donc plus lié à DnaK et acquiert sa stabilité fonctionnelle (Georgopoulos et al., 1994; Gross et al., 1990).

Les facteurs de transcription  $\sigma^{32}$  iront alors se joindre à l'ARN polymérase (ARNP) pour former un complexe capable de reconnaître spécifiquement les promoteurs des gènes des HPS; la concentration cellulaire en HPS augmente. Lors de la période d'adaptation qui suit un choc thermique, l'affinité de l'ARN polymérase avec  $\sigma^{32}$  diminue;  $\sigma^{32}$  se lie à nouveau à DnaK libre et est dirigé vers les systèmes de dégradation. Ce mode de régulation permet une réponse rapide et fournit à la cellule un moyen de réagir efficacement à un stress soudain.

Lorsque la température descend et que la cellule entre dans une période d'adaptation, l'ARNm retrouve sa structure secondaire initiale et DnaK peut interagir à nouveau avec  $\sigma^{32}$  afin de dissocier ce facteur de transcription de l'ARN polymérase. Sigma 32 est alors dirigé vers les systèmes de protéases cellulaires, ce qui provoque une régulation négative de la réponse au choc thermique. La réponse au choc thermique est donc auto-limitante puisqu'une surproduction des protéines du choc thermique, combinée avec une réparation des dommages protéiques par ces chaperonines, induit une répression.

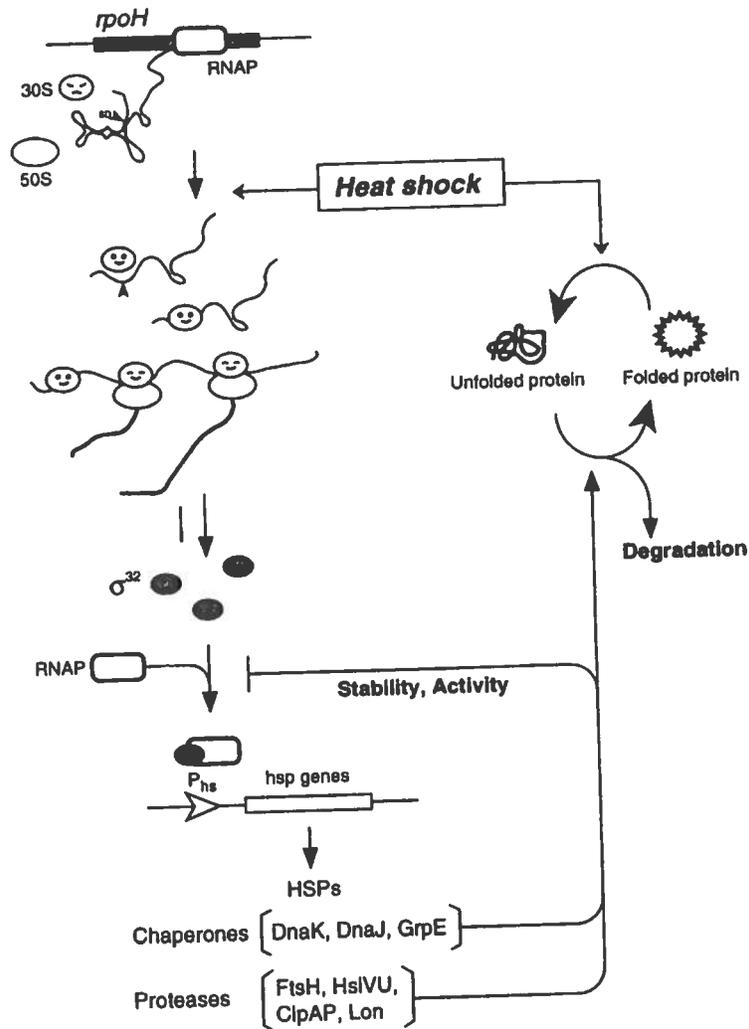


Figure 1. Cycle de régulation de la réponse au choc thermique (Yura, Kanemori et Morita, 2000; copyright).

## 5.2 Transcription de *rpoH* ( $\sigma^{32}$ )

Quatre promoteurs, dont trois nécessitent  $\sigma^{70}$  (P1, P4, P5) et un autre facteur de transcription  $\sigma^{24}$  (P3), sont responsables de l'expression de *rpoH* (Erickson et al., 1987; Nagai et al., 1990). Un des aspects importants de ces promoteurs dans le contrôle de la transcription de *rpoH* est une reconnaissance dépendante de la température. À 30°C, P1 est le promoteur le plus fort, et avec P4, il est responsable de la présence de plus de 90% des ARNm de *rpoH* (Nagai et al., 1990). Lors d'un traitement sévère (50°C), la

transcription de *rpoH* à partir des promoteurs P1 et P4 diminue, alors que celle ayant lieu par le biais du promoteur P3 est mise en marche à de haut niveau (Bukau, 1993). Cette utilisation inhabituelle de P3 résulte du fait que le facteur de transcription  $\sigma^{24}$  (ou  $\sigma^{E}$ ) est particulièrement actif à très haute température ce qui assure la transcription de *rpoH* même lors de conditions de stress extrêmes alors que la transcription dépendante de  $\sigma^{70}$  est largement inactivée. P5 est un promoteur plus faible que P1, P3 et P4 et son activité est induite par l'addition d'éthanol ou en absence de glucose (Mager et Kruijff, 1995).

La principale fonction du contrôle transcriptionnel semble se limiter à atteindre un niveau approprié d'ARNm de *rpoH* lors de conditions optimales de croissance afin d'assurer une production rapide de  $\sigma^{32}$  lors d'un choc thermique. Dans un deuxième temps, le contrôle sert à maintenir le niveau critique d'ARNm nécessaire pour tolérer les conditions extrêmes de croissance. La transcription du gène *rpoH* n'est cependant pas impliquée dans l'augmentation passagère de la synthèse de  $\sigma^{32}$  suite à une élévation de température.

### 5.3. Traduction de l'ARNm de *rpoH*.

L'augmentation de la synthèse de  $\sigma^{32}$ , observée après une élévation de température de 30 à 42°C, est dépendante de la traduction de son ARNm et non de sa transcription puisque ce dernier est déjà présent dans la cellule aux conditions optimales de croissance (figure 2). Cette conclusion a été appuyée par plusieurs observations. D'abord, la synthèse de  $\sigma^{32}$ , mais pas celle de l'ARNm de *rpoH*, augmente remarquablement suite à une élévation de température (Fujita, Nomura et Ishihama, 1987). L'augmentation des niveaux de protéines fusionnées  $\sigma^{32}$ - $\beta$ -galactosidase dépend de la région d'initiation de la traduction utilisée chez *rpoH* et non pas du promoteur (Nagai, Yuzawa et Yura, 1991). Également, l'augmentation d'ARNm de *rpoH* est précédée par une augmentation de la synthèse de  $\sigma^{32}$ ; le niveau maximum de synthèse de  $\sigma^{32}$  et d'accumulation d'ARNm sont atteints à 3 et 6 minutes respectivement après une élévation de température (Kamath-Loeb et Gross, 1991; Straus, Walter et Gross, 1987).

Finalement, l'induction thermique de la synthèse de la protéine fusionnée a lieu même si la synthèse de l'ARNm est inhibée par la rifampicine (Nagai, Yuzawa et Yura, 1991).

Les études portant sur le contrôle de la traduction de  $\sigma^{32}$  ont démontré que les régions de régulation positive (A) et négative (B), situées dans la portion 5' de la molécule d'ARNm de *rpoH*, sont directement impliquées dans la régulation de la synthèse de  $\sigma^{32}$  (figure 3). La région A de 15 nucléotides est complémentaire à une partie de l'ARNr 16S et initie potentiellement la traduction puisqu'elle est située en amont du codon d'initiation. La région B de 100 nucléotides, pour sa part, est impliquée dans la répression de la traduction lorsque les conditions de stress sont absentes. Ces deux régions sont normalement unies entre elles par appariement de paires de bases, ce qui masque la région A et le codon AUG formant le site de liaison au ribosome et d'initiation de la traduction.

L'ARNm de *rpoH* adopte donc une structure secondaire qui limite normalement l'entrée du ribosome et par conséquent sa traduction. Toutefois, cette structure peut être déstabilisée de façon passagère lorsque la cellule est exposée à de hautes températures, ce qui permettrait d'augmenter le taux d'initiation de la traduction. Une troisième région, la région C, aurait aussi un rôle important à jouer dans le contrôle de la stabilité de  $\sigma^{32}$ . Cette région C du facteur de transcription, correspondant aux bases 133 à 140 de l'ARNm  $\sigma^{32}$ , serait impliquée dans le contrôle de la stabilité de  $\sigma^{32}$ , par le biais d'une liaison avec DnaK, et dans sa liaison avec le cœur de l'ARN polymérase (Kanemori et al., 1999; Arsene et al., 1999; Joo et al., 1998).

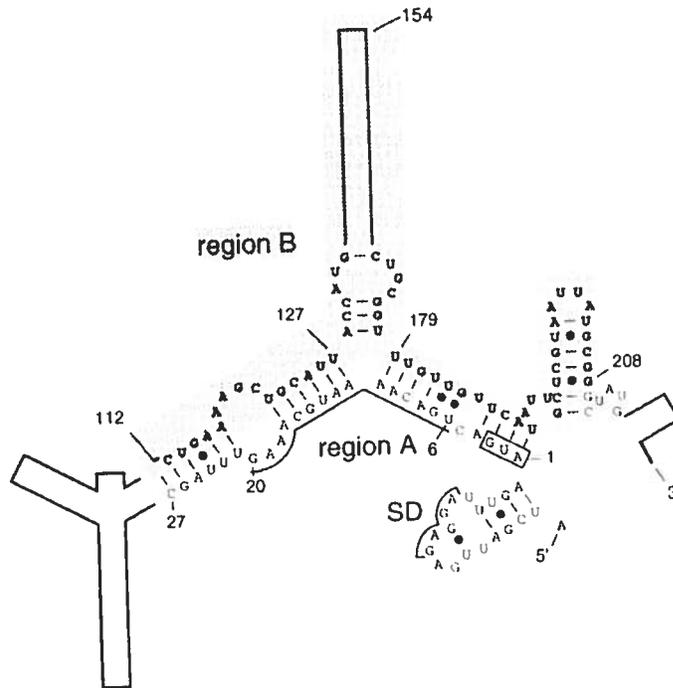


Figure 2. Structure secondaire adoptée par l'ARN messenger de *rpoH* lors de températures optimales de croissance (Yura, Kanemori et Morita, 2000; copyright).

#### 5.4 Transcription des gènes du choc thermique

Les promoteurs des gènes du choc thermique sont reconnus seulement par l'ARN polymérase associé à  $\sigma^{32}$  (Zhou et al., 1988; Fujita, Momura et Ishihama, 1987) et ils diffèrent substantiellement des promoteurs reconnus par  $\sigma^{70}$  de par la région -35 ( $\sigma^{70}$ , TCTCNCCTTGAA;  $\sigma^{32}$ , TTGACA), la région -10 ( $\sigma^{70}$ , CCCCATNTA;  $\sigma^{32}$ , TATAAT) et le nombre de nucléotides séparant ces deux régions (16 à 18 nucléotides; Gross et al., 1990; Cowing et al., 1985) observées chez  $\sigma^{32}$ .

La majorité des gènes du choc thermique sont transcrits de façon efficace même si la concentration cellulaire de  $\sigma^{32}$  est faible lors de conditions optimales de croissance

(Straus, Walter et Gross, 1987). Ceci confirme donc l'habileté du facteur  $\sigma^{32}$  à entrer en compétition avec d'autres facteurs de transcription pour se lier à l'ARN polymérase.

## 6. Répression de la réponse au choc thermique

### 6.1 Réactivation de $\sigma^{70}$

Le facteur de transcription  $\sigma^{70}$  étant inactivé lorsque la température est supérieure à 42°C, il devient une cible pour la machinerie DnaK/J, GrpE qui aura comme fonction de le réactiver. Ce faisant,  $\sigma^{70}$  est en mesure de réprimer la réponse au choc thermique lors d'un retour aux conditions normales de croissance puisque son affinité pour le cœur de l'ARN polymérase est supérieure à celle de  $\sigma^{32}$  qui redeviendra libre et disponible à la dégradation (Blaszczak et al., 1995).

### 6.2 Niveau de la traduction de l'ARNm

La perte de la structure secondaire de l'ARNm *rpoH* est dépendante de la température à laquelle est exposée la cellule et est donc passagère. Ainsi, l'augmentation de la traduction de cet ARNm est suivie d'une phase de répression de l'expression de  $\sigma^{32}$ , ce qui correspond à la phase d'adaptation suivant habituellement la réponse au choc thermique, où l'ARNm reprendra sa structure initiale bloquant à nouveau l'accès du ribosome au codon d'initiation de la traduction (Connelly, Yura et Gross, 1999).

### 6.3 Modulation du cycle par DnaK, DnaJ et GrpE

Il a été démontré que les chaperonines DnaK, DnaJ et GrpE sont les principales protéines impliquées dans la régulation négative qui contrôle la synthèse des protéines du choc thermique (Bukau, 1993). Ces trois protéines interagissent avec  $\sigma^{32}$  libre lors des conditions normales de croissance (Gamer, Bujard et Bukay, 1992) de façon à empêcher l'association entre l'ARN polymérase et le facteur de transcription. En rendant  $\sigma^{32}$  non

disponible pour la transcription des HSP, l'expression des gènes du choc thermique est inhibée.

La compréhension du mécanisme de fonctionnement de DnaK, DnaJ et GrpE dans la modulation de la réponse au choc thermique est démontrée par l'interaction spécifique de ces protéines avec le complexe de transcription spécifique ARN polymérase- $\sigma^{32}$ . DnaK, mais aussi DnaJ et GrpE, interagissent physiquement avec les facteurs de transcription  $\sigma^{32}$  libres lorsque la cellule n'est pas sous des conditions de choc thermique (Gamer, Bujard et Bukay, 1992). Il existe une interaction entre DnaJ et  $\sigma^{32}$  qui se distingue de l'interaction entre DnaK et GrpE avec le même facteur de transcription. En effet, l'addition d'ATP trouble l'association de DnaK et GrpE avec  $\sigma^{32}$ , ce qui n'est pas le cas avec DnaJ. Aussi, les associations entre DnaJ- $\sigma^{32}$  et DnaK- $\sigma^{32}$  ont lieu indépendamment de la présence de DnaK et DnaJ respectivement. Toutefois, l'association de DnaJ avec  $\sigma^{32}$  augmente l'affinité de DnaK pour ce dernier.

Ces interactions ont une influence sur l'association de  $\sigma^{32}$  avec l'ARN polymérase. Dans des systèmes de transcription *in vitro* avec des protéines purifiées, la transcription dépendante de  $\sigma^{32}$  à 30°C est spécialement bloquée par la présence de DnaK et DnaJ. La présence de DnaJ à elle seule est suffisante pour bloquer partiellement la transcription alors que la présence de DnaK, même en excès par rapport à  $\sigma^{32}$ , est moins efficace. Cela souligne le rôle crucial de DnaJ dans l'établissement de la répression de l'activité de  $\sigma^{32}$  (Bukau, 1993). Le rôle de GrpE dans le mécanisme de répression est moins clair mais il pourrait être requis pour provoquer la libération de  $\sigma^{32}$  du complexe ARN polymérase- $\sigma^{32}$  via un système dépendant de l'ATP. La régulation négative de l'activité de  $\sigma^{32}$  semble donc impliquer l'interaction de DnaK, DnaJ et GrpE avec le mécanisme de transcription dépendant de  $\sigma^{32}$  (Hartl et al., 1992).

#### 6.4 Dégradation de $\sigma^{32}$

Les facteurs impliqués dans la grande instabilité de  $\sigma^{32}$  ne sont pas tous connus, mais FtsH y joue un rôle important. Cette protéase est en effet responsable de la dégradation intracellulaire de  $\sigma^{32}$  (Herman et al., 1995; Tomoyasu et al., 1995). Lorsque les protéines endommagées ont été réparées ou détruites, les chaperonines peuvent à nouveau entrer en compétition avec l'ARN polymérase pour se lier  $\sigma^{32}$ . Le facteur de transcription est alors libéré de son association avec l'ARN polymérase et est exposé à la dégradation par FtsH. Ceci a comme conséquence de diminuer la concentration cellulaire de  $\sigma^{32}$ .

#### 7. ELISA : un moyen rapide et efficace pour doser les protéines

Le test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) est couramment utilisé pour la détection d'antigènes et d'anticorps dans les maladies infectieuses humaines et animales, en immunologie de même que dans bien d'autres domaines d'étude (Kemeny et Chantler, 1988). Il existe six systèmes différents pour détecter des anticorps spécifiques, des antigènes solubles ou des antigènes présents à la surface des cellules. Parmi ceux-ci, deux sont utilisés pour la détection d'antigènes solubles, soit la méthode compétitive et la méthode sandwich. Dans les deux cas, la phase solide est couplée à l'antigène (compétitive) ou l'anticorps (sandwich) sur une microplaque de plastique. Dans la méthode sandwich, l'antigène à doser est ajouté par la suite et se couple à l'anticorps fixé à la plaque. Dans la méthode compétitive, on cherche à mettre en contact une quantité connue d'anticorps spécifique et d'un antigène, libre en solution et présent en diverses concentrations, pour favoriser leur association. Plus il y a d'antigène libre en solution, moins il y a d'anticorps qui vont se lier à l'antigène fixé à la plaque. Le signal obtenu est donc inversement proportionnel à la concentration d'antigène présent en solution.

Dans les deux méthodes, le complexe macromoléculaire adsorbé est incubé en présence d'un anticorps couplé de façon covalente à un enzyme, pour former ce qu'on appelle un anticorps conjugué. Les conjugués non liés sont éliminés par lavages et le

substrat est ajouté. Lorsque le substrat est hydrolysé par l'enzyme, un produit coloré ou fluorescent est généré. L'ELISA compétitif est utilisé pour détecter ou quantifier les antigènes solubles, et est employé lorsque l'antigène et son anticorps purifié sont disponibles. L'ELISA sandwich est de 2 à 5 fois plus sensible mais nécessite deux anticorps dirigés contre deux épitopes différents.

La technique ELISA permet de détecter des quantités d'antigènes de l'ordre du nanogramme, mais pour ce faire, deux caractéristiques essentielles doivent être recherchées lors de la mise au point de la méthode soit la sensibilité et la reproductibilité. La précision de la méthode est dépendante de la spécificité de l'anticorps pour son antigène et des anticorps monoclonaux utilisés. La protéine DnaK de *E. coli* et son anticorps monoclonal de souris spécifique sont disponibles commercialement chez StressGen Biotechnologies corp., et seront utilisés pour le développement d'un ELISA de type compétitif qui servira au dosage de la DnaK intracellulaire.

## 8. Problématique et objectifs de la recherche

La capacité des cellules bactériennes de s'adapter à des conditions inhibitrices variables a été démontrée chez plusieurs espèces bactériennes (Foster, 2000; Alekshun et Levy, 2000). L'adaptation des différents microorganismes aux stress environnementaux est généralement évaluée par la viabilité des cellules via un dénombrement cellulaire sur milieu gélosé. Étant donné que le dénombrement cellulaire ne permet pas de différencier les cellules blessées des cellules mortes, suite à un stress, le développement de nouvelles méthodes pour évaluer la survie des cellules s'avère de la plus grande importance de façon à éviter une sous-estimation des cellules viables, mais trop stressées ou blessées pour être dénombrées.

L'objectif principal du présent projet est de mettre au point une méthode nous permettant d'évaluer l'état physiologique de *E. coli* suite à un traitement thermique. Pour ce faire, nous devons, dans un premier temps, choisir une protéine facilement dosable démontrant l'effet du stress thermique sur *E. coli*. La protéine du choc thermique DnaK a

été retenue pour remplir le rôle de biomarqueur étant donné qu'elle tient un rôle important dans la régulation de la réponse au choc thermique et que sa concentration varie en fonction de la température à laquelle sont exposées les cellules (Neidhardt et VanBogelen, 1987). De plus, elle est présente à des concentrations supérieures aux autres protéines du choc thermique, et ce autant dans la cellule à croissance optimale que dans celle subissant un stress induit par la chaleur, ce qui en facilite le dosage.

L'ensemble des travaux constituera à valider le potentiel de DnaK comme biomarqueur de l'efficacité des traitements thermiques, et de la capacité d'adaptation des cellules de *E. coli*, en fonction de différents traitements. Tout d'abord, il faudra mettre au point un ELISA de type compétitif, tel que décrit par Coligan et al. (1992), de façon à pouvoir doser les concentrations intracellulaires de DnaK. La sensibilité et la reproductibilité de la technique sont validées en comparant les résultats obtenus avec ceux cités dans la littérature (Herendeen, VanBogelen and Neidhardt, 1979). Les mises au point terminées, il faudra évaluer les concentrations de DnaK produites lors de différents traitements thermiques. Finalement, la récupération des cellules suite à un choc thermique sera étudiée en incubant les cellules stressées à 37°C immédiatement après un traitement à la chaleur, et en observant la reprise de croissance et la production de DnaK à différents temps post-traitement.

Hypothèse : Valider le potentiel de DnaK comme biomarqueur de l'efficacité des traitements thermiques, et de la capacité d'adaptation des cellules de *E. coli*, en fonction de différents traitements.

Objectif général : Corréler la production de DnaK en fonction de la sévérité des traitements thermiques

Objectifs intermédiaires :

- Choisir un élément dosable indiquant l'état physiologique des cellules après traitement thermique
- Mettre au point un ELISA de type compétitif permettant de doser les concentrations de

## DnaK

- Évaluer les concentrations de DnaK produite chez *E. coli* en fonction de la température et de la durée des traitements thermiques
- Évaluer la reprise de croissance et de production de DnaK à différents temps post traitement thermique

## Moyens pour atteindre les objectifs

1 : La DnaK sera choisie comme biomarqueur de l'état physiologique de *E. coli*. Les concentrations de DnaK seront évaluées par un test ELISA de type compétitif tel que décrit par Coligan et al. 1992.

2 : La sensibilité et la reproductibilité de la technique sont validées en comparant les résultats obtenus avec ceux cités dans la littérature (Herendeen, VanBogelen and Neidhardt, 1979). Les températures étudiées seront de 50, 55, 60 et 70°C.

3 : Les traitements thermiques seront effectués dans un bouillon de culture BHI et dans une matrice de viande.

4 : La reprise de croissance des cellules suite à un choc thermique sera étudiée en incubant les cellules stressées à 37°C immédiatement après un traitement à la chaleur, et en observant la reprise de croissance et la production de DnaK à différents temps post traitement.

## CHAPITRE 2

### MÉTHODOLOGIE

#### 1. Culture des bactéries

Les souches de *E. coli* ATCC 25922 et CRDAV 451, obtenues de la collection du Centre de Recherche et Développement sur les Aliments (CRDA, St-Hyacinthe, Qc, Canada) ont été conservées à -80°C dans du bouillon de culture BHI (brain heart infusion; Difco Laboratories Inc. Detroit, MI) contenant 20% de glycérol. Avant que les souches ne soient utilisées pour les différentes expériences, les cultures congelées étaient sous cultivées à 1% v/v dans du BHI et repiquées quotidiennement dans ce même milieu pour un minimum de 2 et un maximum de 7 jours. Les cultures ont été incubées à une température de 37°C.

#### 2. Détermination du milieu de culture optimal pour la croissance de *E. coli*

Afin de déterminer le milieu de croissance permettant d'obtenir une population maximale de *E. coli*, la croissance des cellules a été étudiée dans les bouillons de culture LB (Luria-Bertani; Difco Laboratories Inc), TSB (trypticase soy broth; Difco Laboratories Inc) et BHI. Un volume de 200 ml de chaque bouillon de culture, distribué

dans un Erlenmeyer de 500 ml et pré-incubé à une température de 30, 37 ou 42°C a été ensemencé à un taux de 1% v/v. L'évolution de la croissance de *E. coli* a été suivie par mesure de la densité optique à 600 nm à toutes les heures et en évaluant la concentration bactérienne par dénombrement sur les mêmes milieux contenant 1.5% d'agar (BBL; Becton Dickinson and Company, Cockeysville, MD, USA).

### 3. Technique ELISA de type compétitif

La mise au point de la technique ELISA de type compétitif a été effectuée en se référant à la technique décrite par Coligan dans le « Current protocols in immunology » (1992).

#### 3.1 Préparation des microplaques

Les microplaques utilisées pour l'ELISA (Plate MaxiSorp surface, Nunc-Immuno, Roskilde, Denmark) ont été recouvertes de 100 µl d'une solution de 0.25µg de DnaK purifié (StressGen Biotechnologies corp., Victoria, Colombie-Britannique, Canada). Cette solution a été obtenue en diluant la solution mère de DnaK (1 mg/ml) dans du NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M pH 9.6. Les microplaques ont été incubées avec un couvercle à 4°C pour une période de 16 heures. Elles ont ensuite été lavées 4 fois avec une solution de PBS-Tween 20 0.05%. Le blocage des sites non-saturés de DnaK a été effectué en ajoutant une solution de PBS-BSA 1% à raison de 200 µl par puits et en les incubant à 22°C pendant 1 heure. Les microplaques ont été lavées 4 fois avec une solution de PBS-Tween 20 0.05%. Une fois que le blocage des plaques a été effectué, les plaques ont été conservées à 4°C, pour un période maximale de 2 semaines, jusqu'à leur utilisation.

#### 3.2 Réaction entre l'anticorps monoclonal purifié (anti-DnaK) et DnaK

Pour l'établissement de la courbe standard, des dilutions de DnaK purifiées situées entre 156 et 10 000 ng/ml ont été effectuées dans une solution PBS-BSA 1%-Tween 20 0.05%. Des dilutions doublantes ont aussi été effectuées avec les échantillons contenant

la DnaK à doser. Dans un microtube, une aliquote de 150  $\mu$ l de chaque solution contenant diverses concentrations de DnaK a été ajoutée à un même volume d'anticorps monoclonaux de souris anti-DnaK purifiés (StressGen Biotechnologies corp). La solution mère d'anticorps purifiés, d'une concentration initiale de 1 mg/ml, a été diluée dans une solution PBS-BSA 1%-Tween 20 0.05% de façon à obtenir une dilution 1:10 000. Le microtube contenant le mélange a été incubé à 25°C pendant 1 heure avec légère agitation rotative. Le mélange anticorps-antigène a été ajouté aux puits de la microplaque en duplicata à raison de 100  $\mu$ l par puits. La microplaque a été incubée deux heures à 37°C avec couvercle. Elle a ensuite été lavée 4 fois avec une solution de PBS-Tween 20 0.05%.

### 3.3 Révélation colorimétrique

La solution mère d'anticorps de mouton anti-IgG de souris conjugués à la peroxydase (Medicorp Inc, Montréal, Qc, Canada) d'une concentration de 5 mg/ml a été resuspendue dans une solution PBS-BSA 1%-Tween 20 0.05% de façon à obtenir une dilution 1:50 000. L'anticorps conjugué est ensuite ajouté dans les puits à raison de 100  $\mu$ l par puits, et la microplaque est incubée pendant 1h30 à 37°C. Elle a ensuite été lavée 4 fois avec une solution de PBS-Tween 0.05%. La tétraméthylbenzene (Medicorp Inc), substrat de la peroxydase, a été ajoutée aux puits à raison de 100  $\mu$ l par puits. Après une période d'incubation de 20 minutes, la densité optique dans chaque puit a été lue à des longueurs d'onde de 370 nm et de 492 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (PowerWave, Bio-tek instruments inc, Winooski, VT, USA). La deuxième longueur d'onde utilisée est une longueur d'onde de référence qui sert à éliminer les émissions non spécifiques à la longueur d'onde utilisée (Coligan et al., 1992).

#### 4. Lyse cellulaire de *E. coli* par sonication et libération de DnaK dans le surnageant

##### 4.1 Préparation de la suspension bactérienne

Lorsque la suspension cellulaire de *E. coli* a atteint une  $D.O._{600nm} = 0.5$ , le volume total de 200 ml a été centrifugé à 13 000 x g pendant 15 minutes à 4°C. Le culot a été lavé deux fois avec du tampon phosphate de sodium 0.1M pH 7.0. Suite au lavage final, le culot a été resuspendu dans 50 ml du même tampon.

##### 4.2 Sonication

Tout au long de l'étape de sonication, le bécher contenant la suspension bactérienne a été maintenu dans un bain de glace et la solution a été agitée afin d'assurer une répartition uniforme des cellules dans la suspension. Le sonicateur (Sonic Dismembrator model 300, Artek systems corp, Farmingdale, NY) a été ajusté de façon à obtenir une fréquence de 16.8 kilocycles/seconde. Il a été mis en marche pour une période d'une minute, puis arrêté une autre période d'une minute. Ce cycle a été répété jusqu'à un total de 15 minutes de sonication. La suspension cellulaire soniquée a été centrifugée à 13 000 x g pendant 15 minutes. Le surnageant a été immédiatement utilisé pour la quantification intracellulaire de DnaK.

#### 5. Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines a été effectué à l'aide de l'ensemble de réactifs « BCA protein assay kit » (Pierce, Rockford, IL, USA). Dans un premier temps, 50 parties du réactif A (contient un mélange de carbonate de sodium, de bicarbonate de sodium, de l'acide bicinchoninique et de tartrate de sodium dans de l'hydroxyde de sodium 0.2N) ont été mélangées à 1 partie du réactif B (contient 4% de sulfate cuivrique). Le mélange A+B a été conservé à température de la pièce pour un maximum de 8 heures. Pour l'établissement de la courbe standard, des dilutions situées entre 0 et 2 000 µg/ml, d'une

solution mère de BSA (bovine serum albumin) d'une concentration de 2 mg/ml, ont été effectuées dans du tampon phosphate de sodium 0.1M pH 7.0.

Pour déterminer la quantité de protéines totales par cellule, une aliquote de 500  $\mu$ l a été prélevé de la suspension cellulaire soniquée et a été centrifugée à 13 000 x g pendant 15 minutes. Des dilutions doublantes ont aussi été effectuées à partir du surnageant contenant les protéines à doser. Un volume de 200  $\mu$ l du mélange A+B a été ajouté dans les puits d'une microplaque de 96 puits (Flacon no. 3070) contenant 25  $\mu$ l des dilutions du surnageant. La plaque a été agitée pendant 30 secondes, puis incubée pour une période de 30 minutes à 37°C. La plaque a été refroidie à la température de la pièce avant de lire la densité optique de chaque puits, à une longueur d'onde de 570 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre (Lambda Reader; Perkin-Elmer, Wilton, CT, USA).

#### 6. Vérification de la sensibilité et de la reproductibilité de la technique ELISA

Pour vérifier l'exactitude des résultats obtenus par la technique ELISA décrite plus haut, la concentration intracellulaire de DnaK chez *E. coli* ATCC 25922 ou CRDAV 451 a été comparée avec les valeurs citées dans la littérature (Herendeen, VanBogelen and Neidhardt, 1979). Pour ce faire, 200 ml de milieu BHI ou LB ont étéensemencés à un taux de 1%, avec une sous culture de *E. coli*, préparée tel que décrit à la section 1, puis incubée à des températures de 30, 37 ou 42°C jusqu'à ce que la phase exponentielle de croissance soit atteinte ( $D.O._{600nm} = 0.5$ ). Les différentes souches de *E. coli* et les divers milieux de culture cités ci-haut ont été utilisés afin de déterminer l'influence de ces deux paramètres sur la production intracellulaire de DnaK.

#### 7. Traitement thermique en bouillon de culture

Avant de soumettre *E. coli* ATCC 25922 à différents traitements thermiques, les cellules ont été incubées à 37°C dans du bouillon BHI jusqu'à ce que la phase exponentielle de croissance soit atteinte ( $D.O._{600nm} = 0.5$ ). L'Erlenmeyer contenant 200 ml de suspension bactérienne a ensuite été plongé dans un bain d'eau, préchauffé à 50,

55, 60 ou 70°C, et maintenu sous agitation pendant toute la durée du traitement. La température à l'intérieur de l'Erlenmeyer a été notée à toutes les minutes (le temps zéro étant équivalent au moment où la température atteint 50°C) à l'aide d'une thermo-sonde (Digi-Sense, Barnant Co., Barrington, IL, USA) de façon à pouvoir calculer la valeur pasteurisatrice associée au traitement thermique imposé aux cellules (exemple de calcul en Annexe B; Martin, 1984b). Après le traitement, la suspension bactérienne a été refroidie dans un bain de glace avec agitation jusqu'à ce que la température atteigne 37°C. La concentration de DnaK produite a été évaluée à l'aide de la technique ELISA décrite plus haut.

#### 8. Reprise de croissance de *E. coli* suite à un traitement thermique

Les traitements thermiques ont été effectués tel que décrit à la section 7, à une température de 55°C et à des valeurs pasteurisatrices ( $PV_{70}^{10}$ ) de 3 et 5. Dès que la suspension bactérienne a atteint une température de 37°C lors de la période de refroidissement, elle a été incubée à 37°C pour une période de 12 et 24 heures de façon à permettre aux cellules viables de récupérer et de se diviser.

#### 9. Dénombrement des cellules viables

##### 9.1 Dénombrement cellulaire sur milieu gélosé

Pour faire un dénombrement cellulaire par mise en plaque, des dilutions en série (1:10) ont été effectuées et mises en plaques. Un Petri, contenant du milieu gélosé, a été divisé en 6 pointes. Un volume de 20µl de chaque dilution a été déposé, sous forme de petits points, sur une des pointes du Petri.

La technique dite des 5 Petris a aussi été utilisée de façon à diminuer les limites de détection du dénombrement cellulaire. Un volume de 1 ml, provenant de la suspension bactérienne, a été aliquoté en portion de 200 µl. Chaque aliquote a été étalée sur un milieu gélosé à l'aide d'un râteau de verre.

## 9.2 Dénombrement par microscopie à fluorescence

Les dénombrements par microscopie à fluorescence ont été effectués en utilisant le système LIVE/DEAD *BacLight* (Molecular Probe Inc, Eugene, OR, USA) selon les recommandations du manufacturier. Brièvement, 25 ml de suspension bactérienne ont été centrifugés à 13 000 x g pendant 15 minutes. Le culot a été resuspendu dans 10 ml d'eau filtrée et une aliquote de 3 ml a été conservé pour la coloration. Un volume de 18 µl d'un mélange de colorants, composé de 9 µl de SYTO 9 et de 9 µl d'iodure de propidium fournis dans la trousse LIVE/DEAD *BacLight* (Molecular Probe Inc), a été ajouté à cet échantillon. Le mélange a ensuite été incubé en absence de lumière à 22°C pendant 30 minutes. Après la période d'incubation, 5 µl du mélange a été préparé en montage humide pour une observation microscopique immédiate. Les bactéries rouges (mortes) ont été observées avec un filtre N<sub>2</sub> 530-580 nm (Leitz, Suisse) et les vertes (vivantes), avec un filtre I<sub>2</sub> 450-490 nm (Leitz) à un grossissement de 1000 X. Au moins 10 champs ont été dénombrés pour chaque essai, pour un total de 1000 bactéries par lame. L'analyse a été effectuée en duplicata.

## 10. Traitement thermique en milieu viande

### 10.1 Préparation de la viande

La viande utilisée pour les expériences provenait de fesses de porc fraîches, découanées et désossées (Marché St-Jean, St-Hyacinthe, Qc, Canada). Dès la réception des fesses de porc, la viande a été découpée et hachée 2 fois à l'aide d'un hachoir de type Butcher Boy (Lasar MFG. Company inc., Los Angeles, CA, USA). La viande a ensuite été emballée sous vide dans des sacs (Sac Vak; Winpak Limitée, St-Léonard, Qc, Canada) en paquet de 3 kg. La viande a été conservée à -40°C jusqu'à son utilisation (Bechtel, 1986).

## 10.2 Préparation de l'émulsion de jambon

La viande, provenant de fesses de porc hachées, a été décongelée à 4°C et conservée à cette température jusqu'à son utilisation. L'émulsion de fesse de porc a été préparée en ajoutant de la saumure à la viande de façon à avoir un pourcentage d'injection égale à 40% soit 40 kg de saumure pour 100 kg de viande. La solution de saumurage était constituée de 19.03 g de phosphate, 70.88 g de sel, 84 g de sucre, 2.1 g d'érythorbate, 13.13 g de sel nitrité et 1011.8 g d'eau, pour un total de 1200 g. L'émulsion de 2 kg de fesse de porc a été effectuée dans un mélangeur de type Stephan (A. Stephan U. Söhne GmbH. Co., Hamein, Germany) en ajoutant d'abord la moitié de la saumure à la viande. L'appareil a été mis en marche à la première vitesse pendant 30 secondes de façon à bien mélanger les deux ingrédients et obtenir une distribution uniforme de la saumure dans le jambon. Le reste de la saumure a été ajouté à la viande et le mélangeur a été remis en marche à la première vitesse pendant 30 secondes, puis à la deuxième pendant 90 secondes. L'émulsion de jambon a été conservée à 4°C (Bechtel, 1986).

## 10.3 Inoculation de l'émulsion de jambon avec *E. coli*

Afin de reproduire les montées de température observées lors de traitements thermiques en bouillon de culture, 1 kg de l'émulsion de jambon a été incubé à 37°C, la température à cœur des bouillons de culture avant traitements thermiques. Pour assurer une répartition rapide de la chaleur et éviter une longue incubation à la température optimale de croissance de *E. coli*, la viande a été placée dans de minces sacs de plastique de façon à avoir une couche de viande de moins d'un centimètre d'épaisseur. Lorsque la température ciblée a été atteinte, l'émulsion a été transférée dans un mélangeur (KitchenAid, St-Joseph, Mi, USA) pour procéder à l'inoculation volontaire. Une suspension de *E. coli* en phase exponentielle, obtenue tel que décrit à la section 1, a été ajoutée à la viande de façon à avoir une concentration finale de  $10^7$  cellules bactériennes par gramme de viande. Le tout a été mélangé pendant 1 minute au robot culinaire de façon à assurer une répartition uniforme des cellules dans la viande.

#### 10.4 Préparation des pastilles de jambon et traitement thermique

La viande a été déposée dans des pastilles de plastiques SampleCups (Decagon Devices inc, Long-Sault, Ont, Canada) à raison de 25 g de viande par pastille. Les pastilles ont ensuite été plongées dans un bain d'eau préchauffé à 50°C pendant diverses périodes de temps. La température à l'intérieur de la pastille a été notée à toutes les minutes (le temps zéro étant équivalent au moment où la température atteint 50°C) à l'aide d'un thermomètre thermocouple (Digi-Sense, Barnant Co.) de façon à pouvoir calculer la valeur pasteurisatrice associée au traitement thermique imposé aux cellules. Après le traitement, les pastilles ont été refroidies dans un bain de glace jusqu'à ce que la température atteigne 37°C. Un échantillon de 25 g de viande a été homogénéisé dans un Stomacher (Lab blender 400, Seward medical, London, UK) pendant 2 minutes à vitesse moyenne avec 225 ml d'eau peptonée (Bacto®Peptone; Difco Laboratories Inc) dans un sac de plastique avec filtre (VWR Scientific Inc, Ville Mont Royal, Qc, Canada). La portion liquide a été récupérée et a été centrifugée à 13 000 x g pendant 15 minutes à 4°C. Le culot a été lavé deux fois avec du tampon phosphate de sodium 0.1M pH 7.0. Suite au lavage final, le culot a été resuspendu dans 50 ml du même tampon. La sonication et le dosage de la DnaK ont été effectués tel que décrit respectivement dans les sections 4.2 et 3 du présent chapitre.

## CHAPITRE 3

### RÉSULTATS

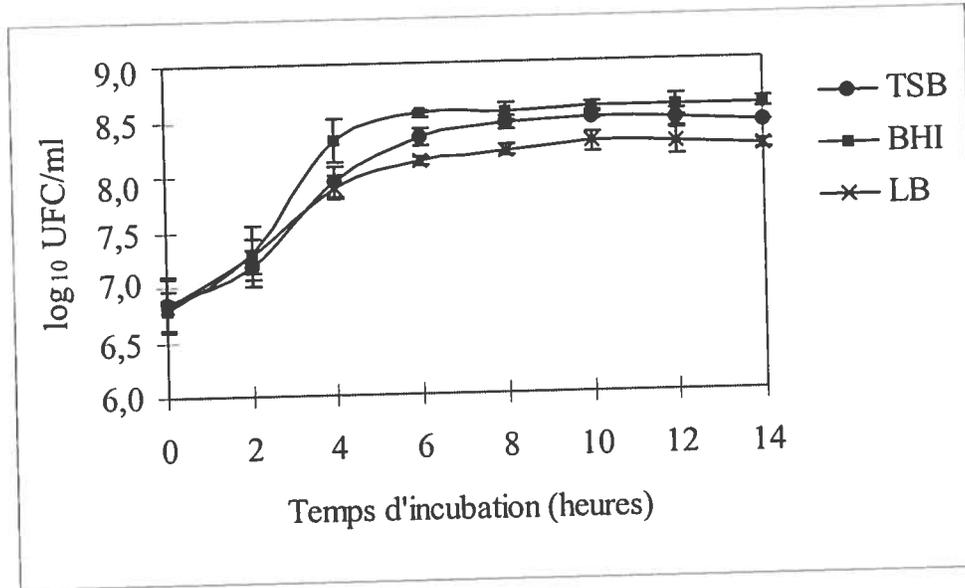
#### 1. Sélection du bouillon de culture approprié

Une étude comparative de la croissance de *E. coli* ATCC 25922 dans différents bouillons de culture (BHI, TBS et LB) a été effectuée afin de déterminer le milieu permettant d'obtenir une concentration maximale de cellules. En s'assurant d'une croissance optimale, on facilitera le dosage initial de la DnaK intracellulaire.

Les concentrations cellulaires observées tout au long de la croissance dans les différents milieux de culture sont similaires. Les concentrations cellulaires après 6 heures de croissance à 37°C étaient de l'ordre de  $10^8$  cellules/ml (figure 4A). En suivant la densité optique à 600nm en fonction du temps d'incubation, les résultats obtenus démontrent que la croissance de *E. coli* ATCC 25922 dans le bouillon de culture BHI donne les courbes de croissance se rapprochant le plus des courbes standards présentées dans la littérature, où les phases de latence, exponentielle et stationnaire sont bien définies (Pelczar, Chan et Krieg, 1993). Comme la densité optique est utilisée pour

déterminer le temps auquel la phase exponentielle est atteinte lors des expérimentations, le choix du bouillon de culture s'est arrêté sur BHI (figure 4B).

A



B

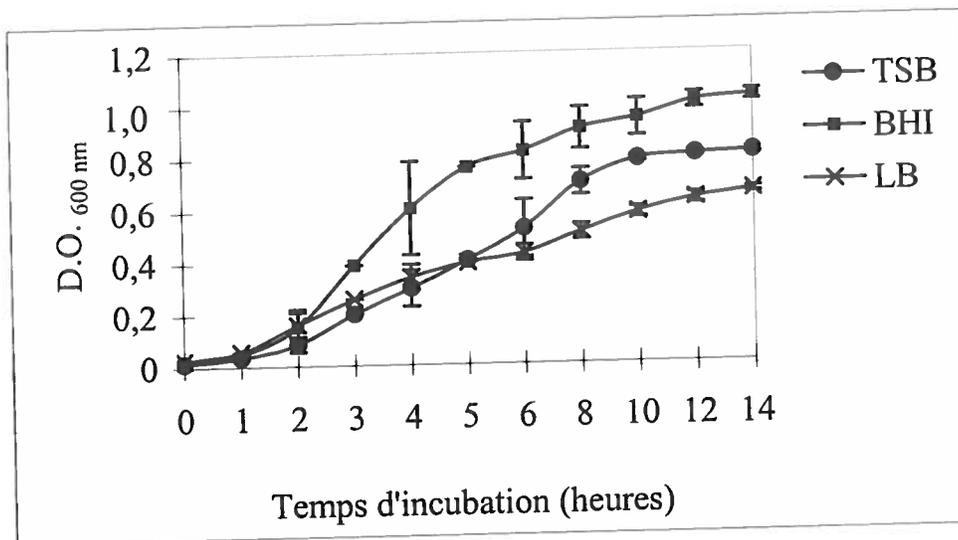


Figure 3. Comparaison de la croissance de *E. coli* ATCC 25922 dans les bouillons de culture TBS, BHI et LB, à l'aide du dénombrement cellulaire sur milieu gélosé (A) et de la densité optique (B). Les expériences ont été répétées 3 fois. Les barres représentent les écarts-type.

## 2. Validation de la méthode ELISA pour le dosage de la DnaK

La production de DnaK intracellulaire a été analysée à l'aide d'une culture bactérienne incubée à 30, 37 et 42°C jusqu'à l'obtention d'une densité optique de 0.5. Les données ainsi recueillies ont été comparées avec celles retrouvées dans la littérature (tableau 1). Le pourcentage de DnaK par rapport aux protéines totales, aux trois températures de références, démontrent que la technique de dosage par ELISA développée permet d'obtenir des résultats qui correspondent à ceux cités dans la littérature (Herendeen, VanBogelen et Neidhardt, 1979) (tableau 1).

Tableau 1. Concentrations intracellulaires de DnaK chez *E. coli* ATCC 25922, suite à une incubation en bouillon BHI à différentes températures jusqu'à l'obtention d'une D.O. de 0.5. Les expériences ont été répétées 3 fois.

Température (°C)	DnaK/cellule <sup>a</sup> (molécules)	DnaK/protéines totales <sup>b</sup> (%)	
		Valeurs expérimentales	Valeurs citées dans la littérature <sup>c</sup>
30	19000 ± 3000	0,63 ± 0,07	0,66
37	38500 ± 6000	0,98 ± 0,11	1,00
42	103000 ± 14000	1,60 ± 0,32	1,42

<sup>a</sup> calcul effectué sur le nombre de cellules initiales (voir appendice C)

<sup>b</sup> les protéines totales sont dosées à l'aide de la trousse BCA de Pierce suite à une étape de sonication

<sup>c</sup> Herendeen, VanBogelen et Neidhardt, 1979

Toutefois, bien que les ratios DnaK/protéines totales soient comparables aux données publiées dans la littérature, il en est autrement lorsque les résultats sont exprimés en molécules de DnaK/cellule. En effet, les calculs effectués avec les données expérimentales donnent un résultat de 38500 molécules de DnaK par cellule, alors que la littérature cite plutôt une concentration de 5000 molécules par cellule lorsque *E. coli* est incubé à 37°C (Neidhardt et VanBogelen, 1987). L'effet relié à la souche et au milieu de

culture utilisé, ont donc été analysés afin de quantifier leur influence sur la production de DnaK. Les résultats présentés au tableau 2 démontrent que la nature du bouillon de culture ne semble pas influencer de façon significative la production de DnaK, alors que cette production est nettement différente d'une souche à l'autre. En effet, les concentrations dosées chez la souche CRDAV451 sont moindres que celles retrouvées chez la souche ATCC 25922 (tableau 2).

Tableau 2. Concentration de DnaK/cellule détectée suite à la croissance à 37°C de différentes souches de *E. coli* dans divers milieux de cultures. Les expériences ont été répétées 3 fois.

Souches et milieux utilisés	Molécules de DnaK/cellule
ATCC 25922/BHI	38500 ± 6000
ATCC 25922/LB	40000 ± 6700
CRDAV 451/BHI	22000 ± 4400

### 3. Concentration intracellulaire de DnaK suite à un traitement thermique

Théoriquement, pour une même valeur pasteurisatrice ( $PV_{T^{\circ}C}$ ), calculée pour des valeurs de  $D_T$  et de  $z$  prédéterminées, l'effet bactéricide du traitement thermique sur les microorganismes devrait être identique. Il est donc possible de calculer et de reproduire, pour différentes températures visées, des profils de traitements thermiques qui auront un effet bactéricide similaire, indépendamment de la température à atteindre au cœur du produit. Le tableau 3 indique le temps nécessaire pour obtenir diverses valeurs pasteurisatrices à différentes températures de traitement (50, 55, 60 et 70°C). On remarque que pour obtenir une valeur pasteurisatrice équivalente, il faut toujours un temps de traitement plus long pour des températures moins élevées.

Tableau 3. Temps nécessaire pour atteindre des valeurs pasteurisatrices de 0.5, 1, 3 et 5, à des températures de 50, 55, 60 et 70°C.

PV <sub>70</sub> <sup>10</sup>	50°C (min)	55°C (min)	60°C (min)	70°C (min)
0.5	50	15	ND <sup>a</sup>	ND
1.0	105	35	ND	ND
3.0	285	105	ND	ND
5.0	480	150	50	10

<sup>a</sup> Non déterminé

Afin de s'assurer qu'aucune DnaK n'a été relarguée dans le surnageant suite à une lyse cellulaire lors des traitements thermiques, un dosage de la chaperonine a été effectué à partir du surnageant après chaque étape menant à la sonication; les analyses ont été effectuées à 37, 50, 55 et 60°C. Aucune DnaK n'a été détectée dans le surnageant avant l'étape de la sonication (limite de détection  $\leq 156$  ng/ml). Ainsi, les pertes extracellulaires sont négligeables par rapport aux quantités intracellulaires dosées.

Lorsqu'un traitement thermique à une valeur pasteurisatrice de 5 était effectué à 60 ou 70°C, aucune DnaK n'était dosée. Étant donné que les valeurs pasteurisatrices partielles correspondant à des températures de 60 et 70°C, sont équivalente à 0.1 et 1 respectivement, il est difficile d'obtenir des valeurs pasteurisatrices totales plus faibles, puisqu'il faudrait que la suspension atteigne de façon instantanée ces températures (voir Annexe B pour plus de détails sur le calcul des valeurs pasteurisatrices totales).

Lorsque les cellules sont soumises à un choc thermique à des températures de 50 et 55°C, une hausse importante des concentrations cellulaires de DnaK a été observée par rapport à la concentration normalement trouvée à une température de croissance optimum, soit 38500 molécules de DnaK/cellule (figure 5). En effet, la quantité de DnaK dosée à une valeur pasteurisatrice de 0.5 double à une température de 50°C, et triple lors d'une exposition à 55°C comparativement aux conditions optimales de croissance. La

concentration de DnaK augmente donc pour atteindre un taux d'expression maximal, qui est situé à des valeurs pasteurisatrices différentes selon la température à laquelle a été effectué le traitement. En effet, le taux de production optimal de DnaK à 50°C est atteint à une valeur pasteurisatrice de 1, soit 217000 molécules de DnaK/cellule, alors que le maximum de DnaK dosée à 55°C est obtenu à une valeur pasteurisatrice de 0.5, soit 98000 molécules/cellules

Par la suite, en fonction de la sévérité du traitement thermique imposé, les concentrations de DnaK/cellule diminuent. À 50°C, les concentrations en DnaK diminuent graduellement en passant de 217000 molécules à 156000, puis à 167000 molécules/cellule à une valeur pasteurisatrice de 1, 3 et 5, respectivement. À 55°C, l'inhibition de la synthèse de la DnaK est plus rapide puisque sa concentration chute de 98000 à 24 000 molécules/cellule, une diminution d'environ 77% lorsque la valeur pasteurisatrice passe de 0.5 à 1 respectivement. À une valeur pasteurisatrice de 3, à peine 10000 molécules sont dosées, comparativement à la concentration trouvée à une température de croissance optimum, soit 38500 molécules de DnaK/cellule, alors qu'à une valeur pasteurisatrice de 5, la quantité de DnaK par cellule se retrouve en dessous de la limite de détection du test ELISA ( $\leq 156$  ng/ml).

Ainsi, pour des valeurs pasteurisatrices identiques, la concentration intracellulaire de DnaK n'est pas semblable. En effet, peu importe le traitement subi par les cellules, les concentrations de DnaK obtenues à 55°C sont inférieures à celles observées à 50°C, pour une même valeur pasteurisatrice de 0.5. La réponse de *E. coli* ATCC 25922 à un traitement thermique est donc différente pour une valeur pasteurisatrice identique, à des températures de traitement situées entre 50 et 60°C, puisque les concentrations en DnaK varient en fonction de la température choisie pour le traitement.

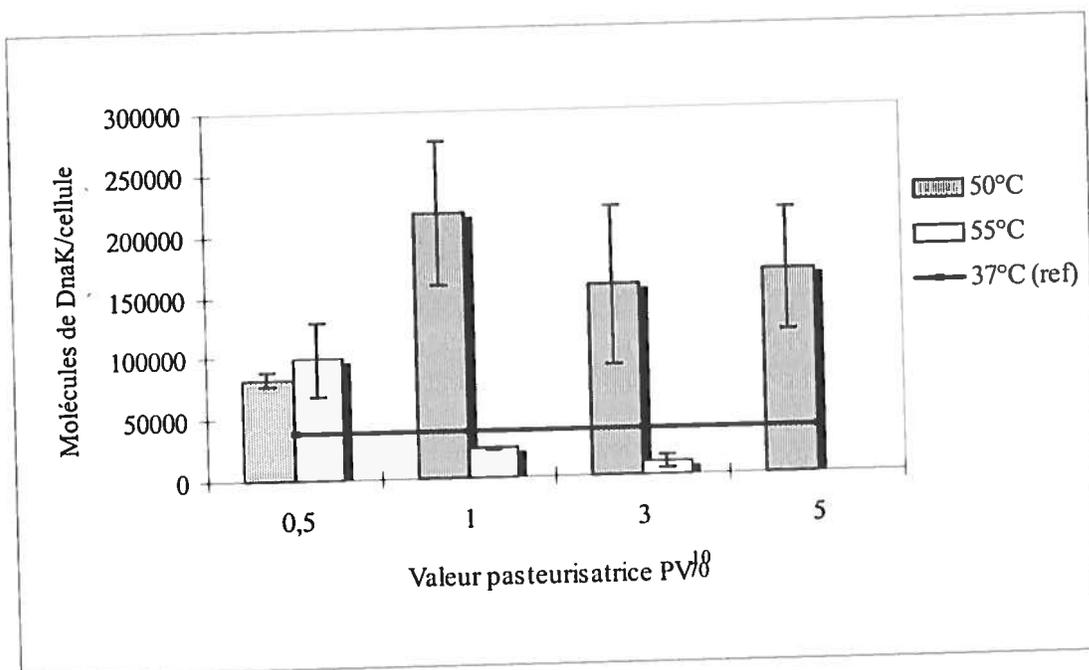


Figure 4. Concentration intracellulaire en DnaK provenant des cellules exposées à différentes valeurs pasteurisatrices. Les concentrations ont été calculées en fonction du nombre de cellules dénombrées avant le traitement. La ligne horizontale indique le niveau de DnaK retrouvé dans les cellules lors d'une incubation à 37°C, soit 38500 molécules/cellule. Les expériences ont été répétées 3 fois. Les barres représentent les écarts-type.

De façon générale, la quantité de DnaK dosée par cellule diminue lorsque les concentrations de cellules viables diminuent sous l'effet des traitements thermiques; les traitements thermiques effectués à 55°C donnent des comptes cellulaires et des concentrations en DnaK plus bas que ceux obtenus à 50°C à l'exception des concentrations de DnaK observées à 50°C à une valeur pasteurisatrice de 0.5 (figure 6). Dans la portion du graphique correspondant aux résultats obtenus à une température de 50°C, on observe que la concentration de DnaK associée à une densité cellulaire de 7.88  $\log_{10}$  UFC/ml, soit 82000 molécules de DnaK/cellule, est nettement inférieure à celle observée à 7.1, 7.6 et 7.9  $\log_{10}$  UFC/ml (concentrations supérieures à 100000 molécules/cellule). Ainsi, la sévérité du traitement imposé à une valeur pasteurisatrice de 0.5 semble moindre que celle subit par les cellules à une valeur pasteurisatrice de 1, 3 ou 5,

puisque la concentration intracellulaire de DnaK est inférieure pour un nombre de cellules viables équivalent.

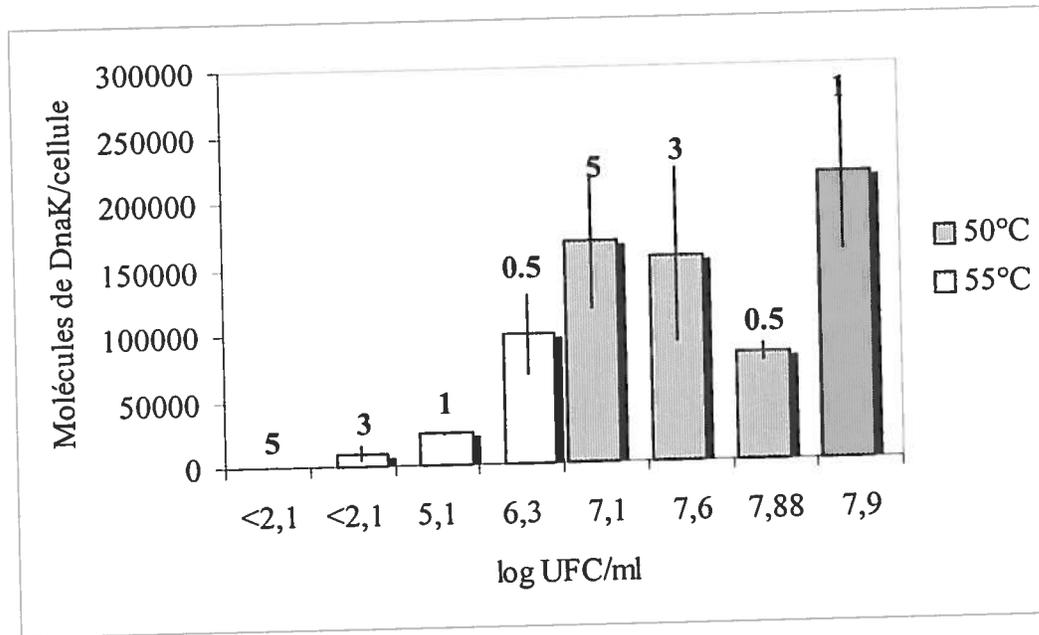


Figure 5. Corrélation entre le nombre de cellules viables et la concentration de DnaK dosées après divers traitements thermiques. Les nombres en caractère gras au-dessus des colonnes correspondent à la valeur pasteurisatrice des traitements. Les expériences ont été répétées 3 fois. Les barres représentent les écarts-type.

Lors des traitements thermiques effectués à 55°C, les comptes cellulaires diminuent plus rapidement en fonction de la sévérité des traitements auxquels sont exposées les cellules comparativement à des valeurs pasteurisatrices équivalentes obtenues à 50°C. De plus, bien que la densité cellulaire à 55°C soit inférieure aux limites de détection ( $\leq 2.7 \log_{10}$  UFC/ml) à une valeur pasteurisatrice de 3, on détecte 10000 molécules de DnaK/cellule alors qu'aucune DnaK n'est détectée à une valeur pasteurisatrice de 5.

#### 4. Adaptation de la cellule suite à un traitement thermique

Les observations faites à 55°C pour une valeur pasteurisatrice de 3 (figure 6), indiquent une concentration de DnaK de 10000 molécules/cellule immédiatement après le traitement thermique, et des comptes cellulaires inférieurs à 2.7 log<sub>10</sub> UFC/ml. De même, pour une valeur pasteurisatrice de 5 effectuée à 55°C, la concentration en DnaK et les comptes cellulaires étaient inférieurs aux limites de détection. Des expériences de récupération post-traitement ont été effectuées à 37°C afin de déterminer si la présence de DnaK n'était pas un indice de la survie des cellules traitées. Dans ce genre d'expérience, le dénombrement cellulaire a été effectué sur gélose (limite de détection < 0.7 log<sub>10</sub> UFC/ml) et par une coloration différentielle (LIVE/DEAD *BacLight*) après des temps d'incubation de 0, 12 et 24 heures.

Lorsque les cellules étaient incubées pour des périodes de 12 et 24 heures à une température de 37°C, suite à un traitement thermique d'une valeur pasteurisatrice de 3 à 55°C, la concentration cellulaire en DnaK était, respectivement, 7 et 5 fois supérieure à celle obtenue immédiatement après le choc thermique (tableau 4). Parallèlement à cette hausse de l'expression de DnaK, on observe une reprise de la croissance des cellules bactériennes, telle qu'indiquée par le dénombrement sur milieu gélosé et par la coloration différentielle. Alors qu'aucune cellule n'a été dénombrée sur gélose après le traitement thermique, des densités cellulaires de l'ordre de 10<sup>4</sup> et 10<sup>8</sup> UFC/ml ont été observées après une période de récupération de 12 et 24 heures respectivement. Au temps zéro après traitement thermique, aucune cellule n'a été dénombrée sur gélose, alors qu'il est possible de dénombrer 79 cellules viables sur un total de 1000 cellules grâce à la coloration LIVE/DEAD *BacLight*.

Pour une valeur pasteurisatrice de 5, obtenue par un traitement à 55°C, les concentrations de DnaK dosées et les comptes cellulaires de *E. coli* sur milieu gélosé sont en dessous des limites de détection (tableau 4) immédiatement après le traitement thermique (< 0.7 log<sub>10</sub> UFC/ml) de même qu'après 12 et 24 heures d'incubation à 37°C. De plus, les résultats observés par microscopie à fluorescence démontrent également

l'absence de cellules viables. Les résultats de récupération post-traitement n'indiquent aucune reprise de croissance, et ce même après une période de récupération d'une durée de 7 jours à 37°C (résultats non-montrés). Ainsi, lorsque les concentrations cellulaires sont inférieures au seuil de détection ( $< 0.7 \log \text{ UFC/ml}$ ) mais que DnaK est présente après traitement thermique, il y a survie des cellules.

Tableau 4. Suivi de l'adaptation des cellules de *E. coli* ATCC 25922, suite à différents traitements thermiques, par dosage de DnaK, dénombrement cellulaire sur gélose et par microscopie à fluorescence. Les expériences ont été répétées au moins 2 fois.

Temps (heures)	$PV_{70}^{10} = 3$ (55°C, 105 min)				$PV_{70}^{10} = 5$ (55°C, 150 min)			
	Concentration en DnaK (mol./cellule)	Compte cellulaire ( $\log_{10}$ UFC/ml)	Microscopie à fluorescence		Concentration en DnaK (mol./cellule)	Compte cellulaire ( $\log_{10}$ UFC/ml)	Microscopie à fluorescence	
			cellules vivantes	cellules mortes			cellules vivantes	cellules mortes
0	10000	$< 0,7$	79	921	$< 1500$	$< 0,7$	0	1000
12	71377	4,57	90	910	$< 1500$	$< 0,7$	0	1000
24	56443	8,29	577	423	$< 1500$	$< 0,7$	0	1000

### 5. Traitement thermique en milieu viande

Des expériences similaires ont été menées en milieu viande afin de comparer le comportement physiologique de *E. coli* par rapport aux résultats obtenus en bouillon de culture. Lorsque des pastilles de 25 grammes de jambon ont été traitées à 50°C pour une valeur pasteurisatrice de 1, la concentration en DnaK était inférieure à la limite de détection ( $< 156 \text{ ng/ml}$ ). Même en utilisant un sac à stomacker avec filtre lors de l'homogénéisation du jambon cuit, de façon à séparer les résidus de viande et les graisses de la suspension bactérienne à recueillir, il était impossible d'obtenir une suspension totalement exempte de ces deux contaminants. En effet, il était difficile d'obtenir un culot contenant uniquement des microorganismes lors des centrifugations, tel que démontré par

la présence de particules de viande sur les géloses lors des dénombrements cellulaires. Avant la sonication, en bouillon de culture et en milieu viande, les cellules récupérées lors de centrifugations ont été resuspendues dans du tampon de façon à obtenir une solution 4 fois plus concentrée. Lors de sonication des cellules suite à un traitement thermique en milieu viande,  $7.09 \log_{10}$ UFC/ml étaient dénombrées avant la lyse cellulaire et  $4.06 \log_{10}$ UFC/ml étaient encore viables après cette étape, ce qui est loin des résultats obtenus en bouillon de culture. En effet, moins de  $0.7 \log_{10}$ UFC/ml ont été dénombrées suite à une sonication de 30 minutes à une fréquence de 16,8 kilocycles. De plus, aucune protéine n'a été détectée en utilisant l'ensemble de dosage de protéines BCA, et aucune DnaK n'a été dosée suite à un traitement thermique en milieu de viande. Ainsi, l'efficacité de la sonication est différente en fonction de la matrice dans laquelle est effectuée l'expérimentation. La méthode de lyse cellulaire développée en bouillon de culture n'est donc pas directement transférable à un modèle expérimental réalisé dans une matrice de viande.

## CHAPITRE 4

### DISCUSSION

#### 1. Efficacité du test ELISA développé pour doser le biomarqueur sélectionné : DnaK

*E. coli* est un des microorganismes les mieux connus en ce qui à trait à la physiologie et la génomique bactérienne, en plus d'être l'un des procaryotes les plus étudiés dans le domaine de la microbiologie. Étant donné toutes les connaissances déjà acquises sur *E. coli*, particulièrement sur les mécanismes de réponse à différents stress environnementaux, le choix du microorganisme utilisé pour cette étude s'est arrêté sur *E. coli* plutôt que l'organisme de référence pour la pasteurisation, soit *E. faecalis*.

Afin d'évaluer l'efficacité des traitements thermiques sur la souche de *E. coli* ATCC 25922, en évitant d'utiliser les méthodes dites classiques de dénombrement cellulaire qui ne permettent pas de différencier les cellules blessées des cellules mortes, une protéine a été sélectionnée, parmi les protéines impliquées dans la réponse bactérienne au choc thermique, pour tenir le rôle de biomarqueur. Le facteur de transcription  $\sigma^{32}$  n'a pas été retenu, même si ce facteur tient un rôle central dans la

régulation de la réponse au choc thermique, parce qu'il est présent en concentrations relativement faibles lors de conditions optimales de croissance (10 à 30 molécules par cellule; Straus, Walter et Gross, 1987). Sigma 32 n'est donc pas un candidat idéal pour servir de biomarqueur de la sévérité des traitements thermiques puisqu'il n'est pas facilement dosable. L'utilisation des protéines DnaJ et GrpE, les co-chaperonines de la protéine DnaK, est aussi exclue. Bien que nécessaire au bon fonctionnement de DnaK, DnaJ est une protéine membranaire, donc plus difficile à extraire sans dénaturation, et elle n'est présente qu'en petite quantité dans la cellule. GrpE n'est pas non plus retenu comme biomarqueur étant donné sa faible concentration cellulaire lors de choc thermique ou lors de croissance optimale (Neidhardt et VanBogelen, 1987). La protéine du choc thermique DnaK a donc été préférée aux autres candidats présentés parce qu'elle tient un rôle important dans la régulation de la réponse au choc thermique, et que sa concentration varie en fonction de la température à laquelle sont exposées les cellules. De plus, elle est présente à des concentrations supérieures aux autres protéines du choc thermique, et ce autant dans les cellules en croissance optimale que dans celles subissant un stress induit par la chaleur, ce qui en facilite le dosage.

Le test ELISA mis au point pour la quantification des concentrations intracellulaires en DnaK, a donné des rapports DnaK/protéines totales très similaires à ceux cités dans la littérature pour des températures de 30, 37 et 42°C (tableau 1; Herendeen, VanBogelen et Neidhardt, 1979). Alors que les rapports DnaK/protéines totales concordent avec la littérature, les rapports molécules de DnaK/cellule observés chez *E. coli* ATCC 25922 étaient nettement supérieurs à ceux cités dans les ouvrages de référence (Neidhardt et VanBogelen, 1979). En utilisant une autre souche de *E. coli* (CRDAV 451), les résultats diffèrent de ce qui a été observé avec la souche ATCC 25922, alors que l'utilisation d'un bouillon de culture différent (LB) permet de recueillir des concentrations en DnaK similaires. Étant donné que les concentrations de DnaK ont varié en fonction des souches de *E. coli* utilisées (tableau 2), l'effet de la souche pourrait expliquer la différence avec les valeurs citées dans la littérature. Le fait que les valeurs obtenues soient nettement supérieures à celles citées dans la littérature pourrait également être expliqué par une meilleure sensibilité du test développé en comparaison aux autres

méthodes employées antérieurement pour doser les concentrations intracellulaires de DnaK, tel l'utilisation de marqueur radioactif (Herendeen, VanBogelen et Neidhardt, 1979), de SDS-Page ou d'immunoblotting (Tomoyasu et al., 1998). Le seuil de détection de notre test ELISA ( $\leq 156$  ng/ml) nous a permis de détecter des différences entre divers traitements (tableau 1, 2, 4 et figure 5, 6).

## 2. Efficacité des traitements thermiques pour contrôler *E. coli* ATCC 25922

La valeur pasteurisatrice ( $PV_{70}^{10}$ ) est un outil utilisé dans plusieurs pays européens afin d'assurer le contrôle des procédés de cuisson, des microorganismes pathogènes, et la réduction satisfaisante des microorganismes responsables de l'altération des aliments. Cet outil théorique permet de comparer divers traitements thermiques effectués à différentes combinaisons de temps-température, et de vérifier leur efficacité sur la destruction des cellules bactériennes. En théorie, l'effet inhibiteur de traitements thermiques différents est semblable lorsque les valeurs pasteurisatrices sont identiques, indépendamment des températures atteintes lors du traitement (Marcotte, 1993; Martin, 1984a). Pour tous les traitements thermiques supérieurs à 60°C, aucune croissance cellulaire n'a été observée sur milieu gélosé peu importe la valeur pasteurisatrice visée. Un traitement supérieur à 60°C semble donc suffisant pour contrôler *E. coli* ATCC 25922 dans les conditions d'analyse utilisées. Toutefois, à des températures situées entre 50 et 60°C, les observations obtenues en laboratoire ne concordent pas avec la notion théorique de valeur pasteurisatrice. En effet, pour une même valeur pasteurisatrice obtenue à des températures de traitement différentes, les comptes cellulaires étaient différents, ce qui indique que l'effet inhibiteur sur les cellules étaient différents selon la température de traitement visée (figure 6).

Les résultats obtenus en utilisant la DnaK comme indicateur de l'état physiologique des cellules abondent dans le même sens. Le plus grand écart obtenu entre les concentrations de cellules et de DnaK minimum et maximum observées lors de traitement à 50°C, se situe entre les valeurs pasteurisatrices de 0.5 et 1. Alors que la différence de concentration cellulaire était inférieure à 1 log (0.8 log), les concentrations

en DnaK étaient 3 fois plus élevées à une valeur pasteurisatrice de 1, comparativement à celles observées à 0.5 (figure 6). La concentration intracellulaire de DnaK a augmenté en fonction de la sévérité des traitements thermiques jusqu'à une concentration maximale, puis a diminué en fonction de la sévérité du traitement thermique et de la difficulté de la cellule de s'adapter au stress ainsi imposé. Il n'existe donc pas de corrélation linéaire entre les comptes cellulaires et les concentrations de DnaK observés après un traitement thermique à 50°C. Les concentrations en DnaK observées à 50°C à des valeurs pasteurisatrices situées entre 1 et 5 sont similaires et se situent au-dessus de la barre des 150000 molécules de DnaK/cellule (figure 5). Cela laisse croire que les cellules se sont adaptées à cette température en maintenant un taux élevé de DnaK et en apportant des changements au niveau de la synthèse des protéines qui vont lui permettre de conserver les protéines nécessaires aux activités métaboliques et à la division cellulaire.

Les comptes cellulaires et la production de DnaK chutent rapidement en fonction de la valeur pasteurisatrice et du temps d'exposition à 55°C pour se situer en dessous des seuils de détection à une valeur pasteurisatrice de 3 et 5 (tableau 2). Cela démontre que chez *E. coli* ATCC 25922, une diminution de croissance proportionnelle à l'élévation de la température est observée lorsque les cellules ont été exposées à des températures supérieures à 50°C. Tel que décrit par Herendeen, VanBogelen et Neidhardt (1979), cette diminution est attribuée au changement important dans la composition protéique que subit la cellule lors d'un traitement thermique. La concentration de plusieurs protéines augmente ou diminue durant la croissance à haute température. Les protéines généralement impliquées dans la transcription et la traduction sont présentes à des niveaux réduits lors de conditions de croissance restrictives. Celles impliquées dans le métabolisme énergétique, dans la réparation et l'élimination des protéines dénaturées ou affectées dans leur structure et leur fonction par les variations de température, sont présentes en plus grandes quantités comparativement à des conditions optimales de croissance. Ainsi, à des températures supérieures à 50°C, on assiste à une synthèse presque exclusive des protéines associées au choc thermique jusqu'à ce que la cellule ne soit plus apte à assurer sa survie par le mécanisme de réponse au choc thermique (Craig et Gross, 1991; Neidhardt, VanBogelen et Vaughn, 1984). Afin d'approfondir les

connaissances sur les concentrations de DnaK produites lors d'un choc thermique, il serait intéressant de ramener, lors d'expériences futures, la quantité de DnaK dosée sur la concentration en protéines totales pour démontrer que la DnaK est produite en plus grande proportion chez *E. coli* par rapport à l'ensemble des protéines.

Dans l'ensemble, les expériences ont permis de démontrer qu'il n'existe aucune corrélation linéaire entre les cellules dénombrées sur milieu gélosé et la quantité de DnaK par cellule. Il est donc impossible de déterminer le nombre de cellules viables en dosant la DnaK et vice versa. Toutefois, la présence de DnaK nous indique que la cellule est viable, et ce malgré l'absence de croissance sur gélose, tel que démontré par les résultats obtenus (tableau 4). En effet, l'absence de reprise de croissance sur milieu gélosé ou par coloration différentielle, après une période de 24 heures ou plus, concorde avec l'absence de DnaK. De plus, les résultats obtenus au niveau des comptes cellulaires et des concentrations de DnaK démontrent qu'une longue exposition à une basse température tend à mieux favoriser l'adaptation des cellules comparativement à une exposition à haute température pour une courte période de temps. *E. coli* semble donc résister plus longtemps à des températures de 50°C puisque la bactérie est apte à produire des protéines de stress nécessaires à sa survie en concentrations supérieures à celles retrouvées à 55°C pour une même valeur pasteurisatrice.

Les résultats obtenus en bouillon de culture ont été difficiles à reproduire dans une matrice de viande. En effet, l'isolement des microorganismes ciblés à partir de la matrice s'est avéré une étape délicate puisque les particules de graisse et les protéines entourant la cellule rendent difficile la récupération des cellules bactériennes lors de la centrifugation. De plus, la lyse des cellules par sonication semble moins efficace en présence de résidus de viande, puisqu'il y a encore des cellules viables dénombrées pour des temps de sonication habituellement suffisant pour la lyse cellulaire en bouillon de culture. Ainsi, de plus amples recherches sont nécessaires au sujet des différentes méthodes de désintégration cellulaire existantes afin de solutionner cette problématique.

### 3. Adaptation et résistance des cellules de *E. coli* à différents traitements thermiques

Au cours des expérimentations, alors qu'aucune cellule n'était dénombrée sur milieu gélosé immédiatement après un traitement thermique à 55°C d'une valeur pasteurisatrice de 3 ( $< 2,1 \log_{10}$  UFC/ml), DnaK a été dosée dans les cellules soumises à une lyse cellulaire par sonication après traitement thermique (figure 6). La théorie selon laquelle une cellule incapable de croître sur milieu gélosé est une cellule qui a perdu toute viabilité (Bogosian, 1998) est ainsi contredite par la présence de DnaK et de cellules viables fluorescentes. Les cellules de *E. coli* ont été incubées pendant différentes périodes de temps à 37°C (12 à 24 heures) de façon à favoriser la croissance des cellules s'étant adapter aux nouvelles conditions environnementales. Suite à cette période de récupération, aucune reprise de croissance n'était observée lorsqu'il y avait absence de DnaK immédiatement après traitement thermique (tableau 4). Toutefois, une reprise de croissance des cellules bactériennes était observée lorsque DnaK était présente immédiatement après traitement thermique. Les cellules atteignent alors des concentrations de l'ordre de  $10^8$  UFC/ml en 24 heures. Dans cette étude, la coloration différentielle des cellules via la microscopie à fluorescence s'est avérée plus appropriée que le dénombrement cellulaire pour évaluer la viabilité de *E. coli* immédiatement après un traitement thermique. En effet, alors qu'aucune cellule n'était dénombrée sur milieu gélosé, une observation en microscopie à fluorescence indiquait toujours qu'un certain pourcentage de la population était viable (tableau 4).

Les études antérieures sur la réponse au stress chez *E. coli*, lors d'un passage à une température d'incubation de 30 à 42°C, ont démontré une augmentation des concentrations de DnaK intracellulaires. Cette augmentation de la concentration de DnaK a été l'une des premières évidences confirmant l'importance de DnaK dans la réponse au choc thermique. Par la suite, son rôle dans la réparation et la réactivation des protéines endommagées suite à un choc thermique a été démontré (Rüdiger, Buchberger et Bukau, 1997). Ainsi, plus le choc thermique est grand, plus les dommages sont importants, plus les protéines capables d'intervenir dans la réparation des protéines sont nécessaires au bon fonctionnement de la cellule. Ces mêmes études stipulent qu'une fois les dommages

réparés, les concentrations en DnaK, qui n'est plus nécessaire en absence de stress, diminuent et retournent à des niveaux se rapprochant de ce qui est observé à 37°C suite à une régulation négative du mécanisme de réponse au choc thermique (Arsene, Tomoyasu et Bukau, 2000). Dans la présente étude, il a été possible de démontrer que les concentrations de DnaK, dosées à des temps 12 et 24 heures après la fin du traitement thermique, sont nettement supérieures à ce qui est observé à 37°C, et immédiatement après un traitement thermique. Le fait de conserver des concentrations supérieures de DnaK alors que les cellules croissent dans des conditions optimales semble démontrer que la cellule survivant à un traitement thermique sous létal garde en mémoire le stress qu'elle a subi et transfère cette mémoire d'une génération à l'autre. C'est comme si les cellules de *E. coli* se maintenaient prêtes à réagir rapidement dans l'éventualité où le stress se répéterait. Les résultats obtenus tendent donc à démontrer que, immédiatement après un traitement thermique, la présence de DnaK, au-delà du seuil de détection du test ELISA, est un indicateur plus approprié que le dénombrement cellulaire de la capacité de la cellule à survivre et à s'adapter suite à un traitement thermique important, d'où l'importance de faire des études de suivi dans le temps pour établir l'efficacité et la vie de tablette des produits.

Suite à la démonstration du fait que les concentrations en DnaK demeurent élevées même après 24 heures d'incubation à 37°C et que la mémoire du stress semble se transmettre d'une génération à l'autre, on peut supposer que la présence de DnaK en concentrations aussi importantes prépare la cellule à réagir plus efficacement à un autre stress et la rend ainsi plus résistante. De fait, les travaux de Foster sur la tolérance au stress acide chez *Salmonella typhimurium* en 1990 et 1993, ont démontré que ce sont les protéines impliquées dans le choc acide sous létal qui conféraient à la cellule une meilleure résistance à un autre stress plus important. Étant donné que le mécanisme de réponse au stress thermique peut aussi être déclenché chez *E. coli* par l'éthanol ou les ultra-violets (Travers et Mace, 1982; Krueger et Walker, 1984), une pré-exposition à un de ces agents, induisant la production de DnaK, pourrait conférer une résistance supérieure de *E. coli* aux traitements thermiques. En effet, la présence de DnaK en concentration supérieure fait en sorte que la cellule est déjà prête à réagir à un autre stress

et s'y adapte de façon plus efficace, tel que le démontre le phénomène des protections croisées. En effet, lors de protections croisées, une adaptation au stress causée par une exposition à des agents chimiques ou physiques antimicrobiens permet à la microflore de mieux résister à un second stress chimiques ou physiques, étant donné l'induction de mécanismes d'adaptation (Lemay et al., 2000).

Il serait donc intéressant d'étudier la résistance de *E. coli* aux traitements thermiques létaux, suite à un pré-traitement des cellules dans des conditions non létales induisant une grande concentration de DnaK. Ce type d'expérience pourrait déterminer s'il est possible de favoriser l'adaptation des cellules au stress thermique par la présence d'importantes quantités de DnaK à l'état libre dans la cellule, prêtes à intervenir rapidement pour tenir leur rôle de chaperonine et réparer les dommages cellulaires engendrés par une hausse de température.

#### 4. Impact des résultats dans un contexte industriel

Les paramètres régissant les cycles de cuisson actuellement utilisés au Canada ont été développés initialement par l'industrie, et ont été établis sur les connaissances acquises au fil du temps (Marcotte, 1993). Il serait pratiquement impossible de régir de façon universelle l'ensemble des produits carnés étant donné la variété des matières premières et des procédés de transformations utilisés. Plusieurs institutions canadiennes, comme le ministère d'Agriculture et Agro-alimentaire Canada, l'Agence Canadienne d'Inspection des Aliments et le Bureau des Dangers Microbiens du ministère de la Santé et du Bien être Social Canada dictent des directives que l'industrie est tenue de suivre. En fait, les directives se résument ainsi : les traitements thermiques appliqués lors de la cuisson des produits de la viande doivent être suffisants pour assurer la destruction de toute forme végétative de germes pathogènes. Pour ce faire, les produits et sous produits de la viande doivent être soumis à une cuisson de 69°C à coeur ou à un traitement de 60°C à cœur pendant une période de temps suffisamment longue pour contrôler la flore pathogène (Agence Canadienne d'Inspection des Aliments, 2000). Chaque industrie est responsable de définir les conditions lui permettant d'atteindre cet objectif et d'assurer la

mise en marché de produits propres à la consommation. Ces directives gouvernementales soumises aux industries, en ce qui concerne les températures à atteindre au cœur du produit, ne permettent pas de mettre en évidence l'effet de destruction des microorganismes obtenus par le traitement thermique puisqu'aucune limite n'est spécifiée au sujet des espèces et des concentrations microbiennes limites tolérées (Marcotte, 1993).

Au Canada, la valeur pasteurisatrice n'est pas utilisée en industrie comme outil de comparaison des différents traitements thermiques. L'information recueillie au cours de cette étude suggère que les valeurs pasteurisatrices ont une efficacité maximale sur les microorganismes uniquement à des températures de traitement supérieures à celles représentant la zone d'adaptation (50-60°). Il faudrait donc passer le plus rapidement possible à des températures supérieures à 60°C et réduire au maximum les périodes dans le cycle de cuisson où les produits carnés se trouvent entre 50 et 60°C puisque c'est à ces températures que la résistance de *E. coli* au stress thermique semble se développer. En effet, c'est à ces températures que la cellule produit en plus ou moins grande quantité les protéines du choc thermique responsables de la survie des cellules ce qui permet à la cellule de s'adapter et de se reproduire suite à une période de récupération (figure 5, tableau 4). Il est important de spécifier que les conclusions tirées au sujet des zones d'adaptation de la cellule aux traitements thermiques sont basées sur une étude faite avec *E. coli*, dont l'absence est utilisée en industrie comme indice d'hygiène. Il aurait été plus approprié d'utiliser *E. faecalis*, le microorganisme de référence pour la cuisson/pasteurisation (Marcotte, 1993; Martin, 1984a) pour mener cette étude, mais les mécanismes de réponse au stress thermique de ce dernier sont encore mal connus. De plus, comme la souche semble avoir une influence sur la réponse au stress thermique, il est difficile d'appliquer ces conclusions à l'ensemble des souches de *E. coli*, et encore moins pour la souche O157:H7, très différente physiologiquement des souches non-enterohémorragiques.

Les observations recueillies dans cette étude indiquent que le test ELISA pour doser DnaK ne peut pas être employé en fin de cuisson pour évaluer l'efficacité des traitements thermiques puisque les températures observées en industries et la durée des

cuissons en fumoir sont nettement supérieures aux valeurs qui ont été utilisées au cours de cette étude. En effet, il a été possible de démontrer que les traitements thermiques effectués à des températures supérieures à 60°C assurent la destruction des microorganismes. Toutefois, cette technique est un outil permettant de déterminer les zones dans le cycle de cuisson où l'adaptation des cellules est favorisée, soit lors de courtes périodes de cuisson ou lors de cuisson à des températures inférieures à 60°C. Ainsi, il serait possible d'obtenir des informations pertinentes concernant l'efficacité des cuissons utilisées dans les restaurants à service rapide, par exemple. En connaissant ces zones critiques, il sera possible d'assurer une meilleure évaluation du risque microbiologique en minimisant le temps passé dans cet intervalle de température au cours des cuissons et en développant des profils de cuisson plus efficaces pour contrôler les microorganismes ciblés et assurer l'innocuité des produits carnés transformés. De plus, une meilleure compréhension de la réponse physiologique favorisant la survie des cellules face à différents stress environnementaux permettrait de contrer l'adaptation et la résistance des microorganismes aux stress, et par le fait même d'assurer un contrôle plus efficace des microorganismes.

## CHAPITRE 5

### CONCLUSION

En utilisant le test ELISA pour détecter la protéine du choc thermique DnaK, il a été possible d'observer le comportement de *E. coli* ATCC 25922 face à différents traitements thermiques, de mieux comprendre et d'approfondir le mécanisme de réponse au choc thermique chez ce microorganisme. De plus, il a été possible de démontrer l'importance de poursuivre ce type de recherche fondamentale puisque les phénomènes de stress et les mécanismes de réponses qu'ils engendrent peuvent également avoir des applications pratiques. En effet, le rôle, le mode d'action et l'impact des protéines de stress sur l'efficacité des systèmes antimicrobiens physiques et chimiques (froid, chaleur, osmose, pH, nitrite, oxydation, etc) utilisés dans l'industrie alimentaire est encore mal connu.

Jusqu'à maintenant, il a été possible de reconfirmer que l'absence de croissance de *E. coli* sur un milieu gélosé n'est pas un bon indicateur de la mortalité des cellules et, par conséquent, de l'efficacité du système antimicrobien à l'étude. En effet, la présence de DnaK et la coloration différentielle par fluorescence se sont avérées des méthodes

permettant une meilleure évaluation de la condition physiologique de *E. coli* après un stress telle une exposition à de hautes températures.

Les expériences ont aussi permis de démontrer qu'à des températures inférieures à 60°C, des valeurs pasteurisatrices identiques ont des effets inhibiteurs différents chez *E. coli*. Les différences notées dans l'état physiologique des cellules sont représentées par les concentrations variables en DnaK dosées après des traitements similaires (*i.e.*, même valeur pasteurisatrice). De plus, une concentration intracellulaire élevée en DnaK suggère une meilleure capacité d'adaptation des cellules puisqu'une reprise de croissance des cellules est observée en moins de 12 heures lorsque DnaK est dosée immédiatement après un traitement thermique. Dans le même sens, il semble que la mémoire du stress se transmette d'une génération cellulaire à l'autre puisque les concentrations en DnaK demeurent élevées après plus de 24 heures d'incubation dans des conditions optimales de croissance. Ainsi, la cellule semble prête à réagir plus efficacement à un autre stress, ce qui pourrait mener à des phénomènes de protection croisée.

L'utilisation de DnaK comme indicateur de la viabilité des cellules de *E. coli* ATCC 25922 suite à différents traitements thermiques a été étudiée dans un modèle liquide dont les propriétés sont extrêmement différentes de celles retrouvées dans un système de viande. En effet, dans un bouillon de culture, les transferts de chaleur y sont rapides. Les muscles et la graisse protègent jusqu'à un certain point les microorganismes étant donné que les transferts de chaleur y sont plus lent et permettent à la cellule de s'adapter plus facilement aux nouvelles conditions environnementales. L'utilisation de DnaK comme biomarqueur de l'efficacité des traitements thermiques a été étudiée dans une matrice de viande, toutefois la méthode de désintégration des cellules bactériennes employées devront être modifiées afin de permettre la récupération des protéines intracellulaires.

L'ensemble des connaissances fondamentales recueillies sur la réponse au stress thermique chez *E. coli* suggère que DnaK pourrait être utilisé comme outil permettant de développer de nouvelles stratégies de cuisson dans l'industrie alimentaire afin de mieux

contrôler la microflore lors de traitements thermiques. Toutefois, de plus amples recherches devront être menées avant que l'on puisse prétendre avoir un impact sur la réglementation actuelle.

Il serait intéressant d'étudier la réponse au stress thermique chez *E. faecalis* puisqu'il est le microorganisme de référence pour évaluer l'effet de destruction des différents traitements thermiques en raison de sa thermotolérance supérieure à celle de l'ensemble des microorganismes pathogènes ou responsables de l'altération des aliments à une température de 69°C (Marcotte, 1993; Reichert, Bremke et Baumgart, 1979). Il serait aussi intéressant d'étudier le comportement de microorganismes pathogènes tels *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* et *Listeria monocytogenes* puisque ces microorganismes peuvent avoir des aptitudes différentes face à l'adaptation au choc thermique. Les informations recueillies pourraient éventuellement donner naissance à l'établissement de nouvelles directives menant à une meilleure efficacité des traitements utilisés en industrie, permettant par le fait même d'améliorer la salubrité et l'innocuité des produits carnés.

APPENDICE A

CONCEPT DE LA VALEUR PASTEURISATRICE

Pour le calcul de la valeur pasteurisatrice d'un cycle de cuisson, ou traitement thermique, plusieurs facteurs doivent être pris en considération, dont la température de référence, le microorganisme de référence ainsi que les valeurs  $D_T$  et  $z$  de ce microorganisme. Dans le cas de cuisson de produits carnés, la température de référence est de 70°C et le microorganisme de référence est *Enterococcus faecalis*. Ce microorganisme est caractérisé par un  $D_{70^\circ\text{C}}$  de 2.95 minutes et un  $z = 10^\circ\text{C}$  (Reichert et al. 1979). Concrètement, la valeur de  $D_{70^\circ\text{C}}$  indique que pour diviser par 10 la population de *E. faecalis* lors d'une exposition à une température de 70°C, il faut 2.95 minutes. Pour ce qui est de la valeur de  $z$ , elle indique qu'une augmentation ou diminution de 10°C permet de multiplier ou diviser la valeur de  $D$  par 10. Ainsi, s'il faut 2.95 minutes pour diviser la population de *E. faecalis* par 10 à 70°C, il en faut 29.5 minutes lors d'une exposition à 60°C ou encore 0.295 minutes à 80°C pour obtenir le même résultat. À partir de ces critères microbiologiques, il est possible de mettre en place un barème de cuisson basé sur la valeur pasteurisatrice du traitement thermique.

Dans un premier temps, il faut définir la valeur pasteurisatrice minimale ( $P_0$ ) à obtenir en fin de cuisson. La valeur pasteurisatrice minimale est définie comme le temps  $t$

$$t = n \times D$$

permettant d'obtenir le taux de destruction ( $n$ ) désiré à la température de référence. Le taux de destruction dépend des valeurs de la population microbienne initiale ( $N_0$ ) et de la population finale désirée ( $N_1$ ).

Si, par exemple, le nombre de microorganismes initiaux dans le produit est de l'ordre de  $10^7$  microorganismes par gramme de viande et que l'on vise un maximum de 1 microorganisme par  $10^6$  grammes de jambon au cœur du produit après cuisson, dans ce cas,

$$\begin{aligned} n &= \log N_0 - \log N_1 \\ &= \log 10^7 - \log 10^{-6} \\ &= 13 \end{aligned}$$

Pour assurer au produit une période de conservation satisfaisante, il faudrait que la température au centre du produit reste pendant 38.35 minutes à 70°C pour obtenir un taux de destruction  $n = 13$

$$(P_o = n \times D_{70^\circ\text{C}} = 13 \times 2.95 = 38.35)$$

Cependant, il n'est pas possible d'obtenir instantanément cette température de 70°C au centre du produit durant la montée en température, ni de la faire chuter au bout de 38.35 minutes lors de la phase de refroidissement. Étant donné que chaque température à cœur a un effet au niveau de la destruction des microorganismes présent dans le produit, il faut tenir compte, non seulement de la phase de chauffage, mais aussi de la phase de refroidissement. La valeur pasteurisatrice partielle ( $P_p$ ) permet de calculer la valeur pasteurisatrice totale obtenue en fin de cuisson après refroidissement. Le temps de pasteurisation partielle est défini comme le temps de maintien de la température de référence (70°C) nécessaire pour obtenir le même taux de destruction de la population de *E. faecalis*, qu'en 1 minute à une température  $T^\circ\text{C}$ . Ces valeurs de pasteurisation partielle sont disponibles dans différents tableaux pour diverses températures de référence, et sont calculées à partir de la variation du log du temps de réduction décimale ( $D_T$ ) de *E. faecalis* en fonction de la température.

$$P_p = \frac{D_{70^\circ\text{C}}}{D_T} = 10^{(T-70)/z}$$

La notion de valeur pasteurisatrice partielle permet de rapporter à la température de référence les effets pasteurisateurs obtenus par les différentes températures successives obtenues à cœur. Ces effets se cumulant (chaque température permet de détruire une partie de la population microbienne présente dans le produit), il est possible de calculer la valeur pasteurisatrice totale du traitement thermique appliqué. Dans notre exemple, pour que l'effet pasteurisateur soit suffisant, il faut que cette valeur soit au moins égale à la valeur pasteurisatrice minimale, soit 38.35 minutes.

Lors des expériences faites dans le cadre de ce projet de maîtrise, la température a été notée à toutes les minutes pendant les phases de montée en température, de maintien et de refroidissement, et ce dès que la température a atteint 50°C. Pour chaque minute à

une température  $T$ , une valeur pasteurisatrice partielle est évaluée de façon à calculer la valeur pasteurisatrice totale du traitement. Dans le présent projet, une table des valeurs pasteurisatrices partielles pour une température de référence de  $70^{\circ}\text{C}$  a été utilisée. Ainsi, il suffit d'additionner les valeurs pasteurisatrices partielles associées aux températures notées à chaque minute pour obtenir la valeur pasteurisatrice totale du traitement.

APPENDICE B

VALEURS PASTEURISATRICES PARTIELLES

Tableau I. Valeurs pasteurisatrices partielles ( $PV_{70}^{10}$ ; tiré de Martin, 1984b) pour chaque température de traitement.

Degrés (°C)	Dixième de degrés									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
50	0.010	0.010	0.010	0.011	0.011	0.011	0.011	0.012	0.012	0.012
51	0.013	0.013	0.013	0.013	0.014	0.014	0.014	0.015	0.015	0.015
52	0.016	0.016	0.017	0.017	0.017	0.018	0.018	0.019	0.019	0.019
53	0.020	0.020	0.021	0.021	0.022	0.022	0.023	0.023	0.024	0.024
54	0.025	0.026	0.026	0.027	0.028	0.028	0.029	0.030	0.030	0.031
55	0.032	0.032	0.033	0.034	0.035	0.035	0.036	0.037	0.038	0.039
56	0.040	0.041	0.042	0.043	0.044	0.045	0.046	0.047	0.048	0.049
57	0.050	0.051	0.052	0.054	0.055	0.056	0.058	0.059	0.060	0.062
58	0.063	0.065	0.066	0.068	0.069	0.071	0.072	0.074	0.076	0.078
59	0.079	0.081	0.083	0.085	0.087	0.089	0.091	0.093	0.095	0.097
60	0.100	0.102	0.105	0.107	0.110	0.112	0.115	0.117	0.120	0.123
61	0.126	0.129	0.132	0.135	0.138	0.141	0.145	0.148	0.151	0.154
62	0.158	0.162	0.166	0.170	0.174	0.178	0.182	0.186	0.191	0.196
63	0.200	0.204	0.209	0.214	0.219	0.224	0.229	0.234	0.240	0.246
64	0.251	0.257	0.263	0.269	0.275	0.282	0.288	0.295	0.302	0.309
65	0.316	0.324	0.331	0.339	0.347	0.355	0.363	0.371	0.380	0.389
66	0.398	0.407	0.417	0.427	0.436	0.447	0.457	0.468	0.479	0.489
67	0.501	0.513	0.525	0.537	0.549	0.562	0.575	0.589	0.603	0.617
68	0.631	0.646	0.661	0.676	0.692	0.708	0.724	0.741	0.759	0.777
69	0.794	0.813	0.832	0.851	0.871	0.891	0.912	0.933	0.955	0.977
70	1.000	1.023	1.047	1.072	1.096	1.122	1.148	1.175	1.202	1.239

## APPENDICE C

### CALCUL DE LA VALEUR PASTEURISATRICE TOTALE

Exemple de calcul de la valeur pasteurisatrice d'un traitement thermique (Martin, 1984b)

Tableau II. Montée de la température au centre d'un erlenmeyer contenant 200 ml de bouillon de culture. La température finale visée est de 60°C.

Temps (min)	Température (°C)	Valeur pasteurisatrice partielle <sup>1</sup>
0	50	0.010
1	51.9	0.015
2	53.4	0.022
3	54.7	0.030
4	55.1	0.032
5	55.9	0.039
6	56.7	0.047
7	57.1	0.051
8	57.7	0.059
9	58.4	0.069
10	58.8	0.076
11	59.2	0.083
12	59.5	0.089
13	59.8	0.095
14	60	0.100
(15 à 35)	60	2.000 (20 x 0.100)
36	55.3	0.034
37	50	0.010

<sup>1</sup> Les valeurs pasteurisatrices partielles pour chaque température peuvent être calculées à l'aide de la formule  $P_p = 10^{(T-T_{ref})/z}$ . Toutefois, il existe des tableaux contenant toutes les valeurs pasteurisatrices partielles calculées pour une température de référence et une valeur de z déterminées (voir Annexe A).

À l'aide de la thermo-sonde placée au centre du produit subissant un traitement thermique, on note la température mesurée à toutes les minutes dès que le produit atteint une température de 50°C. Dans l'exemple du tableau II, on continue de noter la température tout au long du traitement et jusqu'à ce que la température redescende à 50°C pendant la période de refroidissement du produit. Par la suite, il est possible de calculer la valeur pasteurisatrice totale du traitement en additionnant les valeurs pasteurisatrices partielles. Dans l'exemple donné, la valeur pasteurisatrice totale est de 2.861.

## APPENDICE D

### CALCUL DE LA CONCENTRATION DE DnaK

## Exemple de calcul des concentrations de DnaK par cellule ou par protéines totales

Supposons les données suivantes :

Quantité de protéines totales dosées à l'aide  
de la courbe standard BSA (kit BCA) : 451 ug/ml  
Quantité de DnaK dosée (ELISA) : 4336 ng/ml  
Cellules dénombrées :  $2.8 \times 10^8$  UFC/ml  
DnaK est une protéine de 70 KDa  
Masse de 1 Da =  $1.664 \times 10^{-24}$

Masse de DnaK en g

$$1 \text{ Da} = 1.664 \times 10^{-24} \text{ g/molécule}$$

$$70 \text{ KDa} = x$$

$$x = 1.1641 \times 10^{-19} \text{ g/molécule}$$

DnaK/protéines totales

$$\frac{\text{DnaK en g/ml}}{\text{Protéines totales en g/ml}} \times 100 = \%$$

$$\frac{4336 \times 10^{-9} \text{ g/ml}}{451 \times 10^{-6} \text{ g/ml}} \times 100 = 0.96 \%$$

DnaK/cellules

$$\left( \frac{\text{DnaK en g/ml} \times \text{facteur de dilution lors de sonication}}{\text{Concentration cellulaire en UFC/ml}} \right) = \text{DnaK en g/cellule}$$

[ DnaK en g/cellule ] / poids d'une molécule de DnaK en g = molécule de  
DnaK/ cellule

$$\left( \frac{(4336 \times 10^{-9} \text{ g/ml}) \times 0.25}{2 \times 10^8 \text{ UFC/ml}} \right) / 1.1641 \times 10^{-19} = 33\,257 \text{ molécules de DnaK/cellule}$$

## LISTE DES RÉFÉRENCES

AGENCE CANADIENNE D'INSPECTION DES ALIMENTS. Octobre 2000. « Chapitre 4 : Méthodes d'inspection, disposition des produits, surveillance et contrôles ». Manuel de l'hygiène des viandes Partie A.

ALEKSHUN M.N., S.B. LEVY. 2000. « Bacterial drug resistance : response to survival threats ». In : Storz G. et Hengge-Aronis R. (Ed.). Bacterial Stress Responses. ASM Press, American Society for Microbiology, Washington DC, USA. p. 323-365.

ARSENE F., T. TOMOYASU, B. BUKAU. 2000. « The heat shock response of *Escherichia coli*. ». Inter. J. Food. Microbiol. vol. 55, p. 3-9.

ARSENE F., T. TOMOYASU, A. MOGK, C SCHIRRA, A. SCHULZE-SPECKING, B. BUKAU. 1999. « Role of region C in regulation of the heat shock gene-specific sigma factor of *Escherichia coli*,  $\sigma^{32}$  ». J. Bacteriol. vol. 181, p. 3552-3561.

BARDWELL J.C.A., K. TILLY, E. CRAIG, J. KINGS, M. ZYLICZ, C. GEORGOPOULOS. 1986. « The nucleotide sequence of the *Escherichia coli* K12 dnaJ+ gene. A gene that encodes a heat shock protein ». J. Biol. Chem. vol. 261, p. 1782-1785.

BECHTEL P.J. 1986. « Processing and fabrication ». In Muscle as food. Ed Academic Press. Orlando, USA. p. 201-238.

BLASZCZAK A., M. ZYLICZ, C. GEORGOPOULOS, K. LIBEREK. 1995. « Both ambient temperature and the DnaK chaperone machine modulate the heat shock response in *Escherichia coli* by regulating the switch between sigma 70 and sigma 32 factors assembled with RNA polymerase ». EMBO J. vol 14, p. 5085-5093.

BLATTNER F.R., PLUNKETT G. III, BLOCH C.A., PERNA N.T., BURLAND V., RILEY M., COLLADO-VIDES J., GLASNER J.D., RODE C.K., MAYHEW G.F., GREGOR J., DAVIS N.W., KIRKPARTICK H.A., GOEDEN M.A., ROSE D.J., MAU B. and SHAO Y. 1997. « The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12 ». Science. vol. 277, p. 1453-1474.

BLOOM M., S. SKELLY, R.A. VanBOGELEN, F. NEIDHARDT, N. BROT, H. WEISSBACH. 1986. « *In vitro* effect of *Escherichia coli* heat shock regulatory protein on expression of heat shock genes ». J. Bacteriol. vol. 166, p. 380-384.

BOGOSIAN G. 1998. « Viable but nonculturable, or dead? ». ASM News. vol. 64, p. 547.

BRIDGES B.A., M.J. ASHWOOD-SMITH, R.J. MUNSON. 1969. « Correlation of bacterial sensitivities to ionizing radiation and mild heating ». J. Gen. Microbiol. vol. 58, p. 115-124.

BUKAU B. 1993. « Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response ». Mol. Microbiol. vol. 9, p. 671-680.

BUKAU B., P. REILLY, J. McCARTY, G.C. WALKER. 1993. « Immunogold localization of the DnaK heat shock protein in *Escherichia coli* cells ». J. Gen. Microbiol. vol. 139, p. 95-99.

COLIGAN J.E., A.M. KRUISBEEK, D.H. MARGULIES, E.M. SHEVACH, W. STROBER. 1992. Current protocols in immunology. Ed John Wiley & Sons. New-York, USA.

CONNELLY L., T. YURA, C.A. GROSS. 1999. « Autoregulation of the heat shock response in procaryotes ». In : Bukau B. (Ed.). Molecular chaperones and folding catalysts. Regulation, cellular fonction and mechanism. Harwood Academic Publishers. Amsterdam. p. 13-33.

COWING D.W., J.C.A. BARDWELL, E.A. CRAIG, C. WOOLFORD, R.W. HENDRIX, C.A. GROSS. 1985. « Consensus sequence for *Escherichia coli* heat shock gene promoters ». Proc. Natl. Acad. Sci. USA. vol. 82, p. 2679-2683.

CRAIG E.A., C.A. GROSS. 1991. « Is hsp70 the cellular thermometer? ». Trends Biochem. Sci. vol. 16, p. 135-139.

DRAHOS D.J., R.W. HENDRIX. 1982. « Effect of bacteriophage lambda infection on the synthesis of *groE* protein and other *Escherichia coli* proteins ». J. Bacteriol. vol. 149, p. 1050-1063.

ERICKSON J.W., V. VAUGHN, W.A. WALTER, F.C. NEIDHARDT, C.A. GROSS. 1987. « Regulation of the promoters and transcripts of *rpoH*, the *Escherichia coli* heat shock regulatory gene ». Genes Dev. vol. 1, p. 419-432.

FOSTER J.W. 1993. « The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* involves transient synthesis of key acid shock proteins ». J. Bacteriol. vol. 175, p. 1981-1987.

FOSTER J.W. 2000. « Microbial responses to acid stress ». In : In : Storz G. et Hengge-Aronis R. (Ed.). Bacterial Stress Responses. ASM Press, American Society for Microbiology, Washington DC, USA. p. 103-110.

FOSTER J.W., HALL H.K., 1990. « Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium* ». J. Bactriol. vol. 172, p. 771-778.

FUIJITA N., T. NOMURA, A. ISHIHAMA. 1987. « Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase: purification and properties of holoenzyme containing the heat-shock  $\sigma$  subunit ». J. Biol. Chem. vol. 262, p. 1855-1859.

GAMER J., H. BUJARD, B. BUKAY. 1992. « Physical interaction between heat shock proteins DnaK, DnaJ and GrpE and the bacterial heat shock transcription factor  $\sigma^{32}$  ». Cell. vol. 69, p. 833-842.

GEORGOPOULOS C, W.J. WELCH. 1993. « Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones ». Annu. Rev. Cell. Biol. vol. 9, p. 601-634.

GEORGOPOULOS C., D. ANG, K. LIBEREK, M. ZYLICZ. 1990. « Properties of the *Escherichia coli* heat shock proteins and their role in bacteriophage  $\lambda$  growth ». In Stress Proteins in Biology and Medicine. pp.191-221. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab.

GEORGOPOULOS C., K. TILLY, D. DRAHOS, R. HENDRIX. 1982. « The B66.0 protein of *Escherichia coli* is the product of the dnaK<sup>+</sup> gene ». J. Bacteriol. vol. 149, p. 1175-1177.

GEORGOPOULOS C. 1992. « The emergence of the chaperone machines ». Trends Biochem. Sci. vol. 17, p. 294-299.

GEORGOPOULOS C. et al. 1994. « Properties of the heat shock proteins of *Escherichia coli* and the autoregulation of the heat shock response ». In The Biology of heat shock proteins and molecular chaperones. R.I. Morimoto, A. Tissière, C. Georgopoulos. p. 209-249. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

GEORGOPOULOS C.P. 1977. « A new bacterial gene (*groPC*) which affects lambda DNA replication ». Mol. Gen. Genet. vol. 151, p. 35-39.

GRAGEROV A., E. NUDLER, N. KOMISSAROVA, G.A.GAITANARIS, M.E. GOTTESMAN, V. NIKIFOROV. 1992. « Cooperation of GroEL/GroES and DnaK/DnaJ heat shock proteins in preventing misfolding in *Escherichia coli*. ». Proc. Natl. Acad. Sci. USA. vol. 89, p. 10341-10344.

GROSS C.A., D.B. STRAUS, J.W. ERICKSON, T. YURA. 1990. « The function and regulation of heat shock proteins in *Escherichia coli* ». In Stress Proteins in Biology and Medicine. p. 167-190. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab.

GROSSMAN A.D., J.W. ERICKSON, C.A. GROSS. 1984. « The *htpR* gene product of *Escherichia coli* is a sigma factor for heat shock promoters ». Cell. vol. 38, p. 383-390.

HARTL F.U., MARTIN J., NEUPERT W. 1992. « Protein folding in the cell: the role of molecular chaperones Hsp70 and Hsp60 ». Annu Rev Biophys Biomol Struct. vol. 21, p. 293-322.

HERMAN C., D. THEVENET, R. D'ARI, P. BOULOC. 1995. « Degradation of  $\sigma^{32}$ , the heat shock regulator in *Escherichia coli*, is governed by HflB ». Proc. Natl. Acad. Sci. USA. vol. 92, p. 3516-3520.

HERENDEEN S.L., R.A. VanBOGELEN, F.C. NEIDHARDT. 1979. « Levels of major proteins of *Escherichia coli* during growth at different temperatures ». J. Bacteriol. vol. 139, p. 185-194.

HOLT J.G., N.R. KRIEG, J.T. SNEATH, S.T. WILLIAMS. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9<sup>e</sup> ed. Ed. Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland, USA. p. 179-180.

JOO D.M., A. NOLTE, R. CALENDAR, Y.-N. ZHOU, D.J. JIN. 1998. « Multiple regions on the *Escherichia coli* heat shock transcription factor  $\sigma^{32}$  determine core RNA polymerase binding specificity ». J. Bacteriol. vol. 180, p. 1095-1102.

KAMATH-LOEB A.S., C.A. GROSS. 1991. « Translational regulation of  $\sigma^{32}$  synthesis: requirement for an internal control element ». J. Bacteriol. vol. 173, p. 3904-3906.

KANEMORI M., H. YANAGI, T.YURA. 1999. « Marked instability of the  $\sigma^{32}$  heat shock transcription factor at high temperature: implication on the heat shock regulation ». J. Biol. Chem. vol. 274, p. 22002-22007.

KEMENY D.M., S.J. CHANTLER. 1988. « An introduction to ELISA ». In : D.M. Kemeny et S.J. Chantler (Ed.). ELISA and other solid phase immunoassays. Ed John Wiley & Sons. New-York, USA. p. 1-23.

KOCHAN J., H. MURIALDO. 1982. « Stimulation of *groE* synthesis in *Escherichia coli* by bacteriophage lambda infection ». J. Bacteriol. vol. 149, p. 1166-1170.

KRUEGER J.H., G. WALKER. 1984. « *groEL* and *dnaK* genes of *Escherichia coli* are induced by UV irradiation and nalidixic acid in an *htpR*<sup>+</sup>-dependent fashion ». Proc. Natl. Acad. Sci. USA. vol. 81, p. 1499-1503.

LANDICK R.V., E.T. VAUGHN, R.A. VanBOGELEN, J.W. ERICKSON, F.C. NEIDHARDT. 1984. « Nucleotide sequence of the heat shock regulatory gene of *Escherichia coli* suggests its protein product may be a transcription factor ». Cell. vol. 38, p. 175-182.

LaROSSA R.A., T.K. Van DYK. 1991. « Physiological roles of the DnaK and GroE stress proteins: catalysts of protein folding or macromolecular sponges? ». Mol. Microbiol. vol. 5, p. 529-534.

LEMAUX P.G., S.L. HERENDEEN, P.L. BLOCH, F.C. NEIDHARDT. 1978. « Transient rates of synthesis of individual polypeptides in *Escherichia coli* following temperature shifts ». Cell. vol. 13, p. 427-434.

LEMAY M.J., RODRIGUE N., GARIÉPY C., SAUCIERL. 2000. « Adaptation of *Lactobacillus alimentarius* to environmental stresses ». Int. J. Food Microbiol. vol. 55, p. 249-253.

LEWIN B. 1994. Genes V. Oxford University Press Inc. New-York, USA. p. 402.

LIBEREK K, J. MARSZALEK, D. ANG, C. GEORGOPOULOS, M. ZYLICZ. 1991. « *Escherichia coli* dnaJ and grpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK ». Proc. Natl. Acad. USA. vol. 88, p. 2874-2878.

MAGER W.H., A.J.J. DE KRUIJFF. 1995. « Stress induced transcriptional activation ». Microbiol. Rev. vol. 59, p. 506-531.

MARCOTTE M. 1993. « Évaluation de l'efficacité de la cuisson ». Séminaire de perfectionnement du C.R.D.A. St-Hyacinthe, Québec. p. B2 1-29.

MARR A.G., J.L. INGRAHAM. 1972. « Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli* ». J. Bacteriol. vol. 84, p. 1260-1267.

MARTIN J.L. 1984a. « Conduite des cuissons à l'aide des valeurs pasteurisatrice et cuisatrice ». Viandes et produits carnés. vol. 5, p. 62-63.

MARTIN J.L. 1984b. « Conduite des cuissons à l'aide des valeurs pasteurisatrice et cuisatrice ». Viandes et produits carnés. vol. 5, p. 10-11.

MAURIZI M.R. 1992. « Proteases and protein degradation in *Escherichia coli* ». Experientia. Vol. 48. p. 178-201.

MINTON K.W., P. KARMIN, G.M. HAHN, A.D. MINTON. 1982. « Nonspecific stabilization of stress-susceptible proteins by stress-resistant proteins: A model for a biological role of heat shock proteins ». Proc. Natl. Acad. Sci. USA. vol. 79, p. 7107-7111.

NAGAI H., R. YANO, J.W. ERICKSON, T. YURA. 1990. « Transcriptional regulation of the heat shock regulatory gene *rpoH* in *Escherichia coli*: involvement of a novel catabolite-sensitive promoter ». J. Bacteriol. vol. 172, p. 2710-2715.

NAGAI H., H. YUZAWA, T. YURA. 1991. « Interplay of two *cis*-acting mRNA regions in translational control of  $\sigma^{32}$  synthesis during the heat shock response of *Escherichia coli* ». Proc. Natl. Acad. Sci. USA. vol. 88, p. 10515-10519.

NEIDHARDT F.C., T.A. PHILLIPS, R.A. VanBOGELEN, M.W. SMITH, Y. GEORGALIS *et al.* 1981. « Identity of the B56.5 protein, the A-protein, and the *groE* gene product of *Escherichia coli* ». J. Bacteriol. vol. 145, p. 513-520.

NEIDHARDT F.C., R.A. VanBOGELEN. 1981. « Positive regulatory gene for temperature-controlled proteins in *Escherichia coli* ». Biochem. Biophys. Res. Commun. vol. 100, p. 894-900.

NEIDHARDT F.C., R.A. VanBOGELEN. 1987. In Escherichia coli and Salmonella Typhimurium: Cellular and Molecular Biology. (F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter and H.E. Umbarger, Eds). p. 1334-1345. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

NEIDHARDT F.C., R.A. VanBOGELEN, E.T. LAU. 1982. « The high temperature regulon in *Escherichia coli* ». In Heat Shock from Bacteria to Man. p.139-145. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Labs.

NEIDHARDT F.C., R.A. VanBOGELEN, V. VAUGHN. 1984. « The genetics and regulation of heat shock proteins ». Annu. Rev. Genet. vol. 18, p. 295-329.

PELCZAR M.J., E.C.S. CHAN, N.R. KRIEG. 1993. Microbiology: concepts and applications. McGraw-Hill Ed. USA. p.190.

REICHERT J.E., H. BREMKE, J. BAUMGART. 1979. « Zur ermittlung des erhitzungseffektes für kochschinken (f-wert) ». Fleischerei. vol 30, p. 624-628, 630-633.

RÜDIGER S, A. BUCHBERGER, B. BUKAU. 1997. « Interaction of Hsp 70 chaperones with substrates ». Nat. Struct. Biol. vol. 4, p. 342-349.

SAITO H., H. UCHIDA. 1978. « Organization and expression of the *dnaK* and *dnaJ* genes of *Escherichia coli* K-12 ». J. Mol. Gen. Genet. vol. 164, p. 1-8.

SAUCIER L. 1999. « Meat safety: challenges for the future ». Outlook on Agriculture. vol. 28, p. 77-82.

SCHAECHTER M., O. MALLOE, N.O. KJELDGAARD. 1958. « Dependency on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced growth of *Salmonella typhimurium* ». J. Gen. Microbiol. vol. 19, p. 592-606.

STRAUS D., W. WALKER, C.A. GROSS. 1987. « The heat shock response of *Escherichia coli* is regulated by changes in the concentration of  $\sigma^{32}$  ». Nature. vol. 329, p. 348-351.

STRAUS D., W. WALKER, C.A. GROSS. 1990. « DnaK, DnaJ and GrpE heat shock protein negatively regulate heat shock gene expression by controlling the synthesis and stability of  $\sigma^{32}$  ». Genes Dev. vol. 4, p. 2202-2209.

TAYLOR W.E., D.E. STRAUS, A.D. GROSSMAN, Z.F. BURTON, C.A. GROSS, R. BURGESS. 1984. « Transcription from heat-inducible promoter causes heat shock regulation of the sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase ». Cell. vol. 38, p. 371-381.

THOMAS J.G. et F BANEYX. 1996. « Protein folding in the cytoplasm of *Escherichia coli*: requirements for the DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES molecular chaperone machines ». Mol. Microbiol. vol. 21, p. 1185-96.

TILLY K., J. SPENCE, C. GOERGOPOULOS. 1989. « Modulation of the *Escherichia coli* heat shock regulatory factor  $\sigma^{32}$  ». J. Bacteriol. vol. 171, p. 1585-1589.

TILLY K., R.A. VanBOGELEN, C. GEORGOPOULOS, F.C. NEIDHARDT. 1983. « Identification of the heat-inducible protein C15.4 as the *groES* gene product of *Escherichia coli* ». J. Bacteriol. vol. 154, p. 1505-1507.

TOMOYASU T., J. GAMER, B. BUKAU, M. KANEMORI, H. MORI, A. RUTMAN, A.B. OPPENHEIM, T. YURA, K. YAMANAKA, H. HIKI, S. HIRAGA, T. OGURA. 1995. « *Escherichia coli* FtsH protein is a membrane bound, ATP-dependant protease which degrades the heat shock transcription factor  $\sigma^{32}$  ». EMBO J. vol. 14, p. 2551-2560.

TOMOYASU T., T. OGURA, T. TATSUTA, B. BUKAU. 1998. « Levels of DnaK and DnaJ provide tight control of heat shock gene expression and protein repair in *Escherichia coli* ». Mol. Microbiol. vol 30, p. 567-581.

TRAVERS A.A., H.A.F. MACE. 1982. « The heat shock phenomenon in bacteria - a protection against DNA relaxation? ». In Heat Shock from Bacteria to Man. p.127-130. Cold Spring Hardor, NY: Cold Sring Harbor Labs.

WOODCOCK E., G.C. GRIGG. 1972. « Repair of thermally induced DNA breakage in *Escherichia coli* ». Nature New Biol. vol. 237, p. 76-79.

YAMAMORI T., K. ITO, Y. NAJAMURA, T. YURA. 1978. « Transient regulation of protein synthesis in *Escherichia coli* upon shift-up of growth temperature ». J. Bacteriol. vol. 134, p. 1133-1140.

YAMAMORI T., T. OSAWA, T. TOBO, K. ITO, T. YURA. 1982. « *Escherichia coli* gene (*hin*) controls transcription of heat-shock operons and cell growth at high temperature ». In Heat Shock from Bacteria to Man. p.131-137. Cold Spring Hardor, NY: Cold Sring Harbor Labs.

YAMAMORI T., T. YURA. 1980. « Temperature-induced synthesis of specific proteins in *Escherichia coli*: Evidence for transcriptional control ». J. Bacteriol. vol. 142, p. 843-851.

YURA T., M. KANEMORI, M.T. MORITA. 2000. «The heat shock response : regulation and function ». In : Storz G. et Hengge-Aronis R. (Ed.). Bacterial Stress Responses. ASM Press, American Society for Microbiology, Washington DC, USA. p. 3-18.

ZHOU Y., N. KUSAKAWA, J.W. ERICKSON, C.A. GROSS, T. YURA. 1988. « Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants that lack the heat shock sigma factor  $\sigma^{32}$  ». J. Bacteriol. vol. 170, p. 5005-5012.