

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand-Frappier

Mécanismes de radiorésistance du pathogène alimentaire *Escherichia coli* O157:H7

Par

Ghizlane Gaougaou

Thèse présentée pour l'obtention
du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.) en biologie

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Dr Charles Dozois (INRS-IAF)
Examineur externe	Dr Sébastien Faucher (U. McGill)
Examinatrice externe	Dre. Valerie Orsat (U. McGill)
Co-directeur de recherche	Dr Éric Déziel (INRS-IAF)
Directrice de recherche	Dre. Monique Lacroix (INRS-IAF)

RÉSUMÉ

Les microorganismes sont les principaux agents responsables d'intoxications alimentaires. *Escherichia coli* (*E. coli*) O157:H7 en fait partie. C'est un pathogène capable de produire deux toxines de type Shiga (Stxs), soit Stx1 et Stx2 portés respectivement par les deux prophages CP-933V et BP-933W. Comme la majorité des agents pathogènes, *E. coli* O157:H7 est capable de développer des résistances aux différents types de stress. Cette bactérie peut échapper aux stress telle l'irradiation gamma qui est un procédé de stérilisation de plus en plus utilisée par les industries alimentaires pour réduire les risques d'infections microbiennes. L'objectif principal de ce projet est de déterminer le mécanisme de radiorésistance d'*E. coli* O157:H7. L'effet de deux doses d'irradiation a été évalué : La dose de sensibilisation qui endommage la cellule bactérienne sans la tuer et la dose létale. Nous avons effectué, dans un premier temps, des analyses transcriptomiques via la technique "RNA-Seq" à 10 (t10) et à 60 (t60) minutes post-irradiation, associée à une analyse protéomique par la méthode "iTRAQ" à 60 minutes post-irradiation pour évaluer la réponse d'*E. coli* O157:H7 à d'irradiation à une dose de sensibilisation (0,4 kGy). Ainsi, comme une réponse rapide à cette dose, la bactérie contrôle les voies métaboliques (du sulfure et de l'histidine) impliquées dans la production des radicaux libres. En suite, elle arrête sa division cellulaire via la répression du gène *sulA* pour fournir l'énergie nécessaire à la réparation SOS. En effet, les résultats ont montré que des gènes et des protéines intervenant dans cette réponse étaient induits par la dose de sensibilisation. Ce stress semble activer les mécanismes de réponse à différents stress tels le stress oxydatif, le choc thermique et le choc froid. Fait intéressant, nous avons observé que la voie de résistance aux β -lactamines et les gènes de virulence sont induits par ce traitement. Nous avons adapté *E. coli* O157:H7 à la carbenicilline pour évaluer l'implication de la voie de résistance aux β -lactamines dans la résistance à l'irradiation. En Effet, deux gènes intervenants dans la résistance aux antibiotiques de type β -lactamines, soit *ampC* et *ampG*, s'avèrent être impliqués activement dans la résistance à l'irradiation gamma via probablement le contrôle du recyclage des peptidoglycanes. Dans le but d'étudier la capacité d'*E. coli* O157:H7 à s'adapter à une dose qui est normalement "létale", nous avons adapté la bactérie à cette dose létale via six passages à 1.5 kGy. *E. coli* O157:H7 a réussi à survivre à cette dose. Les analyses bio-informatiques ont démontré que l'adaptation à la dose létale d'irradiation a été un résultat de la perte des deux prophages Stx (CP-933V et BP-933W) et à la mutation de trois gènes : le gène *Wt_02639* codant pour une protéine hypothétique, *rpoA* et *wrbA*. Toutefois, la mutation du gène *wrbA* semble activer l'excision du prophage BP-933W et inhiber sa réintégration pour ne pas perturber sa fonction impliquée dans la résistance au stress oxydatif. Les bactéries adaptées avaient perdu leur pouvoir pathogène et leur résistance "caractéristique" au pH acide. Toutefois, la réintroduction du prophage BP-933W leur a permis de regagner ces deux caractéristiques et a reprendre leur sensibilité à l'irradiation et au stress oxydatif à des niveaux proches du *Wt*. En effet, ces caractéristiques ont été acquises par la souche non virulente, soit K-12 MG1655, après l'introduction du prophage BP-933W. En conclusion, cette étude a permis de montrer qu'*E. coli* O157:H7 résiste à l'irradiation, par l'induction des gènes de résistance aux autres types de stress, probablement par la réduction de la production intracellulaire des radicaux libres et principalement par la perte des prophages surtout BP-933W.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, les professeurs Valérie Orsat, Sébastien Faucher et Charles Dozois. Merci sincèrement d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci, Dr Charles Dozois, de nous avoir aidés et guidés dans plusieurs parties de ce travail.

Je remercie ma directrice de recherche, Dre Monique Lacroix, qui s'est montrée toujours à l'écoute, de m'avoir acceptée dans ce projet et d'être disponible, tout au long de ces années de thèse. Je la remercie pour l'aide compétente qu'elle m'a apportée, pour sa patience et son encouragement. Merci Monique.

Ce travail n'aurait pu se faire sans la participation de mon codirecteur Dr Éric Déziel qui m'a accueilli dans son laboratoire. Grâce à ses compétences scientifiques, sa disponibilité, sa patience, son humanité et son soutien moral, j'ai pu passer les unes des plus belles années de ma vie. Merci Éric.

Je remercie également les professeurs Frédéric Veyrier et Philippe Constant qui ont participé à certaines parties de ce projet, pour leurs contributions, leurs conseils et leurs disponibilités.

Je tiens à remercier grandement Yosra, Antony, Katerina, Hajer, Amina, Ahmed, Farah, Quentin, Arvin, Fabrice, Anissa, Sérvane, Sophie, Audrey-Anne, Pauline, Alison, Sarah, Snizhana, Charles, Germàn, Fadi, Koyomi, Marianne, Kanak, Xavier, May, Paula et Carlos.

Un grand merci particulier à Marie-Christine, pour sa gentillesse, son aide et ses qualités humaines. J'ai eu du plaisir à travailler avec toi.

Je tiens également à remercier Stéphane Salmieri pour son soutien technique et ses conseils qui m'ont beaucoup aidé.

Enfin, je voudrais remercier mes amis, Soumaya et son mari Ilyass qui m'ont énormément aidé autant sur le plan personnel que professionnel.

En fin, un grand merci pour tous les membres des laboratoires de Monique Lacroix, Éric Déziel, Charles Dozois, Frédéric Veyrier et Philippe Constant.

Dédicace

Je dédie ce travail à :

Mon mari Khalid qui était toujours disponible pendant les moments les plus difficiles de ma vie, son soutien moral, sa gentillesse, sa patience et son amour m'ont toujours donné le courage dont j'avais besoin.

Mes trois petits trésors Mohamed Yanis, Aylane Mountassir et Iyad Saji, qui, avec leurs beaux sourires et leurs chaleureux câlins, me donnent la force et le courage pour continuer cette vie. Je vous adore beaucoup.

Ma famille au Maroc, vous me manquez tellement...

Mes parents. Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler.

Mes deux frères Radouane et Fahd, ma sœur Nacira et ses deux enfants Adib et Mehdi. Je vous aime énormément.

Ma belle-famille et mon Beau-frère Rachid.

Mes amis au Canada et tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.

شكرا جزيلا، حفظكم الله ورعاكم وأطال في عمركم

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX	xi
Liste des abréviations	xii
1. INTRODUCTION	1
1.1. Contamination des aliments	1
1.2. Techniques pour lutter contre les infections d'origine alimentaire	2
1.2.1. Méthodes thermiques	2
1.2.2. Méthodes non-thermiques	3
1.2.2.1. Ultrasons sous pression	3
1.2.2.2. Hautes pressions hydrostatiques (HPH)	3
1.2.2.3. Champs électriques pulsés	4
1.2.2.4. Irradiation	4
1.3. Effet de l'irradiation sur la conservation des aliments	4
1.3.1. Définition de l'irradiation	4
1.3.2. Irradiation gamma	5
1.3.3. Radiation aux ultraviolet (UV)	8
1.4. Effet de l'irradiation sur la bactérie et son génome	8
1.5. Résistance bactérienne	9
1.5.1. Résistance à l'irradiation : L'exemple de <i>Deinococcus radiodurans</i>	9
1.5.2. Mécanisme de résistance bactérienne	10
1.5.3. La réponse SOS	12
1.6. <i>Escherichia coli</i>	15
1.6.1. Découverte et classification	15
1.6.2. <i>Escherichia coli</i> O157:H7	18
1.6.3. Effet de l'irradiation gamma sur la synthèse de protéines de stress chez <i>E. coli</i> O157:H7	19
1.6.4. Génome d' <i>Escherichia coli</i> O157:H7	20
1.6.5. Principaux facteurs de virulence	21
1.6.6. Shiga toxines Stxs	22
1.6.7. Locus d'effacement des entérocytes (LEE)	23
1.6.8. Plasmide O157 (<i>pO157</i>)	24
1.7. Résistance de <i>Escherichia coli</i> O157:H7	25
1.7.1. Résistance à l'acide	25
1.7.2. Résistance au stress thermique et froid	26
1.7.2.1. Stress thermique	26
1.7.2.2. Stress froid	28
1.7.3. Résistance aux antibiotiques ; l'exemple des β -lactamines	28
1.7.3. Résistance au stress oxydatif	31
1.8. Bacteriophages	32
1.8.1. Cycle lytique et cycle lysogénique	32
1.8.2. Prophages Stx	34
1.8.3. Régulation des gènes <i>stx</i> par la réponse SOS	34
1.8.4. Réplication et recombinaison	36
1.8.5. Système "Red"	37
1.8.6. Intégration des prophages	38

1.9	Problématique	40
2	HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	43
1.1.	Hypothèse	43
2.2	Objectifs	43
2.2.1	Objectif général	43
2.2.2	Objectifs spécifiques:	43
3	ARTICLES	45
3.1	Présentation de l'article « γ -irradiation triggers a global stress response in <i>Escherichia coli</i> O157:H7 including unique protective pathways »	45
3.1.1	Abstract	46
3.1.2	Introduction	46
3.1.3	Material and methods	48
3.1.1.1	Bacterial strains, plasmids and growth conditions	48
3.1.1.2	γ -irradiation treatments	49
3.1.1.3	RNA and protein extractions	49
3.1.1.4	Transcriptomic analysis	49
3.1.1.5	Protein preparation	50
3.1.1.6	iTRAQ sample labelling	50
3.1.1.7	Mass spectrometry	50
3.1.1.8	Database searching	51
3.1.4	Results and discussion	52
3.1.5	Conclusion	68
3.2	Présentation de l'article « Effect of β -lactam antibiotic resistance gene expression on the radio-resistance profile of <i>E. coli</i> O157:H7»	76
3.2.1	Abstract	77
3.2.2	Introduction	77
3.2.3	Materials and methods	79
3.2.3.1	Materials	79
3.2.3.2	Bacterial strains, plasmids and growth conditions	79
3.2.3.3	Construction of mutants and complementation/overexpression vectors	80
3.2.3.4	Antibiotic susceptibility assays	82
3.2.3.5	Development of antibiotic-adapted O157:H7 strains	82
3.2.3.6	γ -irradiation treatments	82
3.2.3.7	Viability and growth study	83
3.2.3.8	RNA preparation and quantitative real-time PCR (qRT-PCR)	83
3.2.3.9	Statistical analysis	83
3.2.4	Results	84
3.2.5	Discussion	94
3.3	Présentation de l'article « BP-933W prophage promotes radiosensitization in <i>Escherichia coli</i> O157:H7»	101
3.3.1	Abstract	101
3.3.2	Introduction	102
3.3.3	Materials and methods	103
3.3.3.1	Bacterial strains and culture conditions	103
3.3.3.2	γ -irradiation treatment and adapting <i>E. coli</i> O157:H7 to a normally lethal dose-of irradiation	104
3.3.3.3	Acid and oxidative stress (paraquat) resistance assays	104
3.3.3.4	Polymerase chain reaction (PCR)	104

O/N bacterial cultures were diluted at 1/1000 and incubated in TSB at 37 °C until the exponential phase of growth ($OD_{600} \approx 1$). DNA extraction was performed using DNeasy Blood and tissue Kit (Qiagen, Montreal, CANADA) as recommended by the supplier. Amplification of genes was carried by PCR using the primers given in Table 11.

	_____	104
3.3.3.5	Bioinformatics analyses _____	107
3.3.3.6	Cytotoxicity assays _____	107
3.3.3.7	Prophage re-introduction _____	107
3.3.3.8	Spot test _____	108
3.3.3.9	Detection of Shiga toxins. _____	108
3.3.4	Results _____	108
3.3.5	Discussion _____	116
3.3.7	References _____	120
4	SYNTHÈSE GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES _____	125
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES _____	133

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Les contaminants alimentaires.....	1
Figure 2 : Spectre électromagnétique.....	5
Figure 3: Processus d'induction de la réponse SOS.....	13
Figure 4 : Mode de colonisation des différents pathotypes d' <i>E. coli</i>	17
Figure 5: Facteurs de virulence d' <i>E. coli</i> O157:H7.....	21
Figure 6: Mécanisme d'action des Shiga-toxines.....	23
Figure 7: Mécanisme de résistance à l'acidité.....	26
Figure 8: Mécanisme de résistance au stress thermique chez <i>E. coli</i>	27
Figure 9: Mécanisme de résistance aux antibiotiques de type β -lactamine.....	30
Figure 10: Réponse au stress oxydatif.....	32
Figure 11: Cycle lytique et lysogénique.....	33
Figure 12: Régulation de l'expression des Shiga-toxines par le cycle phagique.....	35
Figure 13: Réplication et recombinaison des phages de type lambda.....	37
Figure 14: Recombinaison du phage de type Lambda.....	38

Figure 15: Maintien du cycle lysogénique et induction du cycle lytique.	39
Figure 16: KEGG pathway analysis of the differentially expressed genes in <i>E. coli</i> O157:H7 ten min following irradiation at 0.4 kGy.	53
Figure 17: KEGG pathway analysis of the differentially expressed genes in <i>E. coli</i> O157:H7 sixty min following irradiation at 0.4 kGy	54
Figure 18: KEGG pathway analysis of the differentially expressed proteins in <i>E. coli</i> O157:H7 sixty min following irradiation at 0.4 kGy	55
Figure 19: Down-regulation of several genes involved in histidine metabolism following irradiation at 0.4kGy.	56
Figure 20: Up-regulation of several genes implicated in sulfur metabolism following irradiation at 0.4kGy.	57
Figure 21: Viability of <i>E. coli</i> O157:H7 deletion mutants following γ -irradiation.....	60
Figure 22: Growth of <i>E. coli</i> O157:H7 deletion mutants following γ -irradiation.	62
Figure 23: Adaptation of <i>E. coli</i> O157:H7 strains to carbenicillin.....	84
Figure 24: Adaptation of <i>E. coli</i> O157:H7 strains to kanamycin.....	85
Figure 25: Viability of carbenicillin-adapted <i>E. coli</i> O157:H7 following irradiation at 0.4 kGy.	86
Figure 26: Growth of carbenicillin-adapted <i>E. coli</i> O157:H7 following irradiation at 0.4 kGy.	86
Figure 27: Viability of kanamycin-adapted <i>E. coli</i> O157:H7 following irradiation at 0.4 kGy.	87
Figure 28: Growth of kanamycin-adapted <i>E. coli</i> O157:H7 following irradiation at 0.4 kGy.	88

Figure 29: Effect of γ -irradiation on <i>ampC</i> and <i>ampG</i> expression by <i>E. coli</i> O157:H7.....	89
Figure 31: Viability of <i>E. coli</i> mutants and strains after γ -irradiation at 0.4kGy.	91
Figure 32: Growth of <i>E. coli</i> mutants and strains after γ -irradiation at 0.4kGy.	92
Figure 33: Viability of <i>E. coli</i> O157:H7 mutants and strains under paraquat stress.....	93
Figure 34: Viability of <i>E. coli</i> O157:H7 mutants and strains under thermal stress.	94
Figure 42: Transfert horizontal de phages induits par l'irradiation..	131

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Pathotypes et sérotypes d' <i>E. coli</i> pathogènes.....	16
Tableau 2 : Comparaison du génome d' <i>E. coli</i> K-12 non pathogène et de deux souches EHEC O157:H7 pathogènes.....	21
Tableau 3: Induction de l'expression des Stxs.....	36
Table 4: PCR primers used to generate mutants of <i>E. coli</i> O157:H7 EDL933.....	48
Table 5. Genes highly expressed 10 min or 60 min post-irradiation at 0.4kGy	59
Table 6. Different expressed proteins in <i>E. coli</i> O157:H7 60 min post-irradiation	64
Table 7. A list of stress-associated and virulence genes showing differential gene transcription 10 min and/or 60 min following irradiation at 0.4 kGy.....	65
Table 8. Differentially expressed proteins and genes in <i>E. coli</i> O157:H7 60 min post-irradiation	68
Table 9: List of <i>E. coli</i> strains and plasmids used to generate and complement <i>ampC</i> and <i>ampG</i> mutants	80
Table 10: List of primers used to generate and complement <i>ampC</i> and <i>ampG</i> mutants.....	81

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A/E:	Attachement et Effacement
AdiC:	Arginine décarboxylase
ADNsb:	ADN simple brin
AR:	Acid Resistance
AR:	Acid resistance system
Cos:	Cohésif
CSP:	Cold Shock Protein
<i>D. radiodurans:</i>	<i>Deinococcus radiodurans</i>
DAEC:	Diffusely adherent <i>E. coli</i>
<i>E. coli:</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC:	Enteraggregative <i>E. coli</i>
EHEC:	Enterohaemorrhagic <i>E. coli</i>
Ehx:	Entérohémolysine
EIEC:	Enteroinvasive <i>E. coli</i>
EPEC:	Enteropathogenic <i>E. coli</i>
EspP:	Sérine protéase
ETEC:	Enterotoxigenic <i>E. coli</i>
FAO:	Food and Agriculture Organization
GAD:	Acide glutamique
H ₂ O ₂ :	Peroxyde d'hydrogène
HSP:	Heat Shock Protein
IPTG:	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
KatP:	Catalase peroxydase périplasmique
kHz:	Kilohertz

kPa:	Kilopascals
LEE:	Locus d'Effacement des Entérocytes
LexA:	Locus for X-ray sensitivity
MMTS:	Methyl methanethiosulfonate
Mn:	Manganèse
O ₂ ⁻ :	Ion superoxyde
OH•:	Radical hydroxyle
O _L :	Operateur gauche (left)
O _R :	Operateur droit (right)
ORF:	Open Reading Frame
Pol:	ADN polymérase
RecA :	Recombinase A
ROS:	Reactive Oxygen Species
RpoS:	Facteur sigma alternatif
SOD:	Superoxide dismutase
SODC:	CuZnSOD
ssDNA:	Single stranded DNA
StcE:	Métalloprotease
STEC:	Shiga-toxin producing <i>E. coli</i>
Stx:	Shiga-like Toxin
t10:	10 min post-irradiation
T3SS:	type III secretion system
t60:	60 min post-irradiation
TCEP:	Tris-(2-carboxyethyl) phosphine
ToxB:	Adhesine putative
UFC:	Unité Formatrice de Colonie

UV-C:	Ondes Courtes UltraViolettes
VTEC:	Verocytotoxin-producing <i>E. coli</i>
Vtx:	Vérocytotoxine
WHO:	World Health Organisation
γ-irradiation:	Gamma irradiation

1. INTRODUCTION

1.1. Contamination des aliments

Une salubrité alimentaire et une agriculture durable sont les clés d'un développement durable de la société favorisant le bien-être de la population humaine. Les préoccupations des consommateurs concernant la qualité et la salubrité des aliments augmentent sans cesse. Ainsi, la salubrité alimentaire est l'un des principaux problèmes qui attirent l'attention des chercheurs pour bien contrôler les contaminants des aliments. Or, l'alimentation est un vecteur important de maladies infectieuses dues, entre autres, à la présence des microorganismes, tels que des bactéries, des virus, ou des parasites. Ces contaminants sont responsables de plusieurs symptômes liés à la gastro-entérite et peuvent conduire à des conséquences graves telles que douleurs stomacales, méningites ou même décès. En particulier, les bactéries pathogènes constituent la principale source d'infection (Figure 1). Ces agents peuvent contaminer l'aliment à tous les stades de la chaîne alimentaire : de la récolte jusqu'au stade de la consommation et de la ferme jusqu'à la population, pouvant impliquer l'abatage de l'animal, le stockage, le transport, la pré-récolte, l'après-récolte et l'emballage.

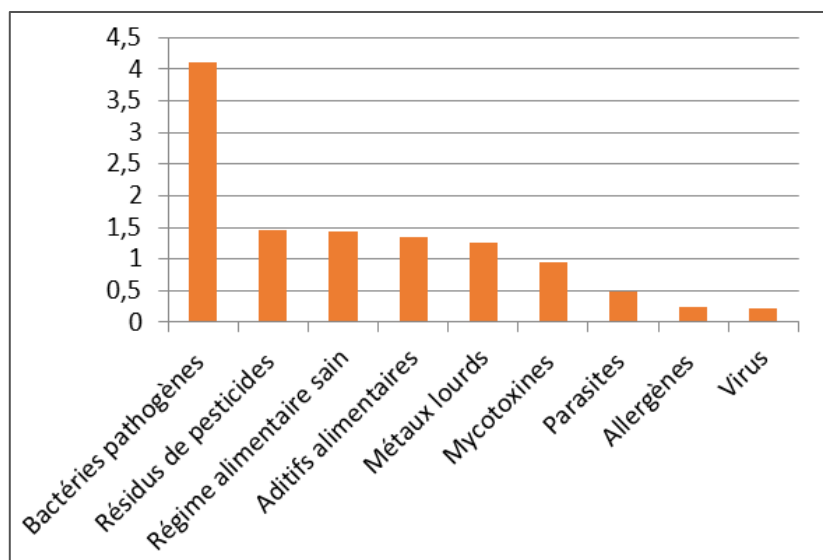


Figure 1. Les contaminants alimentaires. Adaptée de Uyttendaele *et coll.* (2015)

*Le classement (axe Y) est réalisé en fonction du score d'importance moyenne entre 0 (élément le moins important) et 5 (élément le plus important) comme décrit par Van Boxtael *et coll.* 2013

L'émergence des microorganismes résistants aux antibiotiques constituent des menaces potentielles pour la santé publique et environnementale. Ainsi, un des principaux défis reconnus par l'organisation mondiale de la santé est la prévention de la contamination des aliments (Fukuda 2012). Selon Santé Canada (2013), des bactéries pathogènes comme *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), *Escherichia coli* (*E. coli*) O157:H7, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Cronobacter* et *Campylobacter* spp. sont responsables d'environ 4 millions de cas d'infections d'origine alimentaire au Canada chaque année. Des éclosions de toxi-infections sont régulièrement signalées dans le monde. Par exemple, une épidémie d'*E. coli* O157:H7 après une consommation d'aliments emballés contaminés dans l'Union européenne (2006); une éclosion de *Cryptosporidium* associée à des salades ensachées au Royaume-Uni (2012); une éclosion de *L. monocytogenes* due à des produits de salade préemballés contaminés (2016) et une éclosion de *Salmonella* liée à la laitue dans des salades préemballées en Australie (2016).

1.2. Techniques pour lutter contre les infections d'origine alimentaire

Pour répondre aux exigences des consommateurs, les industries alimentaires augmentent leurs recherches sur le développement de méthodes et techniques de production et de conservation des aliments. Or, des intensités élevées de certains traitements peuvent provoquer des changements défavorables dans la qualité organoleptique ou fonctionnelle de l'aliment. Hill *et coll.* (2002) ont démontré que le traitement minimal repose sur l'utilisation de stress sublétaux multiples permettant d'avoir le même taux de contrôle microbien que si un seul stress léthal est utilisé et qui permettra d'avoir une large gamme d'aliments consommables sans risque d'avoir des intoxications ni d'effets sur les qualités sensorielles et organoléptiques des aliments.

1.2.1. Méthodes thermiques

Le traitement à la chaleur est la méthode la plus utilisée pour pasteuriser ou stériliser les aliments. Bien qu'il provoque des inactivations microbiennes importantes, plusieurs effets indésirables de ce traitement ont été démontrés au niveau des aliments comme la désactivation d'enzymes, le changement de la couleur, l'altération des propriétés sensorielles ainsi que la perte de certaines vitamines (Aguilar-Rosas *et coll.* 2007). De plus, plusieurs bactéries développent de plus en plus une capacité à résister à des traitements à la chaleur de 63,5°C pendant 30 minutes (la basse pasteurisation) telles que certaines bactéries à Gram positif asporogènes comme *Micrococcus luteus*, *Streptococcus thermophilus* et *Microbacterium lacticum* et des bacilles à Gram positif sporulés comme les *Bacillus* et les *Clostridium* qui peuvent résister à des températures encore plus élevées (Guillet 2002). Aussi, certaines bactéries augmentent leurs synthèses en protéines dites de choc thermique (hsp : pour « Heat shock proteins») qui favorisent une résistance naturelle à la chaleur. Ainsi, ces effets

secondaires ont poussé les industries alimentaires à développer de nouvelles techniques non-thermiques telles que la haute pression, le champ électrique pulsé, les rayonnements ultraviolets et les rayonnements ionisants en réponse aux demandes des consommateurs. Ces techniques sont développées pour avoir des aliments en bon état, plus frais et de meilleure qualité comme décrit par le comité consultatif national sur les critères microbiologiques pour les aliments (NACMCF pour "The National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods") (NACMCF 2006).

1.2.2 Méthodes non-thermiques

1.2.2.1 Ultrasons sous pression

La définition classique de l'ultrason sous pression est l'énergie produite par des ondes sonores de 20 000 ou plus vibrations (Hertz) par seconde. Le mécanisme de l'inactivation microbienne par les ultrasons a été défini par Hughes et Nyborg (1962). Ainsi, l'ultrason crée des pressions fluctuantes induisant des coupures au niveau des bulles microscopiques ce qui provoque des chocs micromécaniques qui perturbent les composantes structurelles et fonctionnelles des cellules, provoquant ainsi leur lyse. Álvarez et coll. (2003 et 2007) ont démontré que l'utilisation de ce traitement à 20 kilohertz (kHz) sous une pression de 175 kilopascals (kPa) inactive *Salmonella* alors que l'équipe de Pagán et coll. (1999) a observé qu'une pression de 200 kPa à 40°C diminue le temps de réduction décimale de *L. monocytogenes* et de *Salmonella enteritidis*. Cependant, ce traitement n'est pas encore utilisé pour décontaminer les aliments suite à son effet sur l'inactivation de certaines enzymes essentielles.

1.2.2.2 Hautes pressions hydrostatiques (HPH)

Parmi les technologies non-thermiques permettant la conservation des aliments, la haute pression hydrostatique est intéressante. Cette technique rend l'aliment plus stable en provoquant l'inactivation des enzymes et des microorganismes pathogènes (Patterson 2005) en présence d'une faible température (9°C à 20°C) sans changer les caractéristiques sensorielles et nutritionnelles de l'aliment (Cheftel et Culioli 1997). Cependant, l'utilisation de l'HPH même à des températures basses peut avoir un effet indésirable sur la couleur de la viande fraîche qui peut changer avec la pression en raison de la dénaturation de la globine dans la myoglobine ou de l'oxydation du fer (Mor-Mur et Yuste 2003). De plus, la dénaturation d'autres protéines telles que la myosine et l'actine par l'HPH minimise l'aspect rouge de la viande via l'oxydation des lipides secondaires (Hansen et coll., 2004).

1.2.2.3 Champs électriques pulsés

Cette technique se caractérise par sa capacité à inactiver les microorganismes et les enzymes principalement dans les aliments liquides à des températures relativement basses ou modérées (< 60°C) (Espachs-Barroso *et coll.*, 2003) tout en préservant la saveur, la couleur et l'intégrité des composants sensibles à la chaleur. Elle a été utilisée dans l'industrie alimentaire pour la première fois dans le but de prolonger la durée de vie des jus de fruits (Clark, 2006). Cependant, certaines composantes des aliments, comme les gras du lait et les protéines des œufs, ont un effet protecteur sur l'inactivation microbienne ce qui rend l'efficacité de ce système de traitement limitée (Wan *et coll.*, 2009).

1.2.2.4 Irradiation

L'irradiation est l'un des procédés les plus efficaces pour lutter contre les infections d'origine alimentaire en inactivant les microorganismes pathogènes. Cette méthode, considérée comme une pasteurisation à froid si elle est utilisée aux doses recommandées par l'Agence Internationale de l'Énergie Atomique, l'Organisation des Nations Unies pour les aliments et l'agriculture (FAO pour " Food and Agriculture Organization") et Santé Canada, ne provoque pas de grandes pertes au niveau des caractéristiques sensorielles et nutritionnelles de l'aliment. L'avantage de cette technique est que la composition chimique ainsi que l'aspect des produits traités ne sont pas affectés et la technologie peut être effectuée sur un produit emballé (Lawrie, 2006).

1.3 Effet de l'irradiation sur la conservation des aliments

1.3.1 Définition de l'irradiation

La technique de l'irradiation ou traitement par rayonnements ionisants est une méthode d'inhibition des microorganismes utilisée depuis 1940 dans le but de conserver les aliments (Lawrie, 2006). L'irradiation a été promue par la FAO dans le codex *Alimentarius* en 2003. Elle a été acceptée dans 50 pays tels les États-Unis, l'Égypte, l'Asie dont la Chine et la Thaïlande, l'Europe et aussi en Amérique du Sud (Aymerich *et coll.*, 2008). Des organismes comme l'Organisation Mondiale de la Santé (WHO pour «World Health Organisation») et la FAO ont proposé qu'une dose de stérilisation de 45 kGy puisse être utilisée pour conserver toutes les principales catégories d'aliments (World Health Organisation, 2006). Ainsi, le traitement aux rayonnements à des doses de 2 à 7 kGy élimine les bactéries potentiellement pathogènes non-sporulantes comme *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter*, *L. monocytogenes* ou *E. coli* O157:H7 (Farkas, 1998).

L'irradiation est un traitement physique qui consiste à exposer les aliments aux rayons électroniques/électromagnétiques dans le but d'assurer leur innocuité et pour prolonger leur durée de vie. Ainsi, l'irradiation est produite par des rayonnements ionisants qui font partie du spectre électromagnétique (Figure 2). Les rayons X et gamma sont des rayonnements de longueurs d'onde très courtes qui ont un niveau d'énergie très élevé. Ils sont aussi appelés `` rayons ionisants`` (Lacroix, 2002). L'irradiation gamma est mesurée en kGy ($1\text{Gy} = \text{J kg}^{-1}$). Ainsi, la sensibilisation à l'irradiation varie d'un microorganisme à un autre selon sa composition chimique, sa structure physique et sa capacité à se rétablir d'une blessure causée par l'irradiation. De plus, la quantité d'énergie de rayonnement nécessaire pour contrôler les micro-organismes au niveau des aliments varie en fonction de la résistance de l'espèce elle-même, du nombre de microorganismes présents et de l'aliment à traiter (Farkas 2006).

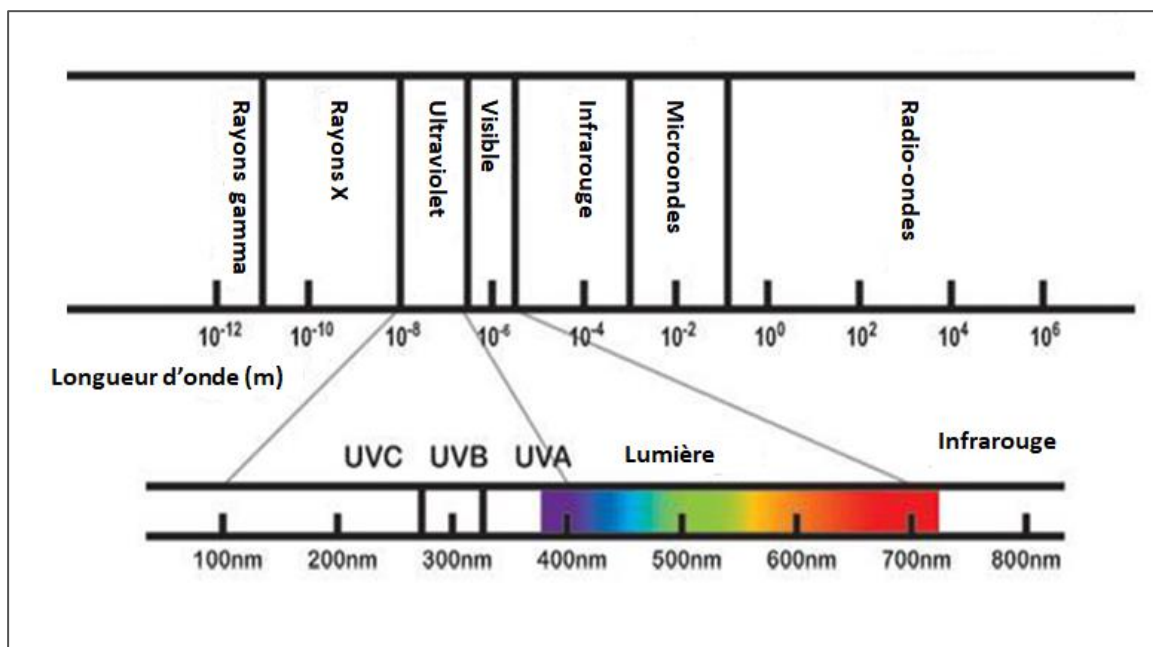


Figure 2. Spectre électromagnétique. Adaptée de <http://healthycanadians.gc.ca/environnement-environnement/sun-soleil/radiation-rayonnement-eng.php>.

1.3.2 Irradiation gamma

L'irradiation gamma est une technique favorisant le maintien de la qualité des fruits et des légumes frais, des viandes, des poissons et des céréales en inactivant les microorganismes (Lacroix et Vigneault, 2007). Elle a été largement utilisée pour inhiber la germination de certains fruits et légumes, retarder leur maturation et leur sénescence et prolonger leur entreposage. Ainsi, des doses de 1 à 2 kGy peuvent prolonger le temps de conservation des fruits et des légumes sans altérer leurs qualités sensorielles (Moy et Nagai, 1985) et sans changer leur fraîcheur après la récolte (Farkas, 2005). La technique d'irradiation peut aussi être utilisée comme une méthode de stérilisation (10-50 kGy), de

pasteurisation (1-10 kGy) ou de désinfection (0,2-0,8 kGy) (Lacroix, 2012). Par exemple, la fraise traitée à une dose de 1,5 à 3 kGy peut être conservée pendant 14 jours sous conditions fraîches sans être endommagée par les microorganismes causant la pourriture des fruits (Dennison et Ahmed, 1971). Une dose de 1 kGy réduit de 4 à 5 log le nombre d'unités formatrices de colonies (UFC) d'enterobactéries et élimine *E. coli* du chou (López, 2005). Aussi, cette même dose élimine *E. coli* du jus de cantaloup (Wang et coll., 2006) et réduit de 2,35 log l'UFC de coliformes totaux au niveau de la laitue fraîche coupée (Zhang et coll., 2006). Konteles et coll. (2009) ont démontré que des doses de 2,5-4,7 kGy réduisent le nombre de microorganismes pathogènes tel que *L. monocytogenes*, au-dessous de la limite de détection dans le fromage. Cette même étude a démontré que l'irradiation n'a pas d'effet sur la texture du fromage Feta, mais une dose de 4,7 kGy affecte sa couleur, son aspect léger ainsi que ses qualités organoleptiques après un stockage de 30 jours à froid ce qui limite l'utilisation de cette technique pour traiter les fromages. Les viandes et les poissons sont très exposés à la contamination microbienne grâce à leurs teneurs élevées en protéines et en eau, éléments essentiels qui favorisent la prolifération des germes. Ainsi, une dose de 2,5 à 5 kGy prolonge leur durée de vie et les protège contre les agents pathogènes comme *Salmonella*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *E. coli*, *L. monocytogenes* et *S. aureus* (Molins, 2001). Une dose de 3 kGy réduit de 4 log le nombre total de micro-organismes sans altérer la saveur de la viande suite à l'oxydation des acides gras et des acides aminés. Au niveau du poulet, une dose d'irradiation de 2 kGy prolonge sa durée de conservation de plus de 15 jours (Balamatsia et coll., 2006). Des doses de 2,5 et 5 kGy prolongent la durée de vie du loup de mer de 15 jours et 17 jours, respectivement, après l'irradiation (Özden et coll., 2007). Au niveau du saumon fumé, une dose de 2 kGy maintient le niveau de *L. monocytogenes* en dessous de 6 log UFC/g après 35 jours de stockage à 5°C avec des changements négligeables de son odeur (Medina et coll., 2009). Toutefois, lorsque cette irradiation est combinée avec d'autres méthodes de conservation telles que l'ajout d'extraits de plantes, d'huiles essentielles et extraits d'épices, le rendement du traitement devient plus efficace (Chiasson et coll., 2004; Mahrouf et coll., 2003). Ces études ont montré que le traitement avec certains produits naturels peut augmenter la radiosensibilité de certaines bactéries.

De plus, des études ont montré que la combinaison de certains traitements avec l'irradiation peut réduire la dose nécessaire pour éliminer les agents pathogènes ou diminuer le taux de croissance des microorganismes lors du stockage des aliments. Ainsi, l'application d'un traitement thermique ``doux`` suivie d'un traitement à l'irradiation prolonge la durée de vie de certains fruits frais sans affecter leur qualité (Farkas, 1990). D'autres études ont montré que l'utilisation d'un traitement à la chaleur combiné avec l'irradiation a un effet synergique permettant la destruction de bactéries sous forme végétative (Farkas 1990) et des spores bactériennes (Gombas et Gomez, 1978). Ainsi, un

traitement avec une moyenne température de 45°C pendant 10 minutes, suivi d'un traitement avec l'irradiation à une dose de 1,2 kGy, perturbe l'intégrité membranaire de *Bacillus cereus*, diminuent sa concentration intracellulaire d'ATP, affectent la membrane cellulaire et augmentent la dégradation de l'ADN par rapport à un traitement par l'irradiation seule (Ayari et coll., 2010).

L'irradiation cause des dommages à l'ADN alors que la chaleur provoque une déstabilisation des membranes (Kim et Thayer, 1996). Cependant, une combinaison d'un traitement à des températures élevées avec l'irradiation augmente l'effet antimicrobien de l'irradiation en inactivant certaines enzymes dans les aliments et en réduisant la dose d'irradiation nécessaire pour éliminer les agents pathogènes (Thakur et Singh, 1995). Ainsi, le traitement thermique à sec en combinaison avec l'irradiation élimine complètement *E. coli* 0157:H7 au niveau de la luzerne et des graines d'haricot tout en réduisant la dose nécessaire pour éliminer ce pathogène (Bari et coll., 2003). Álvarez et coll. (2007) ont observé que des traitements de 21,6 min à 57°C ou de 5 minutes à 60°C réduisent le contenu en *Salmonella* de 5 log dans les œufs entiers liquides alors qu'un pré-traitement avec une dose d'irradiation de 0,3 kGy ne nécessite que des traitements de 5,5 min à 57°C ou 2,3 min à 60°C pour obtenir le même effet antibactérien.

L'emballage sous atmosphère modifiée est un procédé permettant le ralentissement de la croissance bactérienne (Gibson et Davis, 1995). Cependant, l'efficacité de ce traitement dépend de la composition de l'aliment, de la contamination microbienne, des procédés de traitement et des conditions de stockage (Reale et coll., 2008). Ainsi, le traitement à l'irradiation combiné avec l'emballage sous atmosphère modifié offre aussi un effet synergique. Zhu et coll. (2008) ont observé que l'irradiation à une dose de 2,4 kGy après un emballage sous vide du jambon et de la dinde inoculés avec 10^6 à 10^7 UFC/cm² réduit de 5 log le nombre de *L. monocytogenes*. Caillet et coll. (2006) ont démontré que l'augmentation du taux de CO₂ dans l'emballage à 50% avant le traitement par irradiation a été en mesure d'augmenter de 3,8 fois l'effet de certains composés antimicrobiens comme la cannelle de chine (*Cinnamum cassia*) et le trans-cinnamaldéhyde sur la durée de vie des carottes. Cette étude a permis la démonstration de l'augmentation de la sensibilité de *L. monocytogenes* aux rayonnements gamma dans des carottes lors de l'irradiation sous air ou sous atmosphère modifiée (60% O₂, 30% CO₂, 10% N₂) en présence de différents composés antimicrobiens naturels. Les résultats ont montré que la dose nécessaire pour réduire *L. monocytogenes* de 1 log UFC était de 0,36 kGy pour les échantillons conditionnés à l'air et 0,17 kGy pour ceux emballés sous atmosphère modifié. Lafortune et coll. (2005) ont observé que l'irradiation des carottes à 1 kGy sous atmosphère modifié (60% O₂, 30% CO₂, 10% N₂) peut retarder le développement de la flore microbienne totale, mais provoque l'altération de la fermeté.

1.3.3 Radiation aux ultraviolet (UV)

Les rayons ultraviolets sont un type de radiation électromagnétique composée de photons à faible énergie émis à des longueurs d'onde entre 200 et 400 nm. L'irradiation UV est exprimée en millijoules par centimètre carré (mJ cm^{-2}) (Forney 2009; Koutchma 2010). Ainsi, les ondes courtes ultraviolettes (UV-C) dont la longueur d'onde est comprise entre 200 et 280 nm sont utilisés comme une méthode de désinfection, qui implique la lumière blanche intense, et pour le traitement des aliments contre les infections microbiennes (Barbosa-Canovas 2008), ce qui peut prolonger la durée de vie des aliments. Ces UV-C sont utilisés pour traiter les fruits et les légumes frais, les jus frais, les boissons, les viandes fraîches, le poulet et les fruits de mer (Forney 2009). Comme le traitement à l'irradiation gamma, ce traitement agit sur l'ADN ce qui perturbe certaines activités métaboliques des microorganismes (Forney 2009). Or, il n'y a pas beaucoup de données concernant les conditions optimales à utiliser dans les industries alimentaires, ce qui limite l'utilisation de cette méthode surtout qu'elle agit seulement en surface des aliments (Walkling-Ribeiro et coll., 2008).

1.4 Effet de l'irradiation sur la bactérie et son génome

L'irradiation gamma engendre la mort cellulaire qui est causée par des dommages structurels et des dysfonctionnements physiques comme la perturbation des enveloppes cellulaires, les changements de conformations de l'ADN, l'altération des ribosomes, l'aggrégation des protéines, l'altération de la perméabilité sélective de la membrane ou la désactivation de certaines enzymes clés (Gould, 1989). Selon Moseley (1983 et 1989), le traitement à l'irradiation affecte surtout le chromosome. Ainsi, ce traitement a des effets directs et indirects sur la cellule microbienne : les effets directs comprennent les événements causés par l'absorption de l'énergie des rayonnements par les molécules cibles qui conduisent à des cassures au niveau des molécules irradiées alors que les effets indirects dérivent de l'interaction des particules réactives formées par la radiolyse de l'eau telles que le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) et les molécules cibles. Ce radical OH^{\bullet} réagit avec le squelette sucre-phosphate de la chaîne d'ADN provoquant ainsi l'élimination des atomes d'hydrogène à partir des sucres, ce qui cause la dégradation des liaisons d'esters de phosphate et par conséquent l'apparition ultérieure des cassures de l'ADN simple brin (ADNsb). L'endommagement de l'ADN, par l'irradiation, rend les microorganismes incapables de se reproduire (Urbain 1986). Cet avantage fait de l'irradiation une importante technique de conservation de divers produits alimentaires.

1.5 Résistance bactérienne

1.5.1 Résistance à l'irradiation : L'exemple de *Deinococcus radiodurans*

Parmi les organismes les plus résistants connus au monde se trouve *Deinococcus radiodurans* (*D. radiodurans*). Cette bactérie non virulente présente une résistance extraordinaire aux effets létaux de nombreux agents endommageant l'ADN, y compris les rayonnements ionisants, le peroxyde d'hydrogène, les acides, les températures élevées ainsi que de nombreux autres agents endommageant l'ADN (Battista, 1997). Cette bactérie se caractérise par sa grande capacité à réparer les cassures d'ADN double brin induites par les rayonnements ionisants. Ainsi, le processus de cette réparation est radio-inductible en fonction de la synthèse de nouvelles protéines suite à l'irradiation (Kitayama et Matsuyama, 1968; Matsuyama, 1971).

Les ADN chromosomiques et plasmidiques de *D. radiodurans* sont aussi sensibles aux ruptures des doubles brins d'ADN induites par l'irradiation que les bactéries sensibles sauf que cette bactérie, comme d'autres bactéries extrêmement résistantes à l'irradiation, utilise un mécanisme classique de réparation et de protection de l'ADN, mais avec une efficacité bien supérieure à celle des bactéries sensibles à l'irradiation (Cox et Battista 2005; Daly et coll., 2007). Sous sa forme végétative, *D. radiodurans* R1 est particulièrement résistant aux rayonnements UV. Elle est capable de survivre à des doses allant jusqu'à 750 Jm^{-2} avec une perte minimale de viabilité (Brooks et coll., 1980). Ainsi, *D. radiodurans* R1 exprime la totalité des composants du système de réparation par excision de nucléotides dépendant du complexe UvrABC qui caractérise de nombreuses espèces, y compris *E. coli* (Brooks et coll., 1980). Contrairement à *E. coli*, l'inactivation de la voie de réparation par excision n'influence pas la résistance de *D. radiodurans* aux UV. White et coll. (1999) ont démontré que *D. radiodurans* dépourvue de gènes intervenant dans la réparation par excision ne devient sensible aux UV que lorsque le gène *usv* (DR1819) est également inactivé. Ce gène, qui code pour une endonucléase (homologue à celle d'*E. coli*), joue un rôle important dans la réparation des dommages d'ADN induits par les UV, probablement en complétant la réparation par excision ou par l'extension de brins après la réparation par recombinaison (Selvam et coll., 2013). De plus, la répression de *recA* produit également une souche de *D. radiodurans* qui est extrêmement sensible aux dommages de l'ADN (Tanaka et coll., 2004). Cependant, malgré le fait que cette bactérie exprime plusieurs protéines analogues à celles favorisant la résistance d'autres espèces, aucun travail n'a pu à ce jour donner une explication à sa grande résistance aux UV-C (Selvam et coll., 2013). Toutefois, l'inactivation du gène *usv* n'influence presque pas la résistance de cette bactérie aux UV-C en raison de la présence de la voie de réparation par excision. Ainsi, malgré la présence de deux systèmes de réparation par excision qui caractérisent *D. radiodurans*, la cellule ne nécessite pas cette redondance pour résister aux UV-C, ce qui rend difficile

de dire que la présence des deux systèmes de réparation contribue de manière significative à la tolérance extraordinaire de cette espèce aux UV.

Aussi, la souche mutante pour *polA* s'est montrée sensible à toutes les formes de lésions de l'ADN, ce qui indique que l'ADN polymérase I de *D. radiodurans* (homologue à celle de *E. coli*) joue un rôle central dans la réparation des dommages induits par les UV-C sans doute en complétant la réparation par excision ou par l'extension de brin après la réparation par recombinaison (Gutman *et coll.*, 1994). Toutefois, Zahradka *et coll.* (2006) ont démontré que PolA de *D. radiodurans* prend en charge une réplication de l'ADN exceptionnellement efficace dès les premiers stades de récupération après une irradiation. Cependant, le clonage du gène *polA* d'*E. coli*, sensible à l'irradiation, était capable de compléter les mutants *polA* de *D. radiodurans* sensibles à l'irradiation (Gutman *et coll.*, 1994). Le mécanisme par lequel l'irradiation de *D. radiodurans* rend les protéines de réparation, natives ou clonées, plus fonctionnelles qu'au niveau des bactéries sensibles est inconnu (Makarova *et coll.*, 2007). Probablement que l'extrême résistance à l'irradiation est due à l'alignement de ses chromosomes et/ou la morphologie de certaines séquences répétées facilite le réassemblage du génome (Daly, 2006; Makarova *et coll.*, 2001); ou bien à un ensemble de gènes non caractérisés codant pour des fonctions qui améliorent l'efficacité de la réparation de l'ADN (Cox et Battista, 2005); ou encore, les complexes de Manganèse (Mn) non enzymatiques présents dans les membranes bactéries résistantes protègent les protéines, mais pas l'ADN, de l'oxydation suite à l'irradiation (Daly, *et coll.*, 2007).

1.5.2 Mécanisme de résistance bactérienne

Au cours de la transformation des aliments, plusieurs traitements physiques et chimiques sont appliqués pour inactiver la croissance des microorganismes et améliorer la durée de vie des produits. Dans certaines circonstances, ces micro-organismes utilisent des mécanismes physiologiques et moléculaires leur permettant de survivre sous des conditions de stress, ce qui peut perturber les efforts des industries alimentaires visant à contrôler ces agents pathogènes. La majorité des traitements qui inactivent seulement une partie de la population bactérienne et qui favorisent l'apparition de sous-populations distinctes dans la culture traitée sont connus pour favoriser l'apparition de plusieurs résistances (Skandamis *et coll.*, 2008). Toutefois, les microorganismes qui survivent à un type de stress développent souvent une résistance croisée à d'autres types de stress (Wesche *et coll.*, 2009).

Ainsi, pour survivre à des conditions difficiles, les microorganismes essaient de s'adapter aux stress en augmentant leurs synthèses en protéines dites «de choc thermique », qui protègent les cellules et les organismes du stress et empêchent souvent la mort cellulaire (Kvint *et coll.*, 2003; (Park

et *coll.*, 2000). Bien que l'exposition prolongée à des conditions de stress puisse entraîner la mort cellulaire, l'induction de ces protéines rend la bactérie tolérante. Aussi, la réponse au stress oxydatif classique est régulée par des facteurs de transcription, tels que OxyR chez *E. coli* (Storz et *coll.*, 1990), OhrR chez *B. subtilis* (Mongkolsuk et Helmann, 2002) et Yap1 chez *Saccharomyces cerevisiae* (Delaunay et *coll.*, 2000). Ces régulateurs qui sont activés par l'oxydation des cystéines hautement conservées induisent l'expression des enzymes antioxydantes telles que les peroxyrédoxines, les glutarédoxines et les thiorédoxines. Cependant, chez de nombreux microorganismes, la réponse aux stress oxydatifs, non seulement déclenche une réponse antioxydante, mais peut favoriser la régulation positive des gènes de choc thermique. Chez *B. subtilis*, le modèle des bactéries à Gram-positif, l'induction des gènes de choc thermique de classe III est engendrée par le facteur de transcription Spx (disulfide stress-sensing transcription factor) (Rochat et *coll.*, 2012). Aussi, chez *E. coli*, qui est à Gram-négatif, tous les systèmes de chaperon y compris DnaK (intervient dans le repliement et le dépliage des protéines), GroEL (impliqué aussi dans le repliement des protéines), GroES (co-facteur de GroEL) et HtpG (intervient dans l'entretien, l'activation et la stabilisation des protéines), ainsi que d'autres protéines de choc thermique classique comme les protéases Clp (permettent le clivage de plusieurs protéines en réponse à des températures extrêmes) et les courtes protéines de choc thermique IbpA et IbpB (stabilisent l'agrégation des protéines suite à l'exposition à des températures élevées), sont positivement régulées par le stress oxydatif induit par le peroxyde d'hydrogène (Zheng et *coll.*, 2001). Chez *E. coli*, la réponse au choc thermique est contrôlée par le facteur sigma 32 (Arsène et *coll.*, 2000). Ainsi, dans des conditions normales (absence de stress), la concentration du facteur sigma 32 est très faible, et sa demi-vie est très courte *in vivo* (Straus et *coll.*, 1987). Toutefois, l'exposition des cellules à un choc thermique favorise une augmentation de la concentration de ce facteur en impliquant de nombreux mécanismes de régulation transcriptionnelle, traductionnelle et post-traductionnelle (Morita et *coll.*, 1999). L'application des facteurs sublétaux (acide ou thermique) pourrait induire des mécanismes de résistance dans la population survivante et modifier leurs caractéristiques de virulence (Hill et *coll.*, 2002; Wesche et *coll.*, 2009). Par conséquent, il est important d'élucider le mécanisme de la réponse bactérienne (en particulier chez les bactéries pathogènes) aux applications séquentielles des stress létaux.

Comme une réaction envers tous les types de stress, les bactéries développent un mécanisme de réparation d'ADN dans le but de résister à ces différents chocs (Schärer, 2003). Plusieurs mécanismes de réparations d'ADN sont reconnus :

- **Inversion directe** : réparation directe, par les photolyases, des dimères de pyrimidine causés par les rayons UV (Payne et *coll.*, 1987).

- **Réparation par excision de base** : réparation du dommage au niveau d'une base individuelle d'ADN. La base endommagée est éliminée par une ADN glycosylase et une endonucléase clive le désoxyribose. L'espace ainsi libéré est rempli par la base opposée en présence d'une ADN polymérase puis une ADN ligase structure le brin réparé (Zharkov, 2008).
- **Réparation par excision de nucléotide** : réparation des lésions étendues ou qui provoquent un dommage important à l'ADN par une exposition aux UV-C ou à la radioactivité. Les hélicases ouvrent le double brin d'ADN, ensuite les endonucléases simple brin coupent les extrémités 5' et 3' de la lésion, après l'excision l'ADN polymérase synthétise le brin enlevé et l'ADN ligase structure le squelette de l'ADN (Sancar, 1996).
- **Réparation par recombinaison homologue** : c'est la principale voie de réparation des cassures d'ADN double brin causées par les rayonnements ionisants chez les bactéries (Shrivastav et coll., 2007). Elle consiste à utiliser l'ADN homologue non endommagé comme une matrice pour la réparation (Nowosielska, 2007).

L'exposition à des agents qui interfèrent avec la réplication de l'ADN ou qui provoquent des dommages à l'ADN induit l'expression d'un ensemble de gènes intervenant dans la réponse SOS et qui sont impliqués dans la réparation de l'ADN, la recombinaison, la réplication et la division cellulaire (Janion, 2008). Dans certains cas, une exposition prolongée ou répétitive à un même agent stressant pourrait favoriser des résistances à des stress connus comme létaux, tel qu'observé par Lacroix et Lafortune (2004) chez *Pantoea agglomerans* (famille des Entérobactéries) isolée des carottes irradiées avec une dose de 7 kGy et après 30 jours d'entreposage. Pourtant, les entérobactéries sont connues comme des espèces très sensibles à l'irradiation. Cela suggère que cette bactérie a développé un mécanisme de résistance lui permettant de tolérer les différents stress tels que l'irradiation.

1.5.3 La réponse SOS

Les bactéries peuvent être exposées aux différents facteurs de stress comme l'irradiation gamma et les UV-C, pouvant causer, d'une manière directe ou indirecte, des dommages au niveau de l'ADN. La réponse SOS est un système de régulation très conservé chez les bactéries qui est induit en réponse à des dommages (Erill et coll., 2007) et qui permet aux cellules de survivre. Cette réponse favorise également les réarrangements des intégrons, élément génétique retrouvé surtout chez les bactéries à Gram négatif leur permettant de résister aux stress, en contrôlant l'expression des intégrases (Cambray et coll., 2011; Guerin et coll., 2009).

Cette réponse, identifiée pour la première fois en 1975 au niveau d'une fourche de réplication présentant des lésions d'ADN chez *E. coli* (Radman, 1975), est induite par l'activation de la protéine recombinase A (RecA) (Anderson et Kowalczykowski, 1998) (Figure 3). Initialement, des

dimères de LexA (pour Locus for X-ray sensitivity) se lient à la boîte SOS empêchant la transcription des gènes de réparation. Suite à un stress, comme l'irradiation UV-C, certains produits chimiques ou composés oxydants, des acides, des agents mutagènes organiques et certains antibiotiques, l'ADNsb résultant d'un dommage à l'ADN déclenche le mécanisme de réparation. Ainsi, des filaments de RecA se forment et induisent le clivage autocatalytique de LexA et de plusieurs autres répresseurs transcriptionnels ce qui rend LexA incapable de se lier à ses sites cibles, activant ainsi l'expression des gènes SOS (Little, 1991). Toutefois, après la réparation d'ADN, les dimères de LexA nouvellement synthétisés se lient de nouveau à la boîte SOS et inhibent la transcription des gènes cibles.

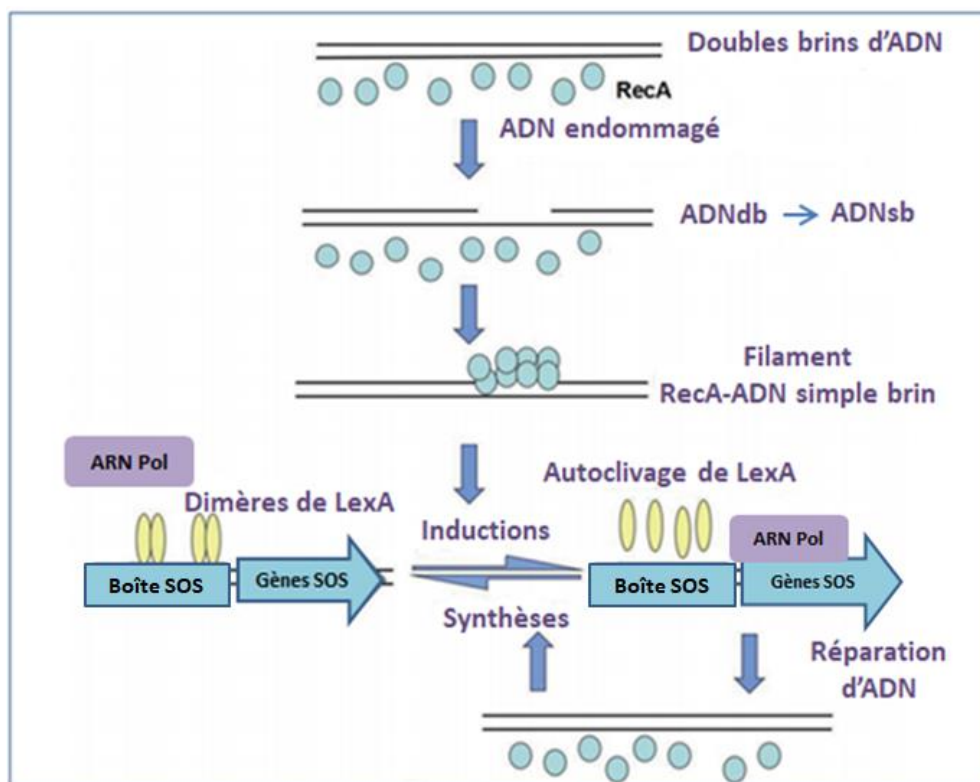


Figure 3. Processus d'induction de la réponse SOS. Adaptée de Qin *et coll.* (2015).

ADNdb: ADN double brin; ADNsb: ADN simple brin; ARN Pol: ARN polymérase.

Chez *E. coli*, la réponse SOS comprend l'activation d'un ensemble spécifique de gènes visant à réparer les dommages à l'ADN (Little, 1991). Chez cette bactérie, l'activation synchronisée des gènes SOS est favorisée par le répresseur transcriptionnel LexA (Wertman et Mount, 1985). Cette protéine forme des dimères qui sont capables de reconnaître un motif de liaison palindromique appelé boîte LexA (ou boîte SOS), qui a été montré pour suivre un consensus 5'-TACTGT(AT)₄ACAGTA-3' (Fernández de Henestrosa *et coll.*, 2000; Wade *et coll.*, 2005). Toutefois, les sites de liaison à la boîte LexA sont généralement situés à proximité ou chevauchent avec le site de liaison à l'ARN polymérase

au niveau des promoteurs des gènes SOS une fois liés à leurs sites cibles, les dimères LexA empêchent la liaison à l'ARN polymérase et répriment ainsi l'expression des gènes. Le gène *lexA* est induit tardivement pour arrêter l'induction de la réponse SOS quand le signal génotoxique disparaît (Fernandez et coll., 2000). Toutefois, quand la cible de LexA est *lexA*, elle échappe à l'autoclivage pour empêcher l'inhibition du mécanisme de la réparation (Butala et coll., 2011). Cette observation peut expliquer comment l'affinité de liaison de LexA aux différents promoteurs est corrélée avec le moment de l'expression des gènes cibles selon leur importance pour la réponse SOS.

La caractérisation expérimentale des gènes régulés par LexA, et donc les gènes qui constituent la réponse SOS, a été réalisée pour *E. coli* (Courcelle et coll., 2001), *Bacillus subtilis* (Goranov et coll., 2006) et *Pseudomonas aeruginosa* (Cirz et coll., 2006). Chez *E. coli* et *B. subtilis*, le régulon LexA comprend soit 43 et 63 gènes respectivement, bien que seulement 7 gènes soient communs entre eux. Par contre, le régulon de la bactérie *P. aeruginosa*, n'est formé que de 15 gènes. Dans tous les cas, LexA contrôle l'expression de *recA* et *lexA*, les régulateurs positifs et négatifs de la réaction respectivement, ainsi que les gènes qui codent pour des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN ou de la recombinaison, et les gènes qui codent pour des ADN polymérases non essentiels.

La protéine RecA est également nécessaire pour la recombinaison homologue (Kowalczykowski et coll., 1994) et participe à la voie de tolérance aux dommages de l'ADN en formant des complexes avec les ADN polymérases IV (Pol IV) et l'ADN Pol V (Godoy et coll., 2007). Évidemment, la survie des cellules est liée à leur tolérance à l'ADN endommagé. Ainsi, la protéine UvrA est l'un des premiers produits de gènes dont l'augmentation de l'expression est souvent liée à un ADN endommagé chez *E. coli* (Courcelle et coll., 2001). Cette enzyme intervient dans la réparation par excision de nucléotides détectant les lésions de distorsion de l'ADN produites par plusieurs facteurs telle que l'irradiation (Yang, 2011). Toutefois, la capacité de la cellule à réparer son ADN par excision est favorisée par une surproduction de l'hélicase UvrD et des sous-unités UvrA et UvrC de l'excinuclease UvrABC. De plus, l'augmentation de l'expression de l'ADN polymérase II accroît la capacité de la cellule à synthétiser de l'ADN au niveau des sites abasiques (Qiu et Goodman 1997) et l'augmentation de 50 fois de la quantité des protéines RecA (Karu et Belk 1982) et RecN (Picksley et coll., 1984) favorisent la réparation par recombinaison. Cependant, lorsque la réparation par recombinaison ne peut pas réparer certaines lésions de l'ADN, le complexe UmuD'C catalyse la synthèse d'ADN trans-lésion (Woodgate et Ennis 1991). Aussi, plusieurs autres facteurs peuvent déclencher la réponse SOS chez *E. coli*. Ainsi, les antibiotiques β -lactamines stimulent cette réponse ce qui facilite la propagation des bactéries par une inhibition transitoire de la division cellulaire lors de la

réparation de l'ADN endommagé, ce qui favorise la survie de la bactérie suite à une exposition normalement létale aux β lactamines (Miller *et coll.*, 2004).

1.6 *Escherichia coli*

1.6.1 Découverte et classification

Le pédiatre et bactériologiste allemand Theodor Escherich avait isolé et décrit en 1885, pour la première fois, le bacille *Bacterium coli commune* à partir des selles de nourrissons souffrants de diarrhées néonatales (Escherich, 1885). Il soupçonnait son implication dans l'apparition des entérites. En 1919, Castellani et Chalmers ont renommé cette bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*) en hommage aux travaux de ce chercheur (Grimont, 1987). Le genre *Escherichia*, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, est un bacille droit à Gram négatif regroupant six espèces différentes selon leurs caractéristiques biochimiques : *E. coli*; *E. hermannii*; *E. blattae* ; *E. fergusonii* ; *E. vulneris* et *E. albertii* (Euzéby, 2007). La plupart des souches de l'espèce *E. coli* colonisent le tractus gastro-intestinal de l'homme et des animaux à sang chaud d'une manière inoffensive en tant que microflore bactérienne normale (Grimont, 1987). Néanmoins, certaines souches d'*E. coli* sont devenues pathogènes par l'acquisition des facteurs de virulence au moyen de transposons, de plasmides, de bactériophages et / ou d'îlots de pathogénicité (Kaper *et coll.*, 2004). En effet, en 1945 Bray avait associé des souches pathogènes d'*E. coli* à certaines épidémies de diarrhée chez les enfants (Braun, 1974). Le développement de la technique du sérotypage dès 1947 a permis d'identifier les souches d'*E. coli*, particulièrement les souches pathogènes, grâce à leur antigène de paroi lipopolysaccharidique «O» (Kauffmann, 1947). Au niveau d'un même séro groupe «O», l'identification de l'antigène flagellaire protéique «H» détermine le sérotype de la souche (Kaper *et coll.*, 2004). Finalement, en 1950, plusieurs sérogroupes particuliers d'*E. coli* ont été déterminés comme des souches pathogènes humaines et animales responsables de symptômes variés allant de faibles diarrhées jusqu'à la mort (Levine 1987; Nataro et Kaper 1998).

Selon leur interaction avec l'hôte, les souches *E. coli* pathogènes peuvent être classées en six pathotypes regroupant les souches de sérotypes spécifiques: EPEC ("Enteropathogenic *E. coli*"); ETEC ("Enterotoxigenic *E. coli*"); DAEC ("Diffusely adherent *E. coli*"); EIEC ("Enteroinvasive *E. coli*"); EAEC ("Enteraggregative *E. coli*" et EHEC ("Enterohaemorrhagic *E. coli*"). Les EPEC et les EHEC possèdent le locus d'effacement des entérocytes (LEE), îlot de pathogénicité responsable de l'adhésion bactérienne aux cellules épithéliales (Griffin, 1991); par contre seuls les EHEC sont capables de produire les "Shiga-like toxin" (Stx) responsables des colites hémorragiques et du syndrome hémolytique et urémique chez l'homme (Kaper *et coll.*, 2004) (Beutin *et coll.*, 2000) (Tableau 1 et Figure 4).

Tableau 1. Pathotypes et sérotypes d'*E. coli* pathogènes

Phénotypes	Caractéristiques	Sérotypes
ETEC	- Diarrhée aqueuse, modérée à sévère associés à des crampes abdominales; - Production des entérotoxines thermostables et/ou thermolabiles.	O78:H12; O120:H7; O128:H7; O20:H-; O25:H42; O6:H16; O8:H9; O11:H2; O15:H11.
EIEC	- Syndromes dysentériques et forte fièvre; - Plasmide de virulence.	Sérotypes appartenant aux sérogroupes : O173; O143; O112; O124; O28ac; O144; O136
EAEC	- Diarrhée persistante; - Production de toxines.	
DAEC	- Diarrhées chez les enfants de plus de 12 mois; - Pas de production d'entérotoxines ou de toxines Stx.	
EPEC	- Diarrhées sévères accompagnées de vomissements et de fièvre chez les enfants de moins de 12 mois; - Pas de production d'entérotoxines ou de toxines Stx . - Présence du locus d'effacement des entérocytes (LEE)	O86:H34; O55:H6; O142:H34; O111:H2; O114:H2; O119:H6; O127:H6; O142:H6; O26:H11, O55:H7; O55:H34; O86:H8, O111:H9; O111:H25, O119:H2; O111ac:H8; O125ac:H6; O128:H2
EHEC	- Diarrhée aqueuse; colite hémorragique; - Productions de toxines Stx (vérotoxines). - Plasmide de virulence. - Présence du locus d'effacement des entérocytes (LEE)	O26:H-; O26:H11; O91:H-; O103:H2; O111:H; O113:H21; O118:H16; O128:H2; O145:H; O145:H28; O146:H21; O157:H7

D'après Beutin *et coll.*, 2000; Kaper *et coll.*, 2004; Milon *et coll.*, 1999; Yousef Alikhani 2005.

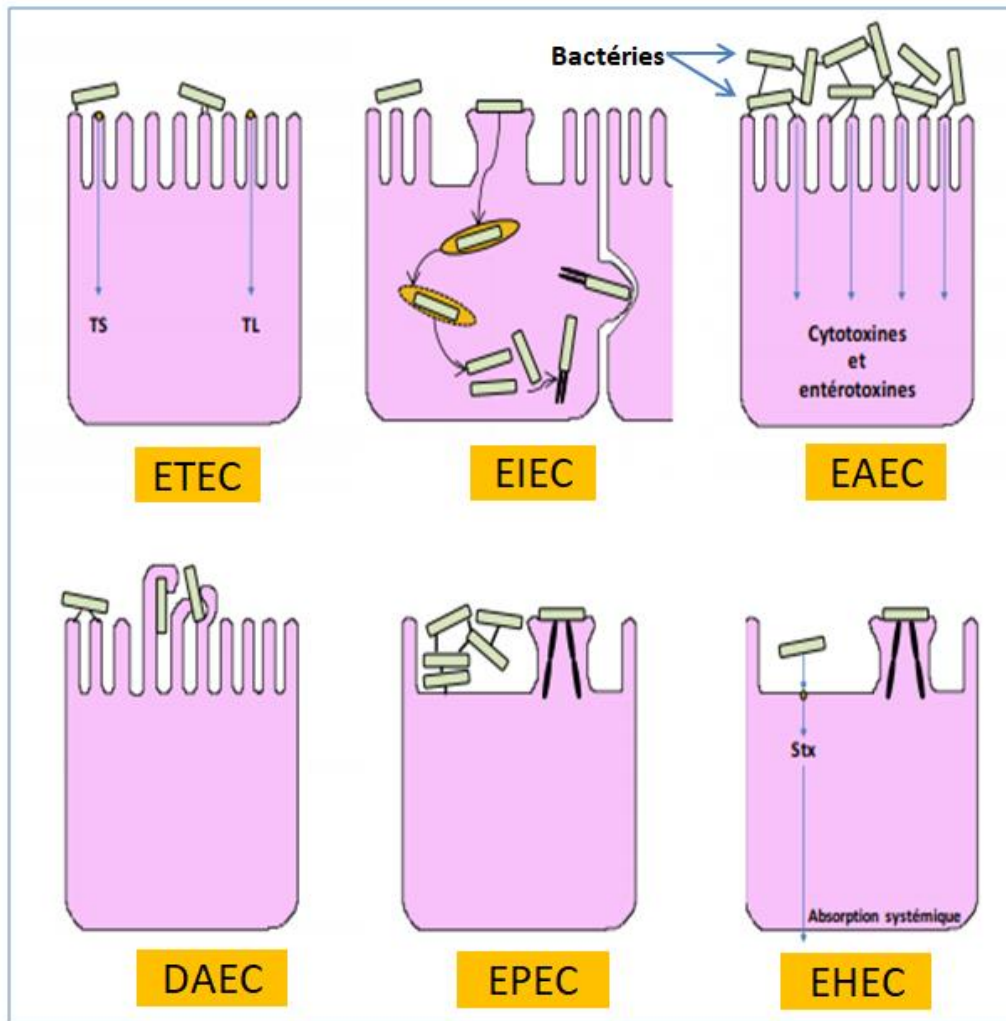


Figure 4. Mode de colonisation des différents pathotypes d'*E. coli*. Adaptée de Kaper et coll., (2004).

ETEC : Colonisent l'intestin grêle et adhèrent aux entérocytes. Ces bactéries produisent des entérotoxines thermolabiles ou thermostables provoquant des diarrhées osmotiques (Nataro and Kaper 1998).

EIEC : Envahissent les cellules épithéliales du côlon provoquant des diarrhées aqueuses accompagnées des crampes abdominales et de fortes fièvres. Elles ont la capacité de se déplacer de la cellule épithéliale infectée aux cellules adjacentes (Nataro et Kaper 1998).

EAEC : Colonisent le petit intestin et le côlon et adhèrent aux cellules épithéliales en formant un biofilm provoquant des diarrhées chroniques. Les EAEC produisent des cytotoxines et des entérotoxines.

DAEC : Colonisent l'intestin et adhèrent aux entérocytes causant des diarrhées chez les enfants de plus de 12 mois. Elles ont la capacité d'induire l'effet cytopathique sur les cellules cibles caractérisé par une exacerbation de certaines microvillosités qui s'enroulent sur les bactéries.

EPEC : Colonisent l'intestin grêle et adhèrent aux entérocytes et provoquent des diarrhées chez les enfants de moins de 12 mois. Elles sont capables de détruire la structure des microvillosités formant ainsi des lésions histopathologiques ou des lésions d'attachement et d'effacement caractéristiques des cellules de la muqueuse intestinale. Ces lésions résultent de l'action de protéines codées par les gènes du locus LEE.

EHEC : Ce pathotype est associé à des symptômes variés allant de la diarrhée à la colite hémorragique et au syndrome hémolytique et urémique (Karmali et coll., 1983). Il envahit le côlon et induit les lésions d'attachement et d'effacement. Les EHEC produisent les Stxs d'où leur dénomination STEC pour "Shiga-toxin producing *E. coli*". Ils peuvent aussi être nommés VTEC pour "Verocytotoxin-producing *E. coli*". Ils ont été isolés pour la première fois en 1982 aux États-Unis après une épidémie suite à la consommation de 'hamburgers' contaminés (Riley et coll., 1983). Plus tard, d'autres épidémies y ont été associées: en 1993 à Washington (501 malades et 3 décès) (Bell et coll., 1994), en 1996 au Japon (9451 malades et 12 décès) (Michino et coll., 1999) et en Écosse en 1996 (9512 malades et 17 décès) (Cowden et coll., 2001). Les bovins constituent le réservoir majeur des EHEC. Bien que ces bactéries produisent les Stx, elles ne sont pas pathogènes pour ces animaux. Le principal mode de transmission des EHEC à l'homme est la consommation d'aliments d'origine animale. Toutefois, l'ingestion d'eau, de fruits ou de légumes contaminés, ou bien le contact avec des animaux ou des personnes infectés peuvent être une source de transmission (Caprioli et coll., 2005; Tozzi, 2001). Cependant, plus de 380 sérotypes VTEC différents colonisant l'homme ou les animaux ont été isolés, mais peu d'entre eux sont des pathogènes humains tels O157:H7, le sérotype le plus connu et le plus étudié (Tarr et coll., 2005).

1.6.2 *Escherichia coli* O157:H7

Les souches d'*E. coli* O157:H7 sont souvent associées aux cas sévères de toxi-infections d'origine alimentaire. Plusieurs infections par ce pathogène ont été associées à la consommation de viandes de bovins. Les légumes, les fruits ou même l'eau potable ont également été impliqués. Ainsi, la consommation d'un aliment avec aussi peu que 10 cellules d'*E. coli* O157:H7 peut causer une colite hémorragique et le syndrome hémolytique et urémique chez l'homme (Karmali et coll., 1983; Phillips 1999). Ce sérotype a été associé à au moins trois épidémies importantes au Canada. En 2014, une éclosion de 119 cas de toxi-infection suite à la consommation de viande contaminée (23 hospitalisations, dont, 6 présentant le syndrome hémolytique et urémique) a été repérée en Alberta (Honish 2017), en 1999, 143 cas ont été signalés en Colombie-Britannique liés à du salami (MacDonald et coll., 2004), et évidemment en 2000, la célèbre éclosion de 2300 cas d'origine hydrique à Walkerton

en Ontario, qui a mené à sept décès (Hrudey *et coll.*, 2003). La bactérie *E. coli* O157:H7 se caractérise par une fermentation tardive (> 24 h) du sorbitol et une incapacité de synthétiser la β -glucuronidase, enzyme capable d'hydrolyser le 4-méthylumbelliféryl-D-glucuronide. Cette molécule synthétique est ajoutée à la solution de Sorbitol MacConkey pour vérifier la contamination des aliments par *E. coli* O157:H7 (Brown 2001).

La virulence d'*E. coli* O157:H7 est due à sa résistance aux acides gastro-intestinaux (Gorden et Small 1993) suite à l'activation du système dépendant de l'acide glutamique (GAD). Aussi, cette bactérie synthétise deux types de distincts toxines, soit Stx1 et Stx2, qui provoque la colite hémorragique et le syndrome hémolytique et urémique (O'Brien *et coll.*, 1984). Les gènes qui codent pour ces toxines, appartenant au génome de bactériophages qui se sont intégrés dans le chromosome bactérien, sont contrôlés par plusieurs stress sublétaux tels des chocs acides et/ou thermiques (Buncic et Avery 1998) et par la présence d'agents antimicrobiens à des concentrations inhibitrices (Yoh *et coll.*, 1999). Le complexe chaperon DnaK/DnaJ/GrpE régule plusieurs fonctions cellulaires clés intervenant à la fois dans le développement, la croissance et la résistance aux stress chez *E. coli* (Mayer et Bukau 2005). Ce complexe contrôle la qualité et le repliement des protéines et l'assemblage ou le désassemblage des complexes oligomériques. Il intervient aussi dans la réponse au stress menant à des agrégations et des repliements anormaux des protéines (Sharma *et coll.*, 2010). Ainsi, l'irradiation de cette bactérie favorise l'augmentation de l'expression relative des ARN messagers qui codent pour certaines protéines de stress GroES, GrpE (co-chaperon permettant la prévention de l'agrégation des protéines suite au stress thermique), ClpB, IbpB et HtpG et diminue celles des gènes qui codent pour DnaK et Htpx (protéase favorisant la dégradation de certaines protéines surproduites (Trudeau *et coll.*, 2014).

1.6.3 Effet de l'irradiation gamma sur la synthèse de protéines de stress chez *E. coli* O157:H7

Plusieurs études ont déterminé le rôle des protéines de choc thermique dans la résistance à plusieurs types de stress mais leurs implications dans la résistance liée à l'irradiation ne sont pas beaucoup étudiées. Caillet *et coll.* (2008) ont démontré que l'irradiation gamma influence l'expression des trois protéines de choc thermique DnaK, GroES et GroEL chez *E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. aureus* et *L. monocytogenes*. Ce traitement favorise l'augmentation de l'expression de GroEL chez les quatre pathogènes alimentaires, principalement chez *E. coli* et *L. monocytogenes*. De plus, ces chercheurs ont observé une importante induction de DnaK et GroES au niveau d'*E. coli*. Trudeau (2012) et Trudeau *et coll.* (2014) ont démontré que chez *E. coli* O157:H7, l'irradiation avec une dose de sensibilisation favorise l'augmentation de la synthèse d'une protéine de 28,6 kDa et diminue celle de 5 autres (13,7;

15,3; 26,9; 30,7 et 34,5 kDa). Cependant, la dose létale a beaucoup plus d'effets sur la synthèse des protéines en provoquant la diminution de la synthèse de 13 protéines (15,3; 17,2; 18,5; 22,1; 26,9; 30,7; 32,8; 34,5; 40,0; 43,3; 54,0; 75,7 et 87,3 kDa) et en augmentant celle de 8 autres (22,8; 24,7; 36,7; 56,8; 60,7; 66,5; 71,0 et 81,5 kDa). En se basant sur le poids moléculaire, ces auteurs ont identifié certaines de ces protéines. Ainsi, les protéines de 54,0 et 75,7 kDa induites correspondent respectivement à la rhamnulokinase et à la protéine Bet de transport de choline et la protéine d'assemblage de primosome alors que les six protéines de 56,8; 60,7; 66,5; 71,0 et 81,5 kDa dont l'expression a été réduite correspondent respectivement à la glycérol kinase; la protéine hypothétique Z2695; la sous-unité SecD de la translocase; les sous-unités gamma et tau de l'ADN polymérase III et la protéine PriA. Or, aucune de ces protéines n'est liée aux protéines de choc thermique comme Dnak, GroEL et GroES.

1.6.4 Génome d'*Escherichia coli* O157:H7

La taille chromosomique d'*E. coli* O157:H7 est d'environ 5,5 Mb (Tableau 2) dont une séquence de 4.1 Mb très bien conservée chez toutes les espèces d'*E. coli* (Perna et coll., 2001b). Toutefois, la comparaison de la taille du génome de deux souches pathogènes de O157:H7, soit EDL933 et Sakai, avec celle de la souche *E. coli* K-12 non pathogène suggère que dans les 1.4 Mb restants du génome, 0.53 Mb sont caractéristiques des souches O157:H7 dénommées îlots O ("O islands") et interviendrait dans sa virulence (Dobrindt et coll., 2003). La majorité de ces séquences spécifiques sont des éléments génétiques mobiles transférés horizontalement tels que des transposons, des séquences d'insertion, des plasmides, ou bien des prophages (Dobrindt 2005). Selon Reid et coll., (2000), *E. coli* O157:H7 dériverait d'une souche O55:H7 non toxigène et moins virulente, possédant le locus d'effacement des entérocytes (LEE) en quatre évènements séquentiels : (i) acquisition du bactériophage contenant stx2, (ii) acquisition du plasmide pO157, (iii) acquisition du bactériophage contenant stx1, et (iv) perte de la capacité de fermenter le D-sorbitol et perte de l'activité bêta-glucuronidase. Ainsi, *E. coli* O157:H7 possède 463 gènes associés aux phages contre seulement 29 gènes chez *E. coli* K-12 (Wick et coll., 2005). De plus, au moins 53 espèces différentes avaient contribué à cette séquence unique d'*E. coli* O157:H7 (Putonti et coll., 2006).

Tableau 2. Comparaison du génome d'*E. coli* K-12 non pathogène et de deux souches EHEC O157:H7 pathogènes. Tiré de Dobrindt (2005)

Pathotype/souche	Taille (pb)	Nb d'ORF (prévu)	Nombre de prophages	Plasmides
Non pathogène K-12 / MG1655	4 639 221	4284	10	-
EHEC (O157:H7) / EDL933	5 528 445	5361	18	pO157
EHEC (O157:H7) / Sakai	5 594 477	5361	24	pO157 et POSAK1

1.6.5 Principaux facteurs de virulence

Plusieurs facteurs de virulence sont présents chez *E. coli* O157:H7. Non seulement les protéines Stx qui sont associées aux maladies humaines, mais aussi la présence du plasmide pO157 sont corrélées à la capacité de provoquer ces maladies (Figure 5) :

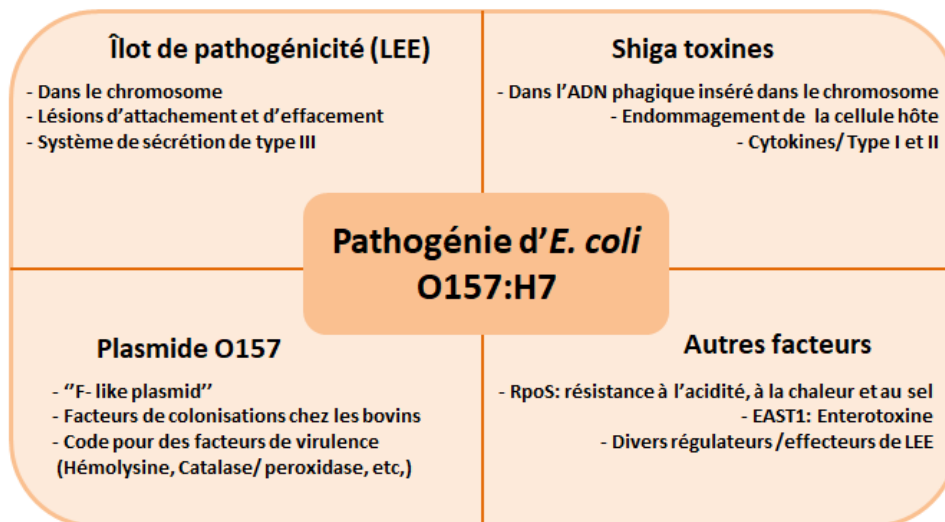


Figure 5. Facteurs de virulence d'*E. coli* O157:H7. Adaptée de Lim *et coll.* (2010)

1.6.6 Shiga toxines Stxs

Principal facteur de virulence caractéristique des EHEC, y compris *E. coli* O157:H7, les Shigatoxines Stxs (ou Vtx pour vérocytotoxine) sont codées par des bactériophages. Elles sont aussi connues sous le nom de vérotoxines suite à leur effet cytotoxique sur les cellules VERO, cellules épithéliales rénales du singe vert d'Afrique (*Cercopithecus aethiops sabaeus*) (Konowalchuk *coll.*, 1977). Elles tiennent leur nom grâce à leur grande similitude avec une toxine produite par *Shigella dysenteriae*. Les Stxs peuvent être divisées en deux groupes : Stx1 et Stx2 (ou Stx2EDL933) qui ont une similitude de 56% en séquences d'acides aminés. Toutefois, les Stx2 sont 1000 fois plus toxiques pour les cellules endothéliales rénales humaines comparativement aux Stx1 (Siegler et *coll.*, 2003). Les Stx1 sont les plus similaires aux toxines produites par *S. dysenteriae* sérotype 1 (Takao et *coll.*, 1988). Cependant, si les Stx1 ont une structure bien conservée avec des variants présentant les mêmes propriétés antigéniques et la même toxicité (Zhang et *coll.*, 2002), les Stx2 se caractérisent par des séquences nucléotidiques très variées ainsi que des propriétés antigéniques différentes (Melton-Celsa 1998). Les Stxs sont des hétéropolymères de 70 kDa possédant une structure conservée. Elles sont formées d'une sous-unité A enzymatiquement active de 33 kDa et de cinq sous-unités B identiques de 7 kDa se liant aux récepteurs globotriosyl céramides GB3 au niveau de la cellule hôte, soit les cellules endothéliales vasculaires humaines, les cellules épithéliales rénales, et au niveau du système nerveux central (Nataro et Kaper 1998). Les animaux ne possèdent pas ces récepteurs dans leur appareil gastro-intestinal ce qui pourrait expliquer pourquoi les EHEC peuvent les coloniser de façon asymptomatique (Malyukova et *coll.*, 2009). Ces deux sous-unités sont le produit d'un opéron de 1,2 Kb appartenant à des bactériophages de type lambda qui s'est intégré dans le chromosome de toutes les souches STEC (Herold et *coll.*, 2004).

La liaison des STEC à la cellule hôte déclenche le mécanisme de la cytotoxicité via la production des Stxs (Figure 6). Ainsi, les sous-unités B des Stxs interagissent avec le récepteur GB3 des Stxs; le complexe Stx-récepteur est internalisé par endocytose à l'intérieur de la cellule et transporté de façon rétrograde au réticulum endoplasmique (RE) à travers l'appareil de Golgi. Une fois dans le RE, la Stx est clivée par des protéases et la fraction toxique A1 est ainsi libérée dans le cytoplasme où elle exerce son activité enzymatique sur l'ARN ribosomique 28S. Cette action inhibe la synthèse des protéines via l'inhibition de la traduction d'ARN et par conséquent provoque la mort cellulaire (Endo et *coll.*, 1988; Karmali et *coll.*, 2010).

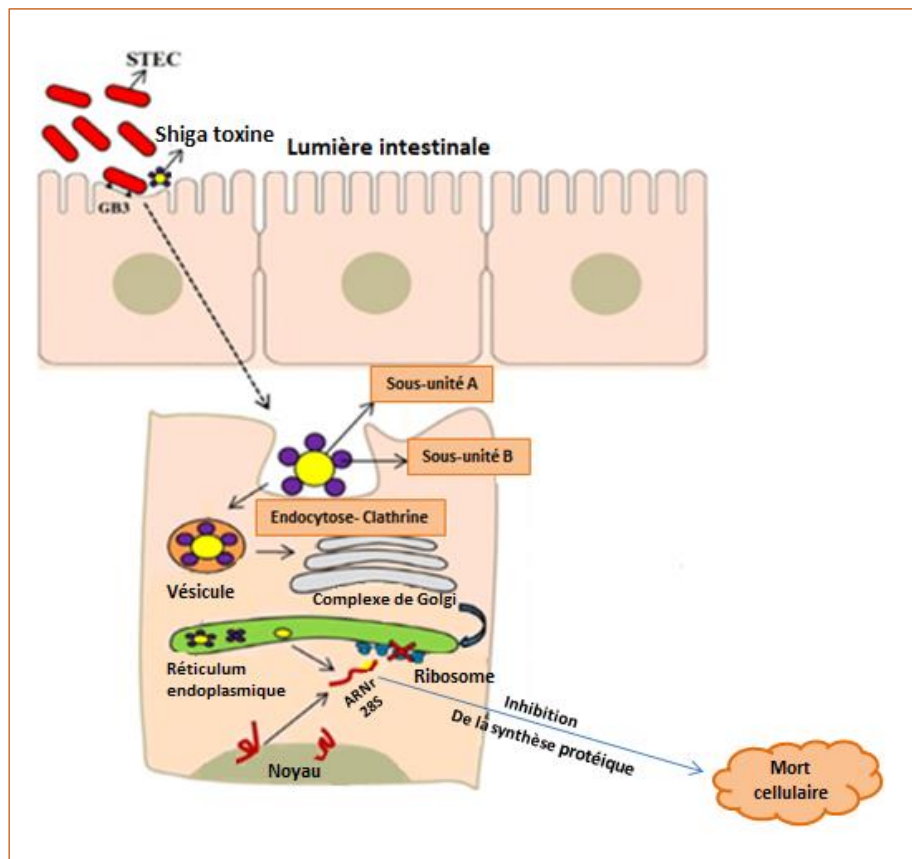


Figure 6. Mécanisme d'action des Shiga-toxines. Adaptée de Vinicius Silva Castro *et coll.* (2017)

1.6.7 Locus d'effacement des entérocytes (LEE)

La colonisation de la muqueuse intestinale par les EHEC induit des lésions histopathologiques spécifiques ou lésions d'attachement et d'effacement (A/E) très semblables à celles induites par les EPEC. Les gènes responsables de ces lésions se situent dans la région LEE, un îlot de pathogénicité de 43 kb avec une séquence de prophage supplémentaire de 7,5kb chez *E. coli* O157:H7. Cet îlot est constitué de 41 gènes répartis en 5 opérons transcriptionnels (Elliott *et coll.*, 1998) organisés en 3 principaux groupes : i) un système de sécrétion de type III (SSTIII), ii) une adhésine (appelée aussi intimine) et son récepteur transloqué Tir, et iii) plusieurs protéines sécrétées faisant partie du SSTIII (Delahay *et coll.*, 2001; Perna *et coll.*, 1998). Toutefois, les lésions A/E provoquent un effacement des microvillosités et une adhérence bactérienne à la membrane cellulaire par un mécanisme non complètement élucidé. Ainsi, via le SSTIII, la bactérie injecte des molécules effectrices directement dans la cellule-hôte, ce qui stimule l'accumulation de micro-filaments d'actine et l'attachement de la bactérie à la membrane cytoplasmique de l'entérocyte via l'adhésine, entraînant

ainsi des modifications au niveau du cytosquelette cellulaire, apparition de piédestaux véritables et enfin la disparition ou l'effacement des microvillosités (Hueck, 1998; Mainil et Daube, 2005).

1.6.8 Plasmide O157 (*pO157*)

En plus des deux facteurs de virulences Stx et LEE codés par des gènes chromosomiques, la majorité des souches EHEC ont un plasmide de virulence très conservé, soit le *pO157* d'environ 90 Kb (Caprioli *et coll.*, 2001). Ce plasmide qui code pour plusieurs autres facteurs de virulence inclut différents éléments génétiques mobiles tels que des séquences d'insertion, des prophages et des parties d'autres plasmides. Il comprend 100 cadres de lecture ouverts (ORF pour "Open Frame Reading") dont 43 ORF présentant des similitudes avec des protéines connues incluant 35 protéines qui pourraient intervenir dans la virulence d'*E. coli* O157:H7 (Burland *et coll.*, 1998). Certaines de ces protéines sont déjà caractérisées telles :

- **La catalase peroxydase périplasmique KatP** : active à la fois au niveau du cytoplasme et du périplasme. Chez *E. coli* O157:H7, elle intervient probablement dans la colonisation de l'intestin via la réduction du stress oxydatif (Brunder *et coll.*, 1996);
- **La sérine protéase EspP** : Capable de cliver la pepsine A et le facteur V de coagulation humaine (Schmidt *et coll.*, 1997);
- **L'entérohémolysine Ehx** : Toxine de type RTX provoquant la lyse des globules rouges qui sont une source du fer, un élément important pour la colonisation et la pathogénicité (Soloaga *et coll.*, 1999). Elle est hautement conservée chez les différents sérotypes d'EHEC comme la O157:H7, la O8:H19 et la O111:H8 (Brashears *et coll.*, 2006).
- **La métalloprotéase StcE** : Intervient dans le mécanisme d'inflammation. Elle est régulée par certains gènes du locus LEE (Lathem *et coll.*, 2002).
- **L'adhésine putative ToxB** : Toxine présentant une similarité de 20% avec la toxine de *Clostridium difficile* (Makino *et coll.*, 1998) et de 43 % avec le produit de *fa-1/lifA*, gène appartenant au chromosome des EPEC et des EHEC non-O157 (Morabito *et coll.*, 2003). Elle est codée par certains plasmides des souches EHEC, principalement *pO157* et *pO26* (Tatsuno *et coll.*, 2001; Tossoli *et coll.*, 2005). Elle interviendrait dans le mécanisme d'adhésion aux cellules-hôtes (Tatsuno *et coll.*, 2001).

1.7 Résistance de *Escherichia coli* O157:H7

1.7.1 Résistance à l'acide

Le faible pH de l'estomac (pH 1,5 à 3) est l'un des principaux mécanismes de défense par lequel l'hôte se protège contre les agents pathogènes entériques d'origine alimentaire (Peterson *et coll.*, 1989). Or, certaines bactéries ont pu élaborer des stratégies pour faire face à cette acidité en développant des mécanismes de résistance. La capacité de survivre dans l'environnement acide de l'estomac augmente les risques de colonisation des intestins. Ainsi, O157:H7 fait partie des bactéries infectieuses extrêmement résistantes à l'acidité (Leyer *et coll.*, 1995). Parmi les mécanismes de résistance à ce stress, trois importants sont identifiés chez *E. coli* :

- Le système 1 (ou AR1 pour "acid resistance 1") nécessitant le facteur sigma alternatif (RpoS) (Price *et coll.*, 2000). Ce mécanisme, réprimé par le glucose, n'est pas bien compris, quoique des études aient démontré que RpoS régule positivement l'expression des gènes de l'opéron *ehxCABD* porté par le plasmide de virulence *pO157* et qui code pour l'enterohémolysine chez *E. coli* O157:H7/EDL933. D'où un rôle potentiel du facteur RpoS dans la virulence chez cette souche (Li *et coll.*, 2008).
- Les systèmes AR2 et AR3, basés sur la décarboxylation d'acides aminés (arginine et glutamate). Pour le système AR2, les glutamate décarboxylases GadA et GadB convertissent le glutamate en acide γ -amino butyrique, ou GABA (Castanie-Cornet *et coll.*, 1999; Lin *et coll.*, 1996). Ce système est régulé positivement, entre autres, par les facteurs sigma de stress global RpoS et RpoN (Mitra *et coll.*, 2012; Tramonti *et coll.*, 2002) et par SdiA, un régulateur négatif des gènes du locus LEE (House *et coll.*, 2009). Tandis que pour le système AR3, l'arginine décarboxylase AdiC convertit l'arginine en agmatine (Gong *et coll.*, 2003). Pour les deux systèmes AR2 et AR3, l'homéostasie du pH est maintenue par la décarboxylation (de l'arginine ou du glutamate) via le remplacement du groupement α -carboxyle par un proton (H^+) transporté de l'environnement extracellulaire au cytoplasme (Figure 7). Toutefois, le système AR3 dépendant du glutamate favorise la résistance la plus efficace à pH 2,0 (Price *et coll.*, 2004).

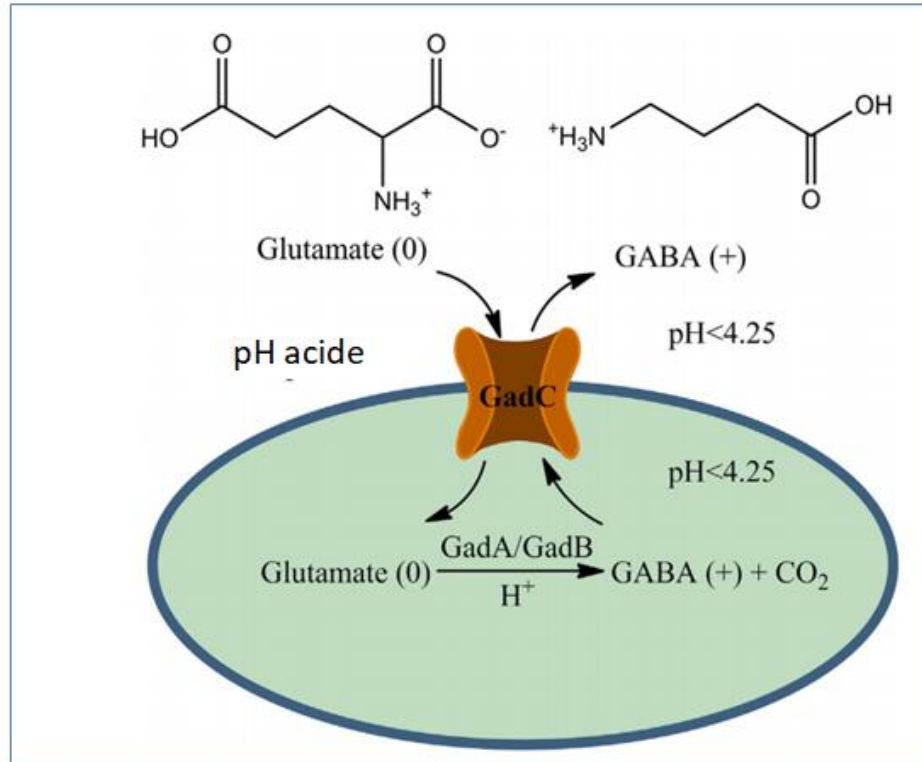


Figure 7. Mécanisme de résistance à l'acidité. Adaptée de Liu *et coll.* (2015).

1.7.2 Résistance au stress thermique et froid

1.7.2.1 Stress thermique

La résistance au stress thermique est favorisée par les protéines HSP (pour "heat shock protein") qui confèrent aux cellules une thermotolérance leur permettant de s'adapter et de survivre à plusieurs types de stress (Joly *et coll.*, 2010; Mjahed *et coll.*, 2012). Toutefois, l'augmentation de la synthèse de ces protéines et leur accumulation favorisent la résistance des bactéries à d'autres stress plus intenses. Ainsi, une action protectrice est attribuée aux HSP envers un stress thermique ou à d'autres types de stress ultérieurs (Parsell *et coll.*, 1993). Les HSP protègent la cellule contre les dommages aux protéines induits par le stress via une augmentation rapide et transitoire du taux de chaperons qui favorisent le repliement des protéines, et des protéases, qui dégradent les protéines mal repliées (Bukau 2000; Horwich *et coll.*, 1999).

En plus de l'hyperthermie, d'autres conditions stressantes provoquant l'endommagement des protéines tels les solvants organiques, les métaux lourds, les infections virales ainsi que tous les changements induisant des dommages aux protéines et influençant leur repliement, peuvent induire la synthèse des HSP (Santoro 2000). Toutefois, la réorientation de la synthèse

protéique suite au stress pousse la cellule à réprimer des gènes « constitutifs » et à activer des gènes de choc thermique par l'implication de processus de régulation transcriptionnelle, post-transcriptionnelle et traductionnelle, d'où le dynamisme de cette réponse. Ainsi, l'exposition d' *E. coli* à des températures élevées active cette réponse qui accroît, d'une manière considérable, les niveaux cellulaires des chaperons et des protéases ce qui lui permet de résister aux problèmes liés à l'agrégation et au mauvais repliement des protéines (Meyer et Baker 2011; Guisbert et coll., 2008). Chez cette bactérie, GroESL, composé des sous-unités GroEL et GroES est le système induit par le choc thermique le plus abondant et le plus étudié.

La régulation de l'expression des HSP passe par la protéine σ^{32} , le facteur central de la transcription en condition de stress qui dirige l'ARN polymérase vers les promoteurs des gènes cibles (Taylor et coll., 1984). Chez *E. coli*, le facteur σ^{32} est régulé positivement par un mécanisme à action directe ou "feedforward" permettant une importante traduction de son ARNm suite à une exposition à des températures élevées (Morita et coll., 1999), tandis qu'elle est régulée négativement par deux boucles de rétroaction ou "feedback" favorisées par les chaperons (DnaK/DnaJ/ GrpE) et les protéases (comme FtsH) (Guisbert et coll., 2008). Toutefois, la régulation de σ^{32} par les chaperons résulte aussi de l'état de repliement des protéines cellulaires. Cet état régule à la fois la dégradation et l'activité de σ^{32} (Figure 8).

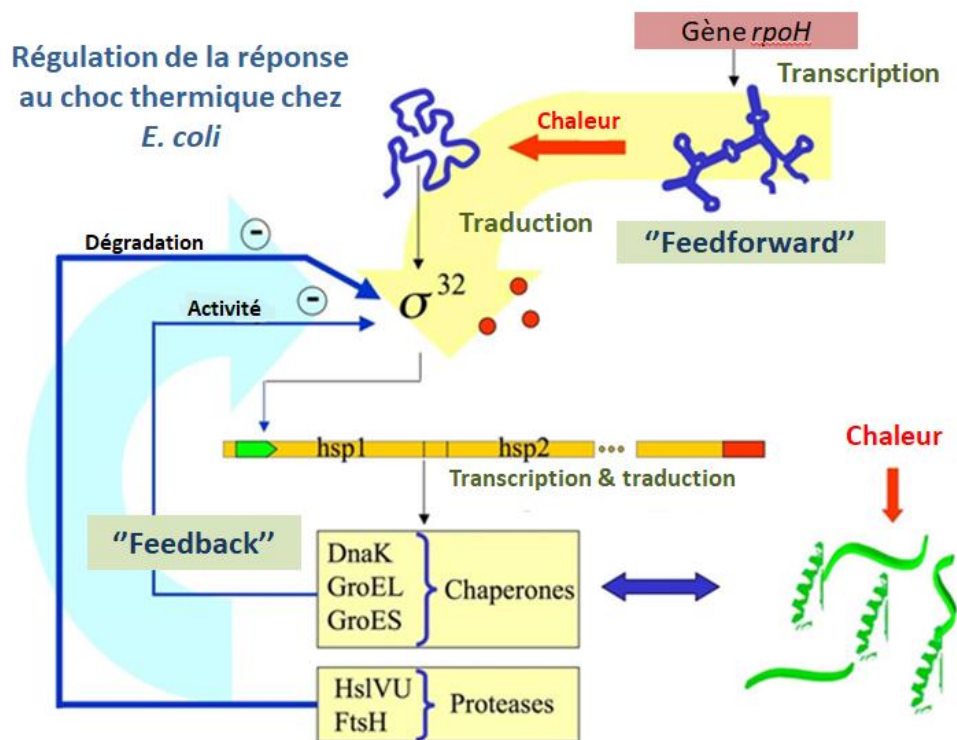


Figure 8. Mécanisme de résistance au stress thermique chez *E. coli*. Adaptée de Guisbert et coll. (2008).

1.7.2.2 Stress froid

Pour survivre à des basses températures, la bactérie augmente sa synthèse en protéines dites de choc froid (CSP pour "Cold Shock Protein"). Ainsi, chez *E. coli*, la réponse au stress froid se manifeste par l'expression de plusieurs protéines impliquées dans le renouvellement de l'ARNm, la réplication cellulaire, la modification conditionnelle et post-synthétique des bicouches de lipides membranaires, le processus de biosynthèse et la captation des sucres. Bien qu'*E. coli* O157:H7 puisse tolérer 5°C, elle peut néanmoins croître à une température aussi basse que 8°C (Palumbo et coll., 1995; Wang et coll., 1997). Cependant, lors d'un choc froid, *E. coli* induit initialement une famille de CSP, avec une production prédominante de CspA, la principale protéine de choc froid, représentant plus de 10% de la synthèse protéique cellulaire totale (Goldstein et coll., 1990). CspA est une protéine chaperon intervenant dans la régulation de l'ARNm par la protection de sa structure secondaire stable en réponse aux basses températures, facilitant ainsi sa traduction (Jones et Inouye 1994). Cependant, une expression élevée de CspA empêcherait la traduction des ARNm, ce qui bloquerait la croissance cellulaire. Ainsi, après l'adaptation au froid, l'ARNm de CspA est dégradé (Neuhaus et coll., 2000). À la fin de la phase d'acclimatation/adaptation au froid, la polynucléotide phosphorylase (Pnase) est induite (Neuhaus et coll., 2000). Cette protéine joue un rôle critique dans la survie d'*E. coli* O157:H7 à 4°C (Hu et coll., 2014) et dans la survie de la souche K-12 à 15°C (Zangrossi et coll., 2000; Beran et coll., 2001). Elle intervient dans la modification post-transcriptionnelle de l'ARNm et la réplication cellulaire (Clements et coll., 2002). De plus, le facteur sigma RpoS est impliqué dans la régulation des enzymes intervenant dans la modification conditionnelle des bicouches lipidiques membranaires des cellules hypothermiquement adaptées, ainsi que dans la régulation de nombreuses protéines impliquées dans les voies métaboliques centrales (énergie, synthèse protéique, etc.) de ce pathogène d'origine alimentaire, en réponse au stress froid (Jia et coll., 2014).

1.7.3 Résistance aux antibiotiques ; l'exemple des β -lactamines

L'utilisation accrue d'antibiotiques dans la nutrition animale pour traiter et contrôler certaines maladies ou pour augmenter la croissance animale favorise la résistance bactérienne aux antibiotiques (Courvalin, 2008). Ainsi, des mutations spontanées apparaissant chez des souches d'*E. coli* O157:H7 telle la souche EDL933 favorisent la résistance à l'ampicilline. Ainsi, de telles mutations ont augmenté la motilité et altéré la sensibilité aux phages et le temps de génération bactérienne *in vitro*, ce qui a entraîné une augmentation de la virulence d'*E. coli* O157:H7/EDL933 (Tóth et coll., 2003).

Chez les bactéries à Gram-négatif, la production des β -lactamases est le premier mécanisme induit par lequel elles résistent aux β -lactamines. Ainsi, l'expression du gène *ampC*, qui code pour la β -lactamase AmpC, est inductible par divers antibiotiques de type β -lactamines, (Sanders

Jr et Sanders Jr, 1986). Chez *E. coli*, les taux d'AmpC augmentent considérablement en présence de ce type d'antibiotique, conduisant au recyclage du peptidoglycane, nécessaire à la croissance et à la division des cellules (Normark, 1995; Park et Uehara, 2008; Livermore, 1995). Dans des conditions non stressantes, AmpC est exprimé à des niveaux très bas dans la cellule. Dans ce cas, la bactérie entame le recyclage normal des peptidoglycanes impliquant le transport des muuropeptides à travers la membrane cellulaire interne via la perméase AmpG. Ainsi, les tripeptides 1,6-anhydro-MurNAc sont formés et convertis, par l'intermédiaire d'AmpD, en pentapeptides qui seront recyclés pour former des molécules UDP-MurNAc-pentapeptide. Ces composés sont incorporés dans la paroi cellulaire. Aussi, ils se lient à l'unité de régulation de l'AmpR qui, dans ces conditions, prédomine et inhibe l'expression du gène *ampC*. Cependant, en présence d'antibiotiques de type β -lactamines, les produits de dégradation des peptidoglycanes, soit les 1,6-anhydro-MurNAc-tripeptides ou pentapeptides s'accumulent dans le cytosol. Ils sont par la suite internalisés vers le cytoplasme à travers AmpG, activant ainsi l'AmpR, qui devient un régulateur positif d'*ampC*. L'AmpC ainsi produite pourra hydrolyser l'antibiotique cible (Lindquist *et coll.*, 1993, Macdougall *et coll.*, 2011; Mark *et coll.*, 2011; Zeng et Lin, 2013) (Figure 9).

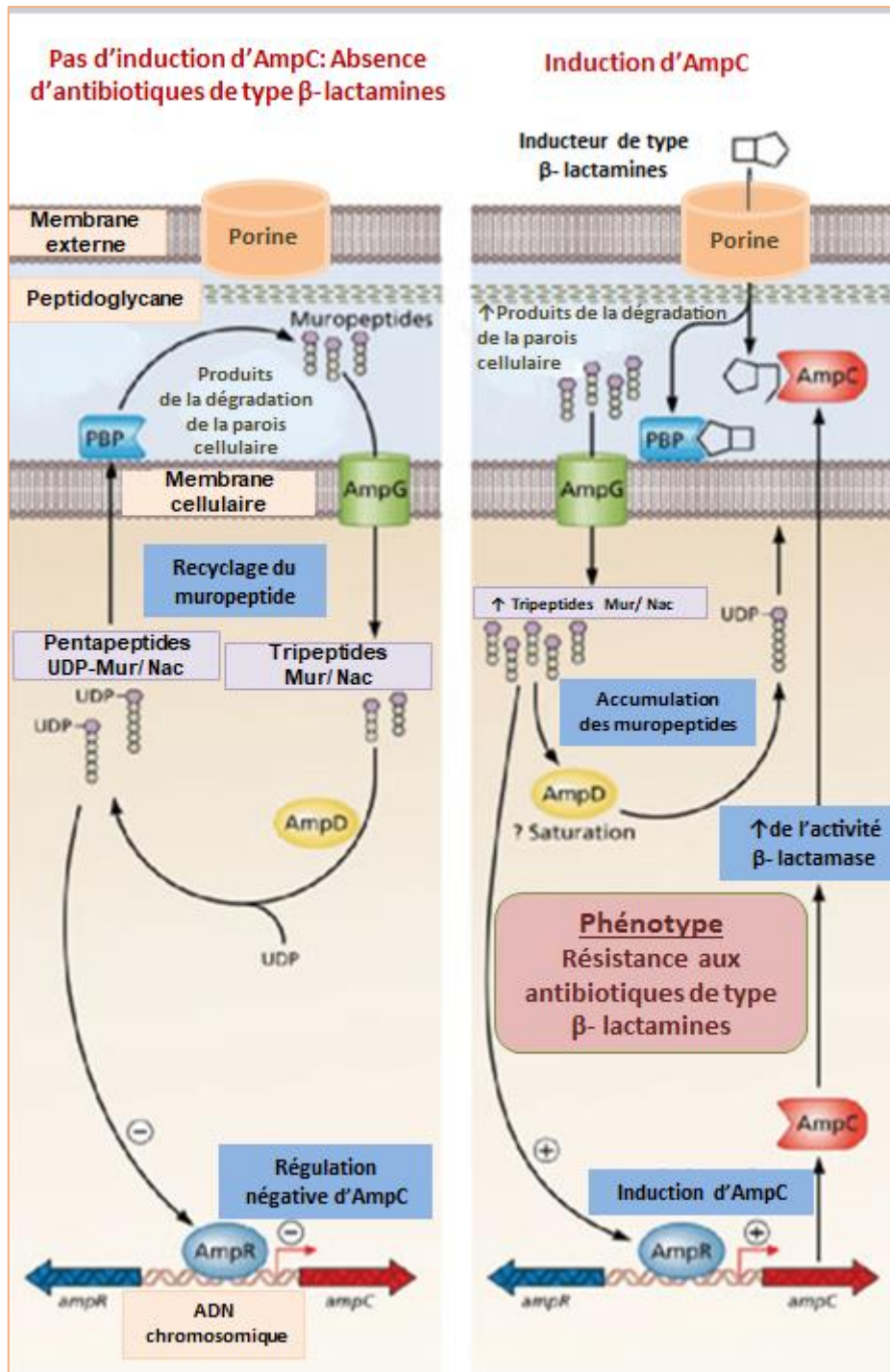


Figure 9. Mécanisme de résistance aux antibiotiques de type β -lactamine.

Adaptée de Harris *et coll.* (2015)

1.7.3 Résistance au stress oxydatif

Le stress oxydatif est dû à la production des dérivés réactifs d'oxygène ou ROS (pour "Reactive Oxygen Species") très toxiques en raison de leur potentiel à endommager les fractions oxydables de l'ADN, des protéines et des lipides. L'ion superoxyde (O_2^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) provoquent la libération du fer à partir du *cluster* Fe-S des protéines, ce qui génère le radical hydroxyle ($\cdot OH$) hyperactif dans l'environnement intracellulaire (Cabiscol *et coll.*, 2000; Cooke *et coll.*, 2003). Toutefois, la réponse au stress oxydatif est indispensable pour assurer la survie des bactéries à métabolisme aérobie. Chez les procaryotes, la superoxyde dismutase (SOD), la peroxyrédoxine et la catalase sont les premières enzymes produites pour se protéger contre les endommagements provoqués par ROS (Cabiscol *et coll.*, 2000; Lushchak, 2001). Or, ces enzymes sont insuffisantes dans les conditions les plus stressantes. Ainsi, chez *E. coli*, plusieurs régulateurs sont activés durant un stress oxydatif, incluant OxyR et SoxS. Ainsi, OxyR contrôle un régulon de plus que 30 gènes en réponse à H_2O_2 ; SoxR dirige un régulant de 100 gènes via l'activation de l'expression de SoxS (en réponse à l'ion superoxyde) et RpoS (en réponse à l'augmentation de sa propre concentration cellulaire) (Kramer *et coll.*, 1987). Toutefois, la réponse au stress oxydatif favorisée par les systèmes OxyR et SoxRS est liée à d'autres processus cellulaires fondamentaux tels que la biosynthèse des acides aminés (méthionine et acides aminés aromatiques), la synthèse de la paroi cellulaire (biosynthèse des lipides A et des peptidoglycanes), et le transport des cations métalliques divalents (Mn^{2+} , Zn^{2+} et Mg^{2+}) (Figure 10). Aussi, le facteur RpoS contrôle l'expression d'environ 200 gènes intervenant dans la résistance au stress oxydatif incluant l'hydroperoxidase KatE, l'exonuclease III XthA et SodC (Patten *et coll.*, 2004; Barth *et coll.*, 2009; Gort *et coll.*, 1999).

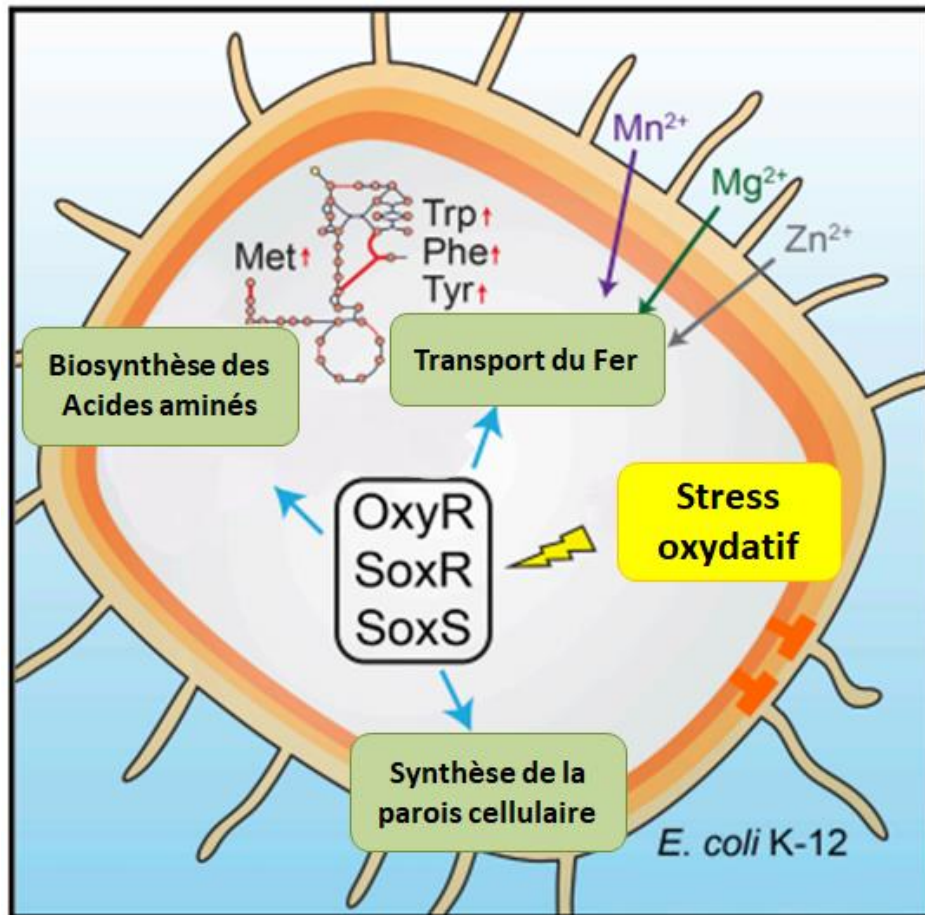


Figure 10. Réponse au stress oxydatif. Adaptée de Seo et coll. (2015)

1.8 Bacteriophages

1.8.1 Cycle lytique et cycle lysogénique

Les bactériophages (ou phages) ont été isolés pour la première fois au début des années 1900 (d'Herelle, 1917; Twort, 1915). Ce sont des virus bactériens jouant un rôle primordial dans l'évolution des bactéries incluant les souches d'EHEC. Par exemple, le génome d'*E. coli* O157:H7 peut contenir jusqu'à 24 prophages insérés dans différents sites du chromosome, promouvant ainsi la diversification génétique de la bactérie (Hayashi et coll., 2001).

Les phages peuvent être divisés en deux groupes selon leur cycle de vie (Figure 11): i) les phages virulents chez lesquels la multiplication se fait seulement par un cycle lytique, commençant par la réplication du génome phagique, puis la production de la capsid, l'assemblage du génome phagique avec les éléments de la capsid et en fin la formation des virions qui se libèrent de la cellule bactérienne souvent après sa destruction (lyse); ii) les phages tempérés : ces phages peuvent se multiplier par un cycle lytique ou un cycle lysogénique. Ce dernier consiste à garder le génome du phage au sein du

génomme bactérien en état de dormance (prophage) (Łobocka *et coll.*, 2004; Ravin 2011). Toutefois, lors de la lysogénie, il n’y a pas d’expression des gènes prophagiques. En se multipliant, la bactérie hôte multiplie le prophage qui, suite à une induction par les rayons UV ou certains antibiotiques capables d’induire la réponse SOS, peuvent entamer le cycle lytique et en conséquence produire des toxines Stxs (voir la section 1.8.3.) (Herold *et coll.*, 2004; Wagner et Waldor 2002).

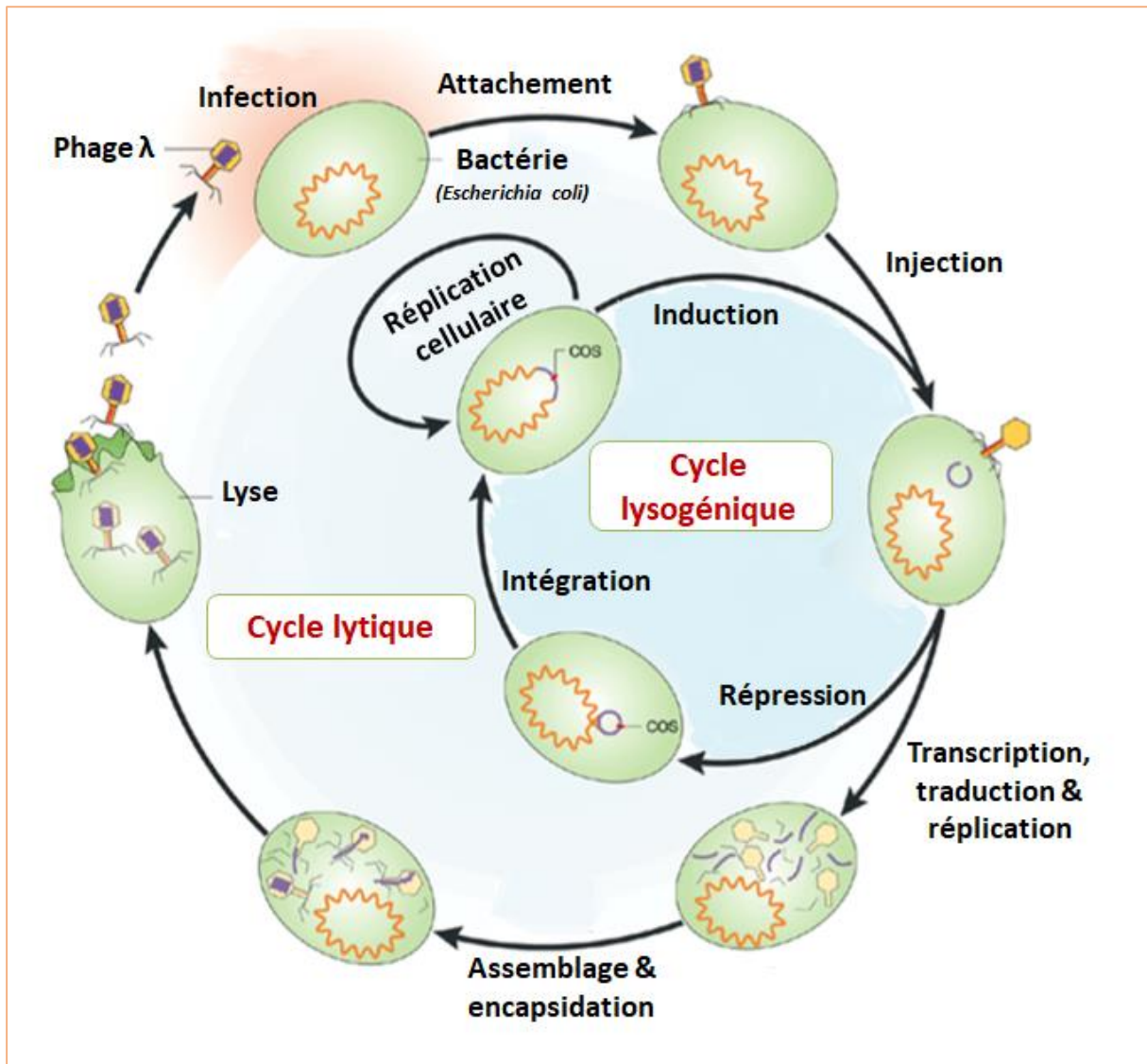


Figure 11. Cycle lytique et lysogénique. Adaptée de Campbell (2003)

1.8.2 Prophages *Stx*

Chez *E. coli* O157:H7, plus de 60 phages sont identifiés. Toutefois, 18 prophages différents ont été identifiés chez la souche EDL933, incluant les prophages CP-933V et BP-933W codant pour les toxines *Stx1* et *Stx2*, respectivement (Perna *et al.* 2001). Ces toxines sont codées par un opéron d'environ 1230 pb porté par deux bactériophages de type lambda intégré dans le génome bactérien (Perna *et al.* 2001). Le génome de ces prophages est très organisé. Il est constitué de trois opérons : "early left", "early right" codant pour les gènes impliqués dans la réplication et la recombinaison, et "late" codant pour les protéines structurales de la particule virale, les protéines d'encapsidation et les protéines de la lyse (Ptashne et Switch, 1992). Ainsi, des protéines (O et P) de l'opéron "early right" initient la réplication en utilisant la machinerie d'*E. coli*. Cette réplication se fait simultanément avec la formation des particules de tête et de queue suite à l'expression de l'opéron "late". En revanche, le mécanisme de l'encapsidation dépend de la réplication de l'ADN phagique. La lyse de la cellule hôte se fait par la holine, qui dégrade la membrane plasmique et la lysine qui lyse la couche de peptidoglycane (Campbell, 1994).

1.8.3 Régulation des gènes *stx* par la réponse SOS

L'expression des gènes *stx* dépend principalement de l'induction des prophages (Tyler *et al.* 2013), bien que la transcription du gène *stx1* puisse être favorisée par son propre promoteur en présence d'une faible quantité de fer (Aertsen *et al.* 2005; Calderwood et Mekalanos 1987). Cependant, l'induction des prophages *Stx* est contrôlée par RecA (Figure 12). Ainsi, à l'état lysogène le répresseur CI reste lié aux sites de l'opérateur droit (O_R) et gauche (O_L) empêchant ainsi l'induction des prophages (Waldor et Friedman, 2005). Toutefois, l'induction de la réponse SOS favorise la production et l'activation de RecA (Mühldorfer *et al.* 1996), qui clive le répresseur CI. Ainsi, l'anti-terminateur Q est transcrit en protéine Q qui active la transcription des gènes de phage y compris *stxA* et *stxB*. Les bactéries subissent une lyse et libèrent *Stx* qui seront absorbés systématiquement par la cellule-hôte. Il est donc supposé que tout agent ou condition endommageant l'ADN active l'induction des prophages.

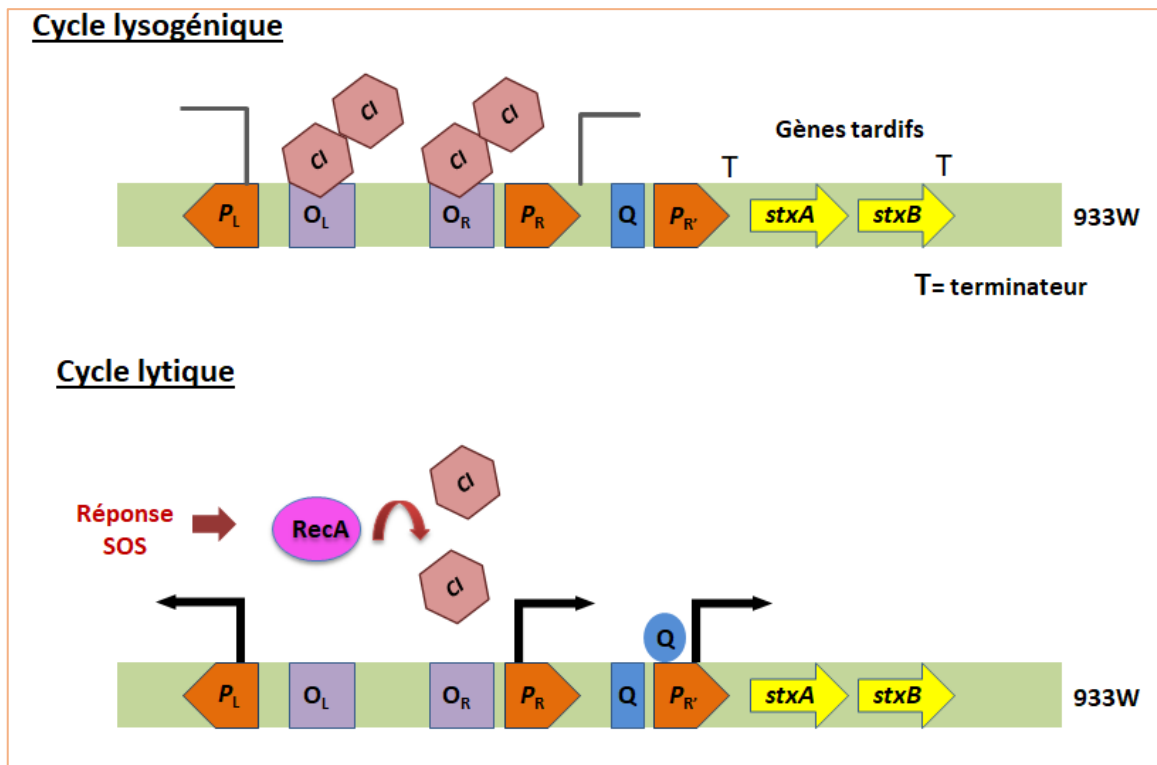


Figure 12. Régulation de l'expression des Shiga-toxines par le cycle phagique.

Exemple du Prophage BP-933W. Adaptée de Sperandio et Pacheco (2012).

Toutefois, les taux des Stx augmentent considérablement sous certains inducteurs typiques de la réponse SOS (Muniesa *et coll.*, 2004; Imamovic et Muniesa, 2012). Ainsi, des antibiotiques comme la mytomycine C, l'ampicilline et la ciprofloxacine augmentent la production de Stx qui a une capacité d'interférer avec la réplication d'ADN déclenchant ainsi la réponse SOS (McGannon *et coll.*, 2010). Le H₂O₂, l'acide nitrique et d'autres facteurs de stress induisent les Stxs (Tableau 3).

Tableau 3: Induction de l'expression des Stxs

Stx	Régulation	Références
Stx1	Cycle phagique	Tyler <i>et coll.</i> 2004.
	Fer	O'Brien <i>et coll.</i> 1982.
	Antibiotiques	Zhang <i>et coll.</i> 2000; McGannon <i>et coll.</i> 2010.
Stx2	Cycle phagique	Tyler <i>et coll.</i> 2004.
	Antibiotiques	Zhang <i>et coll.</i> 2000; McGannon <i>et coll.</i> 2010.
	oxyde nitrique	Vareille <i>et coll.</i> 2007.
	H ₂ O ₂	Wagner <i>et coll.</i> 2001.
	stress	Reading <i>et coll.</i> 2007; Hughes <i>et coll.</i> 2009.

1.8.4 Réplication et recombinaison

Les phages de type lambda initient leur réplication de la même manière qu'*E. coli*, par plusieurs cycles de réplication bidirectionnelle ou "théta" aboutissant à plusieurs monomères circulaires du génome (Weisberg 1983). Toutefois, ces phages peuvent utiliser leur propre système de recombinaison ou bien le système RecBCD d'*E. coli* en présence du site Chi (Figure 13). La présence de ce motif dans le génome des prophages inhibe la dégradation totale du double brin d'ADN par RecBCD, l'hélicase/exonucléase bactérienne. Cependant, lorsqu'il y a une coupure de l'ADN phagique circulaire au niveau du site cohésif (cos), une réplication en "cercle tournant" (sigma) peut se produire (Enquist et Skalka 1973). Or, dans le cas où c'est la seule coupure disponible, la recombinaison phagique dépend généralement de la recombinase bactérienne RecA (Tarkowski *et coll.*, 2002). La protéine Gam inhibe RecBCD pour empêcher la dégradation de l'ADN. Ainsi, l'ADN concatémère peut être produit.

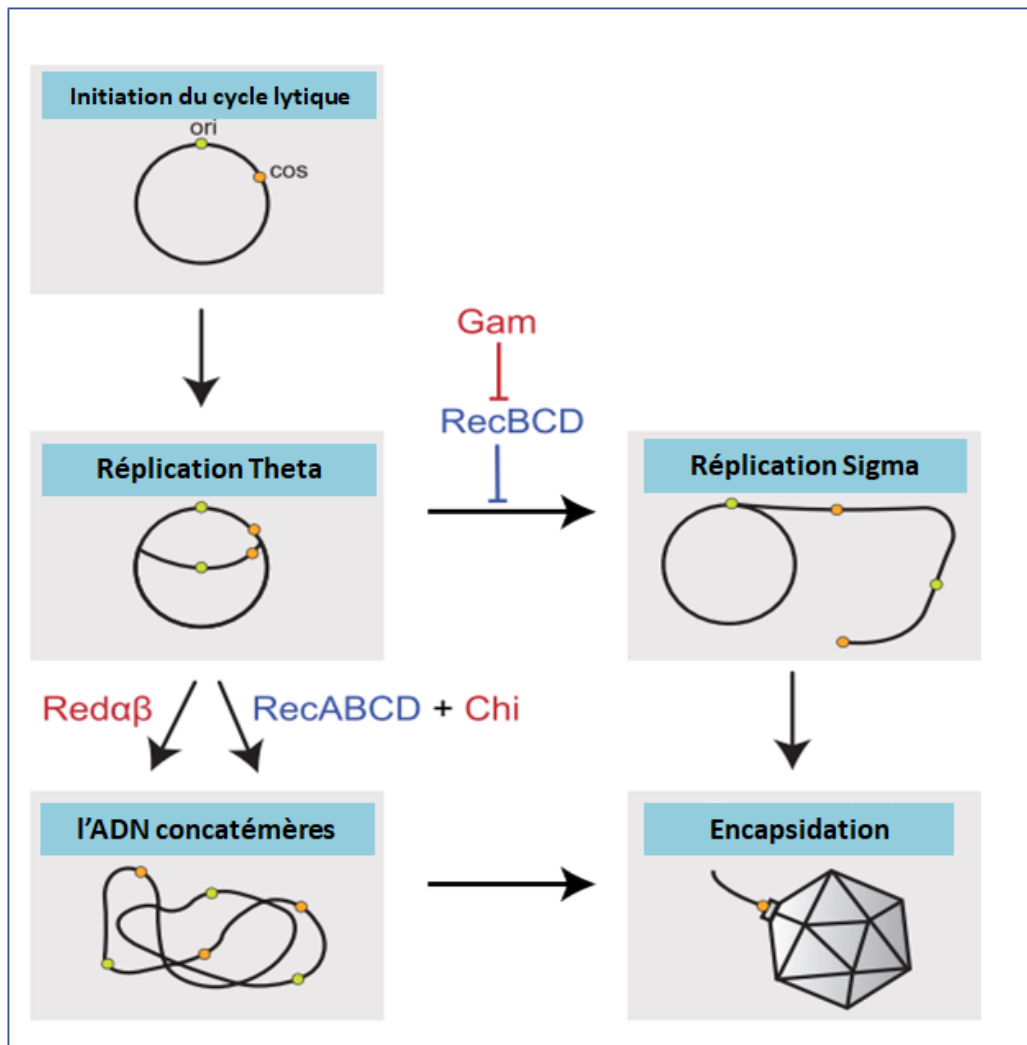


Figure 13. Réplication et recombinaison des phages de type lambda.

Adaptée de Bobay *et coll.* (2013).

1.8.5 Système "Red"

Les gènes *red* (*exoW*, *bet* et *gam*) jouent un rôle critique dans la recombinaison homologue chez les phages de type lambda tels BP-933W et CP-933V (Gingery et Echols, 1968; Singer et Weil, 1968). Ils font partie d'un opéron P_L contrôlé par le répresseur *cI* (Poteete, 2001). Les protéines ExoW et Bet semblent former un complexe fonctionnel exonuclease/recombinase. La protéine Gam favorise la protection des doubles brins d'ADN linéaires par l'inhibition de l'enzyme RecBCD d'*E. coli* via une interférence avec son site de liaison à l'ADN (Court *et coll.*, 2002; Murphy, 2007). Suite à un endommagement d'ADN, la protéine ExoW se lie et digère l'ADN, puis dépose la protéine Bet sur l'ADNsb et se dissocie du complexe ExoW/Bet. Dépendamment du Mg^{2+} , la protéine

Bet commence la renaturation des séquences homologues l'ADNsb préférentiellement sur des sites riches en paires de bases AT.

1.8.6 Intégration des prophages

Les phages Stxs s'intègrent dans le génome bactérien par recombinaison site-spécifique (*att*) médiée par des intégrases de type tyrosine recombinases (Landy 1989). Ces enzymes se fixent sur les sites *att* et activent la recombinaison et l'intégration du phage. Ainsi, une courte séquence similaire permet la reconnaissance entre le génome bactérien (*attB*) et le génome phagique (*attP*) (Weisberg 1983). À la fin, un prophage bordé des sites *attL* et *attR* est ainsi formé (Figure 14).

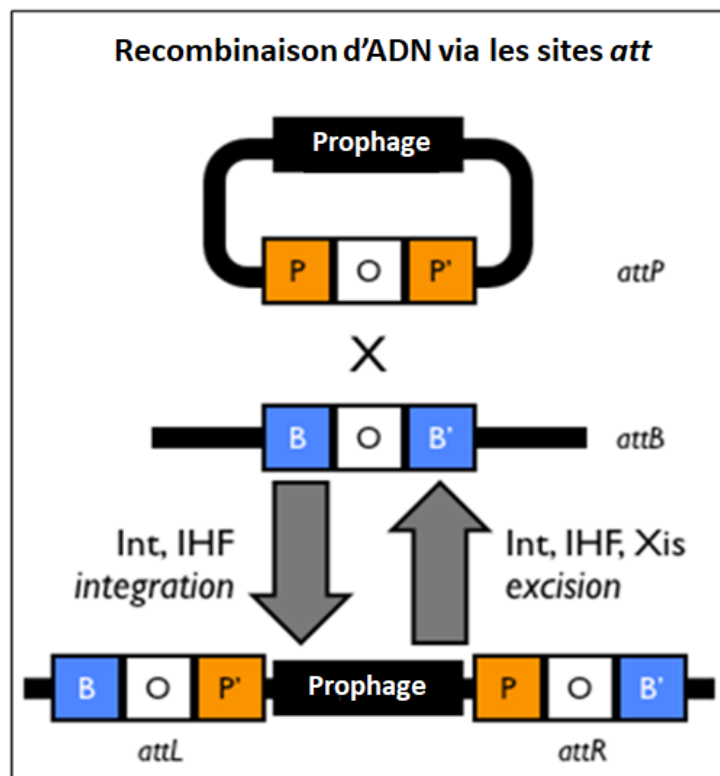


Figure 14. Recombinaison du phage de type Lambda.

Adaptée de <http://parts.igem.org/File:DNAREcombinationattIntIHF.png>

Le site d'insertion est variable selon le phage (Schmidt 2001). Ainsi, pour *E. coli* O157:H7 possédant *stx1* et *stx2*, BP-933W codant pour la Stx2 s'intègre au niveau du gène de *wrbA* ("tryptophan [W] repressor-binding protein") intervenant dans la réponse au stress oxydatif, alors que CP-933V codant pour Stx1 préfère le gène *mlrA* (*yehV*) intervenant dans la formation des pili (fimbriae) et la formation de biofilms bactériens (Herold *et coll.*, 2004). Or, pour les souches O157:H7

qui possèdent seulement *Stx2*, le site d'insertion des phages est souvent *sbcB*, l'exodeoxyribonuclease I (Hayashi *et coll.*, 2001). La même réaction de recombinaison peut favoriser l'excision des prophages *stxs* entre les sites *attL* et *attR* (Weisberg 1983) en présence de l'excisionase (Landy 1989).

Une fois intégré, le prophage exprime constitutivement une seule protéine indispensable au maintien du cycle lysogénique, soit le répresseur *Cl*. Via sa fixation sur les opérateurs O_R et O_L , *Cl* empêche la protéine *Cro* de se fixer sur ces sites inhibant ainsi la transcription de l'opéron "early right" et en conséquence l'induction du cycle lytique (Figure 15). Toutefois, certaines conditions de stress comme la mitomycine C ou l'irradiation UV, peuvent activer la réponse SOS et par conséquent *RecA* clive *Cl*. Ainsi la concentration en *Cl* chute ce qui permet l'expression de la protéine *Cro* qui, en se liant à l'opérateur de *Cl* (O_R3), inhibe sa transcription. Le cycle lytique est, ainsi, déclenché (Ptashne 1992).

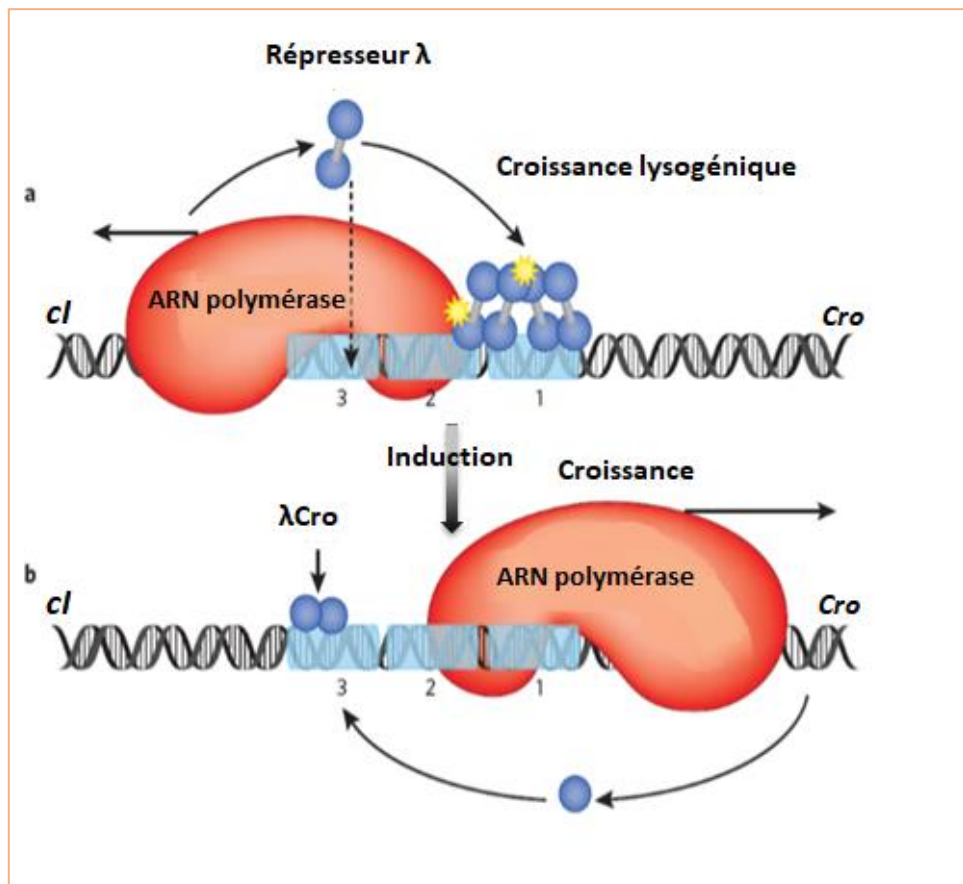


Figure 15. Maintien du cycle lysogénique et induction du cycle lytique.

Adaptée de Ptashne (2011).

1.9 Problématique

E. coli O157:H7 fait partie des principaux agents responsables d'intoxications alimentaires. Ainsi, selon Santé Canada (2013), ces agents pathogènes sont responsables de 4 millions de cas d'infections d'origine alimentaire au Canada chaque année. De plus, 25% de la production alimentaire dans le monde sont perdus à cause de la détérioration précoce des aliments (Ghaly *et coll.*, 2010). Des éclosons de toxi-infections liées à *E. coli* O157:H7 sont régulièrement signalées dans le monde dont au moins trois épidémies importantes au Canada. Ainsi, plusieurs infections par ce pathogène ont été associées à la consommation de viandes de bovins, de légumes, de fruits ou même de l'eau potable. La consommation d'un aliment avec aussi peu que 10 cellules d'*E. coli* O157:H7 peut causer une colite hémorragique et le syndrome hémolytique et urémique chez l'homme (Karmali *et coll.*, 1983; Phillips 1999). La virulence d'*E. coli* O157:H7 est due à sa résistance aux acides gastro-intestinaux (Gorden et Small 1993). Ainsi, 0.53 Mb du génome d'*E. coli* O157:H7 semblent intervenir dans sa virulence (Dobrindt *et coll.*, 2003). La majorité de ces séquences spécifiques sont des éléments génétiques mobiles transférés horizontalement tels que des transposons, des séquences d'insertion, des plasmides, ou bien des prophages (Dobrindt 2005). La souche EDL933 d'*E. coli* O157:H7 possède 18 prophages différents incluant les prophages CP-933V et BP-933W codant pour les toxines Stx1 et Stx2, respectivement (Perna *et coll.*, 2001). L'expression des gènes *stx* qui dépend principalement de l'induction des prophages est sous le contrôle de la réponse SOS (Tyler *et coll.*, 2013). Ainsi, tout agent ou condition endommageant l'ADN activeront l'induction des prophages Stx et la production des toxines Stx (1 et 2) qui seront absorbées systématiquement par la cellule-hôte. Toutefois, des antibiotiques (comme la mytomicine C, l'ampicilline et la ciprofloxacine) le H₂O₂, l'acide nitrique et d'autres facteurs de stress, augmentent considérablement les taux de ces Stx (Muniesa *et coll.*, 2004; Imamovic et Muniesa, 2012).

Au cours de la transformation des aliments, l'irradiation peut être appliquée pour inactiver la croissance des microorganismes et améliorer la durée de vie des produits. C'est un traitement qui n'affecte pas la composition chimique ni l'aspect des produits. Elle peut être effectuée sur un produit emballé (Lawrie, 2006). L'irradiation gamma engendre la mort cellulaire qui est causée par des dommages structurels et des dysfonctionnements physiques comme la perturbation des enveloppes cellulaires, les changements de conformations de l'ADN, l'altération des ribosomes, l'aggrégation des protéines, l'altération de la perméabilité sélective de la membrane ou la désactivation de certaines enzymes clés (Gould, 1989).

Toutefois, dans certaines circonstances, les micro-organismes utilisent des mécanismes physiologiques et moléculaires leur permettant de survivre sous des conditions de stress comme

l'irradiation, ce qui peut perturber les efforts des industries alimentaires visant à contrôler ces agents pathogènes. La majorité des traitements qui inactivent seulement une partie de la population bactérienne et qui favorisent l'apparition de sous-populations distinctes dans la culture traitée sont connus pour favoriser l'apparition de plusieurs résistances (Skandamis *et coll.*, 2008). Ainsi, les microorganismes qui survivent à un type de stress développent souvent une résistance croisée à d'autres types de stress (Wesche *et coll.*, 2009). Cependant, l'utilisation accrue d'antibiotiques dans la nutrition animale pour traiter et contrôler certaines maladies ou pour augmenter la croissance animale favorise la résistance bactérienne aux antibiotiques (Courvalin, 2008). Cette résistance pourrait donc affecter les traitements utilisés par les industries alimentaires pour inhiber la propagation des agents pathogènes et par conséquent augmenterait les risques des toxi-infections.

Le but de ce présent travail est donc de déterminer le mécanisme de la résistance d'*E. coli* O157:H7 à l'irradiation gamma. Dans un premier temps, l'effet de l'irradiation à la dose de sensibilisation (0.4kGy) sur le génome et le protéome d'*E. coli* O157:H7 sera évalué par les techniques RNA-seq et iTRAQ. Ensuite, des souches adaptées à la carbenicilline (β -lactamines) seront testées quant à leur résistance à l'irradiation. En fin, et pour comprendre comment cette bactérie pourrait résister à la dose "létale" d'irradiation, des clones adaptés à cette dose seront séquencés et étudiés.

2 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

1.1. Hypothèse

L'hypothèse de notre travail est que la résistance d'*Escherichia coli* O157:H7 à l'irradiation gamma implique les mécanismes de sa résistance à d'autres types de stress tels aux antibiotiques

2.2 Objectifs

2.2.1 Objectif général

Déterminer le mécanisme de la radiorésistance d'*E. coli* O157:H7.

2.2.2 Objectifs spécifiques:

Objectif 1: Déterminer l'effet de l'irradiation à la dose de sensibilisation sur la réponse globale d' *E. coli* O157:H7;

Objectif 2: Évaluer l'effet des gènes clés de la résistance aux antibiotiques de type β -lactamines sur la radiorésistance d'*E. coli* O157:H7;

Objectif 3: Caractériser le mécanisme de l'adaptation d'*E. coli* O157:H7 à une dose d'irradiation considérée comme "létale".

3.1 Présentation de l'article « γ -irradiation triggers a global stress response in *Escherichia coli* O157:H7 including unique protective pathways »

Ghizlane Gaougaou, Quentin Liot, Philippe Constant, Eric Déziel, Monique Lacroix.

INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boulevard des Prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada.

Soumission : 03 juillet 2019 ; **Acceptation :** ; **Publication :**
Journal : Microbiological research

Résumé

Escherichia coli (*E. coli*) O157:H7, un pathogène humain d'origine alimentaire produisant les shiga-toxines, est capable de développer des résistances à plusieurs stress y compris à l'irradiation gamma. Nous avons évalué la réponse d'*E. coli* O157: H7 à d'irradiation à une dose de sensibilisation (0,4 kGy). Nous avons effectué des analyses transcriptomiques via la technique "RNA-Seq" à 10 (t10) et à 60 (t60) minutes post-irradiation, associée à une analyse protéomique par la méthode "iTRAQ" à 60 minutes post-irradiation. Les résultats ont montré que plusieurs voies ont été induites par ce stress telles les voies de réparation par excision de base et de nucléotides ; le métabolisme du soufre et de l'histidine et certains facteurs de virulence. Le répresseur de la division cellulaire *sulA* ainsi que certains autres gènes impliqués dans la réponse SOS et dans le mécanisme de réparation (tels que *recA*, *recN*, *recJ*, *recQ*, *mutM*, *uvrA*, *uvrB* et *uvrD*) ont été régulés positivement à t60. Comme réponse précoce au stress lié à d'irradiation (à t10), les gènes *dnaK*, *groEL*, *ibpA*, les gènes impliqués dans le métabolisme du soufre, ainsi que ceux liés au stress oxydatif étaient surexprimés. À l'opposé, la synthèse de l'histidine était régulée négativement. Toutefois, les gènes intervenant dans le stress acide, le choc thermique, la résistance aux UV et de virulence, en particulier *stx2A* *stx2B*, étaient régulés positivement 60 minutes après irradiation. Ce traitement a favorisé l'augmentation de l'expression des protéines CysN, MutM, DinD et DnaC. Nos résultats donnent un aperçu sur la réponse d'*E. coli* O157:H7 à une dose non létale 0,4 kGy.

3.1.1 Abstract

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (*E. coli*) O157:H7, one of the most severe human foodborne pathogens, is able to withstand several stresses, including some levels of γ -irradiation. In this study, we assessed *E. coli* O157:H7 response to a sensitization irradiation dose of 0.4 kGy using RNA-seq transcriptomics at 10 (t10) and 60 (t60) min post-irradiation, combined with iTRAQ proteomics analysis at 60 min post-irradiation. Several pathways were induced by the treatment, such as base excision repair and nucleotide excision repair pathways; sulfur and histidine metabolism and genes that contribute to virulence. Additionally, the *sulA* gene, coding for cell division repressor, together with other genes involved in SOS response and repair (including *recA*, *recN*, *recJ*, *recQ*, *mutM*, *uvrA*, *uvrB* and *uvrD*) were up-regulated at t60. As the early response to irradiation stress (t10), *dnaK*, *groEL*, *ibpA*, sulfur metabolism genes, as well as those related to oxidative stress were up-regulated, while histidine biosynthesis genes were down-regulated. Acid stress, heat shock, UV resistance and several virulence genes, especially *stx2A/stx2B*, were upregulated at 60 min post-irradiation. This treatment was also found to increase the levels of CysN, MutM, DinD and DnaC proteins in the cells. Our results provide insight into the irradiation resistance response of *E. coli* O157:H7 at a non-lethal dose.

3.1.2 Introduction

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) represent a significant threat to public health measures. EHECs are characterized by the production of Shiga-like toxins, acquired from *Shigella dysenteriae* by horizontal gene transfer through phages (Perna *et al.*, 2001). More than 200 different serotypes associated with EHEC strains have been identified, including *E. coli* O157:H7, first identified from large foodborne outbreaks in the USA in 1982 (Riley *et al.*, 1983). Intake of food contaminated with as low as 10 cells of *E. coli* O157:H7 can cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome in humans (Karmali *et al.*, 1983, Phillips, 1999).

Compared to the non-pathogenic *E. coli* strain K-12, the genome of *E. coli* O157:H7 strain EDL933 possesses 0.53 Mb involved in its virulence, including 463 phage-related genes compared to only 29 genes in K-12 (Wick *et al.*, 2005; Dobrindt *et al.*, 2003). *E. coli* O157:H7 derived from a non-toxigenic and less virulent strain O55:H7 acquired the locus of enterocyte effacement (LEE) in four sequential events: (i) acquisition of a bacteriophage containing *stx2*; (ii) acquisition of the virulence plasmid *pO157*; (iii) acquisition of a bacteriophage containing *stx1*; and (iv) loss of D-sorbitol fermenting ability and beta-glucuronidase activity (Reid *et al.*, 2000).

Furthermore, the virulence of *E. coli* O157:H7 can also be attributed to its resistance to gastrointestinal acids, for which three systems are involved (Leyer *et al.*, 1995): Acid resistance System 1 (AR1), which requires the alternative sigma factor (RpoS), positively regulates the expression of the *ehxCABD* operon (carried by *pO157* plasmid) encoding the enterohemolysin in EDL933 (Li *et al.*, 2008, Price *et al.*, 2000). AR2 and AR3, in which the pH homeostasis is maintained by decarboxylation of arginine, are promoted by arginine decarboxylase AdiC (for AR2) or by glutamate decarboxylases GadA and GadB (for AR3) via substitution of the α -carboxyl group by H^+ transported from the extracellular environment to the cytoplasm (Price *et al.*, 2000).

Microorganisms usually utilize physiological and molecular mechanisms during food processing that allow them to survive under stress conditions and promote the emergence of multiple resistances (Skandamis *et al.*, 2008). Heat shock proteins (HSPs) such as DnaK, GrpEL, HtpG, Clp and IbpA, which are controlled by sigma factor 32, are positively regulated by oxidative stress induced by hydrogen peroxide in *E. coli* (Zheng *et al.*, 2001). In contrast, this bacterium increases Cold Shock Protein (CSPs) synthesis under low temperatures especially CspA, which is the major cold shock protein accounting for more than 10% of total cellular protein synthesis (Goldstein *et al.*, 1990).

In bacterial cells, oxidative stress can produce reactive oxygen species (ROS) that can damage DNA, proteins, and lipids. Superoxide anion (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2) release iron from the Fe-S clusters of proteins, generating hyperactive hydroxyl radicals (OH^\bullet) in the intracellular environment (Cabiscol *et al.*, 2000, Cooke *et al.*, 2003). In prokaryotes, superoxide dismutase (SOD), peroxiredoxin and catalase are the first enzymes produced to protect against ROS-induced damages (Cabiscol *et al.*, 2000, Lushchak, 2001). In *E. coli*, several regulators are activated during oxidative stresses including OxyR, which regulates more than 30 genes in response to H_2O_2 , SoxR controlling some 100 genes via expression of SoxS in response to superoxide O_2^- , and RpoS which controls the expression of approximately 200 genes involved in oxidative stress response, including hydroperoxidase KatE and SodC (Barth *et al.*, 2009, Patten *et al.*, 2004).

Similar to oxidative stress, gamma irradiation (γ -irradiation) generates ROS, such as OH^\bullet , resulting from radiolysis of water. These OH^\bullet radicals cause elimination of hydrogen atoms from the DNA sugar-phosphate backbone, thus promoting the degradation of the phosphodiester bonds and consequently the subsequent appearance of single-stranded breaks (ssDNA) (Moseley, 1989). Damage to DNA by irradiation prevents microorganisms from replicating and proliferating (Urbain, 1986). However, these microorganisms can develop physiological and molecular mechanisms that allow them to survive stresses, including irradiation treatment. In this work, we have evaluated the effect on *E. coli* O157:H7 of γ -irradiation at the sensitization dose of 0.4 kGy. RNA-seq transcriptomics combined

with iTRAQ proteomics analyses revealed that both conserved (expected) and unexpected pathways are involved in the response to a γ -irradiation stress.

3.1.3 Material and methods

3.1.1.1 Bacterial strains, plasmids and growth conditions

E. coli O157:H7 strain EDL933 (ATCC43895), originally isolated from Michigan ground beef, was provided by Prof. Charles M. Dozois (INRS-IAF-Canada). Following a standard procedure (Baba *et al.*, 2006, Datsenko *et al.*, 2000), deletion mutants ($\Delta recA$, $\Delta recN$, $\Delta umuD$, $\Delta ibpA$, $\Delta sulA$, $\Delta tatC$ and $\Delta uvrB$) were generated by one-step PCR fragment-mediated λ -Red recombination as described by Datsenko and Wanner (2000) using the sensitive plasmid PKD46 (Genetic stock center, Yale University, USA) using primers shown in Table 4. Bacteria were cultivated overnight in Tryptic Soy Broth (TSB) or on Tryptic Soy Agar plates (both from Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA). Transformed bacteria were cultivated in 1 mL SOC medium (Thermo Fisher Scientific, Burlington, Ontario, Canada) (pKD46) or 1 mL TSB and incubated at 30°C for 1h, then on TSB plates supplemented with 100 μ g/mL carbenicillin (for the pKD46) or 50 μ g/mL of kanamycin (for the mutants).

Table 4. PCR primers used to generate mutants of *E. coli* O157:H7 EDL933

Mutants	Primer sequence (5'→3' direction)
$\Delta recA$	F: AAATGGCGATAGGTGCACTG; R: GTCCATAACCTTTGCGGCTA
$\Delta recN$	F: GGTCATAAACAGCAGCAGC; R: TGGTTGATGTCAGGACGGTA
$\Delta umuD$	F: AGATCCAATGCTCCATCTGC; R: AGATCGCAGAATGCCTCATC
$\Delta ibpA$	F: TGGAGCATCCTCCGAGTAAT; R: ATCTTCTGACGGAAACCTG
$\Delta sulA$	F: CCAACGTTGCCAGGTATTCT; R: AAGTGTGAACTCCGTCAGGC
$\Delta tatC$	F: CGAGCCTCACTAACCTGACG; R: CACATTCACCAATCGCCACC
$\Delta uvrB$	F: TGGCAGTCACTGAACAGGC; R: ATGTCTCGGCGGTGAAAGAG

3.1.1.2 γ -irradiation treatments

Cell cultures (Wt or mutants) from the exponential phase of growth ($OD_{600} \approx 1$) were subjected to irradiation treatments at the sensitization dose of 0.4 kGy, as recommended (Caillet *et al.*, 2005). This step was performed at room temperature ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) at the Canadian Irradiation Center, in which samples were irradiated in a UC-15A irradiator (Nordion Inc., Kanata, ON, Canada) with a dose rate of 16.8 kGy/h (0.4kGy/1.4min).

The viability and growth rate of wild-type (Wt) or mutant bacteria were evaluated immediately after irradiation treatment as described previously (Gaougaou *et al.*, 2018).

3.1.1.3 RNA and protein extractions

Wild-type O157:H7 was grown in TSB at 37°C and irradiated at the sensitive dose (0.4 kGy) at the exponential phase of growth ($OD_{600} \approx 1$). RNA extraction was performed 10 min (t10) or 60 min (t60) post-irradiation treatment. A quantity of 5 ml of control (non-irradiated) or irradiated culture was treated with 10 ml of RNAProtect bacterial reagent (Qiagen, Montreal, CANADA), centrifuged at $12,000 \times g$ for 5 min, cells were suspended in 1 mL PureZOL (Life Science Research, Ontario, Canada) and total RNA was extracted according to the manufacturer's instructions. Extraction of proteins was carried out 60 min post-irradiation treatment. Thus, 300 μl extraction buffer (0.5% sodium deoxycholate, 50 mM ammonium bicarbonate, 50 mM DTT, 1 μM Pepstatin, protease inhibitor cocktail) was added to 1 mL of control or irradiated culture, sonicated at $6 \times 10\text{s}$ at a frequency of 20 kHz, and centrifuged at $16,000 \times g$ for 15 min at 4°C .

3.1.1.4 Transcriptomic analysis

Total RNA samples (200 ng in 40 μL per replicate) were sent to the McGill University and Génome Québec Innovation Centre for quality control, library preparation, and sequencing by Illumina HiSeq 2000 PE100. Demultiplexed raw sequencing reads were filtered with fastx_tools (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/) to discard low quality fragments ($q = 20$, $p = 90$; the reads with less than 90% base calls with quality above Qphred score ≥ 20 were removed). Next, R1 files were reverse-complemented and merged with R2 files. The software Rockhopper (Tjaden 2015) was next used to align and annotate the reads on the genome of *E. coli* O157:H7 EDL933. Raw sequences were deposited to the Sequence Read Archive of the National Center for Biotechnology Information under the BioProject PRJNA551375. Comparative transcriptomic analysis of gene expression profiles was performed using the software R (R Core Development Team, 2008) using the package NOISeqBio (Tarazona *et al.* 2011). The resulting standardized gene expression table was used to compute the

parameters of NOISeqBIO statistics, namely the log-ratio of the average expression values and the average difference values for the two experimental conditions. Differential gene expression values were considered significant when the probability to recover the same score value in the noise distribution was $\leq 5\%$. A minimal 1.5-fold-change threshold was applied to restrict downstream interpretations.

3.1.1.5 Protein preparation

Protein extracts from *E. coli* O157:H7 were mixed with 5 volumes of frozen acetone and incubated overnight at -20°C . Precipitated proteins were centrifuged 15 min at $16,000 \times g$. Protein pellets were air dried, and then resuspended in 0.5 M triethylammonium bicarbonate (TEAB) and 0.5% sodium deoxycholate (DOC). Finally, the concentration of proteins in each sample was determined colorimetrically using the Bradford assay. Protein digestion, peptide labelling, and mass spectrometry analyses were performed by the Proteomics platform of the Research Center at the Quebec University Hospital Center (CHUQ, Laval University, QC, Canada).

3.1.1.6 iTRAQ sample labelling

Equal amounts of proteins (50 μg) for each group (control or irradiated) were used for iTRAQ labeling. TEAB and DOC were added to each sample to reach a final concentration of 0.5 M and 0.5%, respectively. Proteins were then reduced using Tris-(2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) and alkylated using Methyl methanethiosulfonate (MMTS) according to the iTRAQ kit manufacturer's instructions (Applied Biosystems). Samples were digested at 37°C overnight with trypsin (Sequence grade Modified, Promega) using a 1:50 ratio. After digestion, peptides were acidified to precipitate DOC, purified with an oasis HLB cartridge (1cc, 10mg, Water Corp.), and lyophilized. Dried peptides were dissolved in 30 μl 0.5 M TEAB and labelled with iTRAQ label reagent (ABI). A 4-fold (4-plex) multiplex labelling was performed for 2 h at room temperature in the dark. Labelled peptides were combined in one tube, dried with a SpeedVac, and cleaned up using HLB cartridges. Samples were then fractionated (14 fractions) on high pH (pH 10) by reversed-phase chromatography using an Agilent 1200 HPLC system. Finally, fractions were dried by SpeedVac and resuspended into 0.1% formic acid for analysis by mass spectrometry.

3.1.1.7 Mass spectrometry

Approximately 1 μg of peptide samples from each of the 14 high-pH fractions were injected, separated by online reversed-phase (RP) nanoscale capillary liquid chromatography (nanoLC), and analyzed by electrospray mass spectrometry (ESI MS/MS). The experiments were performed with a Dionex UltiMate 3000 nanoRSLC chromatography system (Thermo Fisher Scientific / Dionex Softron

GmbH, Germering, Germany) connected to an Orbitrap Fusion mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) equipped with a nanoelectrospray ion source. Peptides were trapped at 20 μ l/min in a loading solvent (2% acetonitrile, 0.05% TFA) on a pre-column cartridge (PepMap C18, 5 mm x 300 μ m; Thermo Fisher Scientific / Dionex Softron GmbH, Germering, Germany) during 5 minutes. Then, the pre-column was switched online with a self-made 50 cm x 75 μ m internal diameter separation column packed with ReproSil-Pur C18-AQ 3- μ m resin (Dr. Maisch HPLC GmbH, Ammerbuch-Entringen, Germany) and the peptides were eluted with a linear gradient from 5-40% solvent B (A: 0,1% formic acid, B: 80% acetonitrile, 0.1% formic acid) in 90 minutes, at 300 nL/min. Mass spectra were acquired by means of a data dependent acquisition mode, using Thermo XCalibur software version 3.0.63. Full scan mass spectra (350 to 1800m/z) were acquired in the orbitrap using an AGC target of 4e5 ions, a maximum injection time of 50 ms and a resolution of 120 000. Internal calibration using lock mass on the m/z 445.12003 siloxane ion was used. Each MS scan was followed by acquisition of fragmentation MSMS spectra of the most intense ions for a total cycle time of 3 seconds (top speed mode). The selected ions were isolated using the quadrupole analyzer in a window of 1.6 m/z and fragmented by higher energy Collision-induced Dissociation (CID) with 45% of collision energy. The resulting fragments were detected by the Orbitrap at resolution 60,000 with an AGC target of 1e5 and a maximum injection time of 120 ms. Dynamic exclusion of previously fragmented peptides was set for a period of 20 sec and a tolerance of 10 ppm.

3.1.1.8 Database searching

Spectra were searched against the *E. coli* O157:H7 entries in the UniProt protein database (www.pir.uniprot.org; 12163 entries) using Proteome discover (version 2.1; Thermo Scientific, San Jose, Ca). Trypsin enzyme parameter was selected with two possible missed cleavages. MMTS alkylation of cysteines was set as static modification as well as iTRAQ modification at the N-terminus of the peptide and on lysine or tyrosine but methionine oxidation and deamidation of Asn and Gln were set as variable modifications. Mass search tolerance was 10 ppm and 25 amu for MS and MS/MS respectively. For protein validation, a maximum False Discovery Rate of 1% at peptide and protein level was used based on a target/decoy search. Protein Discoverer results were exported into a MS Excel spreadsheet. A protein was considered underexpressed when the mean ratio of the replicate was lower than 0.861, while considered overexpressed at a mean ratio higher than 1.351, as calculated from the 5% percentile value of XL-STAT tool.

3.1.4 Results and discussion

Global gene and protein expression profiles of *E. coli* O157:H7 EDL933 following γ -irradiation stress: γ -irradiation is used to eliminate potentially pathogenic bacteria, such as *E. coli* O157:H7, and to prolong shelf life of food products (Koutchma *et al.*, 2009). The impacts of a sensitization irradiation dose of 0.4 kGy on the transcriptomic and proteomic profiles of *E. coli* O157:H7 EDL933 was evaluated to explore and better understand the radioresistance mechanisms of this relevant strain. High-throughput RNA-seq and proteomic methods were performed to respectively investigate the global cellular changes in the irradiated bacterial cells in comparison to control cells. We examined the transcriptomic profiles following 10 min and 60 min of γ -irradiation treatment. The sensitization irradiation dose of 0.4 kGy used in this study only damages the bacteria without killing them (Caillet *et al.*, 2005). In total, irradiation treatment significantly changed the transcription of 2310 genes at t10, corresponding to 65% of the annotated genes. Among these genes, 1320 (57%) were up-regulated and 990 (43%) were down-regulated. At t60 post-irradiation, 1014 genes (33% of the annotated genes) were differentially expressed including 776 (76%) genes that were up-regulated and 238 (24%) that were down-regulated. As for proteins, they were assessed at t60 and among all the 959 proteins that were detected, 6% were up-regulated and 6% were down-regulated.

Based on these results, γ -irradiation stress can be considered as a dramatic stress for *E. coli* O157:H7, as it activated the transcription of more than half of these genes 10 min after treatment. γ -irradiation treatment at 0.4 kGy affected transcription and translation of gene transcripts related to various categories and metabolic pathways: biosynthesis of secondary metabolites; microbial, purin, sulfur, histidine and fatty acid metabolism; antibiotics, amino acids, peptidoglycan and lipopolysaccharide biosynthesis; beta-lactam and vancomycin resistance and virulence (Figures 16-18). This stress activated mechanisms involved in DNA repair by nucleotide or base excision repair and homologous recombination such as *uvrA/B/C*, *recA*, *recN*, *recJ*, *dinB* *umuC/D* (Table 5). However, many more genes were differently expressed at t10 versus t60, suggesting a rapid and intense response to irradiation stress in *E. coli* O157:H7. At t10 post-irradiation, metabolic pathways attributed to oxidative stress were altered, including oxidative phosphorylation. Strikingly, histidine biosynthesis was dramatically reduced 10 min following irradiation. Thus, 88% of genes involved in this pathway were down-regulated (Figure 16) indicating that limiting the histidine metabolism pathway could be an early response to γ -irradiation stress in *E. coli* O157:H7. This finding is consistent with a recent study which has shown that histidine enhances oxidative DNA damage to *E. coli* cells by generation of intracellular hydroxyl radicals in the presence of H₂O₂ (Nagao *et al.*, 2018). On the other hand, irradiation increased the expression levels of 80% of genes involved in sulfur metabolism at both t10 and t60 (Figures 16 and 17). Importantly, sulfur metabolism has been implicated in bacterial defense against ROS via

intracellular accumulation of L-cysteine, a sulfur source. In fact, cysteine reduces intracellular ferric iron which can promote H₂O₂ conversion to hydroxyl radicals (Mironov *et al.*, 2017, Park *et al.*, 2003).

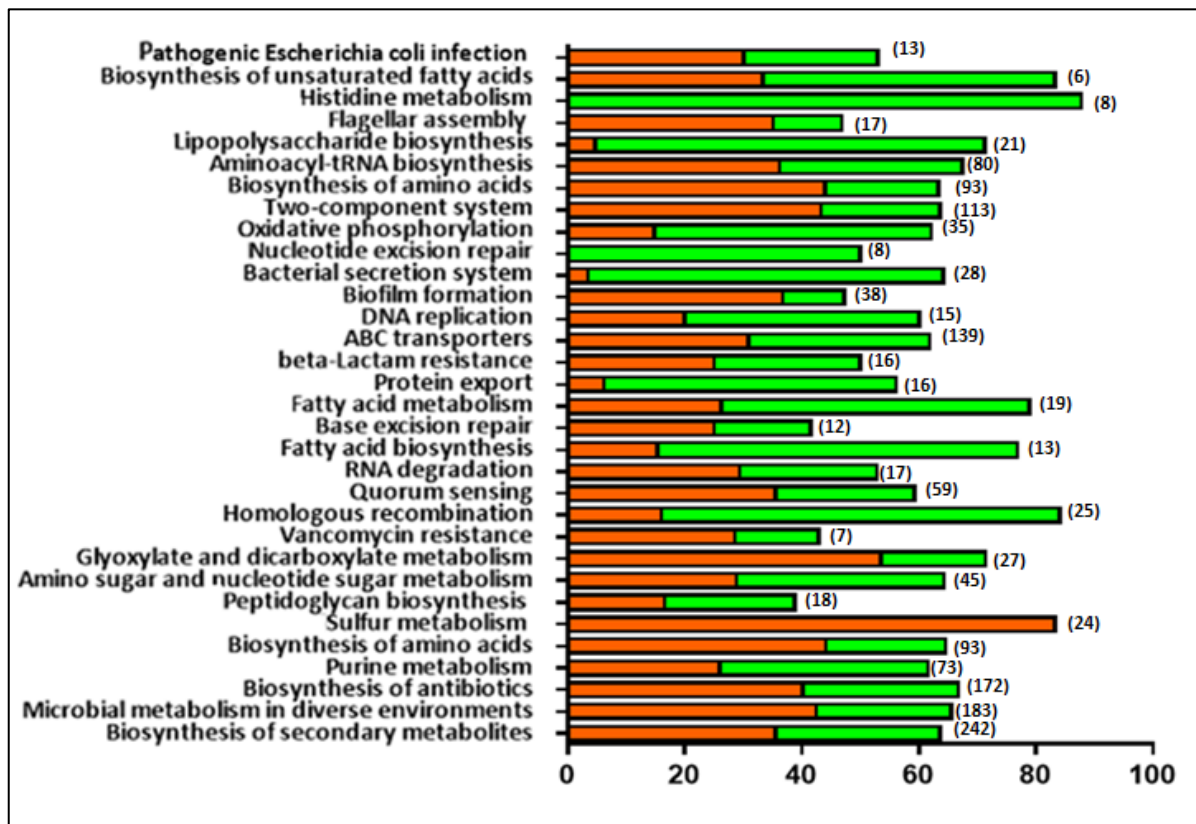


Figure 16. KEGG pathway analysis of the differentially expressed genes in *E. coli* O157:H7 ten min following irradiation at 0.4 kGy. The differentially expressed genes were analysed by RNA-seq transcriptomics. The total number of genes related to each pathway is shown between parentheses. Orange: up-regulated genes; Green: down-regulated genes.

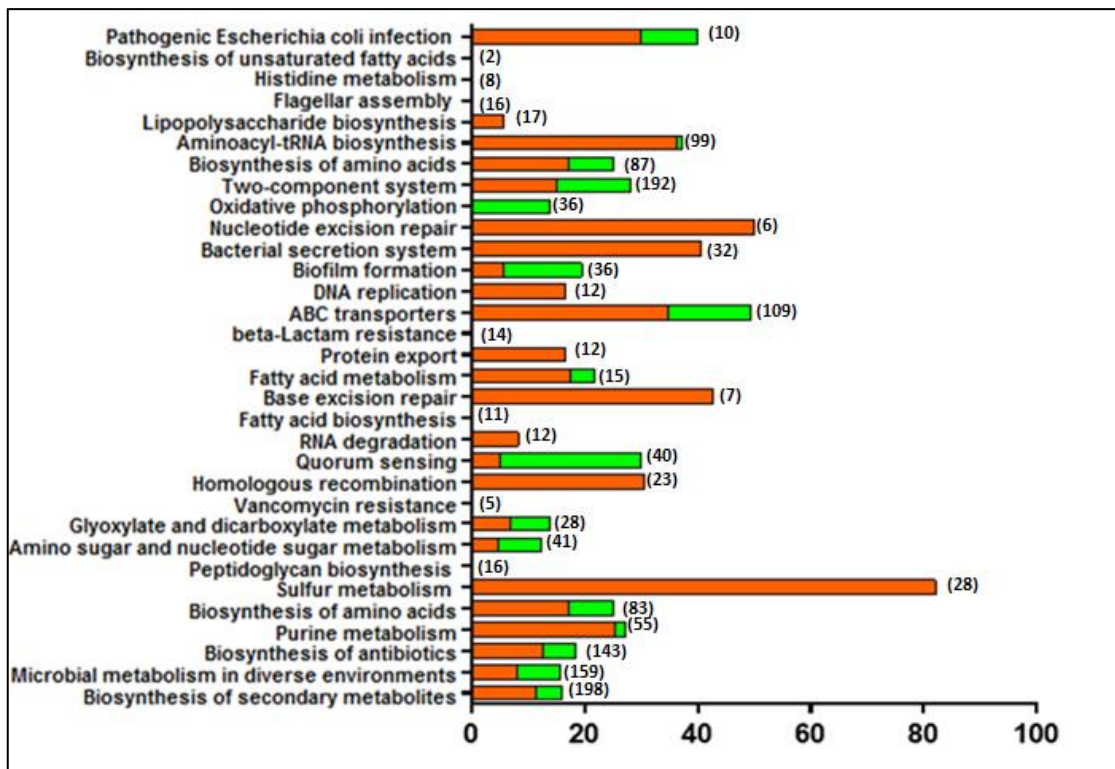


Figure 17. KEGG pathway analysis of the differentially expressed genes in *E. coli* O157:H7 sixty min following irradiation at 0.4 kGy. The differentially expressed genes were analysed by RNA-seq transcriptomics. The total number of genes related to each pathway is shown between parentheses. Orange: up-regulated genes; Green: down-regulated genes.

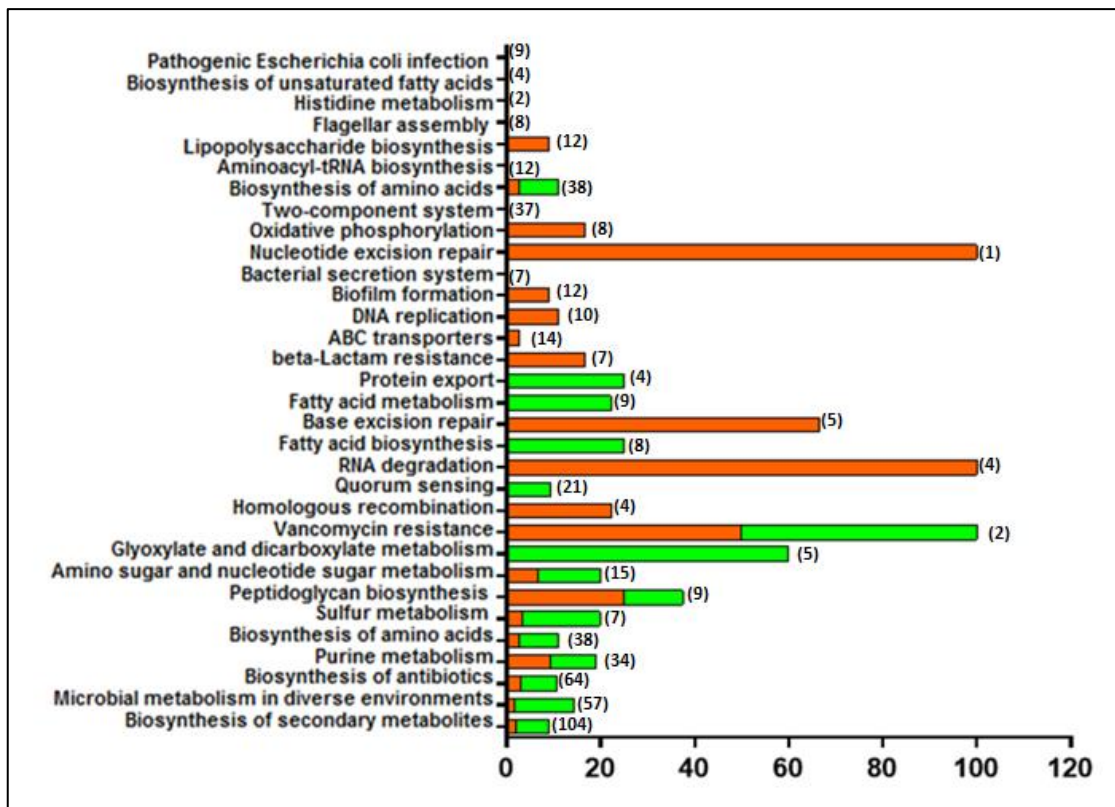


Figure 18. KEGG pathway analysis of the differentially expressed proteins in *E. coli* O157:H7 sixty min following irradiation at 0.4 kGy. The differentially expressed protein were analysed by iTRAQ-based proteomics. The total number of proteins related to each pathway is shown between parenthese. Orange: up-regulated genes; Green: down-regulated genes.

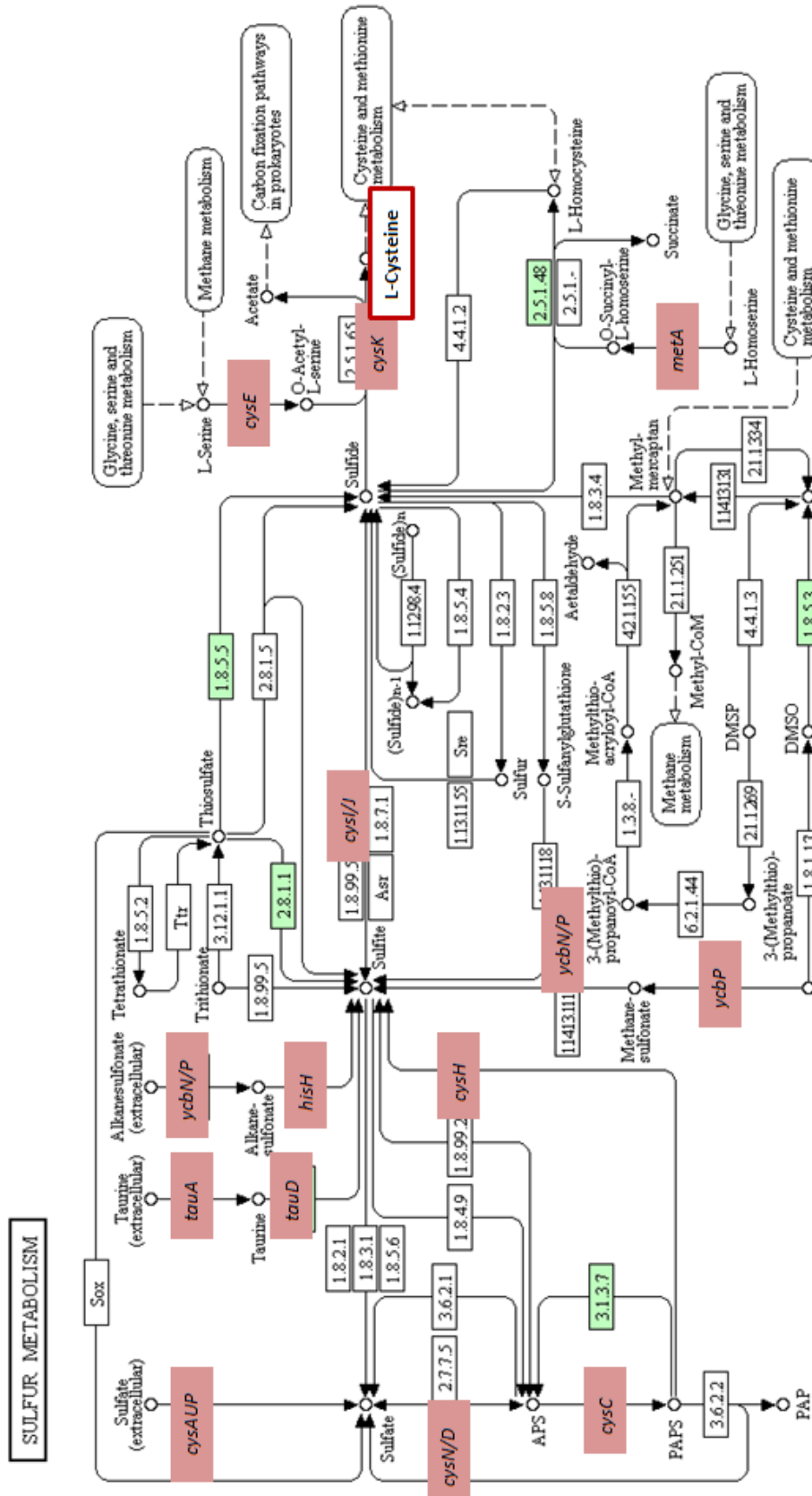


Figure 20. Up-regulation of several genes implicated in sulfur metabolism following irradiation at 0.4kGy. Pink box: up-regulated genes. Green box: not regulated gene involved in sulfur metabolism. Adapted from https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?144319199113401/ece00920.args

Involvement of SOS response genes and proteins in γ -irradiation resistance: *E. coli* O157:H7 highly activates expression of SOS response genes such as *recA*, *recN*, *dinB*, *umuC*, *umuD* and *uvrB* (25 to 79-fold increases), t60 min post-irradiation. Thus, genes involved in base (*mutM*) and in nucleotide excision repair (*uvrA*, *uvrB* and *uvrD*) were 1.88 to 5.9-fold up-regulated. In addition, at t60 expression of genes involving in SOS response was increased. Notably, the expression of *sulA*, encoding the SOS cell division inhibitor, was induced by 73-fold by exposure to γ -irradiation (Table 5). This is consistent with studies showing that in *E. coli*, *sulA* expression increases following stress and SOS induction promotes downregulation of energy-intensive pathways such as cell division to provide the cell more energy to repair damaged DNA (Bhat *et al.*, 2015, Friedberg *et al.*, 2005, Kocharunchitt *et al.*, 2014). In addition, expression of *ibpA*, a heat shock protein increased 13-fold t10 after irradiation treatment suggesting involvement in early response to γ -irradiation stress (Table 5). This corresponds with Matuszewska and *al.* (2008) wherein *ibpA* was involved in resistance to oxidative stress in *E. coli*.

Table 5. Genes highly expressed 10 min or 60 min post-irradiation at 0.4kGy

Locus tag	Gene/Function	Fold change (t10)	Fold change (t60)
Z4002	<i>recA</i> : DNA strand exchange and renaturation	0.16	25
Z3909	<i>recN</i> : recombination and DNA repair	0.07	79
Z0292	<i>dinB</i> : Translesion repair and untargeted mutagenesis	0.2	17
Z2979	<i>parM</i> : Plasmid segregation protein ParM	15	<u>ND</u>
Z1947	<i>umuC</i> : SOS mutagenesis and repair; DNA polymerase V	0.2	36
Z1946	<i>umuD</i> : SOS mutagenesis; error-prone repair	0.14	56
Z1308	<i>sulA</i> : Suppressor of lon; inhibits cell division	0.05	73
Z5360	<i>tatC</i> : Sec-independent protein translocase	0.2	1.6
Z0998	<i>uvrB</i> : DNA repair; excision nuclease subunit B	0.2	5
Z2001	<i>narG</i> : nitrate reductase 1, alpha subunit	12	<u>ND</u>
Z2002	<i>narH</i> : nitrate reductase 1, beta subunit	10	<u>ND</u>
Z3689	<i>cysU</i> : sulfate, thiosulfate transport system permease T protein	12	<u>ND</u>
Z5183	<i>ibpA</i> : heat shock protein	13	<u>ND</u>

*t10: 10 min post-irradiation; t60: 60 min post-irradiation; ND: No difference in expression; bold numbers indicate up-regulated genes; An addition minimal 1.5-fold-change was applied to restrict downstream interpretations.

To investigate how irradiation-induced genes are involved in resistance of *E. coli* O157:H7 to radiation induced stress, deletion mutants of several genes were generated then irradiated at 0.4 kGy. Although growth of six ($\Delta recA$, $\Delta recN$, $\Delta umuD$, $\Delta ibpA$, $\Delta tatC$ and $\Delta uvrB$) of the seven tested mutants was slightly affected before treatment, viability of all mutants, excepted of $\Delta umuD$, was significantly ($P \leq 0.001$) more reduced following γ -irradiation treatment comparatively with the Wt, for which the counts of viable cells showed an average 1.4 log reduction. The reduction level was 4.7, 1.54, 2.1, 2.3, 2.23, 3.44 and 2.83 logs for, $\Delta recN$, $\Delta umuD$, $\Delta recA$, $\Delta tatC$, $\Delta uvrB$, $\Delta sulA$ and $\Delta ibpA$ respectively (Figure 21), supporting their involvement in radioresistance.

This was further verified by measuring the growth kinetics of the mutants after 0.4 kGy γ -irradiation (Figure 22). This experiment revealed that two mutants are especially sensitive to γ -irradiation: $\Delta recN$ and $\Delta tatC$ (Figure 22, A and D), for which recovery after 0.4 kGy required 12h and 13h respectively. In fact, deletion of *tatC*, a translocase exporting folded proteins from the cytoplasm to the outer membrane, compromises the integrity of the outer membrane and consequently makes bacterial cells sensitive to many stresses (Black *et al.*, 2013, Lee *et al.*, 2006, van der Ploeg *et al.*, 2011). In this study, we show that *tatC* seems to have an important role in radioresistance of *E. coli* O157:H7. The most dramatic effect of irradiation treatment was observed in $\Delta recN$ (Figure 21), the gene most strongly induced by irradiation treatment at t60. Byrn and *al.* (2014) have shown that a $\Delta recN$ mutant of *E. coli* K12 was sensitive to irradiation. Indeed, *recN* has long been associated with irradiation survival (Sargentini and Smith, 1986). These data confirm our results regarding the involvement of *tatC* and *recN* in the *E. coli* radioresistance.

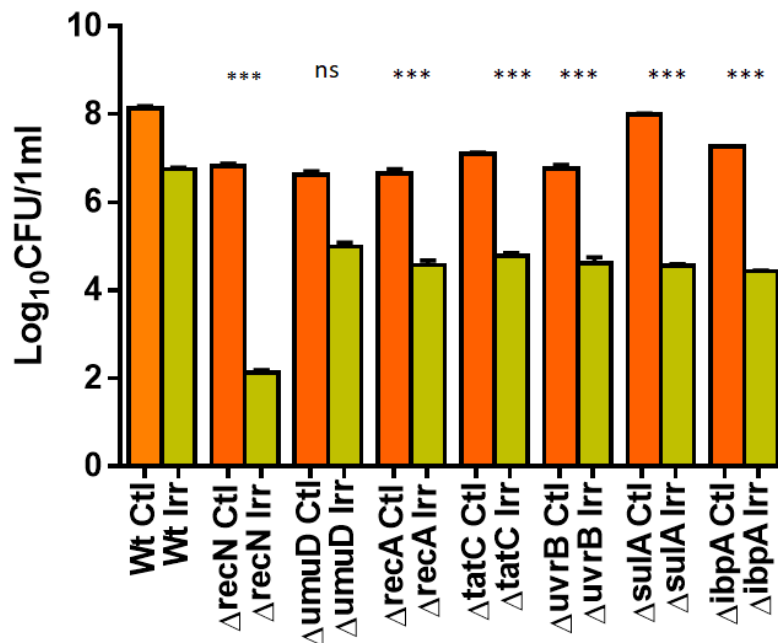


Figure 21. Viability of *E. coli* O157:H7 deletion mutants following γ -irradiation. Differences between the log₁₀CFU counts of (Irr /Ctl) for each strain vs Wt were analyzed using Student's t test. Ctl: control non-irradiated (orange); Irr: irradiated (green).

Interestingly, some of the mutants (especially $\Delta ibpA$) were unable to fully recover and maintain their recovery following irradiation. Deletion or alteration of certain genes involved in DNA repair cause slow growth phenotypes (Byrne *et al.*, 2014, Linn *et al.*, 1987). Normally in *recA* mutants of *E. coli*, double-strand DNA breaks are not repaired causing chromosomal loss and eventually cell death (Skarstad *et al.*, 1993). However, Kouzminova and *al.* (2004) have suggested that *E. coli* can

develop strategies to avoid double-strand DNA breaks, and this may explain many observations (Capaldo *et al.*, 1974, Miranda *et al.*, 2003) including ours (Figures 21 and 22C) when a $\Delta recA$ mutant was found to be viable and can grow following stress.

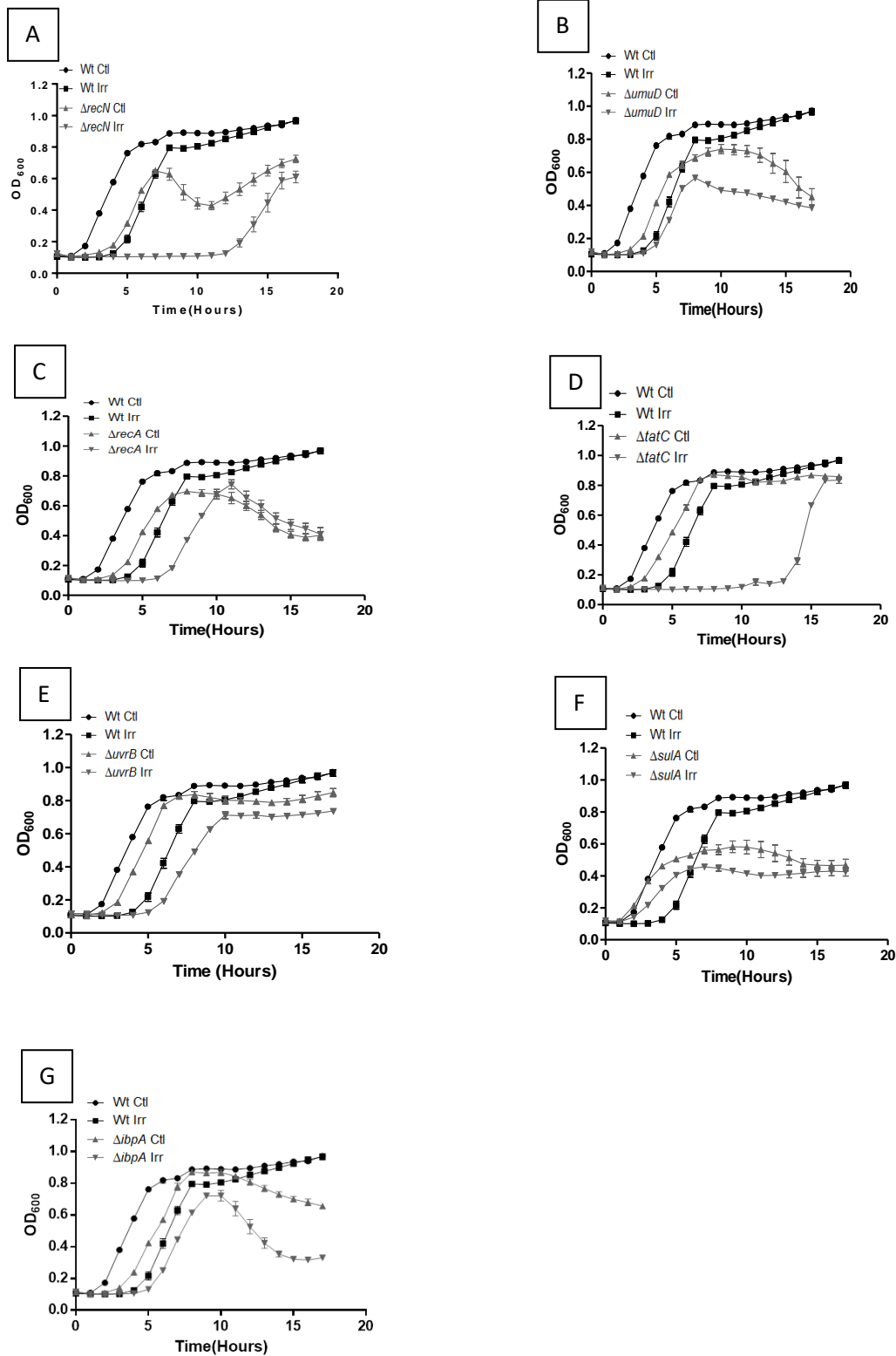


Figure 22. Growth of *E. coli* O157:H7 deletion mutants following γ -irradiation. $\Delta recN$ (A), $\Delta umuD$ (B), $\Delta recA$ (C) or $\Delta tatC$ (D), $\Delta uvrB$ (E), $\Delta sulA$ (F), $\Delta ibpA$ (G). Ctl: control non-irradiated; Irr: irradiated.

Impact on protein profile of O157:H7 t60 post irradiation: We found that RecC, RecJ, RecQ, and CorA proteins were respectively 1.39, 1.38, 1.6 and 1.6-fold up-regulated 60 min post-irradiation (Table 6). In *E. coli*, homologous recombination is a relatively error-free mechanism induced by certain stresses such as γ -irradiation and chemical mutagens. RecBCD and RecF pathways are part of this recombination. Thus, RecBCD and RecF pathways were activated to repair respectively, double-stranded DNA and single-stranded DNA gaps (Kowalczykowski, 2000, Persky *et al.*, 2008). The RecF pathway involves the function of many proteins such as of RecA, RecN, RecJ and RecQ (Tseng *et al.*, 1994) while RecBCD pathway implicates RecC (Masterson *et al.*, 1992). Seo *et al.* (2015) have shown that oxidative stress response is related to other fundamental cellular processes such as transport of divalent metal cations (Mn^{2+} , Zn^{2+} and Mg^{2+}). This data is consistent with the up-regulation of CorA (Table 6), the principal Mg^{2+} uptake system in *E. coli* (Knoop *et al.*, 2005). Other proteins involved in DNA repair are up-regulated at t60 min following irradiation such as replicative DNA helicase DnaB and UvrB which catalyzes the recognition and processing of DNA lesions are respectively 1.46 and 1.5-fold up-regulated (Table 6) consistent with repair system activation following stress by γ -irradiation.

In contrast, DcyD, YecI and MazF proteins were down-regulated after irradiation exposure (t60). Moreover, DcyD which is a D-cysteine desulfhydrase can transform cysteine to pyruvate, ammonia, and sulfide (Awano *et al.*, 2005). YecI (FtnB) promotes iron (III) oxide-hydroxide production, which is able to damage cells. We have previously shown the importance of cysteine accumulation and intracellular oxidative stress inhibition following irradiation. *E. coli* radioresistance may include the down-regulation of DcyC and YecI to decrease cysteine catabolism. Finally, MazF, a toxic component of a type II toxin-antitoxin system, alters the protein expression profile of the cell by mRNA cleavage. MazF induces cell death following stress conditions (Hazan *et al.*, 2004). Thereby, this protein was likely down regulated after irradiation at t60 to protect bacterial killing.

Table 6. Different expressed proteins in *E. coli* O157:H7 60 min post-irradiation

Locus tag	Translated protein	Fold change (t60)
Z4139	RecC: exonuclease V subunit gamma	1.39
Z4230	RecJ: ssDNA exonuclease	1.38
Z5343	RecQ: ATP-dependent DNA helicase	1.6
Z5650	DnaB: replicative DNA helicase	1.46
Z3001	UvrB: excinuclease ABC subunit B	1.5
Z5333	CorA: Magnesium transport protein	1.6
Z3008	DcyD : D-cysteine desulfhydrase	0.8
Z2956	YecI : Ferritin-like protein 2	0.58
Z4097	MazF : Endoribonuclease	0.8

* t60: 60 min post-irradiation; bold numbers indicate up-regulated genes; A protein was considered underexpressed when the mean ratio of the replicate was lower than 0.861 and over-expressed when the mean ratio of the replicate was higher than 1.351

Effects of γ -irradiation on stress-associated and virulence genes: The influence of γ -irradiation treatment at 0.4 kGy on genes implicated in response to oxidative, heat shock, cold shock, acid and UV irradiation stresses and genes related to virulence were investigated (Table 7). Four genes associated with oxidative stress (*rpoS*, *soxR*, *katE* and *sodC*) were up-regulated immediately after γ -irradiation treatment. In contrast, *soxS* and *wrbA* were up-regulated 60 min post-irradiation.

Table 7. A list of stress-associated and virulence genes showing differential gene transcription 10 min and/or 60 min following irradiation at 0.4 kGy.

Locus tag/Stress associated and virulence	Gene name	Fold change t10	Fold change t60
Stress			
Oxydative stress			
z4049	<i>rpoS</i>	1.52	ND
z5661	<i>soxS</i>	ND	1.78
z5662	<i>soxR</i>	1.8	ND
z2761	<i>katE</i>	1.76	ND
z2661	<i>sodC</i>	1.52	1.58
z1423	<i>wrbA</i>	ND	3.9
Acid resistance			
z4930	<i>gadA</i>	2	1.56
z2215	<i>gadB</i>	1.65	1.52
Cold shock			
z1117	<i>cspD</i>	2.87	ND
Heat shock			
z0014	<i>dnaK</i>	2.9	ND
z5748	<i>groEL</i>	2.1	ND
z3059	<i>yedU (hsp31)</i>	3.9	1.52
z0590	<i>htpG (hsp90)</i>	1.57	1.50
UV resistance			
z5059	<i>musM</i>	ND	1.88
Virulence			
z1464	<i>stx2A</i>	0.64	2.4
z1465	<i>stx2B</i>	ND	2.24
z4195 Eiva	T3SS	0.2	2.2
z4197	T3SS	0.4	2.5
z4187	T3SS	ND	7.4

* t10: 10 min post-irradiation; t60: 60 min post-irradiation; ND: No difference in expression; bold numbers indicate up-regulated genes; An addition minimal 1.5-fold-change was applied to restrict downstream interpretations.

We note that *sodC* transcription was increased at both t10 and t60 post-irradiation. In fact, it appears that to protect itself from ROS-induced stress generated by γ -irradiation, *E. coli* use superoxide dismutases such as CuZnSOD (SodC) and catalases such as HPII (KatE), which are part of the major oxidative stress regulon SoxRS (Chiang *et al.*, 2012). Thus, in the presence of ROS, SoxR induces

soxS expression, and as result SoxS protein levels increase which regulate transcription of several genes of oxidative stress response including *sodC* and *katE* (Chiang *et al.*, 2012, Demple *et al.*, 1991, Nunoshiba *et al.*, 1992). The increase in *rpoS* expression was expected because it controls the general stress response in *E. coli* (Notley *et al.*, 1996).

The two acid resistance genes, *gadA* and *gadB* were up-regulated at both t10 and t60 post-irradiation. In pathogenic *E. coli*, *gadA* and *gadB* are induced by low pH (1.5–3.0) to survive and resist the extremely acidic environment of the stomach (Mates *et al.*, 2007, Peterson *et al.*, 1989). GadA and GadB are the key genes of the most effective acid-resistance system (AR2) in *E. coli* (Ma *et al.*, 2003, Tucker *et al.*, 2002). This system is positively regulated by Rpos and RpoN (Mitra *et al.*, 2012, Tramonti *et al.*, 2002). pH homeostasis is maintained by decarboxylation promoted by GadA and GadB via replacement of the α -carboxyl group by a proton (H^+) transported from the extracellular environment to the cytoplasm, increasing the intracellular pH levels (Foster, 2004, Richard *et al.*, 2004). Our results may indicate that AR2 is involved in *E. coli* O157:H7 radioresistance via increasing *gadA* and *gadB* expression by *rpoS* at t10 and by *recN* at t60, and potentially the protons (H^+) transported to cytoplasm may reduce ROS.

On the other hand, *dnaK*, *groEL*, *yedU* and *htpG* which are involved in the heat shock response and *cspD* implicated in cold shock resistance were up-regulated at t10, indicating that these genes encode proteins that are part of the early response to irradiation stress. Expression of *yedU* and *htpG* continued at 60 min after irradiation. These results are in line with Zheng *et al.* (2001) and Trudeau *et al.* (2014) who demonstrated that the chaperone systems including DnaK, GroEL, GroES, YedU and HtpG, were positively regulated by H_2O_2 -induced oxidative stress and by γ -irradiation. Together, these data show that a global stress response is induced in *E. coli* O157:H7 upon exposure to a sensitization dose of irradiation.

Virulence genes (*stx2A*, *stx2B*, *z4195*, *spaS* and *z4187*,) were up-regulated at t60 post-irradiation. Stx1 and Stx2, which are encoded by 2 bacteriophages, are the principal virulence factors of *E. coli* O157:H7 causing bloody diarrhea and hemolytic-uremic syndrome (HUS) (Smith *et al.*, 2014). Stx2 subtypes (Stx2A and Stx2B) are much more toxic than Stx1 (Scheutz, 2015, Strockbine *et al.*, 1986). In addition, the virulence strategy of *E. coli* O157:H7 requires the type III secretion system (T3SS) to export effector proteins directly into host cells (Aili *et al.*, 2008). Many stresses can induce *stx2* (A and B) and T3SS genes, such as acid and oxidative stresses (House *et al.*, 2009; Allen and Griffiths, 2015), which is compatible with our results.

Coherence between transcriptome and proteome at t60 post-irradiation with 0.4kGy: It

is well known that correlation between transcriptome and proteome can be low due to diverse factors such as post transcription regulation (Haider and Pal, 2013). Here, coherence was found between the expression of ten genes and their corresponding translated proteins (Table 8). However, *mutM*, *cysN*, *dnaC* and *dinG* genes and MutM, CysN, DnaC and DinG proteins were up-regulated after *E. coli* O157:H7 exposure to γ -irradiation at 0.4 kGy. We have shown previously that expression of genes involved in DNA damage repair mechanisms increase following irradiation treatment (Table 5). Both MutM and DinG proteins are part of this mechanism. MutM is related to UV radiation stress and is a component of the base excision repair pathway while DinG is involved in DNA recombination repair and the recovery of replication after DNA damage (Voloshin et al., 2007). The CysN protein is a sulfate adenylyl transferase involved in sulfur metabolism which can be induced as a bacterial response to ROS (Table 8).

We also noted that some genes and their protein products were down-regulated by irradiation treatment. This is the case of *aldA*, *ygfP* and *glpK* implicated respectively in pyruvate, purine biosynthesis and glycerolipid degradation. *murQ* involved in amino sugar and nucleotide sugar metabolism, and *livD* associated with biosynthesis of amino acids suggesting that these pathways can disturb damage repair following γ -irradiation. This treatment also decreased expression of *tnaA* and the translated protein TnaA that transforms tryptophan to indole, which can participate in growth inhibition of *E. coli* (Gutiérrez-Huante et al., 2018).

Table 8. Differentially expressed proteins and genes in *E. coli* O157:H7 60 min post-irradiation

Locus tag	Translated protein	Function	Fold transcriptome t60	Fold proteome t60
z5059	MutM	Base excision repair, UV resistance	1.88	1.37
z4059	CysN	Sulfure metabolism	6.8	1.42
z5961	DnaC	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	1.7	1.43
z2851	DinG	Putative regulator	3.3	1.5
z2306	AldA	Microbial metabolism in diverse environments	0.55	0.8
z3693	MurQ	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	0.6	0.83
z5203	TnaA	Tryptophanase	0.62	0.85
z5282	IlvD	Biosynthesis of amino acids	0.65	0.85
z5471	GlpK	Glycerolipid metabolism	0.54	0.86
z4222	YgfP	Purine metabolism	0.6	0.84

*A protein was considered under-expressed when the mean ratio of the replicate was lower than 0.861 and overexpressed when the mean ratio of the replicate was higher than 1.351; An addition minimal 1.5-fold-change was applied to restrict downstream interpretations of transcriptome; Bold numbers indicate up-regulated genes or proteins.

3.1.5 Conclusion

In this study, we investigated the global response of *E. coli* O157:H7 associated with exposure to γ -irradiation at the sensitization dose of 0.4 kGy using transcriptomic and proteomic analyses. γ -irradiation caused important changes in various metabolic pathways involving sulfur and histidine metabolism; amino acid biosynthesis and pathogenicity. Diverse DNA damage repair genes were induced by this stress such as recombinational repair *recA*, *recN*, *recJ* and *recQ*; base excision repair (*mutM*) and nucleotide excision repair (*uvrA*, *uvrB* and *uvrD*). As with other stresses, γ -irradiation promotes down regulation of energy intensive pathways such as cell division to provide the cell with more energy to repair DNA damage. In addition, *E. coli* O157:H7 controls histidine and sulfur metabolism apparently to resist ROS stress. The transcription of genes related to oxidative stress and genes encoding for chaperones DnaK and GroEL was up regulated as an early response to irradiation stress. Also, acid stress, heat shock and UV resistance response genes were positively regulated 60 min post-irradiation treatment indicating their involvement in *E. coli* O157:H7 radioresistance. Finally, virulence genes were activated. Further studies concerning virulence induction in relation to γ -irradiation stress may further explain any correlations between pathogenicity and radioresistance in *E. coli* O157:H7.

Acknowledgment

This research was financially supported by the Natural Science Engineering Research Council of Canada project number 155141/2009. The authors acknowledge the staff of the Centre d'Innovation Génome Québec and McGill University for the preparation of library and sequencing service. We are grateful to Dr. Sylvie Bourassa from the Proteomics Platform of the Quebec Genomics Center for proteomics services and expertise.

References

- Aili M, Isaksson EL, Carlsson SE, Wolf-Watz H, Rosqvist R & Francis MS (2008)** Regulation of *Yersinia* Yop-effector delivery by translocated YopE. *International Journal of Medical Microbiology* 298(3-4):183-192.
- Awano N, Wada M, Mori H, Nakamori S, Takagi H (2005)** Identification and functional analysis of *Escherichia coli* cysteine desulhydrases. *Appl Environ Microbiol* 71:4149-4152.
- Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL & Mori H (2006)** Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular systems biology* 2(1).
- Barth E, Gora KV, Gebendorfer KM, Settele F, Jakob U & Winter J (2009)** Interplay of cellular cAMP levels, σ^S activity and oxidative stress resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology* 155(Pt 5):1680-1689.
- Bhat SV, Booth SC, Vantomme EA, Afroj S, Yost CK & Dahms TE (2015)** Oxidative stress and metabolic perturbations in *Escherichia coli* exposed to sublethal levels of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Chemosphere* 135:453-461.
- Black SL, Dawson A, Ward FB & Allen RJ (2013)** Genes required for growth at high hydrostatic pressure in *Escherichia coli* K-12 identified by genome-wide screening. *PLoS One* 8(9):e73995.
- Byrne RT, Chen SH, Wood EA, Cabot EL & Cox MM (2014)** *Escherichia coli* genes and pathways involved in surviving extreme exposure to ionizing radiation. *Journal of bacteriology* 196(20):3534-3545.
- Caillet S, Shareck F & Lacroix M (2005)** Effect of gamma radiation and oregano essential oil on murein and ATP concentration of *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Prot* 68(12):2571-2579.
- Capaldo FN, Ramsey G & Barbour SD (1974)** Analysis of the growth of recombination-deficient strains of *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology* 118(1):242-249.
- Chiang SM & Schellhorn HE (2012)** Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. *Archives of biochemistry and biophysics* 525(2):161-169.
- Datsenko KA & Wanner BL (2000)** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(12):6640-6645.

- Demple B & Amábile-Cuevas CF (1991)** Redox redux: the control of oxidative stress responses. *Cell* 67(5):837-839.
- Foster JW (2004)** *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nature Reviews Microbiology* 2(11):898.
- Friedberg EC, Walker GC, Siede W & Wood RD (2005)** DNA repair and mutagenesis. American Society for Microbiology Press,
- Goldstein J, Pollitt NS & Inouye M (1990)** Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(1):283-287.
- Gutiérrez-Huante M, Martínez-Duncker ME, Saucedo E & Sánchez J (2018)** The antibiotics potentiator bicarbonate causes upregulation of tryptophanase and iron acquisition proteins in *Escherichia coli*. *Letters in applied microbiology*.
- Haider S, Pal R (2013)** Integrated analysis of transcriptomic and proteomic data. *Curr Genomics*.14(2):91-110.
- Hanada K, Yamashita T, Shobuike Y, Ikeda H (2001)** Role of DnaB helicase in UV-induced illegitimate recombination in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 183(17):4964-9.
- House B, Kus J, Prayitno N, Mair R, Que L, Chingcuanco F, Gannon V, Cvitkovitch D & Foster DB (2009)** Acid-stress-induced changes in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 virulence. *Microbiology* 155(9):2907-2918.
- Karmali M, Petric M, Steele B & Lim C (1983)** Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *The Lancet* 321(8325):619-620.
- Kocharunchitt C, King T, Gobius K, Bowman JP & Ross T (2014)** Global Genome Response of *Escherichia coli* O157: H7 Sakai during Dynamic Changes in Growth Kinetics Induced by an Abrupt Downshift in Water Activity. *PLoS One* 9(3):e90422.
- Kouzminova EA, Rotman E, Macomber L, Zhang J & Kuzminov A (2004)** RecA-dependent mutants in *Escherichia coli* reveal strategies to avoid chromosomal fragmentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(46):16262-16267.
- Kowalczykowski SC (2000)** Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends in biochemical sciences* 25(4):156-165.

- Knoop, V, Groth-Malonek, M, Gebert, M, Eifler, K, and Weyand, K (2005)** Transport of magnesium and other divalent cations: evolution of the 2-TMGxN proteins in the MIT superfamily. *Mol. Genet. Genomics* 274, 205–216.
- Lee PA, Tullman-Ercek D & Georgiou G (2006)** The bacterial twin-arginine translocation pathway. *Annu. Rev. Microbiol.* 60:373-395.
- Li H, Granat A, Stewart V & Gillespie JR (2008)** RpoS, H-NS, and DsrA influence EHEC hemolysin operon (ehxCABD) transcription in *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. *FEMS Microbiol Lett* 285(2):257-262.
- Linn S & IMLAY JA (1987)** Toxicity, mutagenesis and stress responses induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *J Cell Sci* 1987(Supplement 6):289-301.
- Ma Z, Gong S, Richard H, Tucker DL, Conway T & Foster JW (2003)** GadE (YhiE) activates glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in *Escherichia coli* K-12. *Molecular microbiology* 49(5):1309-1320.
- Masterson C, Boehmer PE, McDonald F, Chaudhuri S, Hickson ID & Emmerson PT (1992)** Reconstitution of the activities of the RecBCD holoenzyme of *Escherichia coli* from the purified subunits. *Journal of Biological Chemistry* 267(19):13564-13572.
- Mates AK, Sayed AK & Foster JW (2007)** Products of the *Escherichia coli* acid fitness island attenuate metabolite stress at extremely low pH and mediate a cell density-dependent acid resistance. *Journal of bacteriology* 189(7):2759-2768.
- Matuszewska E, Kwiatkowska J, Kuczyńska-Wiśnik D & Laskowska E (2008)** *Escherichia coli* heat-shock proteins IbpA/B are involved in resistance to oxidative stress induced by copper. *Microbiology* 154(6):1739-1747.
- Miranda A & Kuzminov A (2003)** Chromosomal lesion suppression and removal in *Escherichia coli* via linear DNA degradation. *Genetics* 163(4):1255-1271.
- Mironov A, Seregina T, Nagornykh M, Luhachack LG, Korolkova N, Lopes LE, Kotova V, Zavilgelsky G, Shakulov R & Shatalin K (2017)** Mechanism of H₂S-mediated protection against oxidative stress in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114(23):6022-6027.

- Mitra A, Fay PA, Morgan JK, Vendura KW, Versaggi SL & Riordan JT (2012)** Sigma factor N, liaison to an *ntnC* and *rpoS* dependent regulatory pathway controlling acid resistance and the LEE in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. PLoS ONE 7(9):e46288.
- Nagao T, Nakayama-Imaohji H, Elahi M, Tada A, Toyonaga E, Yamasaki H, Okazaki K, Miyoshi H, Tsuchiya K & Kuwahara T (2018)** L-histidine augments the oxidative damage against Gram-negative bacteria by hydrogen peroxide. International Journal of Molecular Medicine 41(5):2847-2854.
- Notley L & Ferenci T (1996)** Induction of RpoS-dependent functions in glucose-limited continuous culture: what level of nutrient limitation induces the stationary phase of *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 178(5):1465-1468.
- Nunoshiba T, Hidalgo E, Cuevas CA & Demple B (1992)** Two-stage control of an oxidative stress regulon: the *Escherichia coli* SoxR protein triggers redox-inducible expression of the soxS regulatory gene. Journal of Bacteriology 174(19):6054-6060.
- Park S & Imlay JA (2003)** High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the fenton reaction. Journal of Bacteriology 185(6):1942-1950.
- Patten CL, Kirchhof MG, Schertzberg MR, Morton RA & Schellhorn HE (2004)** Microarray analysis of RpoS-mediated gene expression in *Escherichia coli* K-12. Mol Genet Genomics 272(5):580-591.
- Perna NT, Plunkett III G, Burland V, Mau B, Glasner JD, Rose DJ, Mayhew GF, Evans PS, Gregor J & Kirkpatrick HA (2001)** Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Nature 409(6819):529.
- Persky NS & Lovett ST (2008)** Mechanisms of recombination: lessons from *E. coli*. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 43(6):347-370.
- Peterson WL, Mackowiak PA, Barnett CC, Marling-Cason M & Haley ML (1989)** The human gastric bactericidal barrier: mechanisms of action, relative antibacterial activity, and dietary influences. The Journal of infectious diseases 159(5):979-983.
- Phillips CA (1999)** The epidemiology, detection and control of *Escherichia coli* O157. Journal of the Science of Food and Agriculture 79(11):1367-1381.

- Price SB, Cheng C-M, Kaspar CW, Wright JC, DeGraves FJ, Penfound TA, Castanie-Cornet M-P & Foster JW (2000)** Role of rpoS in acid resistance and fecal shedding of *Escherichia coli* O157: H7. Applied and Environmental Microbiology 66(2):632-637.
- R Core Development Team.** (2008) R: A language and environment for statistical computing. In. Computing, R Foundation for Statistical Computing (ed), Vienna, Austria.
- Reid SD, Herbelin CJ, Bumbaugh AC, Selander RK & Whittam TS (2000)** Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. Nature 406(6791):64.
- Richard H & Foster JW (2004)** *Escherichia coli* glutamate-and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential. Journal of bacteriology 186(18):6032-6041.
- Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM & Hargrett NT (1983)** Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. New England Journal of Medicine 308(12):681-685.
- Sargentini NJ, Smith KC (1986)** Quantitation of the involvement of the recA, recB, recC, recF, recJ, recN, lexA, radA, radB, uvrD, and umuC genes in the repair of X-ray-induced DNA double-strand breaks in *Escherichia coli*. Radiat. Res. 107:58-72.
- Scheutz F (2015)** Taxonomy meets public health: the case of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and Other Shiga Toxin-Producing E. coli, American Society of Microbiology. p 17-36.
- Seo SW, Kim D, Szubin R and Palsson BO (2015)** Genome-wide Reconstruction of OxyR and SoxRS Transcriptional Regulatory Networks under Oxidative Stress in *Escherichia coli* K-12 MG1655. Cell Rep. 12, 1289– 1299.
- Skandamis PN, Yoon Y, Stopforth JD, Kendall PA & Sofos JN (2008)** Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. Food Microbiol 25(2):294-303.
- Skarstad K & Boye E (1993)** Degradation of individual chromosomes in recA mutants of *Escherichia coli*. Journal of bacteriology 175(17):5505-5509.
- Smith JL, Fratamico PM & Gunther IV NW (2014)** Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Advances in applied microbiology, Elsevier, Vol 86. p 145-197.

- Strockbine NA, Marques L, Newland JW, Smith HW, Holmes RK & O'brien AD (1986)** Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157: H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infection and immunity* 53(1):135-140.
- Tarazona S, Garcia-Alcalde F, Dopazo J, Ferrer A & Conesa A (2011)** Differential expression in RNA-seq: a matter of depth. *Genome Res* 21(12):2213-2223.
- Tjaden B (2015)** De novo assembly of bacterial transcriptomes from RNA-seq data. *Genome Biol* 16:1.
- Tramonti A, Visca P, De Canio M, Falconi M & De Biase D (2002)** Functional characterization and regulation of *gadX*, a gene encoding an AraC/XylS-like transcriptional activator of the *Escherichia coli* glutamic acid decarboxylase system. *Journal of bacteriology* 184(10):2603-2613.
- Tseng Y-C, Hung J-L & Wang T-CV (1994)** Involvement of RecF pathway recombination genes in postreplication repair in UV-irradiated *Escherichia coli* cells. *Mutation Research/DNA Repair* 315(1):1-9.
- Tucker DL, Tucker N & Conway T (2002)** Gene expression profiling of the pH response in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 184(23):6551-6558.
- Urbain W (1986)** Meats and poultry. Bernard S. Schweigert (Series Ed.), *Food Irradiation, A Monograph in: Food Science and Technology, A Series of Monographs*, Academic Press, Inc., Orlando, San Diego, New York, Austin, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto:124-144.
- van der Ploeg R, Barnett JP, Vasisht N, Goosens VJ, Pöthner DC, Robinson C & van Dijk JM (2011)** Salt-sensitivity of Minimal Twin-arginine Translocases. *Journal of Biological Chemistry:jbc*. M111. 243824.
- Voloshin ON & Camerini-Otero RD (2007)** The DinG protein from *Escherichia coli* is a structure-specific helicase. *Journal of Biological Chemistry* 282(25):18437-18447.
- Wick LM, Qi W, Lacher DW & Whittam TS (2005)** Evolution of genomic content in the stepwise emergence of *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Bacteriology* 187(5):1783-1791.
- Zheng M, Wang X, Templeton LJ, Smulski DR, LaRossa RA & Storz G (2001)** DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *Journal of bacteriology* 183(15):4562-4570.

3.2 Présentation de l'article « Effect of β -lactam antibiotic resistance gene expression on the radio-resistance profile of *E. coli* O157:H7 »

Ghizlane Gaougaou¹, Yosra Ben-Fadhel¹, Eric Déziel¹, Monique Lacroix¹

INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boulevard des Prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada.

Soumission : 27 Septembre 2018; **Acceptation** : 28 novembre 2018; **Publication** : 1 décembre 2018

Journal: Helyion

Résumé

Certains agents pathogènes peuvent développer une adaptation globale favorable en réponse à certains traitements de stress, entraînant ainsi, une virulence accrue et/ou une résistance aux différents stress. La résistance aux β -lactamines, ainsi que les gènes *ampC* et *ampG* impliqués dans cette résistance, ont été étudiés pour évaluer leur rôle éventuel dans la radiorésistance d'*Escherichia coli* O157: H7 (*E. coli*). Des bactéries *E. coli* ont été adaptées à 25, 15 ou 7 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de kanamycine ou de carbénicilline et irradiées avec une dose de sensibilisation (0,4 kGy) ou une dose létale (1,5 kGy). Chez *E. coli* O157: H7 Wt, l'irradiation à une dose de 0,4 kGy a augmenté l'expression des gènes *ampC* et *ampG* respectivement de 1,6 et 2 fois tandis qu'au niveau de la souche préalablement adaptée à 25 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de carbénicilline (Carb25), cette expression était de 2,4 et 3,4 fois plus élevée après le traitement à l'irradiation. Les mutants $\Delta ampC$ et $\Delta ampG$ ainsi qu'*E. coli* adaptée à 25 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de kanamycine étaient plus sensibles à la dose 0,4 kGy que le Wt. *E. coli* Carb25 et les souches surexprimant *ampC* et *ampG* étaient totalement résistants à 0,4 kGy et même capables de survivre et de se développer après l'exposition à une dose d'irradiation de 1,5 kGy, qui est normalement létale. Nous avons également constaté que ces souches peuvent tolérer d'autres stress, tels que les stress oxydatifs, froids et thermiques. Cela démontre que l'adaptation à carbénicilline favorise la résistance à l'irradiation γ et à d'autres stress, probablement via l'augmentation de l'expression de l'AmpC et de l'AmpG. Ces résultats sont importants pour les industries alimentaires, en particulier lorsqu'on envisage l'utilisation de l'irradiation pour la conservation des viandes obtenues directement d'animaux qui ont subis des traitements avec des antibiotiques de type β -lactamines.

3.2.1 Abstract

Some pathogens might develop favorable global adaptation in response to certain stress treatments resulting in enhanced virulence and/or resistance to a different stresses. β -lactam resistance, as well as *ampC* and *ampG* genes involved in this resistance, were studied to evaluate their possible role in *Escherichia coli* O157:H7 (*E. coli*) radioresistance. *E. coli* adapted to 25, 15 or 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of kanamycin or carbenicillin, were produced and treated with sensitization (0.4 kGy) or lethal (1.5 kGy) irradiation doses. In *E. coli* O157:H7, irradiation treatment at 0.4 kGy increased *ampC* and *ampG* expression respectively by 1.6 and 2-fold in the wild-type strain (Wt) but up to by 2.4 and 3.4-fold when the strain was beforehand adapted to 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of carbenicillin (Carb25). Accordingly, $\Delta\textit{ampC}$ and $\Delta\textit{ampG}$ mutants and *E. coli* adapted to 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of kanamycin were more sensitive to 0.4 kGy treatment than Wt. While, *E. coli* Carb25 or overexpression of *ampC* and *ampG* provided complete resistance to 0.4 kGy and were even able to survive and grow after exposure to a normally lethal 1.5 kGy irradiation dose. We further noticed that these strains can tolerate other stresses like oxidative, cold and heat shocks. This demonstrates that carbenicillin adaptation promotes resistance to γ -irradiation and to other stresses, likely at least through increased AmpC and AmpG expression. These results are important for the food industry and particularly when considering the use of irradiation for food preservation of meat obtained directly from animals fed β -lactam antibiotics.

3.2.2 Introduction

The bacterium *E. coli* serotype O157:H7 was identified in 1989 as a human pathogen that can produce one of several Shiga toxins known to cause haemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome (Karmali *et al.*, 1983). *E. coli* O157:H7, found in the feces of healthy cattle, can be acquired by direct contact with infected animals or people, by consumption of contaminated food (i.e. meat, fruits, vegetables and poultry), or by wastewater of slaughterhouses (Karmali *et al.*, 1983; Phillips, 1999; Loukiadis *et al.*, 2006). The emergence of antibiotic use in animal feed to treat, control and prevent clinical diseases or to enhance animal growth promotes bacterial resistance by natural selection of mutant populations unresponsive to the antibiotics (Courvalin, 2008). Furthermore, spontaneous antibiotic-resistant *E. coli* O157:H7 strains are emerging, such as ampicillin and chloramphenicol resistant mutants of strain EDL933, which led to increased motility, altered sensitivity to phages, and altered generation time in vitro and increased virulence (Tóth *et al.*, 2003; Carone *et al.*, 2014). As a result, Canadian authorities have recognized that some antimicrobial drugs used in

veterinary medicine, e.g. β -lactams, can promote the development of resistance and might have serious consequences on human health (Health Canada, 2002).

Bacterial resistance to β -lactam antibiotics induces an SOS response, through RecA and DpiA, and is driven by either β -lactamases modifying penicillin-binding proteins (PBPs), or by increased active efflux or decreased permeability, dependent on permeases (Poole, 2004). In many Enterobacteriaceae and other Gram-negative bacteria, the expression of the β -lactamase gene *ampC* is inducible by various β -lactam antibiotics (Sanders Jr and Sanders Jr, 1986; Zeng and Lin, 2013). Some mutations can alter this inducibility, resulting in increased β -lactamase synthesis and consequently greater resistance to other β -lactam antibiotics (Sanders and Sanders Jr, 1983; Juan *et al.*, 2006). AmpC belongs to the group I, class C of β -lactamases and it is expressed at very low levels in wild type strains. AmpC levels increase significantly in *E. coli* in the presence of certain β -lactam antibiotics (Livermore, 1995).

The expression of *ampC* is induced by several gene products leading to peptidoglycan recycling, which is required for cell growth and division (Normark, 1995; Park and Uehara, 2008). The peptidoglycan layer is composed of β -1,4-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) and N-acetylmuramic acid (MurNAc) residues. Peptidoglycan degradation, caused for instance by the action of β -lactam antibiotics, leads to the generation of a pool of GlcNAc-anhMurNAc-peptides which can be transported to the cytoplasm by the permease AmpG (Park and Uehara, 2008) and act as signals involved in *ampC* induction and metabolism through the transcriptional regulator AmpR and the repressor AmpD. Therefore, mutation in *ampD* or in *ampR* may lead to overproduction of AmpC beta-lactamase (Kaneko *et al.*, 2005; Schmidtke and Hanson, 2008).

In several food industries, γ -irradiation is used to prolong shelf life of food products and to reduce the growth of pathogens (Koutchma *et al.*, 2009; Ben-Fadhel *et al.*, 2016). At doses of 2-7 kGy, γ -irradiation can eliminate potentially pathogenic bacteria, such as *E. coli* O157:H7. The microbial inactivation mechanism of γ -irradiation is explained by oxidative radicals resulting from the radiolysis of water, generating an oxidative stress that will cause damage to nucleic acids, proteins and whole cells (Farkas, 2006). The increase of these free radicals induces an oxidative stress response in the bacteria. However, many pathogens can develop physiological and molecular mechanisms of resistance that can overcome the efforts of food industries to control food contamination and improve food safety. Bacterial radioresistance is a complex phenomenon that is still poorly understood.

The aim of this study is to assess the impact of increased resistance to antibiotics widely used in animal feed (β -lactams) on the radioresistance of *E. coli* O157:H7, more specifically by evaluating the effect of AmpC β -lactamase and of AmpG permease.

3.2.3 Materials and methods

3.2.3.1 Materials

Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG), N,N'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride (Paraquat) carbenicillin, ampicillin, piperacillin and kanamycin were obtained from Sigma Aldrich, Ontario, Canada. PureZOL was provided from Life Science Research, Ontario, Canada.

3.2.3.2 Bacterial strains, plasmids and growth conditions

E. coli strains and plasmids used in this study are listed in Table 9. Bacteria were cultivated overnight (O/N) in Tryptic Soy Broth (TSB, Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) or on Tryptic Soy Agar plates (TSA, Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA). The media was supplemented with: (i) 100 μ g/mL carbenicillin and incubated at 30 °C for *E. coli* O157:H7 (pKD46) (Wt and mutants) or at 37 °C for *E. coli* O157:H7 (Ptrc99A) (Wt and carrying ampC or ampG), (ii) 30 μ g/mL kanamycin and incubated at 37 °C for *E. coli* O157:H7 without pKD46, or (iii) without antibiotics for strain K-12 (Wt and mutants). Transformed cells were recovered in 1 mL SOC medium (Thermo Fisher Scientific, Burlington, Ontario, Canada) (pKD46) or 1 mL TSB and incubated at 30 °C for 1 h. IPTG was added to TSB medium to obtain a final concentration of 1 mM for *E. coli* O157:H7 carrying pTRC99A plasmid. To reach the bacterial exponential phase, the O/N culture was diluted at 1/100th and incubated at 37 °C for 3-4 h until an OD₆₀₀≈1 was obtained. OD₆₀₀ for all cell cultures used in this work was measured with a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Burlington, Ontario, Canada) and a path length correction was applied by multiplying the given value by a factor of 10.

Table 9. List of *E. coli* strains and plasmids used to generate and complement *ampC* and *ampG* mutants

<i>E. coli</i> stains and plasmids	Description	Source or reference
O157:H7 EDL933	Pathogenic strain isolated from Michigan ground beef	Provided by Pr. Charles M. Dozois (INRS-IAF)
K-12		
<i>ΔampC</i>	<i>F</i> ⁻ , <i>Δ(araD-araB)567</i> , <i>ΔlacZ4787(::rrnB-3)</i> , <i>λ</i> ⁻ , <i>rph-1</i> , <i>Δ(rhaD-rhaB)568</i> , <i>ΔampC777::kan</i> , <i>hsdR514</i>	Genetic stock center (Baba <i>et al.</i> , 2006)
<i>ΔampG</i>	<i>F</i> ⁻ , <i>Δ(araD-araB)567</i> , <i>ΔlacZ4787(::rrnB-3)</i> , <i>ΔampG790::kan</i> , <i>λ</i> ⁻ , <i>rph-1</i> , <i>Δ(rhaD-rhaB)568</i> , <i>hsdR514</i>	Genetic stock center (Baba <i>et al.</i> , 2006)
Plasmid		
pKD46	Sensitive plasmid <i>F</i> ⁻ , <i>λ</i> ⁻ , <i>rph-1</i> , pKD46	Genetic stock center (Datsenko and Wanner, 2000)
pTrc99A	<i>trcP</i> vector, <i>lacI</i> promoter, pUC18 EcoRI-SmaI,	Provided by Pr. Charles M. Dozois (INRS-IAF)

3.2.3.3 Construction of mutants and complementation/overexpression vectors

Deletion mutants were derived using one-step PCR fragment-mediated lambda red recombination mutagenesis (Datsenko and Wanner, 2000). The pKD13 strain was used to create KEIO mutants (Baba *et al.*, 2006). Using primers listed in Table 10, the *ampC::kan* and *ampG::kan* alleles were amplified directly from K-12 mutant strains JW4111-2 (*ΔampC::kan*) and JW0423-1(*ΔampG::kan*) respectively, obtained from the Keio collection to generate *ΔampC::kan* and *ΔampG::kan* in O157:H (Sabri *et al.*, 2009). The purified PCR fragment was transformed into DH5α competent cells carrying pKD46 by heat shock. The extracted plasmid with *ΔampC::kan* or *ΔampG::kan* was transformed by electroporation (1800 volts, 200 ohms, 25 μF) into *E. coli* O157:H7 competent cells. The homologous recombination between pKD46 and chromosomal genes was then evaluated. *E. coli* O157:H7 mutants were verified by amplification and sequencing of *ampC::kan* or *ampG::kan* using primers cited in Table 10.

Table 10. List of primers used to generate and complement *ampC* and *ampG* mutants

Genes	Sequence (5' to 3')
Homologous primers	
<i>ampC</i> . Fwd	GAGCTTCATTGGTCGCGTAT
<i>ampC</i> . Rev	TTCACTCTGCTGCCACATTC
<i>ampG</i> . Fwd	ATATCGCCATCATCGTACC
<i>ampG</i> . Rev	CAAAGGGGAGTGCAGAAGA
Primers for overexpression	
<i>ampC</i> .over-EcoRI-Fwd	<u>CTCTGAATTC</u> TTTTCTACGGTCTGGCTGCT
<i>ampC</i> .over-SmaI-Rev	<u>CTCTCCCGGG</u> CAGGCGCATAAATGTTTCCT
<i>ampG</i> .over-EcoRI-Fwd	<u>CTCTGAATTC</u> GCTGACCGATACCATCGCT
<i>ampG</i> .over-SmaI-Rev	<u>CTCTCCCGGG</u> GCTAAGCCGCACAAAAGAAC
Primers for verification	
<i>ampC</i> .over-Fwd	TTTTCTACGGTCTGGCTGCT
<i>ampC</i> .over-Rev	CAGGCGCATAAATGTTTCCT
<i>ampG</i> .over-Fwd	TGCTGACCGATACCATCGCT
<i>ampG</i> .over-Rev	GCTAAGCCGCACAAAAGAAC
Primers for qRT-PCR	
<i>ampC</i> . Fwd	CGCTAAGGAGTGCAACATGA
<i>ampC</i> . Rev	CGCAGCATGTAAAAGCGATA
<i>ampG</i> . Fwd	GCCGCCCTTAATTTTTCTTC
<i>ampG</i> . Rev	GCAATGGAACGGTAAAAGC
<i>rpoH</i> Fwd	TCGTCAAAGTTGCGACCACCAAAG
<i>rpoH</i> rev	ATCGTCGTCGGAAGACAGGTCAA

Overexpression of *ampC* and *ampG* was achieved using the high-copy number inducible plasmid pTRC99A (Amann *et al.*, 1988). These two genes were amplified using *E. coli* O157:H7 DNA as

the template and the primers cited in Table 10 designed to have EcoRI and SmaI cohesive ends. The resulting PCR amplicon was digested by EcoRI and SmaI (New England Biolabs, Massachusetts, USA) and used for ligation to EcoRI-/SmaI-treated pTrc99A. The recombinant plasmid was transformed into DH5 α competent cells by heat shock. After miniprep, it was transformed by electroporation (1800 volts, 200 ohms, 25 μ F) into *E. coli* O157:H7 competent cells. Transformants carrying the pTRC99A::ampC, pTRC99A::ampG, or pTRC99A vector alone were selected on TSA plates supplemented with 100 μ g/mL of carbenicillin. Plasmids were digested by EcoRI and migrated on 1% agarose gels to confirm gene insertion.

3.2.3.4 Antibiotic susceptibility assays

The minimum inhibitory concentration (MIC) of the antibiotics was determined as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014). The evaluated antibiotics were carbenicillin, ampicillin, piperacillin and kanamycin. All antibiotics were prepared in distilled water to a final concentration of 50 μ g/mL for kanamycin and 100 μ g/mL for the others. A Blank Antimicrobial Susceptibility Disks (Thermo Fisher Scientific, Burlington, Ontario, Canada) imbibed with either 5 μ L or 10 μ L of one of the antibiotics, corresponding to 250 μ g and 500 μ g for kanamycin and 500 μ g and 1000 μ g for the other antibiotics, were used for the antibiotic susceptibility assays on *E. coli* O157:H7 mutants.

3.2.3.5 Development of antibiotic-adapted O157:H7 strains

E. coli O157:H7 was adapted to 25, 15 or 7 μ g/mL of carbenicillin or kanamycin by successive passages ($n = 4$) in TSB supplemented with the respective antibiotic at the specified concentration. After each passage, bacteria at DO=1 diluted at 1/100 were used for the next passage. The selected concentrations of each antibiotic used in this study were enough to slow down the bacterial growth. After the adaptation step and for all following experiments, adapted bacteria were cultivated in TSB without antibiotic.

3.2.3.6 γ -irradiation treatments

Cell cultures (all strains) from the exponential phase of growth ($OD_{600} \approx 1$) were transferred into microfuge tubes and subjected to one of two different irradiation treatments: the sublethal dose of 0.4 kGy to only damage the cells or the lethal dose of 1.5 kGy (Caillet *et al.*, 2005). Experiments were performed at room temperature (20 ± 1 °C) at the Canadian Irradiation Center, where samples were irradiated in a UC-15A irradiator (Nordion Inc., Kanata, ON, Canada) equipped with a ^{60}Co source with a dose rate of 16.8 kGy/h.

3.2.3.7 Viability and growth study

All strains were evaluated immediately after irradiation treatment for their viability and growth. The obtained working cultures were serially diluted and plated on TSA plates and then incubated overnight at 37 °C. For the growth assays, the cultures were diluted in TSB to an OD₆₀₀ = 0.05 and 200 µL of cell culture were distributed in wells of sterile microtiter plates. This experiment was performed in a Bioscreen C apparatus (Growth Curves USA) where the cultures were incubated at 37 °C for 20 h and the OD₆₀₀ growth measurements were performed every 30 minutes after a homogenization period of 30 seconds.

3.2.3.8 RNA preparation and quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

E. coli O157: H7 Wt and Carb25 adapted bacteria were incubated in TSB at 37 °C and irradiated at the sublethal dose at the exponential phase of growth (OD₆₀₀ ≈ 1). Control and irradiated cultures were incubated at 37 °C for 60 min and then RNA extraction was performed. Bacterial culture was centrifuged at 12,000 x g for 5 min and the cells were suspended in 1 mL PureZOL. RNA extraction was carried out as recommended by the supplier. The iScript reverse transcription kit (Life Science Research, Ontario, Canada) was used to synthesize cDNA from 50 ng of RNA and quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was then performed using the SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix reagent (Life Science Research, Bio-Rad) on a Rotor-Gene 6000 thermocycler (Corbett). Modulation of gene expression from qRT-PCR was normalized to the expression of the internal *rpoH* gene. The primers used in this study are listed in Table 10. The variation of gene expression was calculated using the $-2\Delta\Delta C_t$ method of Livak and Schmittgen (2001). The relative expression of Wt was used as a reference to calculate the *ampC* and *ampG* expression levels.

3.2.3.9 Statistical analysis

Each experiment was done in triplicate (n = 3) and experimental values are presented as means +/- standard deviation. Statistical analysis was done using Prism5 (GraphPad Software, Inc.) and differences between means were considered significant when the confidence interval was lower than 5 % (***, P ≤ 0.001; **, P ≤ 0.01; *, P ≤ 0.05; student t test).

3.2.4 Results

Two populations of *E. coli* O157:H7 were subcultured four times on various concentrations of carbenicillin (Carb25, Carb15 and Carb7) or kanamycin (Kan25, Kan15 and Kan7) until adaptation. Once these adapted bacteria were obtained, all remaining experiments were performed without antibiotic treatment. The bacterial growth rate increased according the number of passages and to the antibiotic concentration. *E. coli* O157:H7 was more easily adapted to kanamycin than to carbenicillin (Figures 23 and 24).

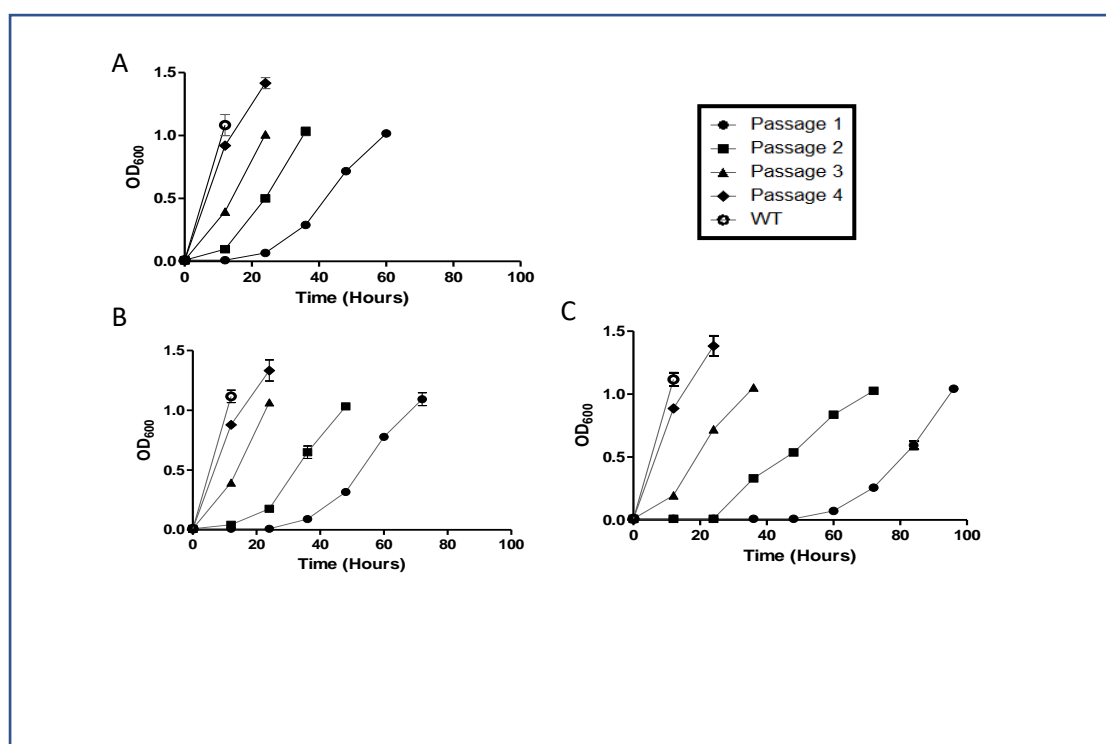


Figure 23. Adaptation of *E. coli* O157:H7 strains to carbenicillin. Bacteria were adapted to 7 µg/mL (A), 15 µg/mL (B) or 25 µg/mL (C) of carbenicillin by successive passages in TSB supplemented with antibiotic at the specified concentration (n=4). Bacteria were incubated at 37 °C and 1/100th dilution was carried out from the culture at OD₆₀₀ ≈ 1 and then sub-cultured for the next passage. 200 µL of each cell culture were used for growth monitoring.

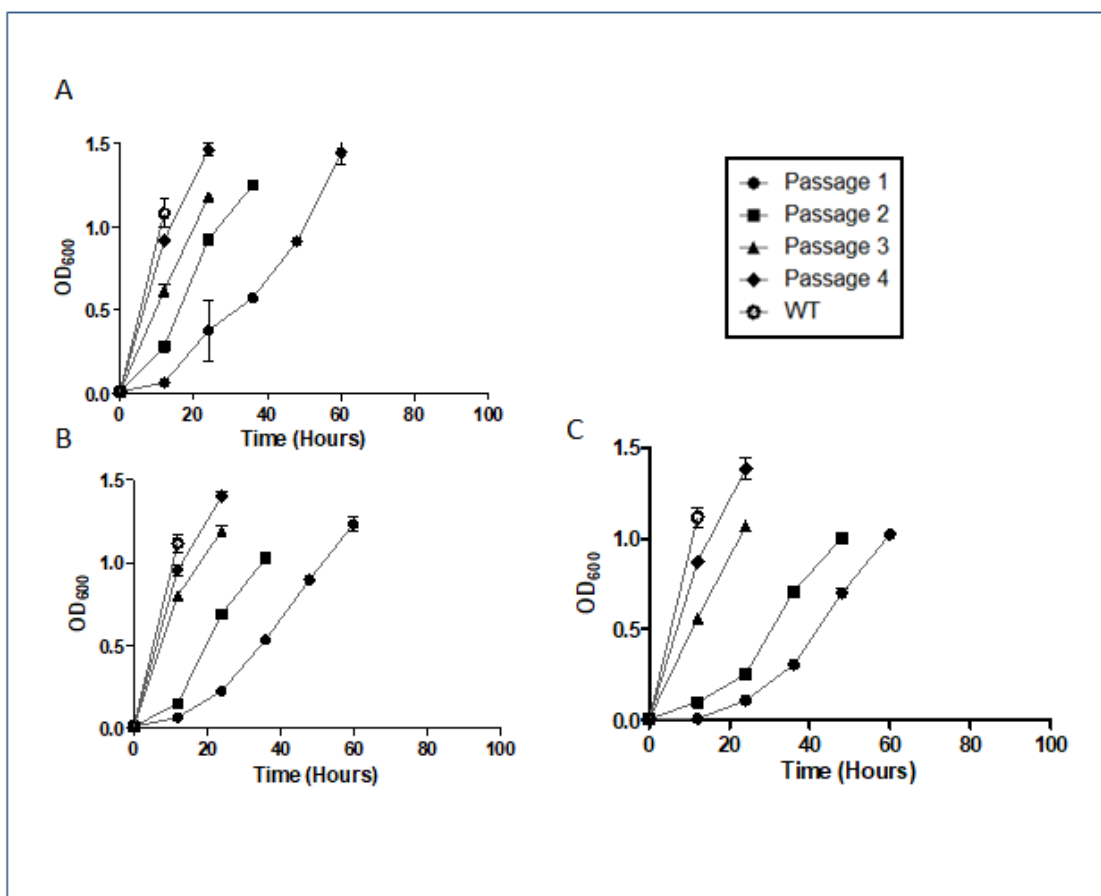


Figure 24. Adaptation of *E. coli* O157:H7 strains to kanamycin. Bacteria was adapted to 7 µg/mL (A), 15 µg/mL (B) or 25 µg/mL (C) of kanamycin by successive passages in TSB supplemented with antibiotic at the specified concentration (n=4). Bacteria were incubated at 37 °C and 1/100th dilution was carried out from the culture at OD₆₀₀ ≈ 1 and then sub-cultured for the next passage. 200 µL of each cell culture were used for growth monitoring.

Adapted subpopulations were cultivated in TSB medium O/N at 37 °C, diluted at 1/100th and incubated at 37 °C until OD₆₀₀ ≈ 1. The viability was then tested vs the Wt strain immediately following γ -irradiation treatment with 0.4 kGy (Figure 25). As expected, irradiation significantly ($P \leq 0.001$) reduced the counts of viable Wt bacteria (1.6 log reduction as compared to the control). The growth rate was also affected. In contrast, the same treatment had no significant effect on the survival ($P > 0.05$) of the carbenicillin-adapted subpopulations (Figure 25). However, irradiation seemed to have little effect on their growth (Figure 26); and after 400 min and 600 min post-irradiation, respectively Carb25 and Carb15 were completely resistant (Figures 26A and 26B).

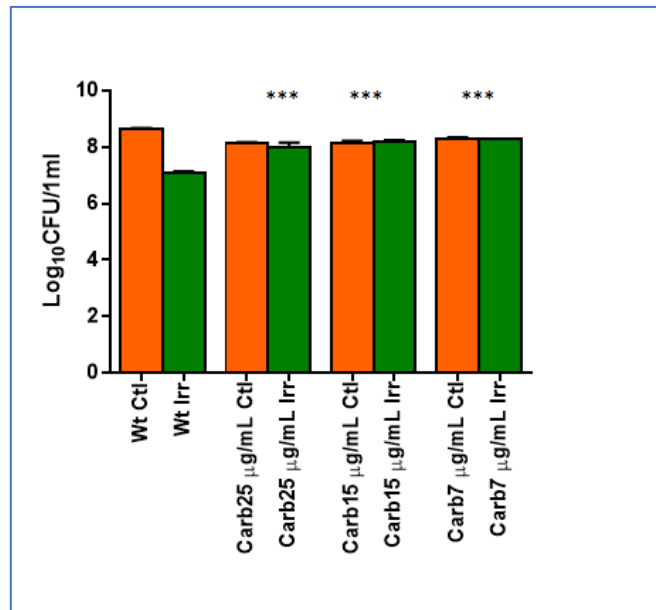


Figure 25. Viability of carbenicillin-adapted *E. coli* O157:H7 following irradiation at 0.4 kGy. Immediately after irradiation treatment, five μL of each cell culture were used. Results are represented by \log_{10} of CFU/mL. Differences between the \log_{10} CFU counts of (Irr /Ctl) for each strain vs Wt were analyzed using Student's t test. Carb: carbenicillin adapted bacteria; Ctl: control non-irradiated; Irr: irradiated.

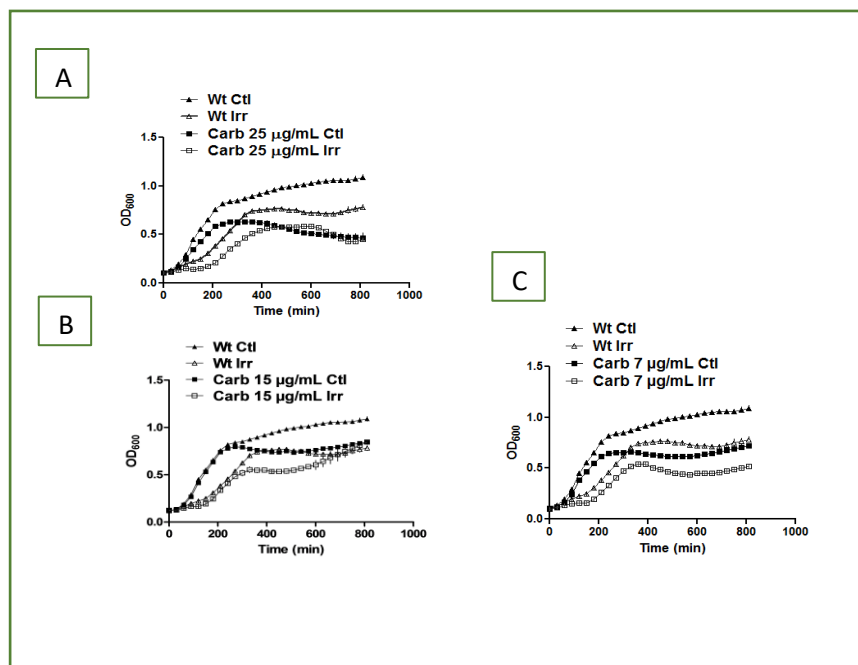


Figure 26. Growth of carbenicillin-adapted *E. coli* O157:H7 following irradiation at 0.4 kGy. (A) Growth at 25 $\mu\text{g/mL}$, (B) at 15 $\mu\text{g/mL}$ or (C) at 7 $\mu\text{g/mL}$ carbenicillin, treated or not with irradiation at 0.4 kGy. 200 μL of each cell culture were used. Carb: carbenicillin adapted bacteria; Ctl: control non-irradiated; Irr: irradiated.

These observations show that bacterial adaptation to high concentrations of carbenicillin (i.e. $\geq 15 \mu\text{g}/\text{mL}$) confers resistance to γ -irradiation. In contrast to carbenicillin, the adaptation of *E. coli* O157:H7 to different concentrations of kanamycin did not increase its radioresistance, and a significant difference was observed between irradiated and non-irradiated cells adapted to the three concentrations of kanamycin (Figures 27 and 28). The reduction level was 1.4, 1.8, 2 and 1.6 \log_{10} CFU/mL for Wt and adapted *E. coli* to 7, 15 and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively.

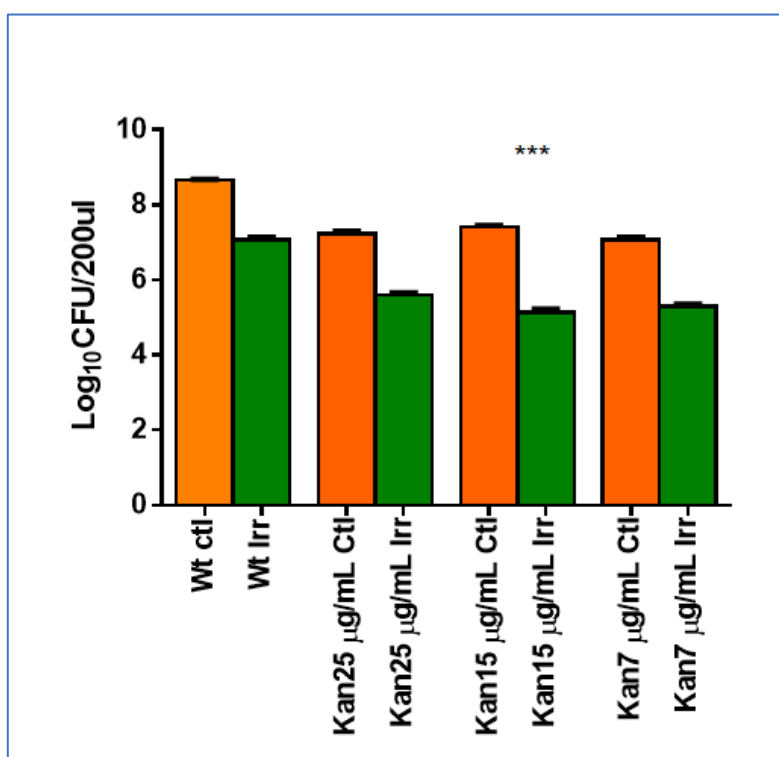


Figure 27. Viability of kanamycin-adapted *E. coli* O157:H7 following irradiation at 0.4 kGy. 5 μL of each cell culture were used. Results are represented by \log_{10} of CFU in 1 mL. Differences between the \log_{10} CFU counts of (Irr /Ctl) for each strain vs Wt were analyzed using Student's t test. Kan: kanamycin adapted bacteria; Ctl: control non-irradiated; Irr: irradiated.

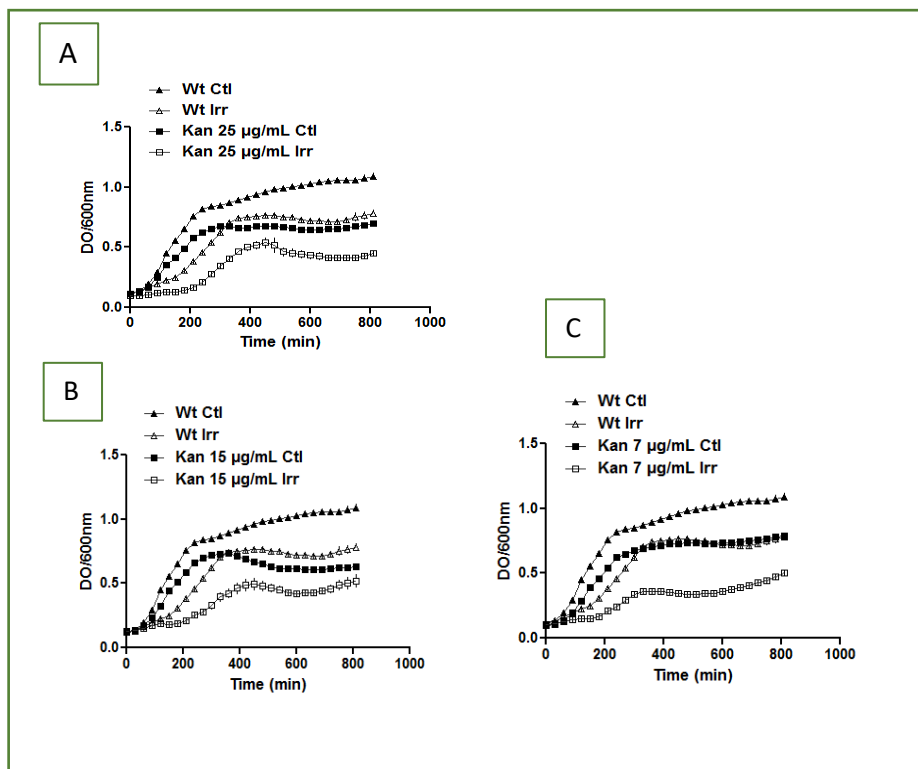


Figure 28. Growth of kanamycin-adapted *E. coli* O157:H7 following irradiation at 0.4 kGy. (A) Growth at 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (B) 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and (C) 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ treated or not with irradiation at 0.4 kGy. 200 μL of each cell culture were used. Kan: kanamycin adapted bacteria; Ctl: control non-irradiated; Irr: irradiated.

These results were confirmed by evaluating *E. coli* growth after treatment (Figure 28). A significant difference was observed throughout the whole experimental period between irradiated and non-irradiated *E. coli* cells adapted to the three concentrations of kanamycin. These results indicate that kanamycin resistance has no effect on the development of resistance to 0.4 kGy irradiation treatment in *E. coli* O157:H7. The transcription of *ampC* and *ampG* was assessed by qRT-PCR 60 min after irradiation at 0.4 kGy. The results (Figure 29A) demonstrate that irradiation treatment of *E. coli* led to a significant increase ($P \leq 0.01$) in the expression of *ampC* and *ampG*, showing respectively an increase of 1.6 and 2-fold at 60 min post-treatment compared to the non-irradiated control. Interestingly, even without irradiation treatment, the expression of *ampC* was 2.4-fold higher in Carb25 than in the Wt. No significant difference ($> 1.5 \log_2$) was observed on the *ampG* expression. Moreover, irradiation treatment at 0.4 kGy further increased the expression of both *ampC* and *ampG* genes by 1 \log_2 in Carb25 bacteria (Figure 7b). Sequencing of the Carb25 *ampC* and *ampG* genes revealed no mutation, compatible with an adaptation to carbenicillin promoted by modifications in gene expression.

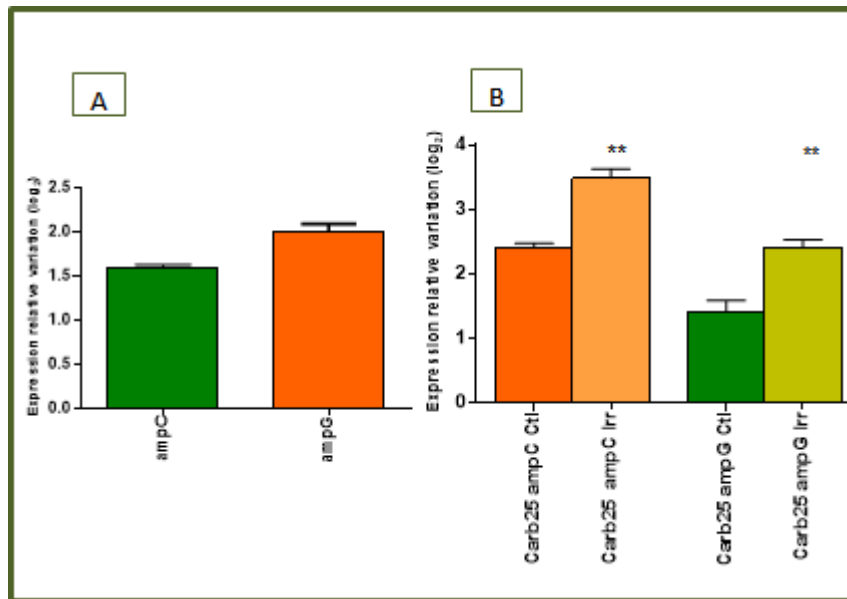


Figure 29. Effect of γ -irradiation on *ampC* and *ampG* expression by *E. coli* O157:H7. (A): in wild type bacteria. (B): in 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ carbenicillin adapted bacteria (Carb25). Relative gene expression represents the change in transcription in bacteria 60 minutes after irradiation treatment at a dose of 0.4 kGy. Results are represented by \log_2 RNA expression using $-2^{\Delta\Delta Ct}$. The difference was considered as significant when the expression relative variation $\geq 1.5 \log_2$. T-student was carried out between Control and irradiated Carb25 strains. Carb25: 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ carbenicillin adapted bacteria, Ctl: control non-irradiated and Irr: irradiated.

To further investigate the effect of these genes on the radioresistance of *E. coli* O157:H7, mutants in these genes were generated. As expected, the antibiogram results showed that $\Delta ampC$ and $\Delta ampG$ mutants are very sensitive to β -lactam antibiotics (ampicillin, piperacillin and carbenicillin) (Figure 30 A,B,C). This sensitivity is dose-dependent and was higher with carbenicillin compared to the other antibiotics. In contrast, no significant effect of kanamycin on the $\Delta ampG$ mutant and only a little effect on the $\Delta ampC$ mutant were observed (Figure 29D).

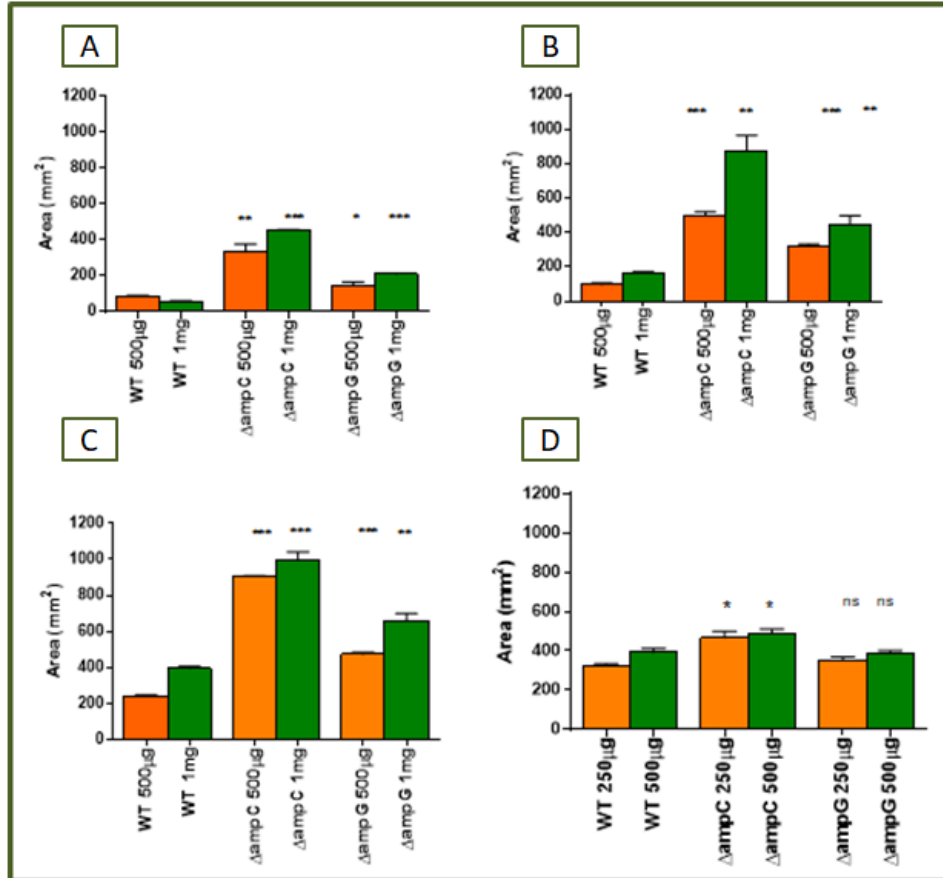


Figure 30. Antibiotics susceptibility assays on *E. coli* O157:H7 *ampC* or *ampG* mutants. The disk containing 500 µg or 1 mg of (A) ampicillin, (B) piperacillin and (C) carbenicillin or 250 or 500 µg of (D) kanamycin was placed onto the surface of the agar plates. Inhibition area = $(R^2 \times \pi)$.

Since the carbenicillin-adapted subpopulations were more resistant to γ -irradiation treatments, we tested whether the mutants with more sensitivity to β -lactam antibiotics would behave the opposite way. The effects of γ -irradiation at sensitization dose of 0.4 kGy and lethal dose of 1.5 kGy on the viability and the growth of *E. coli* $\Delta ampC$ and $\Delta ampG$ mutants are shown in Figures 30A and 31A. The data demonstrate that inactivation of *ampC* and *ampG* increased the sensitivity of the cells to irradiation treatment at a dose of 0.4 kGy. Viability was reduced by 2 and 2.8 log₁₀ CFU/mL in $\Delta ampC$ and $\Delta ampG$ mutants, respectively, as compared to only 1.1 log₁₀ CFU/mL reduction in the Wt. To verify the effect of *ampC* and *ampG* deletion in radiosensitivity, *E. coli* $\Delta ampC$ and $\Delta ampG$ mutants were complemented respectively, by *ampC* and *ampG* genes on pTRC99A plasmid which is inducible by IPTG. Irradiation response of $\Delta ampC$ overexpressing *ampC* ($\Delta ampC[ampC+]$) and $\Delta ampG$

overexpressing *ampG* ($\Delta ampG[ampG+]$) was compared to Wt[pTRC99A] as a control. Very interestingly, the complemented mutants overexpressing the corresponding gene ($\Delta ampC[ampC+]$ and $\Delta ampG[ampG+]$) became completely resistant to irradiation at the sensitization dose (Figure 31) with only a limited growth difference with the Wt (Figure 32). Moreover, these overexpressing mutants were able to survive and grow after irradiation treatment at a dose of 1.5 kGy, which is completely lethal for $\Delta ampC$ and $\Delta ampG$ mutants and for Wt O157:H7 (Figures 31 A and B). Our findings suggest that AmpC and AmpG may intervene in the radioresistance of *E. coli* O157:H7.

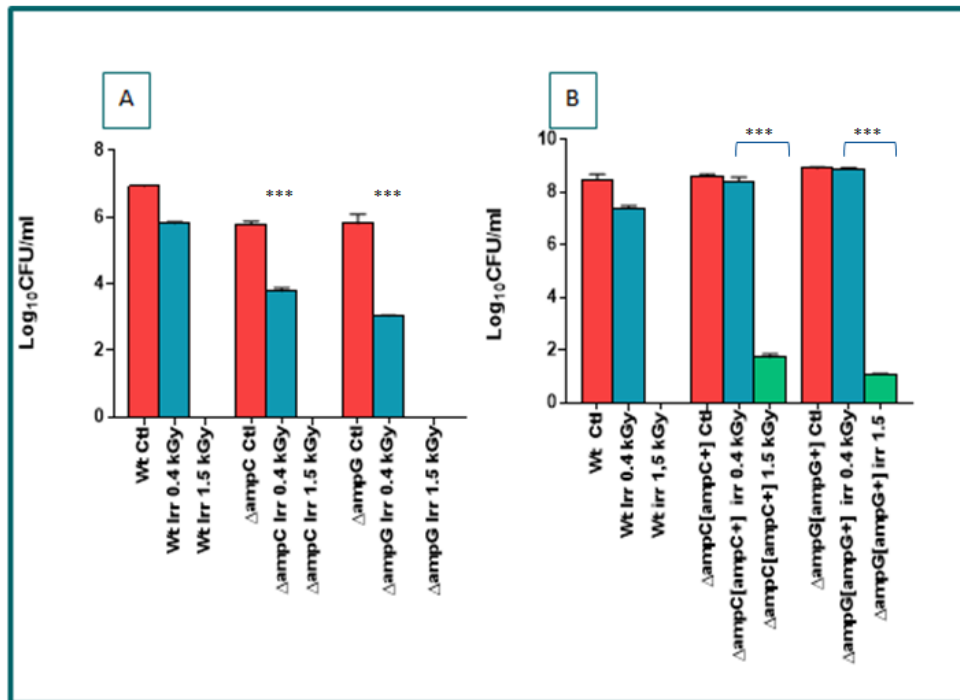


Figure 30. Viability of *E. coli* mutants and strains after γ -irradiation at 0.4 kGy. A: viability of $\Delta ampC$ and $\Delta ampG$. *E. coli*. B: viability of $\Delta ampC[ampC+]$ and $\Delta ampG[ampG+]$. 5 μ L of each cell culture were used. Results are represented by log₁₀ of CFU in 1 mL. Differences between the log₁₀CFU counts of (Irr/Ctl) for each strain vs Wt were analyzed using Student's t test. Ctl: control non-irradiated; Irr: irradiated; 0.4 kGy: sensitive dose; 1.5 kGy: lethal dose.

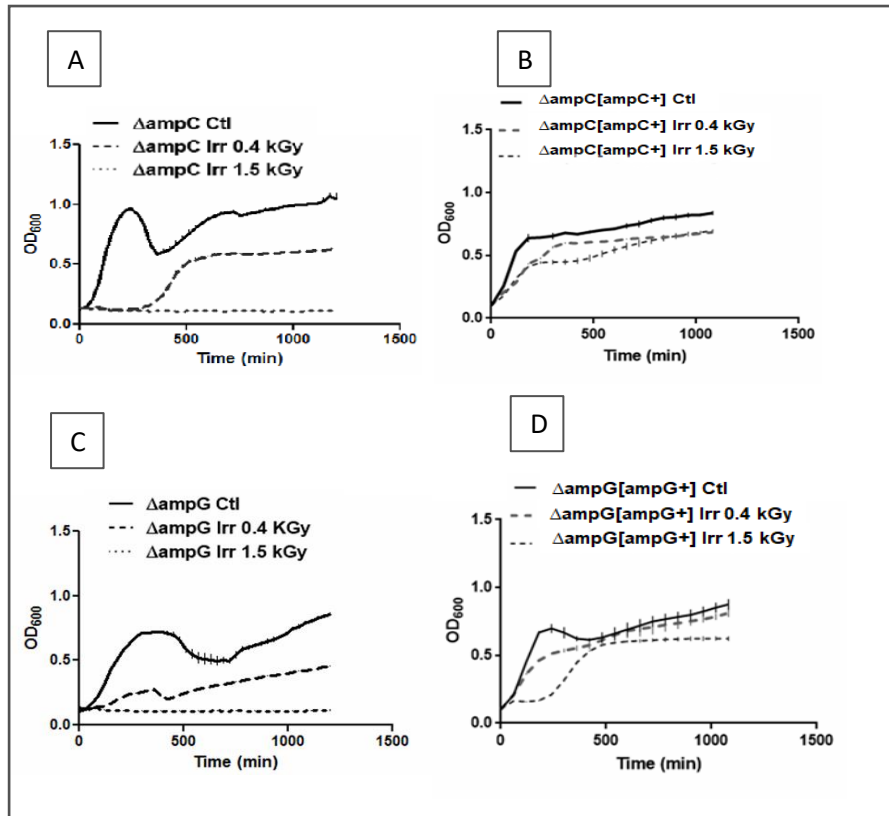


Figure 31. Growth of *E. coli* mutants and strains after γ -irradiation at 0.4kGy. $\Delta ampC$ (a), $\Delta ampC$ - $ampC$ (b), $\Delta ampG$ (c) or $\Delta ampG$ - $ampG$ (d). 200 μ L of each cell culture were used. Ctl: control non-irradiated; Irr: irradiated; 0.4 kGy: sensitive dose; 1.5 kGy: lethal dose.

Since response mechanisms to stresses are often redundant, we also evaluated the effect of these two genes in the response to other stresses like oxidative (paraquat), heat and cold stress. Interestingly, in contrast with the Wt and the *ampC* and *ampG* mutants, Carb25, $\Delta ampC[ampC+]$, and $\Delta ampG[ampG+]$ strains were all able to survive and grow after incubation at 50 °C for 2 h or 1 week at 4 °C and in presence of 0.5 mM or 1 mM paraquat, a metabolic generator of superoxide (Figures 33 and 34).

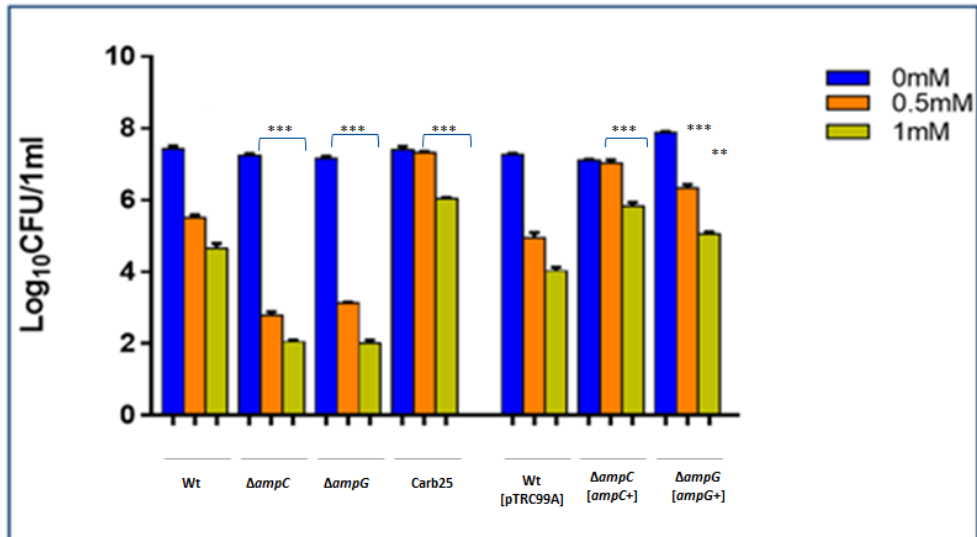


Figure 32. Viability of *E. coli* O157:H7 mutants and strains under paraquat stress. The bacteria at the exponential phase of growth ($OD_{600} \approx 1$) are cultured in TSB supplemented with 0.5 or 1mM of paraquat and incubated at 37 ° C for 40 min. 5 μ L of each cell culture were used. Results are represented by \log_{10} of CFU. Differences between the \log_{10} CFU counts for each strain vs Wt (or Wt/pTRC99A) at different concentrations of paraquat were analyzed using Kruskal-Wallis rank sum test.

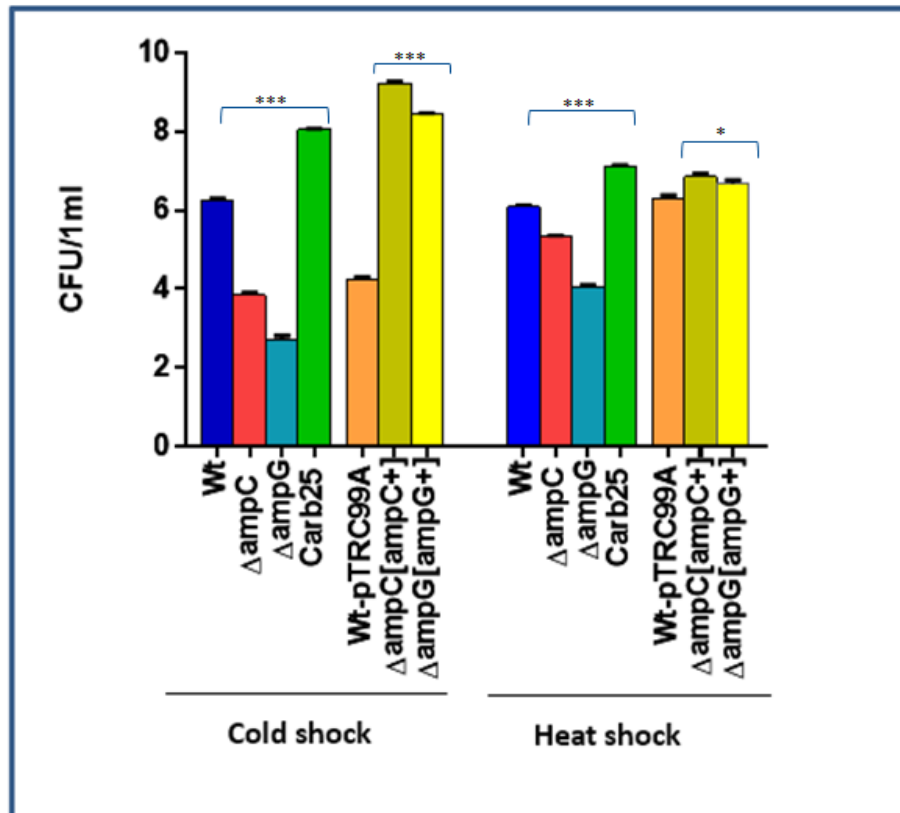


Figure 33. Viability of *E. coli* O157:H7 mutants and strains under thermal stress. The bacteria at the exponential phase of growth ($OD_{600} \approx 1$) are cultured in TSB and incubated at 50°C for 2h (heat shock) or at 4°C for 1 week (cold shock). 5 μ L of each cell culture were used. Results are represented by \log_{10} of CFU. Differences between the \log_{10} CFU counts of (Irr /Ctl) for each strain vs Wt (or Wt/pTRC99A) were analyzed using Student's t test.

3.2.5 Discussion

In the present study, we have demonstrated that the resistance of *E. coli* O157:H7 to some antibiotic types could reduce its sensitivity to irradiation treatment at a dose that is normally lethal. In fact, our results show that an *E. coli* O157:H7 subpopulation adapted to carbenicillin recovered growth faster than wild-type bacteria following an irradiation treatment at the sensitization dose (Figures 25 and 26). This was not the case for a subpopulation of *E. coli* O157:H7 adapted to kanamycin (Figures 27 and 28). We also demonstrated that the viability and the growth of the adapted bacteria were affected as compared to the Wt. This could be the result of a trade-off phenomenon, which is a negative correlation between stress resistance/adaptation and growth of bacteria like pathogenic *E. coli* (Basra *et al.*, 2018). These findings suggest that the acquisition of radioresistance after a bacterial adaptation to antibiotics depends on the class of antibiotic.

Wesche *et al.* (2009) reported that microorganisms that survive a given stress could gain

resistance to that stress or another one. This phenomenon is attributable to the cross-protection mechanisms found in some bacteria and has an important impact on the industrial process conditions and food safety. While there is increasing evidence of a relationship between different stress resistances, few studies have focused on the evaluation of the effect of bacterial resistance to a given stress on radioresistance. Collectively, it is possible that resistance to β -lactam antibiotics is responsible for some mechanism of resistance to an irradiation treatment at a dose of 0.4 kGy.

Peptidoglycan turnover and recycling are among the most important processes in the bacterial life cycle. These mechanisms are involved in the regulation of virulence and the resistance response (Folkesson *et al.*, 2005; Boudreau *et al.*, 2012). The β -lactamase AmpC, produced by some Gram-negative bacteria, can interact with many β -lactam antibiotics including ampicillin, carbenicillin, penicillin and piperacillin (Sanders Jr and Sanders Jr, 1986). One of the regulators of this protein is the permease AmpG which imports muropeptide, a peptidoglycan-derived product, to the cytoplasm where it activates the transcription of *ampC* (Korfmann and Sanders, 1989; Yang *et al.*, 2013).

To evaluate the impact of β -lactam resistance on the *E. coli* O157:H7 radioresistance, we assessed the expression of two genes required for β -lactamase activity in *E. coli* (i.e. *ampC* and *ampG*) under γ -irradiation treatment. These marker genes were selected based on RNA-seq results demonstrating that their expression increases in *E. coli* O157:H7 following 0.4 kGy irradiation treatment (unpublished data). We have shown that the expression of both genes was significantly increased (Figure 29) confirming our RNA-seq results. Collectively, these findings indicate that AmpC and AmpG could be related to *E. coli* O157:H7 radioresistance. In addition, $\Delta ampC$ and $\Delta ampG$ mutants in strain O157:H7 showed an important sensitivity towards different β -lactam antibiotics (Figures 31A and 32A), consistent with previous studies that have reported a role of these genes in the resistance of other *E. coli* strains to β -lactams (Sanders, 1987; Lindquist *et al.*, 1993).

In the current study, we have also demonstrated that γ -irradiation up-regulates *ampC* and *ampG* expression of both Wt and Carb25 O157:H7 (Figure 29). This could be explained by the response of *E. coli* to muropeptide distribution by increasing *ampC* and *ampG* expression, which then promotes resistance. In fact, Caillet *et al.* (2005) reported that irradiation treatment affects peptidoglycan recycling by modification of the distribution of muropeptides on *E. coli*, probably as a result of modification of the glycan-binding peptides. Peptidoglycan recycling is important for cell growth and division (Park and Uehara, 2008). The AmpG permease can transport GlcNAc-anhMurNAc-peptides, a peptidoglycan degradation product, to the cytoplasm where it is lysed by the β -glucosaminidase NagZ to produce anhMurNAc-peptides, which are then metabolized to UDPMurNAc-pentapeptides or by *ampD* to generate GlcNAc, anhMurNAc, murein tripeptide, and D-Ala. Murein tripeptide is ligated to UDP-MurNAc, therefore returning it to the murein synthesis pathway. In absence of β -lactam, UDPMurNAc-pentapeptide binds AmpR and converts it into a repressor of *ampC* transcription. In the

presence of a β -lactam, anhMurNAc-peptides accumulate and bind AmpR, which then leads to the activation of ampC transcription (Dietz *et al.*, 1997; Jacobs *et al.*, 1997). The inactivation of *ampG* results in non-inducible and micro-constitutive β -lactamase phenotypes to the bacterial cell, correlating peptidoglycan recycling and β -lactamase induction (Korfmann and Sanders, 1989; Lindquist *et al.*, 1993).

On the other hand, $\Delta ampC[ampC+]$ and $\Delta ampG[ampG+]$ strains overproducing AmpC and AmpG respectively and Carb25 adapted strains were paraquat resistant (Figure 33). In fact, sub-lethal concentrations of ampicillin or norfloxacin were associated with ROS-induced mutagenesis in *E. coli* and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (Cuirolo *et al.*, 2009; Kohanski *et al.*, 2010). In addition, β -lactam-induced clinical hetero-resistant *S. aureus* is associated with oxidative stress via increasing ROS production and DNA damage, both factors responsible for SOS response induction (Rosato *et al.*, 2014). This suggests that carbenicillin, similarly to ampicillin, leads to this mutagenesis induced by ROS and activates genes involved in the SOS response. Consequently, when *E. coli* O157:H7 was irradiated, it had all the resistance machinery already activated, which may have contributed to its radioresistance when adapted to carbenicillin, but not to kanamycin (Figures 25 and 28).

Also, in *E. coli* O157:H7, we see that overexpression of *ampC* or *ampG* promotes heat and cold stress resistance (Figure 34), maybe because AmpR has an effect on thermic tolerance, that is similar to what is observed in *Pseudomonas aeruginosa* and this by increasing the expression of the DnaJ-DnaK-GrpE Hsp70 system, involved in heat stress response (Balasubramanian *et al.*, 2014) and by controlling the cold stress response. On the basis of these observations, it appears that the type of stress applied on *E. coli* O157:H7 affects the response to other types of stress.

The *ampR* gene is involved in the oxidative stress response of *Pseudomonas aeruginosa* (Balasubramanian *et al.*, 2014). In the present study, the $\Delta ampC$ and $\Delta ampG$ mutants were more sensitive to irradiation treatment compared to the Wt. In the $\Delta ampG$ mutant, anhMurNAc-peptides probably accumulate in the periplasm, resulting in no production of UDPMurNAc-pentapeptide. It is thus possible that UDPMurNAc-pentapeptide plays a role in the activation of the oxidative stress response by its interaction with ampR. In this context, *E. coli* becomes less resistant to an irradiation treatment when there is no interaction. These observations suggest that AmpC may be involved in *E. coli* O157:H7 radioresistance by a direct ROS gene synthesis control or interaction with ampR (Figures 31, 32A and 32B). Moreover, different growth profiles of $\Delta ampC$ and $\Delta ampG$ mutants were observed (Figure 32). This could be related to the perturbation in peptidoglycan recycling caused by the absence of ampC or ampG, thus affecting cell growth and division (Park and Uehara, 2008).

In *E. coli*, various mutations in the *ampC* promoter/attenuator region, in *ampG*, in *ampD* or in *ampR* genes may lead to constitutive overproduction of AmpC beta-lactamases (Kopp *et al.*, 1993; Caroff *et al.*, 1999; Kuga *et al.*, 2000). We have amplified and sequenced the *ampC* and *ampG* genes of

Carb25 adapted bacteria and no mutation was detected in the *ampC* promoter region, in the *ampC* or *ampG* genes, suggesting that carbenicillin adaptation leads to AmpC overproduction (Figure 29B) by mutation in other regulatory elements, such as *ampR* or *ampD* but not in *ampG*. In this case, we can suppose that in Carb25 adapted bacteria, irradiation stress is important to induce the positive regulatory mechanism involving AmpG. In the absence of this stress, AmpC overexpression is potentially mediated by AmpR and/or AmpD.

In conclusion, the results of this study clearly demonstrate that in addition to their contribution in antibiotic resistance, *ampC* and *ampG* genes modulate the resistance of *E. coli* O157:H7 to γ -irradiation and possibly to other stress such as oxidative, cold and heat stress. Transcriptomic studies of $\Delta ampC$ and sequencing of the Carb25 adapted complete genome could be assessed to confirm respectively the hypothesis of the role of *ampC* in inducing radioresistance through the control of the peptidoglycan recycling and to determine the genes involved in carbenicillin adaptation in *E. coli* O157:H7. These results can be of great interest to the food industry and especially for irradiation treatment of meat from β -lactam-treated animals, which could affect the efficiency of irradiation treatment. Since kanamycin did not show any effect on radioresistance, it will be important to investigate the effects of additional antibiotic classes currently used in animal production to verify their effects on the radioresistance or resistance to other stresses of *E. coli* O157:H7.

Acknowledgements

We thank Nordion for performing the irradiation treatment. Pr. Charles M. Dozois for providing bacterial strains and Sébastien Houle, Marie-Christine Groleau and Gabrielle Gendron-Lepage for their technical help.

References

- Amann E, Ochs B, Abel K-J.** Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 1988;69(2):301-315.
- Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, Mori H.** Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* 2006;2(1).
- Balasubramanian D, Kumari H, Jaric M, Fernandez M, Turner KH, Dove SL, Narasimhan G, Lory S, Mathee K.** Deep sequencing analyses expands the *Pseudomonas aeruginosa* AmpR regulon to include small RNA-mediated regulation of iron acquisition, heat shock and oxidative stress response. *Nucleic Acids Res* 2014;42(2):979-998.
- Basra P, Alsaadi A, Bernal-Astrain G, O'Sullivan ML, Hazlett B, Clarke LM, Schoenrock A, Pitre S, Wong A.** Fitness Tradeoffs of Antibiotic Resistance in Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *Genome Biol Evol* 2018;10(2):667-679.
- Ben-Fadhel Y, Leroy V, Dussault D, St-Yves F, Lauzon M, Salmieri S, Jamshidian M, Vu DK, Lacroix M.** Combined effects of marinating and γ -irradiation in ensuring safety, protection of nutritional value and increase in shelf-life of ready-to-cook meat for immunocompromised patients. *Meat science* 2016;118:43-51.
- Boudreau MA, Fisher JF, Mobashery S.** Messenger functions of the bacterial cell wall-derived muropeptides. *Biochem* 2012;51(14):2974.
- Caillet S, Shareck F, Lacroix M.** Effect of gamma radiation and oregano essential oil on murein and ATP concentration of *Escherichia coli* O157: H7. *J Food Prot* 2005;68(12):2571-2579.
- Caroff N, Espaze E, Berard I, Richet H, Reynaud A.** Mutations in the *ampC* promoter of *Escherichia coli* isolates resistant to oxyiminocephalosporins without extended spectrum β -lactamase production. *FEMS Microbiol Lett* 1999;173(2):459-465.
- Carone BR, Xu T, Murphy KC, Marinus MG.** High incidence of multiple antibiotic resistant cells in cultures of in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Mutat Res-Fund Mol M* 2014;759:1-8.
- Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing Twenty-Fourth Informational Supplement.....2014.
- Courvalin P.** Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance. *J Intern Med* 2008;264(1):4-16.
- Cuirolo A, Plata K, Rosato AE.** Development of homogeneous expression of resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains is functionally associated with a β -lactam-mediated SOS response. *J Antimicrob Chemother* 2009;64(1):37-45.
- Datsenko KAWanner BL.** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97(12):6640-6645.

- Dietz H, Pfeifle D, Wiedemann B.** The signal molecule for beta-lactamase induction in *Enterobacter cloacae* is the anhydromuramyl-pentapeptide. *J Antimicrob Chemother* 1997;41(10):2113-2120.
- Farkas J.** Irradiation for better foods. *Trends Food Sci Technol* 2006;17(4):148-152.
- Folkesson A, Eriksson S, Andersson M, Park JT, Normark S.** Components of the peptidoglycan-recycling pathway modulate invasion and intracellular survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Cell Microbiol* 2005;7(1):147-155.
- Health Canada.** Uses of Antimicrobials in Food Animals in Canada: Impact on Resistance and Human Health In: *Veterinary Drugs Directorate HC editor* 2002.
- Jacobs C, Frère J-M, Normark S.** Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible β -lactam resistance in gram-negative bacteria. *Cell* 1997;88(6):823-832.
- Juan C, Moyá B, Pérez JL, Oliver A.** Stepwise upregulation of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal cephalosporinase conferring high-level β -lactam resistance involves three AmpD homologues. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(5):1780-1787.
- Kaneko K, Okamoto R, Nakano R, Kawakami S, Inoue M.** Gene mutations responsible for overexpression of AmpC β -lactamase in some clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. *J Clin Microbiol* 2005;43(6):2955-2958.
- Karmali M, Petric M, Steele B, Lim C.** Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* 1983;321(8325):619-620.
- Kohanski MA, DePristo MA, Collins JJ.** Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol Cell* 2010;37(3):311-320.
- Kopp U, Wiedemann B, Lindquist S, Normark S.** Sequences of wild-type and mutant ampD genes of *Citrobacter freundii* and *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37(2):224-228.
- Korfmann G, Sanders C.** ampG is essential for high-level expression of AmpC beta-lactamase in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33(11):1946-1951.
- Koutchma T, Forney LJ, Moraru CI, 2009.** Ultraviolet light in food technology: principles and applications, CRC press.
- Kuga A, Okamoto R, Inoue M.** ampR gene mutations that greatly increase class C β -lactamase activity in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(3):561-567.
- Lindquist S, Weston-Hafer K, Schmidt H, Pul C, Korfmann G, Erickson J, Sanders C, Martin HH, Normark S.** AmpG, a signal transducer in chromosomal β -lactamase induction. *Mol Microbiol* 1993;9(4):703-715.
- Livak KJ, Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 2001;25(4):402-408.
- Livermore DM.** beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995;8(4):557-584.

- Loukiadis E, Kerouredan M, Oswald E, Brugere H.** Virulence Factors of Enterohemorrhagic *Escherichia Coli* (EHEC) in Sewage of French Slaughterhouses and Environmental Risk for Public Health. *Epidemiology* 2006;17(6):S236.
- Normark S.** β -Lactamase induction in gram-negative bacteria is intimately linked to peptidoglycan recycling. *Microb Drug Resist* 1995;1(2):111-114.
- Park JT Uehara T.** How bacteria consume their own exoskeletons (turnover and recycling of cell wall peptidoglycan). *Microbiol Mol Biol Rev* 2008;72(2):211-227.
- Phillips CA.** The epidemiology, detection and control of *Escherichia coli* O157. *J Sci Food Agric* 1999;79(11):1367-1381.
- Poole K.** Resistance to β -lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci* 2004;61(17):2200-2223.
- Rosato RR, Fernandez R, Paz LI, Singh CR, Rosato AE.** TCA cycle-mediated generation of ROS is a key mediator for HeR-MRSA survival under β -lactam antibiotic exposure. *PloS one* 2014;9(6):e99605.
- Sabri M, Houle S, Dozois CM.** Roles of the extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* ZnuACB and ZupT zinc transporters during urinary tract infection. *Infect Immun* 2009;77(3):1155-1164.
- Sanders C.** Chromosomal cephalosporinases responsible for multiple resistance to newer β -lactam antibiotics. *Annu Rev Microbiol* 1987;41(1):573-594.
- Sanders CCSanders Jr WE.** Emergence of resistance during therapy with the newer β -lactam antibiotics: role of inducible β -lactamases and implications for the future. *Rev Infect Dis* 1983;5(4):639-648.
- Sanders Jr CCSanders Jr WE.** Type I β -lactamases of gram-negative bacteria: interactions with β -lactam antibiotics. *J Infect Dis* 1986;154(5):792-800.
- Schmidtke AJ Hanson ND.** Role of ampD homologs in overproduction of AmpC in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(11):3922-3927.
- Tjaden B. (2015)** De novo assembly of bacterial transcriptomes from RNA-seq data. *Genome Biol* 16:1.
- Tóth I, Csík M, Emçdy L.** Spontaneous antibiotic resistance mutation associated pleiotropic changes in *Escherichia coli* O157: H7. *Acta Vet Hung* 2003;51(1):29-44.
- Wesche AM, Gurtler JB, Marks BP, Ryser ET.** Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *J Food Prot* 2009;72(5):1121-1138.
- Yang T-C, Chen T-F, Tsai JJ, Hu R-M.** AmpG is required for BlaXc beta-lactamase expression in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* str. 17. *FEMS Microbiol Lett* 2013;340(2):101-108.
- Zeng X Lin J.** Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Front Microbiol* 2013;4:128.

3.3 Présentation de l'article « BP-933W prophage promotes radiosensitization in *Escherichia coli* O157:H7 »

Ghizlane Gaougaou, Antony Vincent, Katerina Krylova, Hajer Habouria, Amina Baraketi, Frederic Veyrier, Charles Dozois, Éric Déziel, Monique Lacroix.

INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boulevard des Prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada.

Soumission : ; **Acceptation :** ; **Publication :**
Journal :

Résumé

L'entérohémorragique (EHEC) *Escherichia coli* (*E. coli*) O157: H7 est un agent pathogène d'origine alimentaire portant deux prophages CP-933V et BP-933W codant respectivement pour Stx1 et Stx2. Le but de ce travail est de déterminer le mécanisme d'adaptation d' *E. coli* O157:H7 à la dose "létale" d'irradiation (1.5kGy). Six passages à cette dose ont favorisé la perte de CP-933V et de BP-933W et la mutation de trois gènes, *rpoA*, *wrbA* et un gène codant pour une protéine hypothétique (Wt_02639). Les clones adaptés à cette dose (C1, C2 et C3) étaient résistants au stress oxydatif (paraquat), sensibles au pH acide (pH 2) et peu cytotoxique. Cependant, BP-933W a été capable à se réintroduire au niveau des clones C1 et C2 mais pas dans son site spécifique *wrbA* qui était lui aussi muté. Les clones qui ont réintroduit le prophage BP-933W (C1-Φ et C2-Φ) ont regagné leur cytotoxicité, leur sensibilité au stress oxydatif et à la dose létale d'irradiation et leur résistance à l'acidité. De plus, la souche non-virulente MG1655 de *E. coli* K-12 ayant intégrée BP-933W dans son génome est devenue cytotoxiques, sensible à l'irradiation et au stress oxydatif et légèrement plus résistantes à l'acidité. Mis ensemble, ces résultats indiquent que les prophages jouent un rôle critique dans la radio-sensibilité d'*E. coli* O157: H7 et que les mutations de *rpoA* et Wt_02639 peuvent intervenir dans sa radio-résistance et de sa sensibilité à l'acide.

3.3.1 Abstract

Enterohemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli* (*E. coli*) O157:H7 is a foodborne pathogen that carries both Stx1 and Stx2 shiga toxins encoded by the prophages CP-933V and BP-933W respectively. The aim of this work is to determine the *E. coli* O157: H7 adaptation mechanism at the "lethal" dose of irradiation (1.5kGy). Six passages at this dose promote the loss of CP-933V and BP-933W prophages and mutation of three genes, *wrbA*, *rpoA* and a gene encoding a hypothetical protein (Wt_02639). Clones adapted to this dose (C1, C2 and C3) were resistant to oxidative stress (paraquat), sensitive to acid pH (pH 2) and less cytotoxic. Although, BP-933W could re-integrate into the C1 and C2 genomes this did not occur at the bacterial site-specific (*attB*) site in the *wrbA* gene, which was mutated in

these strains. Clones of C1 and C2 that had regained prophages (C1-Φ and C1-Φ) had recovered sensitivity to oxidative stress and to the lethal dose of irradiation and increased cytotoxicity and acid resistance. In addition, the non-virulent strain *E. coli* K-12/MG1655 carrying BP-933W has become cytotoxic, sensitive to irradiation and oxidative stress and slightly acid resistant. These results indicate that prophages play a critical role in radiosensitization, and that mutation in *rpoA* and *moly* may be participate in radioresistance and acid sensitivity of *E. coli* O157:H7.

3.3.2 Introduction

Enterohemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli* (*E. coli*) O157:H7 and other STEC/VTEC are an important health risk to public health and food safety. EHEC O157:H7 can cause life-threatening diseases that range from mild gastroenteritis to hemorrhagic colitis and, in extreme cases, from hemolytic uremic syndrome to kidney failure (1, 2). *E. coli* O157:H7 is proposed to have evolved from non-toxicogenic *E. coli* O55:H2 strain possessing a *locus of enterocyte effacement* (LEE). It is recognized that this evolution involved four sequential steps: (i) acquisition of *stx2*, (ii) acquisition of plasmid pO157, (iii) acquisition of *stx1*, and (iv) loss of loss of beta-glucuronidase activity and the capacity to ferment D-sorbitol (3).

Bacteriophages are viruses specific to bacteria and contribute in several manners to the evolution of their hosts. One of these is lysogenic conversion and horizontal gene transfer (3), whereby phage genes integrate into bacterial genomes, and can thus increase bacterial gene content which may also result in gains of function and potentially fitness. For example, it is well known that the virulence of some bacteria rely on phage genes acquired through this process (4, 5). Compared to the non-pathogenic *E. coli* K-12 laboratory strain MG1655, *E. coli* O157:H7 strain EDL933 possesses 1,387 more genes. This increased gene repertoire includes genes encoding alternative metabolic capacities, virulence factors, several prophages and hypothetical proteins (6). *E. coli* O157:H7 strain EDL933 carries both *stx1* and *stx2* genes located on the prophages PV-933V and BP-933W respectively. These prophages are considered beneficial to their bacterial hosts by providing new functions during lysogenic conversion that can be considered a bacterial-phage co-evolution (7).

Stx prophages integrate into the bacterial genome by site-specific recombination through a tyrosine recombinase integrase that binds to the *att* sites to promote recombination and phage integration (8, 9). The BP-933W prophage is integrated adjacent to the *wrbA* involved in the oxidative stress response, and the PV-933V is integrated adjacent to the *mlrA* (*yehV*) which encodes a regulator involved in curli and cellulose production (10, 59).

To maintain lysogeny, lambdoid prophages constitutively express the *ci* gene that represses expression of genes involved in the lytic cycle. DNA-damaging agents such as UV irradiation, mitomycin C and, antibiotics, activate the SOS response and as a result a proteolytic cleavage of CI protein by the RecA protein can induce the lytic cycle (11, 12). The same recombination reaction may promote excision of prophages in the presence of excisionase (8, 13). In some cases, prophages can inactivate the expression of a bacterial gene via their integration into the open reading frame or the adjacent regulatory region. The prophage can also be excised when bacterial cells require this gene function to counter a stress encountered while the bacteriophage is integrated at this site. Active lysogeny is reversible when the excised prophage can remain in the cell as an episome and may reintegrate into the bacterial chromosome in the absence of conditions that can favour the lytic cycle. In other cases, excision of the prophage may be followed by phage loss without triggering lytic production or bacterial lysis (11, 12, 14). DNA damage by exposure to mitomycin C, and oxidative stress can induce the SOS response and promote a switch from lysogenic to the lytic state in *E. coli* O157:H7, and can also result in prophage excision (8, 13).

γ -irradiation can also be a factor that induces the SOS response. This treatment prolongs shelf life of food products such as fresh fruits and vegetables, meat, fish and cereals by reducing the presence of bacteria that can lead to food spoilage as well as potential foodborne pathogens (15, 16). γ -irradiation generates an oxidative stress that kills bacterial cells through generation of reactive oxygen species (ROS) from the radiolysis of water. This oxidative stress causes structural damage and physical dysfunction in bacteria: including DNA damage and modifications, disruption of the cellular envelopes; ribosome alterations; and alteration of selective permeability of the membrane (17).

However, many bacteria, including *E. coli* O157:H7, can acquire radioresistance. Herein, we investigate mechanisms underlying how *E. coli* O157:H7 can resist a lethal dose of irradiation (1.5 kGy) and determine what genetic changes can contribute to this process. *E. coli* O157:H7 strain EDL933 carrying both *stx1* and *stx2* was adapted to a 1.5 kGy dose of irradiation, which is normally considered lethal by several passages. Genome sequencing of these adapted bacteria and stress resistance studies were performed to determine radioresistance mechanisms of *E. coli* O157:H7.

3.3.3 Materials and methods

3.3.3.1 Bacterial strains and culture conditions

E. coli O157:H7 EDL933 and Sakai strains were isolated from meat and a human clinical case respectively, four isolates of *E. coli* O157:H7 (isolated from animals or human) and *E. coli* K-12/MG1655 (our laboratory stock) were used. All bacterial cultures were grown in Tryptic Soy Broth

(TSB, Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) with or without shaking (240 rpm) in a TC-7 roller drum (New Brunswick) or on Tryptic Soy Agar (TSA, Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) at 37 °C. The Bioscreen C apparatus (Growth Curves USA) was used for growth assays. Briefly, 200 µL of cell cultures diluted to an OD₆₀₀ = 0.05 in TSB, were distributed into wells of sterile microtiter plates and then incubated at 37°C for 20 h without agitation. The OD₆₀₀ growth measurements were performed every 1 hour after a resuspension period of 30 seconds. For viability studies, bacterial cultures were serially diluted, plated on TSA agar and incubated overnight (O/N) at 37°C. For Shiga Toxin detection and cytotoxicity assays, 50 ng/mL mitomycin C (Sigma Aldrich, Ontario, Canada) was added to bacterial cultures.

3.3.3.2 γ -irradiation treatment and adapting *E. coli* O157:H7 to a normally lethal dose-of irradiation

E. coli O157:H7 was adapted to a normally lethal irradiation dose by successive passages of cell cultures from the exponential phase of growth (OD₆₀₀ \approx 1). After each passage, bacteria were incubated at 37°C with shaking until OD₆₀₀ =2. Bacterial cultures were transferred into microfuge tubes and subjected consecutively to the a dose of 1.5 kGy of irradiation (18). After the 4th passage, cell culture (OD₆₀₀ \approx 1) was irradiated, plated on TSA plates and then incubated overnight at 37°C. Ten colonies (clones) were cultivated O/N in TSB at 37°C, diluted 100 times, incubated at 37°C with shaking until OD₆₀₀ \approx 1 and irradiated at 1.5 kGy. Then viability and growth studies were performed. The irradiation treatment was performed at room temperature (20 \pm 1 °C) at the Canadian Irradiation Center as described previously (19).

3.3.3.3 Acid and oxidative stress (paraquat) resistance assays

E. coli O157:H7 Wt strains, *E. coli* K-12 MG1655 and all clones with/without prophages were cultivated in TSB and incubated O/N at 37°C with shaking. For acid resistance assays, bacteria were diluted to an OD₆₀₀ \approx 1 in TSB at pH=2 (NaOH, 1N) and incubated at 37°C with shaking for 5h. Viability of bacteria was tested every 1 hour as described for general culture conditions. For oxidative stress resistance, bacteria at OD₆₀₀ \approx 1 were incubated in TSB supplemented with paraquat at 0.2µM, 0.3µM or 0.5µM and incubated at 37°C with shaking for 40 min. Viability was then evaluated by plate count dilutions.

3.3.3.4 Polymerase chain reaction (PCR)

O/N bacterial cultures were diluted at 1/1000 and incubated in TSB at 37 °C until the exponential phase of growth (OD₆₀₀ \approx 1). DNA extraction was performed using DNeasy Blood and tissue

Kit (Qiagen, Montreal, CANADA) as recommended by the supplier. Amplification of genes was carried by PCR using the primers given in Table 11.

Table11. Primers used in this study

Gene	Primers	Product size (pb)
<i>lexA</i>	F: GTTAACGGCCAGGCAACAAG R: AAGCTCTGCTGACGAAGGTC	560
<i>rpoA</i>	F: CAACCATTCTGGCTGAACAA R: CAGAGACAGTCCACGGGAAG	270
<i>moly</i>	F : TTGGCTCATCTTGCGCATTG R : TTGAAGCTGCCCTACGTACC	250
Insertion site verification		
<i>stx1A</i>	F(Z3345): GAAACATGGGTGCTCTGACA R(<i>stx1A</i>) : GTAAATTCCTTCGCAACCA	300
<i>stx1B</i>	F(<i>stx1B</i>) : CGCTTTGCTGATTTTTCACA R(Z3342):ACTGCACCTTCTCCACCTGT	300
<i>stx2A</i>	F(Z1460): GGTAACGCCTTCACAAAGC R (<i>stx2A</i>) : CGATACTCCGGAAGCACATT	300
<i>stx2B</i>	F (<i>stx2B</i>) : TCCCGGGAGTTTACGATAGA R (Z3342) : TACACCGTCTGGTACGTGGA	300

3.3.3.5 Bioinformatics analyses

The DNA of the wild-type strain and each of the adapted clones was sequenced at high-throughput using an Illumina HiSeq at the Sequencing Platform of Genome Canada (McGill University, Canada). The raw sequencing reads were processed using fastp version 0.19.5 (20) and ParDRe 2.2.5 (21). Reads quality was assessed using FastQC version 0.11.8 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). The reads of the wild-type strain were *de novo* assembled using SPAdes version 3.13.0 (22) with k-mer lengths of 21, 33, 55 and 77. The resulting contigs were ordered on the reference sequence of *E. coli* EDL933 (23) using Mauve version 2015-02-13 (24) and were annotated using Prokka version 1.13.3 (25). The nucleotide differences and genome alterations among adapted clones and wild-type strains were identified using Snippy version 3.2 (<https://github.com/tseemann/snippy>). The macro differences were visualized by mapping the reads from the clones onto the sequence of the wild-type strain using in combination BWA version 0.7.17-r1188 (26), SAMtools version 1.9 (27), and shinyCircos (28).

The statistical analyses were made in triplicate (n = 3). Statistical analysis was done using Prism 5 (GraphPad Software, Inc.). A *P* value was considered to be statistically significant when $P \leq 0.05$ (Student t test).

3.3.3.6 Cytotoxicity assays

The cytotoxicity assay was performed as described by (29) with some modifications. Vero cells (ATCC[®] CCL-81™) were plated into 96-well cell culture plates (10⁴ cells/well) in Dulbecco's Modified Eagle's medium (Wisent Bioproducts, Canada) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Wisent Bioproducts, Canada) and incubated at 37°C with 5% CO₂. Before infection, the cells were washed with Hanks' Balanced Salt solution 1X (Wisent Bioproducts, Canada) and bacteria were added to confluent monolayers at a multiplicity of infection (MOI) of 100 for 2, 4, 9 and 16 h. The total amount of LDH released into the medium was determined by CytoTox96 kit (Promega, USA) according to the manufacturer's instructions and measured using a Tecan plate reader (Tecan Group Ltd, Suisse) at 490 nm. The percentage of cytotoxicity was calculated using the following formula:

$$\text{Percent cytotoxicity} = 100 \times \frac{\text{Experimental LDH Release (OD490)}}{\text{Maximum LDH Release (OD490)}}$$

3.3.3.7 Prophage re-introduction

E. coli O157:H7 EDL933 was cultivated in TSB supplemented with 50ng/mL mitomycin C and incubated at 37°C for 18 hours. Bacterial culture was centrifuged (5000 x g for 10 min at 4°C) and the

supernatant was filtered through syringe filters (0.45 µm pore size). Infection of bacteria with phages from the filtered supernatant was carried out as described by Z. Lu and F. Breidt (30). A quantity of 200 µl of TSB and 5 µl of K-12 MG1655 or of bacteria adapted to a lethal dose of irradiation (Clone1: C1 Clone2: C2 Clone3: C3) at the exponential phase of growth ($OD_{600} \approx 1$) and 45 µl of filtered supernatant were added and incubated in a 96-well microplate at 37°C for 20 h without shaking. To select lysogenic bacteria 100 µl of cell culture from each well were centrifuged as described previously and 10 µl of each supernatant was used in spot-tests onto a lawn of *E. coli* K-12 MG1655 and by PCR for detection of *stx1A/B*, *stx1A/B* and *lexA* sequences using specific primers (Table 11).

3.3.3.8 Spot test

A 5 ml volume of targeted bacteria at $OD_{600}=0.15-0.2$ was applied to TSA plates containing 0.5% agar for 30 sec and then discarded. A quantity of 10 µl of tested samples was spotted on the completely dried agar as a bacterial overlay. The plates were left to dry and were inspected for lysis zones after an O/N incubation at 37°C.

3.3.3.9 Detection of Shiga toxins.

Shiga toxins were detected in supernatants of *E. coli* O157:H7 Wt, C1, C2, K-12 MG1655 and bacteria carrying reintegrated prophages (C1-Φ, C2-Φ and K-12-Φ) using ELISA. The test was performed as described by Baraketi *et al.* (2018). Briefly strains were incubated in TSB at 37°C. After O/N incubation bacterial cultures were diluted 1/10 in TSB supplemented with mitomycin C (50ng/mL) and incubated at 37°C for 20 hours. The supernatants were filtered as described above. The ELISA was performed in 24-well microplates using 1 mL of each supernatant, Rabbit IgG (Sigma Aldrich, Ontario, Canada), Anti-Shiga Toxin 2 as detection antibody and polyclonal anti-rabbit (Thermo Fisher Scientific, Burlington, Ontario, Canada) as secondary antibody coupled to Horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA). Absorbance was read using a Biotek microplate reader at 450 nm and Gen 5 2.07 software.

3.3.4 Results

Genomic modification of *E. coli* O157:H7 following adaptation to a normally lethal dose of irradiation. To determine *E. coli* O157:H7 potential paths of resistance to radiation exposure that is normally lethal to *E. coli*, we have adapted EDL933 strain to 1.5 kGy after several passages (Figure 35A). Bacteria were able to survive and grow 14 days after the first passage at lethal dose of irradiation and the bacterial growth increased with the number of passages (Figure 35B). The viability of 10 clones was tested after the 6th passage of irradiation (1.5 kGy). All of them were able to survive directly after this

“lethal stress” (Figure 35C). Since the viability of *E. coli* O157:H7 C1, C2 and C3 were the highest (2.8, 3.71 and 2.4 log CFU/mL respectively). The genomes of these clones were sequenced.

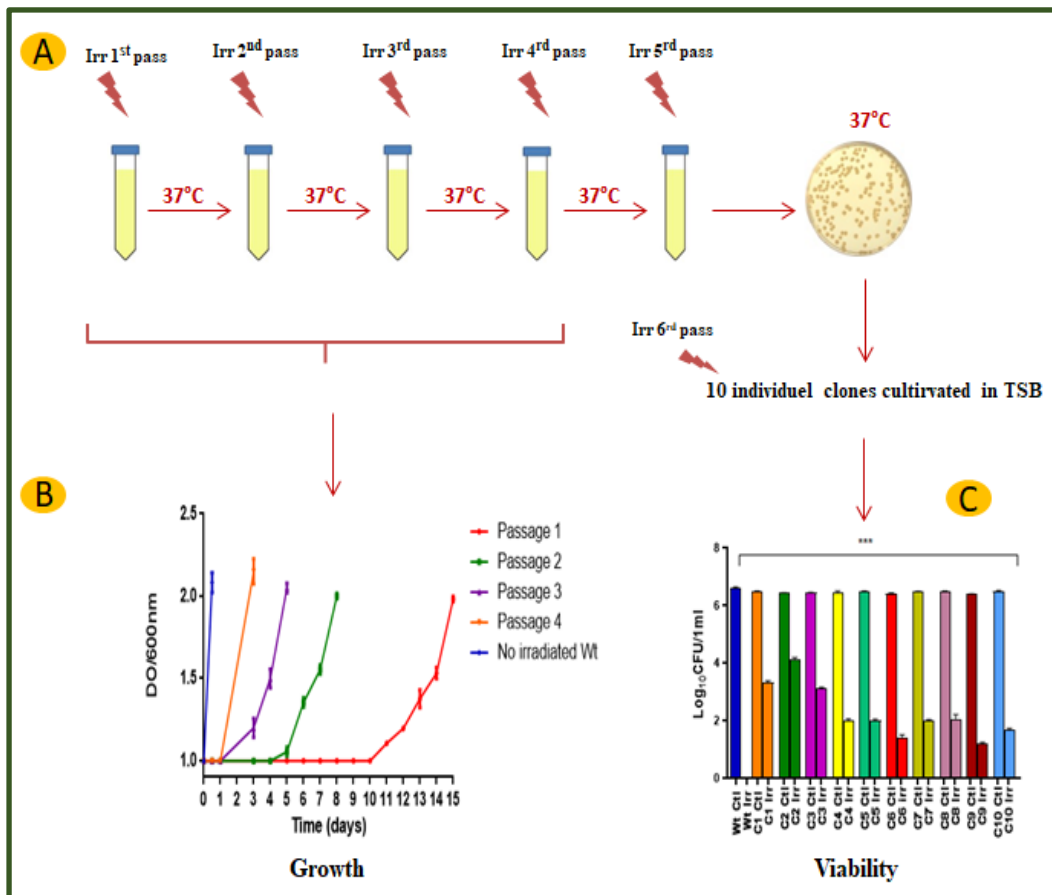


Figure 35. *E. coli* O157:H7 adaptation to lethal dose of irradiation. A: Procedure for adapting bacteria to a lethal dose (1.5 KGy). **B:** Bacterial growth following irradiation after each passage **C:** Viability of ten adapted clones after the 6rd passage following irradiation. Differences between the log₁₀CFU counts of (Irr /Ctl) for each strain vs Wt were analyzed using Student's t test.

Bioinformatics analyses indicated that deletions of the two prophages , CP-933V and BP-933W (encoding the Stx1 and Stx2 toxins) and of tow genes (*lexA*, and *dinI*) and mutations in three genes, *rpoA*, *wrbA* and *moly*, which encodes a hypothetical protein, in *E. coli* O157:H7 C1, C2, and C3 irradiation adapted clones (Figure 2). PCR amplification and sequencing of *rpoA*, *wrbA* and *moly* from clones after each 1.5 kGy dose of irradiation showed that these mutations appeared after the second/third passage (Table 12).

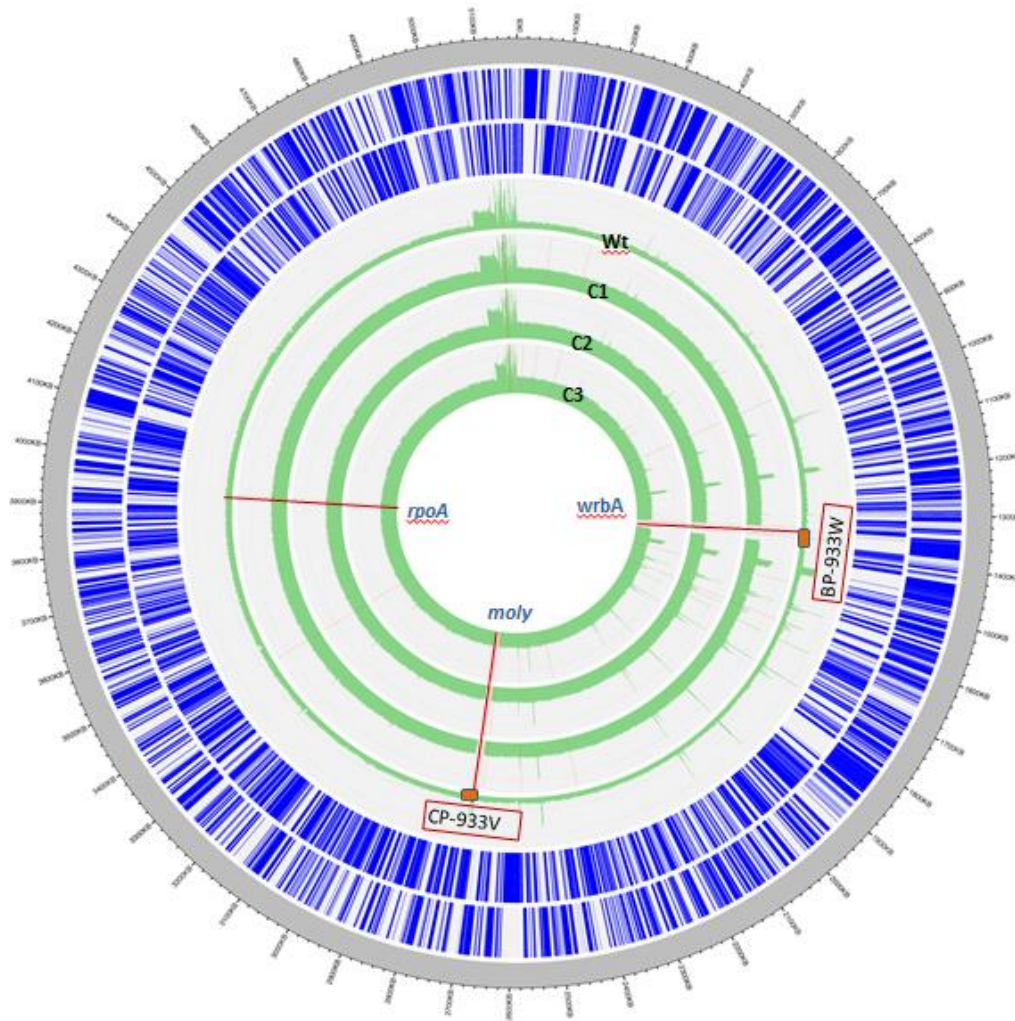


Figure 36. Circular genome map of *E. coli* O157:H7/EDL933 adapted to a lethal dose of irradiation (C1, C2 and C3) compared with Wt. From the outside, the circles represent the genes encoded on the forward strand, those encoded on the reverse strand, the coverage of the wild-type and that for the clones 1, 2 and 3. Common mutated genes between C1, C2 and C3 were indicated by red lines. Prophage positions are designated by orange boxes.

Table 12. Mutations identified in *E. coli* O157:H7 C1, C2 and C3 irradiation adapted clones

Gene	Mutations	Passage
Wt_00837 (<i>wrbA</i>)	p.G25A ; p. Val9Ile	P2
Wt_02639 (<i>moly</i>)	p. C3109T ; p.Arg1037Cys	P3/P4
Wt_03821 (<i>rpoA</i>)	p. G835T ; p.Gly279Cys	P1/P2

Correlation between irradiation adaptation and presence of stxs. *E.coli* O157:H7 strain Sakai (isolated from a human clinical case) and four isolates of *E.coli* O157:H7 from animals or humans were tested to determine the correlation between adaptation to a lethal dose of irradiation and *stx* genes. Isolates 2 and 3 are *stx*-free and able to survive directly after irradiation treatment at 1.5 kGy. Other bacteria lost their *stx* genes after the second passage of irradiation (Table 13).

Table 13. Correlation between passage at a lethal dose of irradiation and Stx carrying of *E. coli* O157:H7strains

Isolates or strains	Presence of <i>stx</i> before irradiation	Growth after irradiation (days)	Presence of <i>stx</i> After irradiation (After passage 2)
Isolate 1 (Bovine)	<i>stx1</i> and <i>stx2</i>	8	None
Isolate 2 (human case)	None	1	None
Isolate 3 (Bovine)	None	1	None
Isolate 5 (Pork)	<i>stx1</i> and <i>stx2</i>	21	None
Sakai (human case)	<i>stx1</i> and <i>stx2</i>	18	None

Re-integration of prophage and cytotoxicity. To confirm the hypothesis about acquiring resistance to lethal dose of irradiation due to prophage excision, the supernatant of irradiated *E.coli* O157:H7 Wt was incubated with each clone for 18h at 37°C to obtain lysogens with reintegrated prophages. However, C3 was unable to integrate prophage and *lexA*. Lysogenic clones of C1 and C2 were selected and genes *stx1* A/B, *stx2* A/B and *lexA* were detected by PCR. It was shown that *stx2A*; *stx2B* and *lexA* have been integrated. Moreover *stx2A* and *stx2B* integrated into a different site on the chromosome than in the *E.coli* O157:H7 Wt.

The production of Stx toxins (1 and 2) was evaluated by ELISA. As expected, C1 and C2 are Stx-free. In contrast, these clones recovered Stx production after prophage reintegration (C1-Φ and C2-Φ)(Figure 37A). The cytotoxicity effect of clones (C1, C2), complemented clones (C1-Φ and C2-Φ) vs *E. coli* O157:H7 Wt was established (Figure 37B). According to previous research, STEC was able to lyse Vero cells (29). To evaluate this phenotype with the clones, we infected cells with cultures from each strain as described in materials and methods. The lactate dehydrogenase (LDH) released from

damaged cells was measured, as described in the CytoTox96 kit (Promega, USA), the amount of LDH released is proportional to the number of lysed Vero cells. Strains producing Stx toxins gave higher cytotoxicity effect after 12-hours of infection, around 30% of cytotoxicity with clones that regained the expression of Stx toxins. However, the cytotoxicity was completely absent when we infected with clones C1, C2. Interestingly, K-12- Φ is able to produce Stx and has become cytotoxic. These results confirm that the presence of these toxins could damage the cells and induce cell lysis and release of lactate dehydrogenase(32).

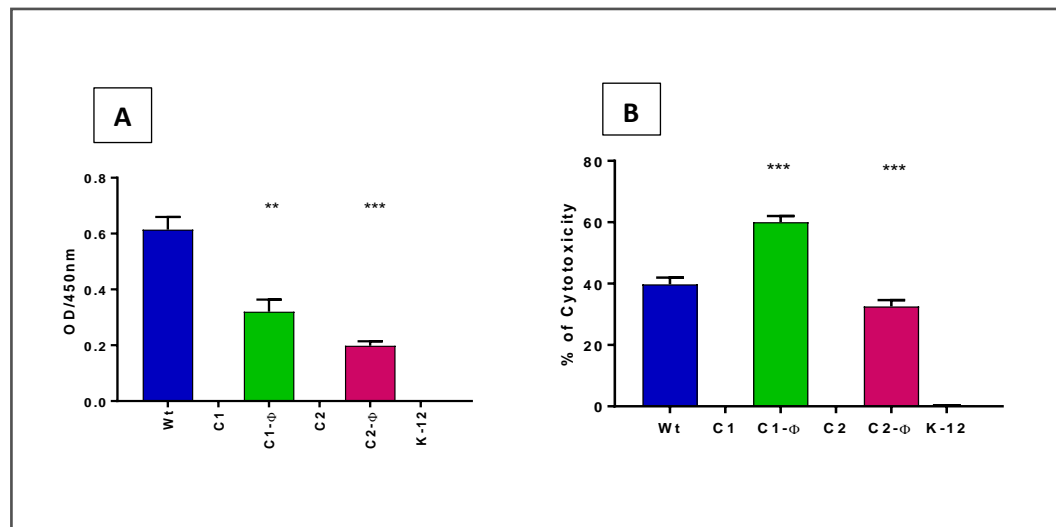


Figure 37. Cytotoxicity of *E. coli* O157:H7 clones carrying or not BP-933W prophages. A: Shiga Toxin detection by ELISA test. B: Cytotoxicity effect on VERO cells using LDH Release detection test. Ctl: control non-irradiated; Irr: irradiated.

Resistance to a lethal dose of irradiation. A dose of 1.5 kGy of irradiation was found to be lethal for *E. coli* O157:H7 (18). At the same time clones C1, C2 and C3 adapted over time and through repeated passages and exposure to this irradiation dose were able to become more resistant and grow under this stress (Figures. 35C and 39A). Also, K-12 MG1655 is resistant to this dose (Figures, 38 and 39C). Compared to *E. coli* O157:H7 Wt which showed no growth at lethal dose of irradiation, the C1 clone survived with viable counts decreasing to 2.86 log₁₀ CFU/mL and was able to grow after adaptive period of 8h. In contrast, prophage reintroduction influenced viability and growth of C1 (Figures. 38 and 39B). Immediately following irradiation treatment, C1- Φ only demonstrated survival of 0.5 log₁₀ CFU/mL on TSA plate (figure 38). In the other hand, prophage introduction influence irradiation resistance of K-12. However, viable counts of K-12- Φ decrease to 0.98 log₁₀ CFU/mL under 1.5kGy. The growth of this strain was affected 10h after Irradiation comparatively with k-12 Wt (figures 38 and 39C).

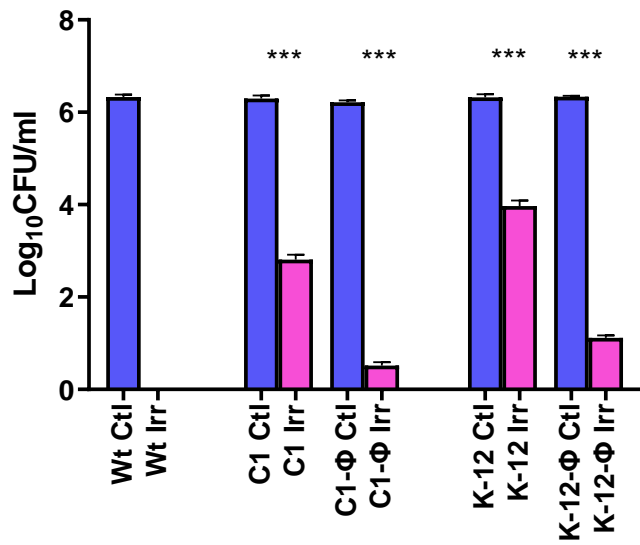


Figure 38. Viability of *E. coli* O157:H7 clones carrying or not BP-933W prophages following a lethal dose of γ -irradiation. Ctl: control non-irradiated; Irr: irradiated. Differences between the log₁₀CFU counts of (Irr /Ctl) for each strain vs Wt were analyzed using Student's t test.

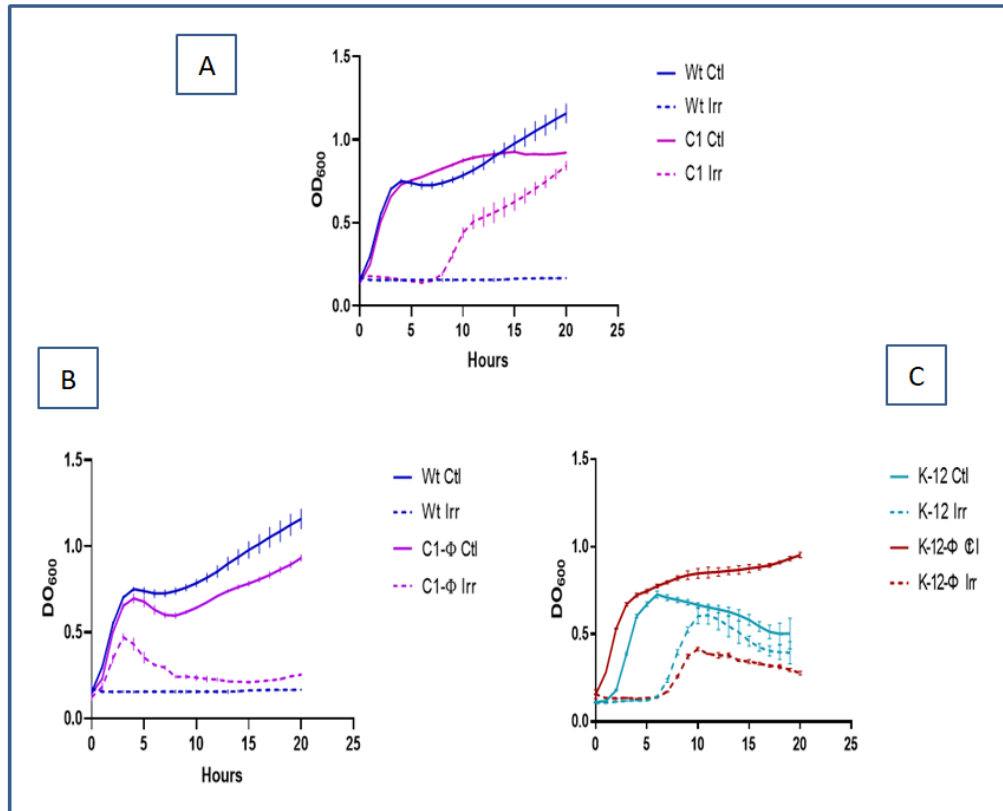


Figure 39. Growth of *E. coli* O157:H7 adapted to a lethal dose of irradiation. Growth of C1 (A), C1-Φ (B) or K-12-Φ (C). Ctl: control non-irradiated; Irr: irradiated.

Acid resistance. It is known that *E. coli* O157: H7 is virulent also due to its resistance to acid in the gastrointestinal tract (33). To verify if clones that lost PV-933V and BP-933W prophages during irradiation adaption, become more sensitive to acid pH, we studied bacterial viability in TSB medium at pH=2. *E. coli* O157: H7 C1 did not survive after 2h in this acid pH environment, although *E. coli* O157: H7 Wt was resistant to acid (pH=2). However, prophage re-introduction increased viability significantly ($P < 0.005$) up to 4h for C1-Φ (Figure 40). Although, the viability of C1 after re-introduction of prophages was less than for the Wt. BP-933W introduction decrease slightly K-12 acid resistance. These results suggest that BP-933W may contribute to increased acid resistance in *E. coli* O157:H7 EDL933 and K-12 MG1566 strains.

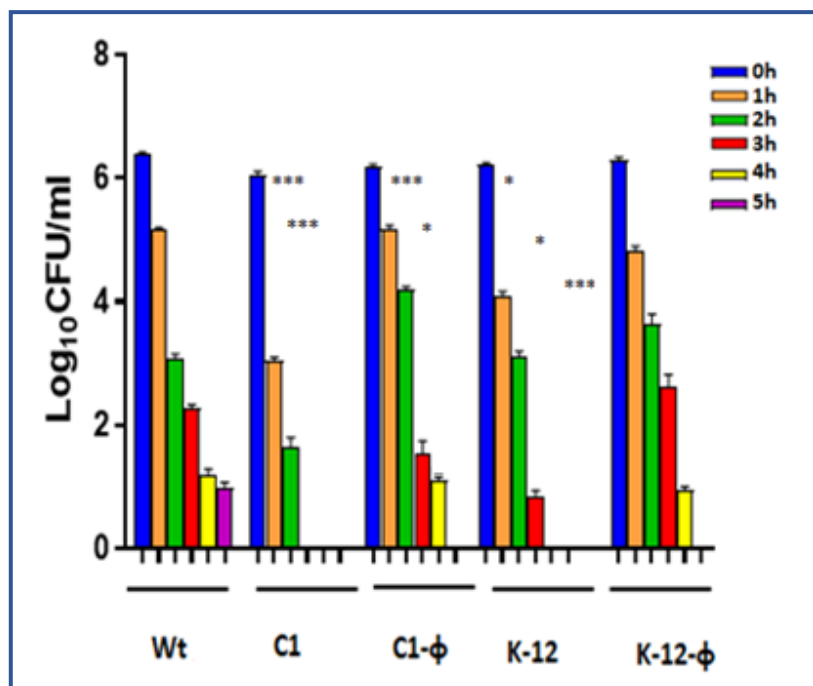


Figure 40. Viability of *E. coli* O157:H7 clones carrying or not BP-933W prophages under acid stress (pH2). The \log_{10} CFU counts for each strain vs Wt at pH 2.0 were analyzed every hour using Kruskal-Wallis rank sum test.

Paraquat resistance. As with irradiation stress, oxidative stress produces reactive oxygen species (ROS) which can cause DNA damage and activate a bacterial stress response (34). To determine if prophages are involved in the ROS response, we tested paraquat resistance of *E. coli* O157:H7, the clones that were adapted to irradiation and clones wherein prophages were re-introduction. As shown in Figure 41, Wt strain EDL933 is sensitive to paraquat and its viability reduced by 0.3-1.4 \log_{10} CFU/mL. In contrast, *E. coli* O157:H7 C1 and C2 are completely resistant to paraquat stress, indicating correlation between oxidative and irradiation stress resistance. By contrast, re-introduction of prophages in these radiation adapted clones (strains C1-φ and C2-φ) rendered them significantly sensitive to paraquat ($P < 0.05$ with 0.2 μ M and $P < 0.005$ with 0.3 and 0.5 μ M) compared to the adapted clones C1 and C2. Viability of these bacteria reduced by 1.4-1.8 \log_{10} CFU/mL and by 1.4-1.8 \log_{10} CFU/mL respectively under paraquat stress.

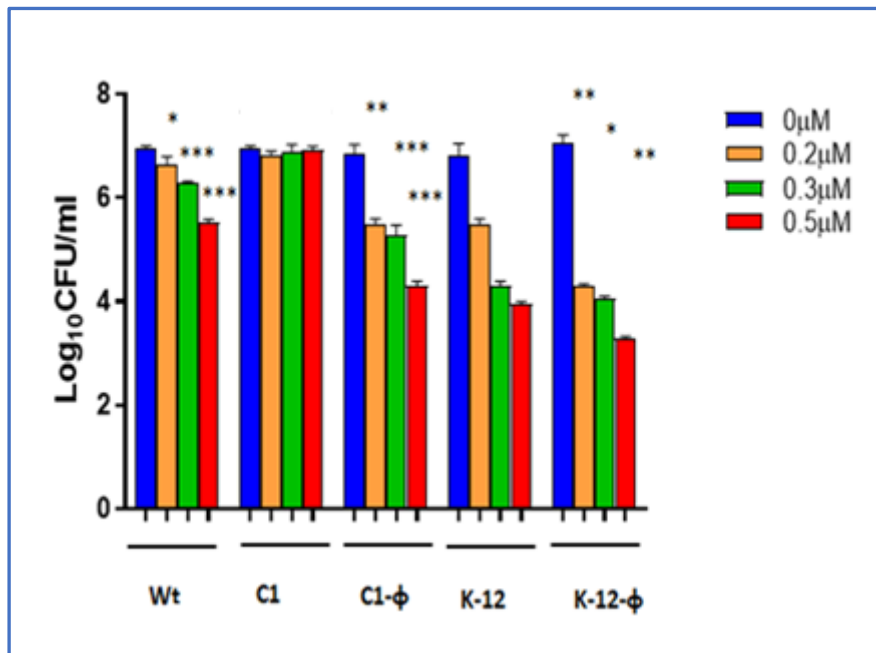


Figure 41. Viability of *E. coli* O157:H7 clones carrying or not BP-933W prophages under oxidative stress (paraquat). Differences between the log₁₀CFU counts for each strain vs Wt at different concentrations of paraquat were analyzed using Kruskal-Wallis rank sum test.

3.3.5 Discussion

One of the key virulence traits of EHEC O157: H7 EDL933 is the production of Shiga toxins (Stx1 and Stx2) encoded respectively by CP-933V and BP-933W temperate bacteriophages that are integrated into the genome (6, 8, 35). In this work, we investigated the potential for adaptation to a lethal dose of irradiation by repeatedly exposing bacterial cells to irradiation following a growth restoration over six passages and radiation exposures. The radioresistant clones were also shown to gain resistance to paraquat-generated oxidative stress and were more sensitive to acidity compared to Wt parent strain EDL933. Adaptation to a lethal dose of irradiation caused deletion of both BP-933W and CP-933V prophages (including loss of the *stx1* and *stx2* toxin encoding genes). This result is coherent with reports describing the loss of the CP-933V and BP-933W *E. coli* O157:H7 prophages from the genome following antibiotic stress from exposure to ciprofloxacin, fosfomycin, or mitomycin C, although this stress also promoted bacterial cell lysis (36).

Several studies have shown that phage integration or excision can inactivate or alter gene function through physical disruption of the genes or their promoter regions. As such, insertion and excision of prophages from bacterial genomes can alter bacterial physiology (37). CP-933V is integrated near the *mlrA* (*yehV*) chromosomal locus and contributes to reduced expression of curli fimbriae and biofilm formation (38, 41).

BP-933W is integrated at the *wrbA* and disturbs response to environmental stress (39, 40, 45). Deletion of these prophages may allow restoration of MlrA and WrbA and potentially restore their native function and regulation in *E. coli* strain PA20 (41).

However, CP-933V and BP-933W excision only occurred after the second irradiation passage. Under DNA-damage stress, RecA cleaves the CI repressor promoting phage induction which can lead to phage release, due to bacterial cell lysis (14). Some bacteria may excise the prophages as an episome that may potentially reintegrate into the bacterial genome. For certain phages, the episome can be lost without killing the bacteria (37). This is the case with phages CP-933V and BP-933W which are unable to reintroduce into clones (C1 and C2) after 2 passages at 1.5kGy. In our current study, it is likely that the increase in resistance of the adapted clones to irradiation (1.5kGy) and oxidative stress was due to prophage excision. In addition, the deletion of *lexA* which constitutively activates the SOS response also occurred when phage genomes were lost.

Interestingly, in the process of adaptation of *E. coli* K-12 to a lethal dose of irradiation among other genomimc alterations the *E. coli* K-12 prophage e14 was deleted from the genome (42, 43). As with CP-933V and BP-933W, e14 is a lambdoid prophage that is inducible by mitomycin C treatment. The insertion site in the bacterial genome is the isocitrate dehydrogenase (*icd*) gene that is involved in oxidative stress resistance (44) (36) (43). These data correspond to our results and indicate that increased resistance to irradiation in *E. coli* is linked to a loss of prophage elements from the genome.

In addition, it is known that e14 prophage is excised in the response to SOS induction (46). Harris *et al.* (42) have concluded that this happens because of the mutations in the *recA* gene. In this work, *E. coli* O157:H7 adapted to a lethal dose of irradiation, lost the *lexA* gene. The possible explanation of this is promotion of the SOS response activation via *lexA* deletion or due to *recA* mutations after irradiation dose in *E. coli*

It is possible that *E. coli* O157:H7 radiosensitization may in part be due to prophage induction which could result in bacterial cell death and lysis. To test this hypothesis CP-933V and BP-933W prophages were re-introduced into *E. coli* O157:H7 C1 and C2 using the method of A. Hull *et al.* (47). Only BP-933W could be re-introduced into the bacterial genome (C1 and C2) but it did not integrate into the *wrbA* site.

Interestingly, *lexA* was also acquired along with the BP-933W bacterial genome. However, in *Deinococcus radiodurans* (*D. radiodurans*), a non-pathogenic bacterium which is extraordinarily resistant to irradiation, LexA is not involved in SOS response regulation following irradiation (48). As with *D. radiodurans*, *E. coli* O157:H7 C1, C2 and C3 adapted clones, wherein *lexA* genes are deleted, are radioresistant (compared to *E. coli* O157:H7 Wt).

We were unable to explain why *lexA* is reintroduced as BP-933W prophage and if *lexA* is a part of BP-933W genes, concerning that some phages do not encode their own SOS-sensitive repressor, but use host LexA to switch from the lysogenic to the lytic state(49).

It is interesting to note that, as observed in C1, C2 and C3, 2 passages at lethal dose of irradiation cause the loss of *lexA* and *stx* (1 and 2) in other EHEC strains including isolate 1, isolate 4 and Sakai strain (table 13). However, de Vargas and Landy (50) have shown that simultaneous excision of the lambdoid prophages inhibits reintegration of phages by disruption of the phage attachment site (*attP*). In this study, bacterial *attB* site in the *wrbA* gene (39) is mutated (G25 >A) suggesting that mutation of the bacterial attachment site may induce prophage excision and inhibit further integration at the same site. As *wrbA* was mutated following irradiation and passaging, this may explain why BP-933W did not reintegrate at the *wrbA* attachment site.

It has been reported that *stx2*-containing phages can insert at other sites in O157:H7 strains, and sites can include *wrbA*, *argW*, *yecE* or at *mlrA* (*yehV*) (the insertion site of CP-933V) (6, 51-53). Reid et al. (54) have demonstrated that in ancestral *E. coli* O55:H7, *stx2* was integrated before *stx1* to form O157:H7. For this reason, it's possible that BP-933W potentially integrated into *mlrA* explaining why CP-933V can no longer integrate into the bacterial genome.

Interestingly, in C1, C2 and C3, Glycine at 279 and Arginine at 1037 of respectively *rpoA* and *moly* are substituted by cysteine. Clones adapted to a lethal dose of irradiation were more sensitive to acid. X. Shi and G. N. Bennett (55) have shown that RpoA has a critical role in acid resistance 2 (AR2) systems which promote the most effective resistance at pH 2.0 via GadA and GadB proteins. Also, *rpoA* mutants are acid sensitive (56). To maintain pH homeostasis, GadA and GadB promote decarboxylation via replacement of the α -carboxyl group by a proton (H^+) transported from the extracellular environment to the cytoplasm, which increases the intracellular pH (57). This result suggests that alterations in *rpoA*, which may potentially be beneficial during radiation stress, may reduce acid resistance due to this cysteine substitution, if this change affects its role in GadA and GadB expression to resist pH acid.

Notably, the clones which have become adapted to radiation treatment have lost the shiga toxin encoding genes and are now no longer cytotoxic for Vero epithelial cells. The cytotoxicity, however, is once again restored following reintroduction of BP-933W and expression of the Stx2 toxin. Although clones C1 is non-cytotoxic, he is become resistant to a lethal dose of irradiation. By contrast, clone C1- Φ that regained BP-933W and *stx2* significantly lost radioresistance concomitant with a regain in the capacity to kill target host epithelial cells, Taken together, this indicates that while harbouring the *stx2* encoding prophage, can contribute to EHEC virulence, its carriage is detrimental for surviving radiation stress.

3.3.6 Conclusion

In this work, *E. coli* O157:H7 adaptation to a lethal dose of irradiation promoted modifications in the bacterial genome including deletion of CP-933V and BP-933W prophages encoding Stx toxins. Further, loss of these prophages resulted in loss of cytotoxicity to epithelial cells and significantly decreased resistance of EHEC O157:H7 to acidity (pH 2.0) while increasing resistance to lethal irradiation and oxidative stress. This specific adaptation to irradiation might be seen as an example of a biological trade-off where the bacterium cannot maintain virulence and resistance at the same time. As the re-integration of prophage BP-933W to radiation adapted clones resulted in both a regain in cytotoxicity and acid resistance, but a marked increase in radiosensitivity, this further supports the notion that the potential adaptation of EHEC to high doses of radiation would involve elimination of the Stx encoding phages and likely lead to a substantial attenuation of virulence.

3.3.7 References

1. **Croxen MA, Finlay BB. 2010.** Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology* 8:26.
2. **Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. 2004.** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews microbiology* 2:123.
3. **Brüssow H, Canchaya C, Hardt W-D. 2004.** Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiology and molecular biology reviews* 68:560-602.
4. **Canchaya C, Fournous G, Brüssow H. 2004.** The impact of prophages on bacterial chromosomes. *Molecular microbiology* 53:9-18.
5. **Edlin G, Lin L, Bitner R. 1977.** Reproductive fitness of P1, P2, and Mu lysogens of *Escherichia coli*. *Journal of virology* 21:560-564.
6. **Perna NT, Plunkett III G, Burland V, Mau B, Glasner JD, Rose DJ, Mayhew GF, Evans PS, Gregor J, Kirkpatrick HA. 2001.** Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Nature* 409:529.
7. **Hartley M-A, Ronet C, Fasel N. 2012.** Backseat drivers: the hidden influence of microbial viruses on disease. *Current opinion in microbiology* 15:538-545.
8. **Landy A. 1989.** Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annual review of biochemistry* 58:913-941.
9. **Schmidt H. 2001.** Shiga-toxin-converting bacteriophages. *Research in Microbiology* 152:687-695.
10. **Herold S, Karch H, Schmidt H. 2004.** Shiga toxin-encoding bacteriophages genomes in motion. *International Journal of Medical Microbiology* 294:115-121.
11. **Waldor MK, Friedman DI. 2005.** Phage regulatory circuits and virulence gene expression. *Current Opinion in Microbiology* 8:459-465.
12. **Meessen-Pinard M, Sekulovic O, Fortier L-C. 2012.** Evidence of In Vivo Prophage Induction during named-content genus-species named-content-1 Clostridium difficile Infection. *Applied and Environmental Microbiology* 78:7662-7670.
13. **Weisberg RA, Enquist LW, Foeller C, Landy A. 1983.** Role for DNA homology in site-specific recombination: The isolation and characterization of a site affinity mutant of coliphage λ . *Journal of Molecular Biology* 170:319-342.
14. **Ptashne M, & Switch, A. G. 1992.** Phage lambda and higher organisms. Cell and Blackwell Scientific, Cambridge, MA.
15. **Koutchma T, Forney LJ, Moraru CI. 2009.** Ultraviolet light in food technology: principles and applications. CRC press.
16. **Lacroix M, Vigneault C. 2007.** Irradiation treatment for increasing fruit and vegetable quality.

17. **Gould WD, McCready, R. G. L., Rajan, S., & Krouse, H. R. . 1989.** Stable isotope composition of sulphate produced during bacterial oxidation of various metal sulphides. Biohydrometallurgy–Proceedings of the International Symposium Held at Jackson Hole, Wyoming:13-18.
18. **Caillet S, Shareck F, Lacroix M. 2005.** Effect of gamma radiation and oregano essential oil on murein and ATP concentration of *Escherichia coli* O157: H7. J Food Prot 68:2571-2579.
19. **Gaougaou G, Ben-Fadhel Y, Déziel E, Lacroix M. 2018.** Effect of β -lactam antibiotic resistance gene expression on the radio-resistance profile of *E. coli* O157:H7. Heliyon 4:e00999.
20. **Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. 2018.** fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. bioRxiv:274100.
21. **González-Domínguez J, Schmidt B. 2016.** ParDRe: faster parallel duplicated reads removal tool for sequencing studies. Bioinformatics 32:1562-1564.
22. **Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD. 2012.** SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. Journal of computational biology 19:455-477.
23. **Latif H, Li HJ, Charusanti P, Pálsson BØ, Aziz RK. 2014.** A gapless, unambiguous genome sequence of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 strain EDL933. Genome announcements 2:e00821-14.
24. **Darling AE, Mau B, Perna NT. 2010.** progressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. PloS one 5:e11147.
25. **Seemann T. 2014.** Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics 30:2068-2069.
26. **Li H, Durbin R. 2009.** Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. bioinformatics 25:1754-1760.
27. **Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R. 2009.** The sequence alignment/map format and SAMtools. Bioinformatics 25:2078-2079.
28. **Yu LH, Wu SJ, Peng YS, Liu RN, Chen X, Zhao P, Xu P, Zhu JB, Jiao GL, Pei Y. 2016.** Arabidopsis EDT 1/HDG 11 improves drought and salt tolerance in cotton and poplar and increases cotton yield in the field. Plant biotechnology journal 14:72-84.
29. **Xiong Y, Wang P, Lan R, Ye C, Wang H, Ren J, Jing H, Wang Y, Zhou Z, Bai X. 2012.** A novel *Escherichia coli* O157: H7 clone causing a major hemolytic uremic syndrome outbreak in China. PloS one 7:e36144.
30. **Lu Z, Breidt F. 2015.** *Escherichia coli* O157: H7 bacteriophage Φ 241 isolated from an industrial cucumber fermentation at high acidity and salinity. Frontiers in microbiology 6:67.
31. **Allen KJ, Griffiths MW. 2012.** Impact of hydroxyl-and superoxide anion-based oxidative stress on logarithmic and stationary phase *Escherichia coli* O157:H7 stress and virulence gene expression. Food microbiology 29:141-147.
32. **Welch R. 1991.** Pore-forming cytolysins of Gram-negative bacteria. Molecular microbiology 5:521-528.

33. **Gorden J, Small P. 1993.** Acid resistance in enteric bacteria. *Infection and immunity* 61:364-367.
34. **Moseley B. 1989.** Ionizing radiation: action and repair. Mechanisms of action of food preservation procedures, London, Elsevier Applied Science:43-70.
35. **Huber KE, Waldor MK. 2002.** Filamentous phage integration requires the host recombinases XerC and XerD. *Nature* 417:656.
36. **Shaikh N, Tarr PI. 2003.** *Escherichia coli* O157: H7 Shiga toxin-encoding bacteriophages: integrations, excisions, truncations, and evolutionary implications. *Journal of bacteriology* 185:3596-3605.
37. **Feiner R, Argov T, Rabinovich L, Sigal N, Borovok I, Herskovits AA. 2015.** A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 13:641.
38. **Yokoyama K, Makino K, Kubota Y, Watanabe M, Kimura S, Yutsudo CH, Kurokawa K, Ishii K, Hattori M, Tatsuno I, Abe H, Yoh M, Iida T, Ohnishi M, Hayashi T, Yasunaga T, Honda T, Sasakawa C, Shinagawa H. 2000.** Complete nucleotide sequence of the prophage VT1-Sakai carrying the Shiga toxin 1 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain derived from the Sakai outbreak. *Gene* 258:127-139.
39. **Plunkett G, Rose DJ, Durfee TJ, Blattner FR. 1999.** Sequence of Shiga Toxin 2 Phage 933W from *Escherichia coli* O157: H7: Shiga Toxin as a Phage Late-Gene Product. *Journal of bacteriology* 181:1767-1778.
40. **Grandori R, Khalifah P, Boice JA, Fairman R, Giovanielli K, Carey J. 1998.** Biochemical Characterization of WrbA, Founding Member of a New Family of Multimeric Flavodoxin-like Proteins. *Journal of Biological Chemistry* 273:20960-20966.
41. **Uhlich GA, Chen C-Y, Cottrell BJ, Hofmann CS, Yan X, Nguyen L. 2016.** Stx1 prophage excision in *Escherichia coli* strain PA20 confers strong curli and biofilm formation by restoring native mlrA. *FEMS Microbiology Letters* 363:fnw123-fnw123.
42. **Harris DR, Pollock SV, Wood EA, Goiffon RJ, Klingele AJ, Cabot EL, Schackwitz W, Martin J, Eggington J, Durfee TJ. 2009.** Directed evolution of ionizing radiation resistance in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 191:5240-5252.
43. **Wang X, Kim Y, Ma Q, Hong SH, Pokusaeva K, Sturino JM, Wood TK. 2010.** Cryptic prophages help bacteria cope with adverse environments. *Nature communications* 1:147.
44. **Dalziel K. 1980.** Isocitrate dehydrogenase and related oxidative decarboxylases. *FEBS letters* 117:K45-K55.
45. **Patridge EV, Ferry JG. 2006.** WrbA from *Escherichia coli* and *Archaeoglobus fulgidus* is an NAD(P)H:quinone oxidoreductase. *J Bacteriol.* 188(10):3498-506.
46. **Greener A, Hill C. 1980.** Identification of a novel genetic element in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology* 144:312-321.
47. **Hull A, Acheson D, Echeverria P, Donohue-Rolfe A, Keusch G. 1993.** Mitomycin immunoblot colony assay for detection of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in fecal samples: comparison with DNA probes. *Journal of clinical microbiology* 31:1167-1172.

48. **Narumi I, Satoh K, Kikuchi M, Funayama T, Yanagisawa T, Kobayashi Y, Watanabe H, Yamamoto K. 2001.** The LexA protein from *Deinococcus radiodurans* is not involved in RecA induction following γ irradiation. *Journal of bacteriology* 183:6951-6956.
49. **Fornelos N, Browning DF, Butala M. 2016.** The use and abuse of LexA by mobile genetic elements. *Trends in microbiology* 24:391-401.
50. **de Vargas LM, Landy A. 1991.** A switch in the formation of alternative DNA loops modulates lambda site-specific recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88:588-592.
51. **Kotewicz ML, Mammel MK, LeClerc JE, Cebula TA. 2008.** Optical mapping and 454 sequencing of *Escherichia coli* O157: H7 isolates linked to the US 2006 spinach-associated outbreak. *Microbiology* 154:3518-3528.
52. **De Greve H, Qizhi C, Deboeck F, Hernalsteens J-P. 2002.** The Shiga-toxin VT2-encoding bacteriophage ϕ 297 integrates at a distinct position in the *Escherichia coli* genome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* 1579:196-202.
53. **Serra-Moreno R, Jofre J, Muniesa M. 2007.** Insertion site occupancy by stx2 bacteriophages depends on the locus availability of the host strain chromosome. *Journal of bacteriology* 189:6645-6654.
54. **Reid SD, Herbelin CJ, Bumbaugh AC, Selander RK, Whittam TS. 2000.** Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature* 406:64.
55. **Shi X, Bennett GN. 1994.** Effects of rpoA and cysB mutations on acid induction of biodegradative arginine decarboxylase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 176:7017-7023.
56. **Price SB, Cheng C-M, Kaspar CW, Wright JC, DeGraves FJ, Penfound TA, Castanie-Cornet M-P, Foster JW. 2000.** Role of rpoS in Acid Resistance and Fecal Shedding of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology* 66:632-637.
57. **Foster JW. 2004.** *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nature Reviews Microbiology* 2:898.
58. **Baraketi1 A, D'Auria S, Frascini C, Salmieri S, MenissierJ, Lacroix M (2018)** Novel spider web trap approach for the detection of *Escherichia coli* O157:H7. (Submitted for publication). biosensors journal.
59. **Brown PK, Dozois CM, Nickerson CA, Zuppardo A, Terlonge J, Curtiss 3rd R (2001)** MlrA, a novel regulator of curli (AgF) and extracellular matrix synthesis by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology* 41(2):349-63.

4 SYNTHÈSE GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Le projet de cette thèse portait sur la réponse à l'irradiation- γ d'*E. coli* O157:H7, un agent pathogène responsable de plusieurs toxi-infections d'origine alimentaire. L'irradiation- γ est utilisée pour éliminer les bactéries potentiellement pathogènes telles qu'*E. coli* O157:H7 et pour prolonger la durée de conservation des produits alimentaires (Forney *et coll.*, 2009). Le premier objectif de ce travail était de déterminer la réponse d'*E. coli* O157:H7 à une dose de sensibilisation (0,4 kGy), qui doit endommager la cellule bactérienne sans la tuer (Caillet *et coll.*, 2005). Nous avons évalué l'effet de l'irradiation gamma à la dose 0,4 kGy sur le transcriptome de la souche EDL933 d'*E. coli* O157:H7 à 10 min et 60 min après traitement en utilisant la technologie RNA-seq, par séquençage Illumina HiSeq. Vu que nous avons observé une importante augmentation de la transcription de gènes considérés 'intéressants' à 60 min post-irradiation (t60), nous avons décidé de caractériser les protéines par la technique iTRAQ à t60 également, pour déterminer les potentielles cohérences entre le transcriptome et le protéome.

Ainsi, 65% des gènes d'*E. coli* O157:H7/EDL933 étaient différemment transcrits à t10, dont 1320 régulés positivement et 990 régulés négativement. D'autre part, à t60, 1014 gènes des 33% gènes différemment transcrits étaient surexprimés et 238 gènes étaient sous-exprimés. Quant aux protéines, 6% d'entre elles étaient régulées positivement et 6% négativement. Ces gènes et protéines transcrits sont liés à diverses catégories et voies métaboliques telles que la biosynthèse des métabolites secondaires, le métabolisme de la purine, du soufre, de l'histidine et les acides gras, de même que la biosynthèse des antibiotiques et du lipopolysaccharide, aussi, la résistance aux bêta-lactamines et à la vancomycine. Les gènes impliqués dans la virulence étaient aussi différemment exprimés. Rappelons que les nombreux gènes différemment exprimés à t10, incluaient ceux impliqués dans le métabolisme de l'histidine et du soufre. Ainsi, *E. coli* O157:H7 régule négativement la majorité des gènes du métabolisme d'histidine, un acide aminé générant des radicaux hydroxyles. Cette sous-expression a probablement perturbé le métabolisme de l'histidine dans le but de minimiser les dommages oxydatifs sur les cellules bactériennes, comme indiqué par Nagao *et coll.* (2018). De plus, en réponse au stress ionisant, la bactérie régule positivement les gènes du métabolisme du soufre, probablement pour augmenter la réponse au ROS. D'après cette hypothèse, elle accumulerait la L-cystéine, qui est une source de soufre, à l'intérieur de la cellule pour réduire le fer impliqué dans la production des radicaux hydroxyles (Mironov *et coll.*, 2017; Park *et coll.*, 2005; Shatalin *et coll.*, 2011). Ceci est compatible avec l'étude de Mironov *et coll.* (2017) dans laquelle ils avaient démontré que la protection contre le stress oxydatif se fait via la dégradation de L-cystéine en H₂S qui séquestre le fer libre nécessaire à la réaction génotoxique de Fenton. Le changement du profil génétique de ces deux métabolismes se fait 10 min après l'irradiation avec une dose de 0,4 kGy. Cela suggère que, comme

une réponse précoce au stress lié à l'irradiation gamma, *E. coli* O157:H7 cherche à inhiber la production des radicaux libres pour minimiser les dommages liés au stress oxydatif.

En outre, à t10 le gène *ibpA* impliqué dans la résistance au stress oxydatif (Matuszewska *et coll.*, 2008) ainsi que les gènes associés à ce stress et évalués dans cette étude (*rpoS*, *soxR*, *katE* et *sodC*) étaient régulés positivement. D'un autre côté, la forte augmentation de la transcription du gène *sulA*, le principal répresseur de la division cellulaire, était accompagné par la surexpression des gènes impliqués dans la réponse SOS tels *recA*, *recN*, *umuD* et *uvrB*. Or, l'induction de la réponse SOS favorise la régulation négative de la division cellulaire qui nécessite beaucoup d'énergie afin d'en fournir à la cellule pour réparer l'ADN endommagé (Bhat *et coll.*, 2015; Friedberg *et coll.*, 2006; Kocharunchitt *et al.* 2014).

La réponse au stress lié à l'irradiation induit les gènes de réponses à certains autres stress comme le choc thermique (*dnaK*, *groEL*, *hsp31* et *htpG*) et froid (*cspD*), le stress acide (*gadA* et *gadB*) en plus des gènes du stress oxydatif (*rpoS*, *soxR*, *katE* et *sodC*). Bien que DnaK, GroEL, Hsp31 et HtpG soient connues comme intervenant dans la réponse à plusieurs stress autres que le choc thermique (Santoro, 2000), un rôle dans la résistance à l'irradiation pourrait donc être attribué aux autres gènes. Ces informations peuvent expliquer le pouvoir des microorganismes résistants à un type de stress à en développer d'autres (Wesche *et coll.*, 2009). De plus, les gènes de virulence, *stx2A*, *stx2B*, *eivA*, *eivG* et *z4187* ont été activés à t60 après le traitement à l'irradiation. Stx1 et Stx2, codés respectivement par les bactériophages CP-933V et BP-933W, forment le principal facteur de virulence chez *E. coli* O157:H7 (Smith *et coll.*, 2014). Les sous-types Stx2 (*stx2A* et *stx2B*) sont plus toxiques que Stx1 (*stx1A* et *stx1B*) (Scheutz, 2014; Strockbine NA, *et coll.*, 1986). De plus, la virulence d'*E. coli* O157:H7 nécessite le système de sécrétion de type III (T3SS pour "type III secretion system") qui est essentiel pour la colonisation intestinale (Aili *et coll.*, 2008; Sharma *et coll.*, 2012). Les gènes *eivA*, *eivG* et *z4187* en font partie. Les protéines du système T3SS, qui sont codées par les opérons LEE, couvrent les membranes internes et externes des cellules bactériennes afin d'exporter les protéines effectrices directement dans les cellules hôtes (Garmendia *et coll.*, 2005). Des études viennent confirmer nos résultats en démontrant que des stress comme les stress oxydatifs et la haute pression augmentent l'expression des facteurs de virulence incluent *stx2A* et *stx2B* et des gènes codant pour les protéines du T3SS y compris *eviA* (Allen et Griffiths, 2015; Zhao *et coll.*, 2016).

Fait intéressant, une cohérence entre l'expression de dix gènes et celles de leurs protéines traduites a été observée 60 min post-irradiation. Quatre étaient surexprimés, *mutM*, *dnaC* et *dinG* impliqués dans le mécanisme de réparation des dommages d'ADN et *cysN* qui intervient dans le métabolisme du soufre et qui est probablement induit en réponse aux ROS, comme indiqué

précédemment. Les gènes et leurs produits en protéines sous-exprimés étaient *alda*, *ygjP* et *glpK* impliqués respectivement dans les métabolismes microbiens, purine et glycérolipidiques; *murQ* intervenant dans le métabolisme des sucres; *livD* associé à la biosynthèse d'acides aminés et *tnaA* qui participe à l'inhibition de la croissance de *E. coli* (Gutiérrez-Huante *et coll.*, 2018).

Suite aux résultats de cette partie, nous avons pu conclure que chez *E. coli* O157:H7, l'irradiation à la dose de sensibilisation réprime la division cellulaire, active la réponse SOS, inhibe la production des ROS, induit les facteurs de virulence et met en place les mécanismes de réponse à d'autres stress. Wagner *et al.*, ont démontré que les Stxs des *E. coli* O157:H7 peuvent être libérées à l'extérieur de la cellule bactérienne sans la formation des phages. Ils avaient suggéré que peut-être les gènes du système de sécrétion du type II portés par le plasmide ou bien la destruction des bactéries par le système immunitaire humain peuvent favoriser le relâchement des Stxs. Il pourrait donc être intéressant d'évaluer l'effet de l'irradiation d'*E. coli* O157:H7 à la dose de sensibilisation sur le taux des protéines Stxs intracellulaire et extracellulaire et déterminer son impact sur les cellules VERO.

Parmi les observations qui nous ont surprises, l'induction de la voie de résistance aux antibiotiques de type β -lactamine par l'irradiation à la dose de sensibilisation, ce qui suggère que cette voie puisse intervenir dans la résistance à ce stress. Les antibiotiques de type β -lactamine sont les plus efficaces et les plus utilisés soit pour traiter, contrôler, prévenir les maladies cliniques ou pour stimuler la croissance des animaux. En outre, des mutants d'*E. coli* O157:H7/EDL933 se sont montrés résistants à l'ampicilline et au chloramphénicol avec une augmentation de motilité et de virulence (Tóth *et coll.*, 2003; Carone *et coll.*, 2014). Or, la conservation, par irradiation, des viandes provenant d'animaux ayant reçus des antibiotiques de type β -lactamine pourrait être moins efficace si ces animaux sont colonisés par des mutants spontanés d'*E. coli* O157:H7. En effet, ces mutants ont activé la machinerie pour résister aux β -lactamines, qui pourraient favoriser la résistance à l'irradiation.

Bien qu'il existe une multitude de preuves d'une relation entre les différents mécanismes de résistance aux stress, peu d'études ont été consacrées à l'évaluation de l'effet de la résistance bactérienne à un stress donné sur la radiorésistance. Pour cet effet, nous avons élaboré un deuxième objectif qui était d'évaluer l'effet de la résistance aux β -lactamines sur la résistance à l'irradiation. Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication présentée à la section **3.2**. Nous avons démontré que les bactéries adaptées à 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ carbenicilline (Carb25) surexpriment *ampC* et *ampG* vs le WT et que cette surexpression est encore plus forte après le traitement à l'irradiation. De plus, la surexpression d'*ampC* et *ampG* respectivement au niveau des mutants $\Delta ampC$ et $\Delta ampG$, qui étaient alors sensibles à la dose 0,4kGy, a favorisé la résistance totale à 0,4 kGy et même une réduction de la sensibilité à une dose normalement létale (1,5 kGy). Cette étude confirme l'intervention des gènes

ampC et *ampG* dans la résistance à l'irradiation gamma, via probablement la régulation du recyclage des peptidoglycanes.

Le renouvellement et le recyclage des peptidoglycanes font partie des processus les plus importants du cycle de vie des bactéries. Ces mécanismes sont impliqués dans le contrôle de la virulence et de la résistance aux stress (Folkesson *et coll.*, 2005; Boudreau *et coll.*, 2012). Une étude réalisée dans notre laboratoire (Caillet *et coll.*, 2005) avait démontré que le traitement à l'irradiation affecte le recyclage des peptidoglycanes via la perturbation de la distribution des mucopeptides chez *E. coli*. En effet, le recyclage des peptidoglycanes implique principalement AmpC, AmpG, AmpD et AmpR. En plus de la résistance à l'irradiation, *E. coli* O157:H7/Carb25 était résistante au stress oxydatif, aux chocs thermique et froid. Le séquençage du génome complet d'*E. coli* O157:H7/Carb25 pourrait nous indiquer toutes les modifications provoquées par l'adaptation à la carbenicilline et qui favorisent, en conséquence, la résistance à l'irradiation et aux autres stress évalués dans cette étude. Ces résultats peuvent être intéressants pour l'industrie alimentaire, en particulier si l'irradiation est utilisée pour conserver la viande d'animaux traités par des β -lactamines, ce qui pourrait affecter l'efficacité du traitement. Néanmoins, l'efficacité des autres traitements comme la chaleur ou le froid peut aussi être affectée. Comme la kanamycine n'a montré aucun effet sur la radiorésistance, il sera important d'étudier les effets des différentes classes d'antibiotiques actuellement utilisées en production animale afin de vérifier leurs effets sur la radiorésistance d'*E. coli* O157:H7 ou sur ses résistances aux autres stress.

L'étude réalisée dans le cadre du premier objectif a démontré que l'irradiation à la dose de sensibilisation (0,4 KGy) induit les facteurs de virulence. Cela nous a encouragés à évaluer l'effet de l'adaptation d'*E. coli* O157:H7 à la dose létale d'irradiation et son potentiel impact sur la pathogénicité de notre bactérie. Ainsi, un troisième objectif a été ciblé, soit l'évaluation l'effet de l'adaptation à la dose létale d'irradiation sur le génome d'*E. coli* O157:H7. Bien que six passages à la dose létale d'irradiation aient favorisé une croissance bactérienne proche à celle du WT, deux passages étaient suffisants pour qu'*E. coli* O157:H7 perde les deux bactériophages CP-933V et BP-933W et que trois de ses gènes (*rpoA*, *moly* et *wrbA*) soient mutés. En accord avec nos résultats, certains antibiotiques comme la ciprofloxacine, la fosfomycine et la mitomycine C favorisent l'excision de CP-933V et BP-933W d'*E. coli* O157:H7/EDL933 (Shaikh et Tarr, 2003; Hull *et coll.*, 1993). Or, contrairement à l'excision médiée par ces antibiotiques qui lyse la cellule, certaines bactéries de la population d'*E. coli* O157:H7/EDL933 semblaient résister à la dose létale d'irradiation via une dégradation des prophages à l'intérieur de la cellule. Ainsi, sous un stress, RecA clive le répresseur CI et en conséquence induit la synthèse des phages qui généralement lysent les cellules bactériennes (Ptashne 1992). Cependant, certaines bactéries peuvent exciser les prophages en tant qu'épisome qui peut être réintégré dans le

gène cible lorsque l'inactivation de ce dernier est bénéfique pour l'hôte. Dans certaines circonstances, l'épisome sera perdu sans tuer les bactéries (Feiner *et coll.*, 2015). C'est le cas des CP-933V et BP-933W, qui étaient incapables de réintégrer le génome de l'hôte et étaient dégradés à l'intérieur de la bactérie. D'autre part, la dose létale d'irradiation a favorisé la délétion du gène *lexA*, le répresseur de la réponse SOS. Néanmoins, si la réponse SOS est constitutivement active, elle induit constitutivement les phages ce qui tuerait les bactéries. Or, dans notre cas, les deux prophages codant pour les principaux facteurs de virulence (Stxs) sont déletés, ce qui explique la survie des bactéries adaptées malgré la délétion de *lexA*. De plus, *lexA* n'est pas impliqué dans la réponse SOS chez *D. radiodurans*, qui est non pathogène et extrêmement résistante à l'irradiation, ce qui suggère une corrélation possible entre LexA, la virulence et la radiorésistance (Narumi *et coll.*, 2001). Par contre, nous n'avons pas pu expliquer pourquoi *lexA* s'est réintégré dans le génome bactérien comme le prophage BP-933W ou s'il en fait partie ni trouver une réponse claire quant à l'utilisation du LexA "bactérienne" pour passer du cycle lysogène au cycle lytique (Fornelos *et coll.*, 2016).

Plusieurs études ont démontré que l'intégration des phages dans des gènes critiques peut perturber la structure génétique de l'hôte et également réguler la physiologie de l'hôte via l'excision ou l'intégration du prophage (Feiner *et coll.*, 2015). Nous avons démontré que la mutation de *wrbA* (G25> A) a touché le site spécifique d'intégration (*attB*) de BP-933W ce qui pourrait expliquer l'excision de ce prophage et l'inhibition de sa réintégration dans *wrbA*, probablement, pour activer l'expression de ce gène impliqué dans la résistance aux stress oxydatifs (Grandori et Carey, 1994). Toutefois, lorsque le locus principal n'est pas disponible, les phages contenant *stx2* peuvent modifier leur site d'insertion dans les souches O157:H7 en d'autres site tel *yehV*, le site d'insertion du CP-933V (Perna *et coll.*, 2001a; Serra-Moreno *et coll.*, 2007). Il est donc possible que BP-933W se soit intégré au niveau *yehV*, ce qui explique pourquoi le CP-933V n'a pas pu intégrer le génome bactérien. Toutefois, le séquençage du génome complet pourra déterminer le site d'insertion de ce prophage qui pourrait intervenir dans la sensibilité à l'irradiation observée au niveau des clones qui l'ont réintégré.

Au niveau des bactéries adaptées à la dose létale d'irradiation, les gènes *rpoA* et *moly* ont été mutés par la substitution, respectivement, de la glycine 279 et l'arginine 1037 par une cystéine. Ces bactéries sont sensibles au pH acide (pH=2) ce qui est en accord avec l'étude de Price *et coll.* (2004) dans laquelle ils ont démontré que les mutants *rpoA* sont sensibles au pH acide. RpoA a un rôle essentiel dans le système AR2, via l'induction de l'expression des protéines GadA et GadB. Pour maintenir l'homéostasie du pH, GadA et GadB favorisent la décarboxylation par remplacement du groupement α -carboxyle par un proton (H^+) transporté de l'environnement extracellulaire vers le cytoplasme ce qui augmente le pH intracellulaire (Foster, 2004). D'un autre côté, Guo *et coll.* (2012) ont démontré que *rpoA* est fortement impliqué dans la résistance au stress oxydative. L'ensemble de

ces résultats suggèrent que la mutation du gène *rpoA* pourrait être la cause de la sensibilité au pH=2. Aussi cette mutation augmenterait l'activité de la protéine RpoA et en conséquence favoriserait la radiorésistance des clones adaptés à la dose létale d'irradiation. Le même effet pourrait être attribué au gène *moly* muté, codant pour une protéine hypothétique dont le rôle est encore inconnu.

Fait intéressant, des études avaient démontré que l'adaptation d'*E. coli* K-12 à une dose létale d'irradiation a provoqué des mutations au niveau de certains gènes incluant *recA* et la perte du prophage e14 et (Wang *et al.*, 2010). Toutefois, ce prophage présente des caractéristiques similaires aux prophages Stxs d'*E. coli* O157:H7 CP-933V et BP-933W. e14 un prophage de type lambda codant pour des facteurs de virulence et inséré au niveau du génome bactérien dans un gène de réponse au stress oxydatif (*icd*) (Harris *et coll.*, 2009; Mehta *et coll.*, 2004; Shaikh et Tarr., 2003; Wang *et coll.*, 2010; Dalziel *et coll.*, 1980). Ces données concordant avec nos résultats appuient fortement notre Hypothèse quant à la radiorésistance d'*E. coli* O157:H7 favorisée par la perte des prophages CP-933V et BP-933W. Toutefois, l'induction de la réponse SOS, provoque l'excision du prophage e14 chez *E. coli* K-12 (Greener et Hill, 1980). Harris *et coll.* (2010) ont conclu que des mutations de *recA*, le gène clé de la réponse SOS, sont impliquées dans la radiorésistance d'*E. coli* K-12 mais ils ne pouvaient pas expliquer comment. Dans notre étude, *E. coli* O157: H7 adapté à la dose létale d'irradiation a perdu *lexA*, le régulateur négatif de RecA. Peut-être que chez *E. coli*, la dose létale d'irradiation, induit l'expression constitutive de la réponse SOS via la délétion de *lexA* ou la mutation de *recA*.

L'excision de deux prophages a favorisé la perte de la cytotoxicité envers les cellules VERO. Toutefois, les bactéries qui ont réintégré le prophage BP-933W ont récupéré leur cytotoxicité via la récupération du gène *stx2*. Non seulement le pouvoir pathogène a été récupéré suite à cette réintégration, mais aussi la sensibilité à l'irradiation, au stress oxydatif et la résistance au pH acide, malgré que ces bactéries aient conservé les mutations observées auparavant. Ces données peuvent confirmer que le principal facteur qui tue *E. coli* O157:H7 suite à une irradiation est l'induction des phages, surtout le BP-933W codant pour *stx2*. Cela signifie que la radiosensibilisation d'*E. coli* O157:H7 dépend de l'acquisition des prophages.

Conclusion

Dans ce travail, nous avons pu démontrer une différence entre la réponse à l'irradiation à une dose de sensibilisation et l'adaptation à une dose létale chez *E. coli* O157:H7. Toutefois, dans les deux cas, l'irradiation cible la virulence de la bactérie. Une dose létale d'irradiation, et probablement d'autres types de stress, utilisé pour conserver un aliment contenant un mélange de populations

bactériennes, peut favoriser le transfert horizontal des gènes *stx2* d'*E. coli* O157:H7 à une autre espèce d'*E. coli* non pathogène suite au traitement par une température élevée combinée avec une irradiation aux UV (Yue et coll., 2012)

En fait, si une population pathogène sensible à l'irradiation via l'induction des prophages, meurt après la lyse cellulaire, ses phages se transfèrent horizontalement à une population non pathogène mais résistante à cette dose d'irradiation. Dans ce cas, la population qui était résistante devient pathogène. Ce qui constituerait un risque possible pour la santé publique et pour les industries alimentaires (Figure 42). Un traitement à l'irradiation (ou un autre type de traitement) en deux cycles pourrait aider à éviter ce problème potentiel.

De plus, nous avons démontré que la réponse aux antibiotiques de types β -lactamines via AmpC et AmpG, favorise la résistance à l'irradiation, donc des traitements des animaux aux β -lactamines qui favoriseraient l'émergence de bactéries résistantes pourraient aussi causer l'apparition d'un certain niveau de radiorésistance.

En conclusion, les connaissances acquises dans cette thèse devraient permettre une utilisation plus judicieuse de l'irradiation pour traiter les aliments potentiellement contaminés avec l'important pathogène O157:H7.

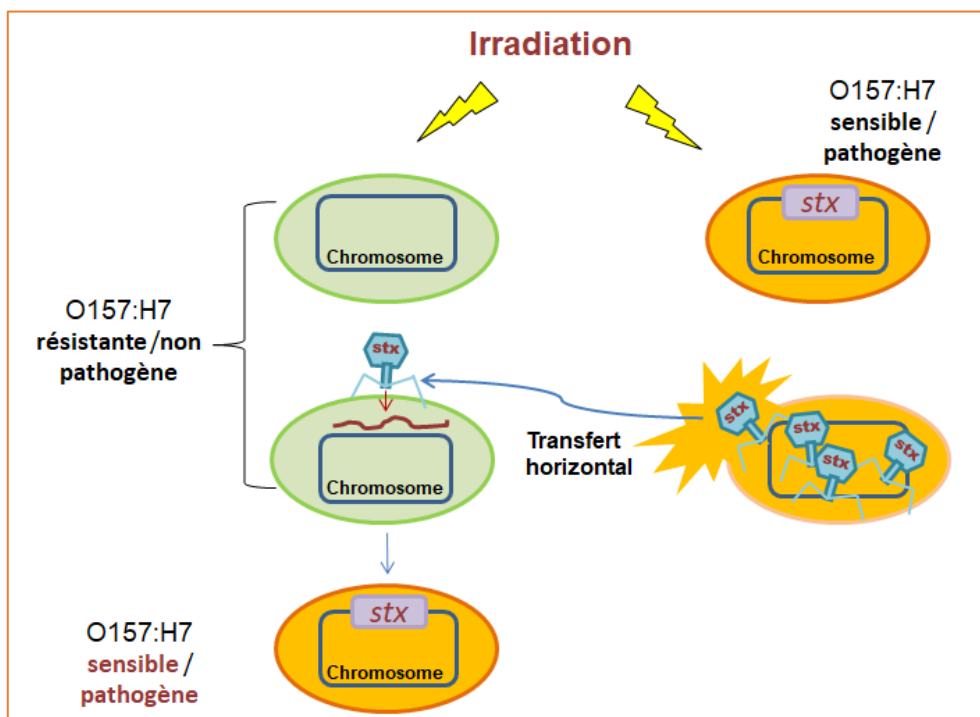


Figure 34. Transfert horizontal de phages induits par l'irradiation. Le transfert horizontal peut se faire d'une population bactérienne sensible et pathogène à une population résistante et non pathogène.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aertsen A, Faster D, Michiels CW (2005)** Induction of Shiga Toxin-Converting Prophage in *Escherichia coli* by High Hydrostatic Pressure. *Applied and Environmental Microbiology* 71(3):1155-1162
- Aguilar-Rosas SF, Ballinas-Casarrubias ML, Nevarez-Moorillon GV, Martin-Belloso O, Ortega-Rivas E (2007)** Thermal and pulsed electric fields pasteurization of apple juice: Effects on physicochemical properties and flavour compounds. *Journal of Food Engineering* 83(1):41-46
- Álvarez I, Mañas P, Sala FJ, Condón S (2003)** Inactivation of *Salmonella enterica* Serovar *Enteritidis* by Ultrasonic Waves under Pressure at Different Water Activities. *Applied and Environmental Microbiology* 69(1):668-672
- Álvarez I, Niemira BA, Fan X, Sommers CH (2007)** Modeling the Irradiation Followed by Heat Inactivation of *Salmonella* Inoculated in Liquid Whole Egg. *Journal of Food Science* 72(5):M145-M152
- Anderson DG, Kowalczykowski SC (1998)** Reconstitution of an SOS Response Pathway: Derepression of Transcription in Response to DNA Breaks. *Cell* 95(7):975-979
- Arsène F, Tomoyasu T, Bukau B (2000)** The heat shock response of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology* 55(1):3-9
- Ayari S, Dussault D, Millette M, Hamdi M, Lacroix M (2010)** Response of *Bacillus cereus* to γ -Irradiation in Combination with Carvacrol or Mild Heat Treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(14):8217-8224
- Aymerich T, Picouet PA, Monfort JM (2008)** Decontamination technologies for meat products. *Meat Science* 78(1):114-129
- Balamatsia cc, Rogga K, Badeka A, Kontominas Mg, Savvaidis In (2006)** Effect of Low-Dose Radiation on Microbiological, Chemical, and Sensory Characteristics of Chicken Meat Stored Aerobically at 4°C. *Journal of Food Protection* 69(5):1126-1133
- Barbosa-Canovas GV, Bermúdez-Aguirre, D (2008)** Introduction : Food Science and Technology *International* 14(5):403-409
- Bari MI, Nazuka E, Sabina Y, Todoriki S, Isshiki K (2003)** Chemical and Irradiation Treatments for Killing *Escherichia coli* O157:H7 on Alfalfa, Radish, and Mung Bean Seeds. *Journal of Food Protection* 66(5):767-774
- Battista JR (1997)** AGAINST ALL ODDS:The Survival Strategies of *Deinococcus radiodurans*. *Annual Review of Microbiology* 51(1):203-224
- Bell BP, Goldoft M, Griffin PM, Davis MA, Gordon DC, Tarr PI, Bartleson CA, Lewis JH, Barrett TJ, Wells, JG (1994)** A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience. *JAMA* 272, 1349-53.

- Beutin L, BÜLte M, Weber A, Zimmermann S, Gleier K (2000)** Investigation of human infections with verocytotoxin-producing strains of *Escherichia coli* (VTEC) belonging to serogroup O118 with evidence for zoonotic transmission. *Epidemiology and Infection* 125(1):47-54
- Bhat AH, Dar KB, Anees S, Zargar MA, Masood A, Sofi MA, Ganie SA (2015)** Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 74:101-110
- Bobay LM, Touchon M, Rocha EPC (2013)** Manipulating or Superseding Host Recombination Functions: A Dilemma That Shapes Phage Evolvability. *PLOS Genetics* 9(9): e1003825.
- Braun, O H (1974)** Letter: Bray's discovery of pathogenic *Escherichia coli* as a cause of infantile gastroenteritis. *Arch Dis Child* 49:668.
- Brooks BW, MURRAY RGE, JOHNSON JL, STACKEBRANDT E, WOESE CR, FOX GE (1980)** Red-Pigmented Micrococci: A Basis for Taxonomy. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 30(4):627-646
- Brown CA, BG Harmon Zhao, T and Doyle, M P (2001)** Healthy animals as carriers of STEC, In Verocytotoxigenic *Escherichia coli*. Food and Nutrition Press Inc, Trumbull p. 263-278.
- Boudreau MA, Fisher JF, Mobashery S. Messenger (2012)** functions of the bacterial cell wall-derived muropeptides. *Biochem* 51(14):2974.
- Bukau B (2000)** Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* 101:119-122
- Buncic S, Avery SM (1998)** Effects of cold storage and heat-acid shocks on growth and verotoxin 2 production of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology* 15(3):319-328
- Butala M, Klose D, Hodnik V, Rems A, Podlesek Z, Klare JP, Anderluh G, Busby SJW, Steinhoff H-J, Žgur-Bertok D (2011)** Interconversion between bound and free conformations of LexA orchestrates the bacterial SOS response. *Nucleic Acids Research* 39(15):6546-6557
- Caillet S, Millette M, Turgis M, Salmieri S, Lacroix M (2006)** Influence of Antimicrobial Compounds and Modified Atmosphere Packaging on Radiation Sensitivity of *Listeria monocytogenes* Present in Ready-to-Use Carrots (*Daucus carota*). *Journal of Food Protection* 69(1):221-227
- Caillet S, Shareck F, Lacroix M (2005)** Effect of gamma radiation and oregano essential oil on murein and ATP concentration of *Escherichia coli* O157: H7. *J Food Prot* 68(12):2571-2579
- Caillet S, Millette M, Dussault D, Shareck F, Lacroix M (2008)**. Effect of gamma radiation on heat shock protein expression of four foodborne pathogens. *J. Appl. Microbiol.*105, 1384-1391.
- Cabiscol E, Tamarit J, Ros J (2000)** Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol* 3:3-8.
- Calderwood SB, Mekalanos JJ (1987)** Iron regulation of Shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the *fur* locus. *Journal of Bacteriology* 169(10):4759-4764
- Cambray G, Sanchez-Alberola N, Campoy S, Guerin É, Da Re S, González-Zorn B, Ploy M-C, Barbé J, Mazel D, Erill I (2011)** Prevalence of SOS-mediated control of integron integrase expression as an adaptive trait of chromosomal and mobile integrons. *Mobile DNA* 2(1):6

- Campbell A (1994)** Comparative molecular biology of lambdoid phages. *Annu Rev Microbiol* 48: 193–222.
- Campbell A (2003)** Prophage insertion sites. *Research in Microbiology* 154(4):277-282
- Caprioli A, Morabito S, Brugère H, Oswald E (2005)** Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res* 36(3):289-311
- Carone BR, Xu T, Murphy KC, Marinus MG (2013)** High incidence of multiple antibiotic resistant cells in cultures of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mutat Res.* 759:1-8.
- Castanie-Cornet MP, Penfound TA, Smith D, Elliott JF, Foster JW (1999)** Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 181(11):3525-35
- Cheftel JC, Culioli J (1997)** Effects of high pressure on meat: A review. *Meat Science* 46(3):211-236
- Chiasson F, BORSA J, OUATTARA B, LACROIX M (2004)** Radiosensitization of *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhi in Ground Beef. *Journal of Food Protection* 67(6):1157-1162
- Cirz RT, O'Neill BM, Hammond JA, Head SR, Romesberg FE (2006)** Defining the *Pseudomonas aeruginosa* SOS Response and Its Role in the Global Response to the Antibiotic Ciprofloxacin. *Journal of Bacteriology* 188(20):7101-7110
- Clark JP (2006)** Processing-pulsed electric field processing, vol 60, p. 66-67
- Courcelle J, Khodursky A, Peter B, Brown PO, Hanawalt PC (2001)** Comparative Gene Expression Profiles Following UV Exposure in Wild-Type and SOS-Deficient *Escherichia coli*. *Genetics* 158(1):41-64
- Courvalin P (2008). Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance. *J intern Med.* 264(1):4-16
- Cox MM, Battista JR (2005)** *Deinococcus radiodurans* the consummate survivor. *Nature Reviews Microbiology* 3:882
- Cowden JM, Ahmed S, Donaghy M, Riley A (2001)** Epidemiological investigation of the central Scotland outbreak of *Escherichia coli* O157 infection, November to December 1996. *Epidemiol. Infect.* 126, 335-41
- Daly MJ (2006)** Modulating Radiation Resistance: Insights Based on Defenses Against Reactive Oxygen Species in the Radioresistant Bacterium ***Deinococcus radiodurans***. *Clinics in Laboratory Medicine* 26(2):491-504
- Daly MJ, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Vasilenko A, Zhai M, Leapman RD, Lai B, Ravel B, Li S-MW, Kemner KM, Fredrickson JK (2007)** Protein Oxidation Implicated as the Primary Determinant of Bacterial Radioresistance. *PLOS Biology* 5(4):e92
- Dalziel, K (1980)** Isocitrate dehydrogenase and related oxidative decarboxylases. *FEBS Lett.* 117 Suppl (1980) K45-55.

- Delaunay A, Isnard AD, Toledano MB (2000)** sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *The EMBO Journal* 19(19):5157-5166
- Dennison RA, Ahmed EM (1971)** Effects of low level irradiation upon the preservation of food products. Final Summary Report, May 1963--March 1970. United States Atomic Commission. 34 p.
- Dobrindt U (2005)** Genomics of *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology* 295(6):357-371
- Dobrindt U, Agerer F, Michaelis K, Janka A, Buchrieser C, Samuelson M, Svanborg C, Gottschalk G, Karch H, Hacker J (2003)** Analysis of Genome Plasticity in Pathogenic and Commensal *Escherichia coli* Isolates by Use of DNA Arrays. *Journal of Bacteriology* 185(6):1831-1840
- Enquist LW, Skalka A (1973)** Replication of bacteriophage λ DNA dependent on the function of host and viral genes: I. Interaction of red, gam and rec. *Journal of Molecular Biology* 75(2):185-212
- Erill I, Campoy S, Barbé J (2007)** Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiology Reviews* 31(6):637-656
- Escherich T (2008)** Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. Universitätsbibliothek Johann Christian Senckenberg.
- Espachs-Barroso A, Barbosa-Cánovas GV, Martín-Belloso O (2003)** Microbial and Enzymatic Changes in Fruit Juice Induced by High-Intensity Pulsed Electric Fields. *Food Reviews International* 19(3):253-273
- Euzéby JP (2007)** posting date. *Dictionnaire de bactériologie vétérinaire*. [Online].
- Farkas J (1990)** Combination of irradiation with mild heat treatment. *Food Control* 1(4):223-229
- Farkas J (1998)** Irradiation as a method for decontaminating food: A review. *International Journal of Food Microbiology* 44(3):189-204
- Farkas J (2006)** Irradiation for better foods. *Trends Food Sci Technol* 17(4):148-152
- Farkas J, Andrassy E, Polyák-Fehér, K (2005)** Improvement of the microbiological safety of two chilled semi-prepared meals by gamma irradiation. *Food Technology and Biotechnology* 43(3):263-269
- Feiner R, Argov T, Rabinovich L, Sigal N, Borovok I, Herskovits AA (2015)** A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 13:641
- Fernández de Henestrosa AR, Ogi T, Aoyagi S, Chafin D, Hayes JJ, Ohmori H, Woodgate R (2000)** Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 35(6):1560-1572
- Folkesson A, Eriksson S, Andersson M, Park JT, Normark S (2005)**. Components of the peptidoglycan recycling pathway modulate invasion and intracellular survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Cell Microbiol*;7(1):147-155.

- Fornelos N, Browning DF, Butala M (2016)** The use and abuse of LexA by mobile genetic elements. *Trends in microbiology* 24(5):391-401
- Forney L, Moraru, C, Koutchma, T (Ed.), Sun, DW (2009)** Ultraviolet Light in Food Technology. In: Press BRC (ed).
- Foster JW (2004)** *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nature Reviews Microbiology* 2(11):898.
- Friedberg EC, Aguilera A, Gellert M, Hanawalt PC, Hays JB, Lehmann AR, Lindahl T, Lowndes N, Sarasin A, Wood RD (2006)** DNA repair: From molecular mechanism to human disease. *DNA Repair* 5(8):986-996
- Fukuda K (2012)**. Food safety in a globalized world. *Bull WHO* 93:212-212.
- Gibson DM, Davis HK (1995)** Fish and shellfish products in sous vide and modified atmosphere packs. In: Dodds K (ed) *Principles of modified-atmosphere and Sous vide product packaging*. Technomic Publishing Co., Lancaster, pp 153–174
- Godoy VG, Jarosz DF, Simon SM, Abyzov A, Ilyin V, Walker GC (2007)** UmuD and RecA Directly Modulate the Mutagenic Potential of the Y Family DNA Polymerase DinB. *Molecular Cell* 28(6):1058-1070
- Goldstein J, Pollitt NS, Inouye M (1990)** Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87(1):283-287
- Gombas DE, Gomez RF (1978)** Sensitization of *Clostridium perfringens* spores to heat by gamma radiation. *Applied and Environmental Microbiology* 36(3):403-407
- Goranov AI, Kuester-Schoeck E, Wang JD, Grossman AD (2006)** Characterization of the Global Transcriptional Responses to Different Types of DNA Damage and Disruption of Replication in *Bacillus subtilis* *Journal of Bacteriology* 188(15):5595-5605
- Gorden J, Small PL (1993)** Acid resistance in enteric bacteria. *Infection and Immunity* 61(1):364-367
- Gould GW (1989)** Heat-induced injury and inactivation. Mechanisms of action of food preservation procedures, In G. W. Elsevier Science Publishers, Barking, United Kingdom. Gould (ed). p. 11-42
- Greener A, Hill CW (1980)** Identification of a novel genetic element in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 144:312–321
- Griffin PM, Tauxe, RV (1991)** The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157: H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiologic reviews* 13(1):60-98.
- Grimont PAD (1987)** Taxonomie des *Escherichia*. *Médecine et Maladies Infectieuses* 17:6-10
- Guerin É, Cambray G, Sanchez-Alberola N, Campoy S, Erill I, Da Re S, Gonzalez-Zorn B, Barbé J, Ploy M-C, Mazel D (2009)** The SOS Response Controls Integron Recombination. *Science* 324(5930):1034-1034

- Guillet F, Bonnefoy C, Leyral G, Verne-Bourdaïs, É (2002)** Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires. Wolters Kluwer France. Editions Doin. 248 p
- Guisbert E, Yura T, Rhodius VA, Gross CA (2008)** Convergence of Molecular, Modeling, and Systems Approaches for an Understanding of the *Escherichia coli* Heat Shock Response. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72(3):545-554
- Gutman PD, Fuchs P, Minton KW (1994)** Restoration of the DNA damage resistance of *Deinococcus radiodurans* DNA polymerase mutants by *Escherichia coli* DNA polymerase I and Klenow fragment. *Mutation Research/DNA Repair* 314(1):87-97
- Guo W, Hao H, Dai M, et al. (2012)** Development of quinoxaline 1, 4-dioxides resistance in *Escherichia coli* and molecular change under resistance selection. *PLoS One.*;7(8):e43322
- Hansen E, Juncher D, Henckel P, Karlsson A, Bertelsen G, Skibsted LH (2004)** Oxidative stability of chilled pork chops following long term freeze storage. *Meat Science* 68(3):479-484
- Harris DR, Pollock SV, Wood EA, Goiffon RJ, Klingele AJ, Cabot EL, Schackwitz W, Martin J, Eggington J, Durfee JT, Middle CM, Norton JE, Popelars MC, Li H, Klugman SA, Hamilton LL, Bane LB, Pennacchio LA, Albert TJ, Perna NT, Cox MM, Battista JR (2009)** Directed evolution of ionizing radiation resistance in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 191:5240–5252
- Harris PN, Tambyah PA, Paterson DL (2015)** Beta-lactam and beta-lactamase inhibitor combinations in the treatment of extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*: time for a reappraisal in the era of few antibiotic options *Lancet Infect Dis* 15(4):475–485
- Hayashi T, Makino K, Ohnishi M, Kurokawa K, Ishii K, Yokoyama K, Han CG, Ohtsubo E, Nakayama K, Murata T, Tanaka M, Tobe T, Iida T, Takami H, Honda T, Sasakawa C, Ogasawara N, Yasunaga T, Kuhara S, Shiba T, Hattori M, Shinagawa H (2001)** Complete Genome Sequence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and Genomic Comparison with a Laboratory Strain K-12. *DNA Research* 8(1):11-22
- Herold S, Karch H, Schmidt H (2004)** Shiga toxin-encoding bacteriophages genomes in motion. *International Journal of Medical Microbiology* 294(2):115-121
- Hill C, Cotter PD, Sleator RD, Gahan CGM (2002)** Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing. *International Dairy Journal* 12(2):273-283
- Honish L, Punja, N, Nunn S, Nelson D, Hislop N, Gosselin G, Dittrich D (2017)** Infections à *Escherichia coli* O157: H7 associées à des produits de viande de porc contaminés—Alberta (Canada), de juillet à octobre 2014. *ÉCLOSIONS DE MALADIES ENTÉRIQUES*, 43, 23
- Horwich AL, Weber-Ban EU, Finley D (1999)** Chaperone rings in protein folding and degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(20):11033-11040
- Hrudey SE, Payment P, Huck PM, Gillham RW, Hrudey EJ (2003)** A fatal waterborne disease epidemic in Walkerton, Ontario: comparison with other waterborne outbreaks in the developed world. *Water Science and Technology*, 47(3): 7-14
- Hueck CJ (1998)** Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:379-433

- Hughes DE, Nyborg WL (1962)** Cell Disruption by Ultrasound. *Science* 138(3537):108-114
- Hughes DT, Clarke MB, Yamamoto K, Rasko DA, Sperandio V (2009)** The QseC adrenergic signaling cascade in enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC). *PLoS Pathog* 5:e1000553
- Hull A, Acheson D, Echeverria P, Donohue-Rolfe A, Keusch G (1993)** Mitomycin immunoblot colony assay for detection of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in fecal samples: comparison with DNA probes. *Journal of clinical microbiology* 31(5):1167-1172
- Imamovic L, Muniesa M (2012)** Characterizing RecA-independent induction of Shiga toxin2-encoding phages by EDTA treatment. *PLoS One* 7:e32393.
- Janion C (2008)** Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*. *International journal of biological sciences* 4(6):338-344
- Jia H, MR J, MW J, Mei-Jun Z (2014)** Polynucleotide Phosphorylase Is Required for *Escherichia coli* O157:H7 Growth Above Refrigerated Temperature. *Foodborne Pathogens and Disease* 11(3):177-185
- Joly AL, Wettstein G, Mignot G, Ghiringhelli F and Garrido C (2010)** Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity. *J. Innate Immun.* 2, 238-247
- Jones PG, Inouye M (1994)** The cold shock response a hot topic. *Molecular Microbiology* 11(5):811-818
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT (2004)** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2:123
- Karmali M, Petric M, Steele B, Lim C (1983)** Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* 321(8325):619-620
- Karu AE, Belk ED (1982)** Induction of *E. coli* RecA protein via RecBC and alternate pathways: Quantitation by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Molecular and General Genetics* MGG 185(2):275-282
- Kauffmann F (1947)** Review : the Serology of the *Coli* Group. *Journal of Immunology* 57(1):71-100
- Kim AY, Thayer DW (1996)** Mechanism by which gamma irradiation increases the sensitivity of *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 to heat. *Applied and Environmental Microbiology* 62(5):1759-1763
- Kitayama S, Matsuyama A (1968)** Possibility of the repair of double-strand scissions in *Micrococcus radiodurans* DNA caused by gamma-rays. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 33(3):418-422
- Kocharunchitt C, King T, Gobius K, Bowman JP, Ross T (2014)** Global Genome Response of *Escherichia coli* O157:H7 Sakai during Dynamic Changes in Growth Kinetics Induced by an Abrupt Downshift in Water Activity. *PLOS ONE* 9(3):e90422
- Konowalchuk J, Speirs JI, Stavric S (1977)** Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 18(3):775-779

- Konteles S, Sinanoglou VJ, Batrinou A, Sflomos K (2009)** Effects of γ -irradiation on *Listeria monocytogenes* population, colour, texture and sensory properties of Feta cheese during cold storage. *Food Microbiology* 26(2):157-165
- Koutchma T (2010)** UV irradiation improves safety of foods and beverages. In: SPIE IP (ed). vol 7789
- Kowalczykowski SC, Dixon DA, Eggleston AK, Lauder SD, Rehrauer WM (1994)** Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews* 58(3):401-465
- Kvint K, Nachin L, Diez A, Nyström T (2003)** The bacterial universal stress protein: function and regulation. *Current Opinion in Microbiology* 6(2):140-145
- Lacroix M (2012)** Irradiation Handbook of Food Safety Engineering. P 497-523
- Lacroix M, Lafortune R (2004)** Combined effects of gamma irradiation and modified atmosphere packaging on bacterial resistance in grated carrots (*Daucus carota*). *Radiation Physics and Chemistry* 71(1):79-82
- Lacroix M, Marcotte M, Ramaswamy H (2002)** Irradiation in combination with others processes for the preservation of fruits, vegetables, nuts and spices. Handbook of post harvest technology. , Marcel Dekker, New York,
- Lacroix M, Vigneault C (2007)** Irradiation treatment for increasing fruit and vegetable quality. Stewart postharvest review 3 (7), 1-8
- Lafortune R, Caillet S, Lacroix M (2005)** Combined Effects of Coating, Modified Atmosphere Packaging, and Gamma Irradiation on Quality Maintenance of Ready-to-Use Carrots (*Daucus carota*). *Journal of Food Protection* 68(2):353-359
- Landy A (1989)** Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of lambda Site-Specific Recombination. *Annual Review of Biochemistry* 58(1):913-941
- Lawrie RA, Ledward, D. A. (2006)** Lawrie's Meat Science Seventh English, edition ed
- Levine MM (1987)** *Escherichia coli* that Cause Diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent. *The Journal of Infectious Diseases* 155(3):377-389
- Lim JY, Yoon J, Hovde CJ (2010)** A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *J Microbiol Biotechnol.*20(1):5-14.
- Little JW (1991)** Mechanism of specific LexA cleavage: Autodigestion and the role of RecA coprotease. *Biochimie* 73(4):411-421
- Liu YP, Tang HZ, Lin ZL, Xu P (2015)** Mechanisms of acid tolerance in bacteria and prospects in biotechnology and bioremediation, *Biotechnol. Adv.* 33 1484–1492,
- Łobocka MB, Rose DJ, Plunkett G, Rusin M, Samojedny A, Lehnher H, Yarmolinsky MB, Blattner FR (2004)** Genome of Bacteriophage P1. *Journal of Bacteriology* 2004 186(21):7032-7068

- López V, Avendaño V, Romero R, Garrido S, Espinoza J, Vargas M (2005)** Effect of gamma irradiation on the microbiological quality of minimally processed vegetables. *L Archivos latinoamericanos de nutricion* 55(3):287-292
- Lushchak VI, Lushchak LP, Mota AA, Hermes-Lima M (2001)** Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280, 100-107
- MacDonald DM, Fyfe M, Paccagnella A, Trinidad A, Louie K, Patrick D (2004)** *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to salami, British Columbia, Canada, 1999. *Epidemiol Infect* 132,283-289.
- Macdougall C (2011)** Beyond susceptible and resistant, part I: treatment of infections due to gram-negative organisms with inducible betalactamases. *J Pediatr Pharmacol Ther*; 16:23-30
- Mahrour A, Caillet S, Nketsa-Tabiri J, Lacroix M (2003)** Microbial and Sensory Quality of Marinated and Irradiated Chicken. *Journal of Food Protection* 66(11):2156-2159
- Mainil JG and G Daube (2005)** Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? *J Appl Microbiol* 98:1332-1344
- Makarova KS, Aravind L, Wolf YI, Tatusov RL, Minton KW, Koonin EV, Daly MJ (2001)** Genome of the Extremely Radiation-Resistant Bacterium *Deinococcus radiodurans* Viewed from the Perspective of Comparative Genomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65(1):44-79
- Makarova KS, Omelchenko MV, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Vasilenko A, Zhai M, Lapidus A, Copeland A, Kim E, Land M, Mavromatis K, Pitluck S, Richardson PM, Detter C, Brettin T, Saunders E, Lai B, Ravel B, Kemner KM, Wolf YI, Sorokin A, Gerasimova AV, Gelfand MS, Fredrickson JK, Koonin EV, Daly MJ (2007)** *Deinococcus geothermalis*: The Pool of Extreme Radiation Resistance Genes Shrinks. *PLOS ONE* 2(9):e955
- Malyukova I, Murray KF, Zhu C, Boedeker E, Kane A, Patterson K, Peterson JR, Donowitz M, Kovbasnjuk O (2009)** Macropinocytosis in Shiga toxin 1 uptake by human intestinal epithelial cells and transcellular transcytosis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 296(1):G78-G92
- Mark BL, Vocadlo DJ, Oliver A (2011)** Providing β -lactams a helping hand: targeting the AmpC β -lactamase induction pathway. *Future Microbiol* 6:1415–1427.
- Matsuyama T, and Hirai, M. F- (1971)** CENTER LUMINESCENCE DURING X-RAY IRRADIATION IN KCl. Publisher.
- Matuszewska E, Kwiatkowska J, Kuczyńska-Wiśnik D, Laskowska E (2008)** *Escherichia coli* heat-shock proteins IbpA/B are involved in resistance to oxidative stress induced by copper. *Microbiology* 154(6):1739-1747
- Mayer MP, Bukau B (2005)** Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62(6):670

- McGannon CM, Fuller CA, Weiss AA (2010)** Different classes of antibiotics differentially influence Shiga toxin production. *Antimicrob Agents Chemother* 54:3790–3798
- Medina M, Cabeza MC, Bravo D, Cambero I, Montiel R, Ordóñez JA, Nuñez M, Hoz L (2009)** A comparison between E-beam irradiation and high pressure treatment for cold-smoked salmon sanitation: microbiological aspects. *Food Microbiology* 26(2):224-227
- Mehta P, Casjens S, Krishnaswamy S (2004)** Analysis of the lambdoid prophage element e14 in the *E. coli* K-12 genome. *BMC Microbiol.* 4:4
- Melton-Celsa AR (1998)** Structure, biology, and relative toxicity of Shiga toxin family members for cells and animals. *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E coli* Strains:121-128
- Meyer AS, Baker TA (2011)** Proteolysis in the *Escherichia coli* heat shock response: a player at many levels. *Current Opinion in Microbiology* 14(2):194-199
- Michino H, Araki K, Minami S, Takaya S, Sakai N, Miyazaki M, Ono A, Yanagawa H (1999)** Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am. J. Epidemiol.* 150, 787-96
- Miller C, Thomsen LE, Gaggero C, Mosseri R, Ingmer H, Cohen SN (2004)** SOS response induction by β -lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science* 305(5690):1629-1631
- Milon A, Oswald E, De Rycke J (1999)** Rabbit EPEC: a model for the study of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Vet Res* 30(2-3):203-219
- Mironov A, Seregina T, Nagornykh M, Luhachack LG, Korolkova N, Lopes LE, Kotova V, Zavilgelsky G, Shakulov R, Shatalin K, Nudler E (2017)** Mechanism of H-S-mediated protection against oxidative stress in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114(23):6022-6027
- Mjahed H, Girodon F, Fontenay M and Garrido C (2012)** Heat shock proteins in hematopoietic malignancies. *Exp Cell Res.* 318(15):1946-1958.
- Moazed D and Harry NF (1987)** Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature.* 327:398-397
- Molins RA (2001)** Irradiation of meats and poultry. In *Food Irradiation, Principles and applications* (Molins R ed.), Wiley - Interscience, John Wiley & Sons Inc. , New York , pp. 131-191
- Mongkolsuk S, Helmann JD (2002)** Regulation of inducible peroxide stress responses. *Molecular Microbiology* 45(1):9-15
- Mor-Mur M, Yuste J (2003)** High pressure processing applied to cooked sausage manufacture: physical properties and sensory analysis. *Meat Science* 65(3):1187-1191
- Morita M, Kanemori M, Yanagi H, Yura T (1999)** Heat-Induced Synthesis of *Escherichia coli*: Structural and Functional Dissection of rpoH mRNA Secondary Structure. *Journal of Bacteriology* 181(2):401-410
- Moseley B (1989)** Ionizing radiation: action and repair. Mechanisms of action of food preservation procedures, London, Elsevier Applied Science:43-70

- Moseley BEB (1983)** Photobiology and Radiobiology of *Micrococcus (Deinococcus) radiodurans*. In: Smith KC (ed) Photochemical and Photobiological Reviews: Volume 7. Springer US, Boston, MA, pp 223-274
- Moy JH, Nagai NY (1985)** Quality of fresh fruits irradiated at disinfestation doses. University of Hawaii at Manoa, United States
- Mühldorfer I, Hacker J, Keusch GT, Acheson DW, Tschäpe H, Kane AV, Ritter A, Olschläger T, Donohue-Rolfe A (1996)** Regulation of the Shiga-like toxin II operon in *Escherichia coli*. Infection and Immunity 64(2):495-502
- Muniesa M, Blanco JE, De Simon M, Serra-Moreno R, Blanch AR, et al. (2004)** Diversity of stx2 converting bacteriophages induced from Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle. Microbiology 150: 2959-2971.
- Murphy KC (2007)** The λ Gam Protein Inhibits RecBCD Binding to dsDNA Ends. Journal of Molecular Biology 371(1):19-24
- Nagao T, Nakayama-Imaohji H, Elahi M, Tada A, Toyonaga E, Yamasaki H. ... Kuwahara, T. (2018)** L-histidine augments the oxidative damage against Gram-negative bacteria by hydrogen peroxide. International Journal of Molecular Medicine 41:2847-2854
- Narumi I, Satoh K, Kikuchi M, Funayama T, Yanagisawa T, Kobayashi Y, Watanabe H, Yamamoto K (2001)** The LexA protein from *Deinococcus radiodurans* is not involved in RecA induction following γ irradiation. Journal of bacteriology 183(23):6951-6956
- Nataro JP, Kaper JB (1998)** Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews 11(1):142-201
- National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF) (2006)** Requisite scientific parameters for establishing the equivalence of alternative methods of pasteurization. J Food Prot, 69, 1190–216.
- Neuhaus K, Rapposch S, Francis KP, Scherer S (2000)** Restart of Exponential Growth of Cold-Shocked *Yersinia enterocolitica* Occurs after Down-Regulation of cspA mRNA. Journal of Bacteriology 182(11):3285-3288
- Nowosielska A (2007)** Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 5. The role of recombination in DNA repair and genome stability. Acta Biochimica Polonica, 54(3):483-494.
- O'Brien AD, LaVeck GD, Thompson MR, Formal SB (1982)** Production of Shigella dysenteriae type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. J Infect Dis 146:763–769.
- O'Brien A, Newland J, Miller S, Holmes R, Smith H, Formal S (1984)** Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. Science 226(4675):694-696
- Özden Ö, İnuğur M, Erkan N (2007)** Effect of different dose gamma radiation and refrigeration on the chemical and sensory properties and microbiological status of aqua cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Radiation Physics and Chemistry 76(7):1169-1178

- Pagán R, Mañas P, Raso J, Condón S (1999)** Bacterial Resistance to Ultrasonic Waves under Pressure at Nonlethal (Manosonication) and Lethal (Manothermosonication) Temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 65(1):297-300
- Palumbo SA, Call JE, Schultz FJ, Williams AC (1995)** Minimum and Maximum Temperatures for Growth and Verotoxin Production by Hemorrhagic Strains of *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection* 58(4):352-356
- Park SH, Lee SJ, Chung HY, Kim TH, Cho CK, Yoo SY, Lee Y-S (2000)** Inducible Heat-Shock Protein 70 Is Involved in the Radioadaptive Response. *Radiation Research* 153(3):318-326
- Park S, Imlay JA (2003)** High Levels of Intracellular Cysteine Promote Oxidative DNA Damage by Driving the Fenton Reaction. *Journal of Bacteriology* 185(6):1942-1950
- Park S, You X, Imlay JA (2005)** Substantial DNA damage from submicromolar intracellular hydrogen peroxide detected in Hpx mutants of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(26):9317-9322
- Parsell DA, Taulien J and Lindquist S (1993)** The role of heatshock proteins in thermotolerance. *Phil. Trans. Royal Soc. London (B)* 339, 279-285
- Patterson MF (2005)** Microbiology of pressure-treated foods. *Journal of Applied Microbiology* 98(6):1400-1409
- Payne G, Heelis PF, Rohrs BR, Sancar A (1987)** The active form of *Escherichia coli* DNA photolyase contains a fully reduced flavin and not a flavin radical, both in vivo and in vitro. *Biochemistry* 26(22):7121-7127
- Perna NT, Plunkett G, Burland V, Mau B, Glasner JD, Rose DJ, Mayhew GF, Evans PS, Gregor J, Kirkpatrick HA (2001a)** Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Nature* 409(6819):529-533
- Perna NT, Plunkett III G, Burland V, Mau B, Glasner JD, Rose DJ, Mayhew GF, Evans PS, Gregor J, Kirkpatrick HA (2001b)** Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Nature* 409(6819):529
- Phillips CA (1999)** The epidemiology, detection and control of *Escherichia coli* O157. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79(11):1367-1381
- Picksley SM, Lloyd RG, Buckman C (1984)** Genetic Analysis and Regulation of Inducible Recombination in *Escherichia coli* K-12. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 49:469-474
- Price, SB, Cheng CM, Kaspar CW, Wright JC, DeGraves FJ, Penfound, TA, Castanie-CornetMP, Foster, JW (2000)** Role of rpoS in Acid Resistance and Fecal Shedding of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (2), 632-637.
- Ptashne M, Switch AG (1992)** Phage lambda and higher organisms. Cell and Blackwell Scientific, Cambridge, MA
- Putonti C, Luo Y, Katili C, Chumakov S, Fox GE, Graur D, Fofanov Y (2006)** A Computational Tool for the Genomic Identification of Regions of Unusual Compositional Properties and Its Utilization

- in the Detection of Horizontally Transferred Sequences. *Molecular Biology and Evolution* 23(10):1863-1868
- Qin TT, Kang HQ, Ma P, Li PP, Huang LY, Gu B (2015)** SOS response and its regulation on the fluoroquinolone resistance. *Annals of translational medicine* 3(22):358-358
- Qiu Z, Goodman MF (1997)** The *Escherichia coli polB* Locus Is Identical to *dinA*, the Structural Gene for DNA Polymerase II: CHARACTERIZATION OF Pol II PURIFIED FROM A *polB* MUTANT. *Journal of Biological Chemistry* 272(13):8611-8617
- Radman M (1975)** SOS Repair Hypothesis: Phenomenology of an Inducible DNA Repair Which is Accompanied by Mutagenesis. In: Hanawalt PC, Setlow RB (eds) *Molecular Mechanisms for Repair of DNA: Part A*. Springer US, Boston, MA, pp 355-367
- Ravin NV (2011)** N15: The linear phage-plasmid. *Plasmid* 65(2):102-109
- Reading NC, Torres AG, Kendall MM, Hughes DT, Yamamoto K, Sperandio V (2007)** A novel two-component signaling system that activates transcription of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector involved in remodeling of host actin. *J Bacteriol* 189:2468-2476
- Reale A, Sorrentino E, Iaffaldano N, Rosato MP, Ragni P, Coppola R, Capitani D, Sobolev AP, Tremonte P, Succi M, Mannina L (2008)** Effects of ionizing radiation and modified atmosphere packaging on the shelf life of aqua-cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24(12):2757-2765
- Reid SD, Herbelin CJ, Bumbaugh AC, Selander RK, Whittam TS (2000)** Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature* 406(6791):64
- Rochat T, Nicolas P, Delumeau O, Rabatinová A, Korelusová J, Leduc A, Bessières P, Dervyn E, Krásný L, Noirot P (2012)** Genome-wide identification of genes directly regulated by the pleiotropic transcription factor Spx in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research* 40(19):9571-9583
- Sancar A (1996)** DNA Excision Repair. *Annual Review of Biochemistry* 65(1):43-81
- Santé Canada (2013)** Maladies d'origine alimentaire. Publisher. <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/aliments-nutrition/salubrite-aliments/maladies-origine-alimentaire.html>
- Santoro MG (2000)** Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochemical Pharmacology* 59(1):55-63
- Schärer OD (2003)** Chemistry and Biology of DNA Repair. *Angewandte Chemie International Edition* 42(26):2946-2974
- Schmidt H (2001)** Shiga-toxin-converting bacteriophages. *Research in Microbiology* 152(8):687-695
- Selvam K, Duncan JR, Tanaka M, Battista JR (2013)** DdrA, DdrD, and PprA: Components of UV and Mitomycin C Resistance in *Deinococcus radiodurans* R1. *PLOS ONE* 8(7):e69007
- Serra-Moreno R, Jofre J, Muniesa M (2007)** Insertion site occupancy by *stx2* bacteriophages depends on the locus availability of the host strain chromosome. *Journal of bacteriology* 189(18):6645-6654

- Shaikh N, Tarr PI (2003)** *Escherichia coli* O157: H7 Shiga toxin-encoding bacteriophages: integrations, excisions, truncations, and evolutionary implications. *Journal of bacteriology* 185(12):3596-3605
- Sharma SK, De Los Rios P, Christen P, Lustig A, Goloubinoff P (2010)** The kinetic parameters and energy cost of the Hsp70 chaperone as a polypeptide unfoldase. *Nature Chemical Biology* 6:914
- Shatalin K, Shatalina E, Mironov A, Nudler E (2011)** H-S: A Universal Defense Against Antibiotics in Bacteria. *Science* 334(6058):986-990
- Shi X, Bennett GN (1994)** Effects of *rpoA* and *cysB* mutations on acid induction of biodegradative arginine decarboxylase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 176(22):7017-7023
- Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA (2007)** Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Research* 18:134
- Siegler RL, Obrig TG, Pysher TJ, Tesh VL, Denkers ND, Taylor FB (2003)** Response to Shiga toxin 1 and 2 in a baboon model of hemolytic uremic syndrome. *Pediatric Nephrology* 18(2):92-96
- Skandamis PN, Yoon Y, Stopforth JD, Kendall PA, Sofos JN (2008)** Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. *Food Microbiology* 25(2):294-303
- Sperandio V, Pacheco A (2012)** Shiga toxin in enterohemorrhagic *E.coli*: regulation and novel anti-virulence strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2(81)
- Storz G, Tartaglia LA, Ames BN (1990)** The OxyR regulon. *Antonie van Leeuwenhoek* 58(3):157-161
- Straus DB, Walter WA, Gross CA (1987)** The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of σ_{32} . *Nature* 329:348
- Takao T, Tanabe T, Hong YM, Shimonishi Y, Kurazono H, Yutsudo T, Sasakawa C, Yoshikawa M, Takeda Y (1988)** Identity of molecular structure of Shiga-like toxin I (VT1) from *Escherichia coli* O157 : H7 with that of Shiga toxin. *Microbial Pathogenesis* 5(5):357-369
- Tanaka M, Earl AM, Howell HA, Park MJ, Eisen JA, Peterson SN, Battista JR (2004)** Analysis of *Deinococcus radiodurans*'s Transcriptional Response to Ionizing Radiation and Desiccation Reveals Novel Proteins That Contribute to Extreme Radioresistance. *Genetics* 168(1):21-33
- Tarkowski TA, Mooney D, Thomason LC, Stahl FW (2002)** Gene products encoded in the *ninR* region of phage λ participate in Red-mediated recombination. *Genes to Cells* 7(4):351-363
- Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL (2005)** Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *The Lancet* 365(9464):1073-1086
- Taylor WE, Straus DB, Grossman AD, Burton ZF, Gross CA, Burgess RR (1984)** Transcription from a heat-inducible promoter causes heat shock regulation of the sigma subunit of *E. coli* RNA polymerase. *Cell* 38(2):371-381
- Thakur BR, Singh RK (1995)** Combination processes in food irradiation. *Trends in Food Science & Technology* 6(1):7-11

- Toth I, Herault F, Beutin L, and Oswald E. (2003).** Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: establishment of the existence of a new *cdt* variant (Type IV). *J Clin Microbiol* 41:4285-4291
- Tozzi AE, S. Goriotti, and A. Caprioli. (2001)** Epidemiology of Human Infections by *Escherichia coli* O157 and other Verocytotoxin-Producing *E. coli* Verocytotoxigenic *E. coli*.
- Trudeau K (2012)** Étude des mécanismes de radiorésistance et radiosensibilisation bactérienne lors de l'irradiation gamma
- Trudeau K, Vu KD, Déziel É, Shareck F, Lacroix M (2014)** Effect of γ -irradiation on gene expression of heat shock proteins in the foodborne pathogen *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Radiation Biology* 90(3):268-273
- Tyler JS, Mills MJ, Friedman DI. (2004)** The operator and early promoter region of the Shiga toxin type 2-encoding bacteriophage 933W and control of toxin expression. *J Bacteriol* 186:7670–7679.
- Tyler JS, Beeri K, Reynolds JL, Alteri CJ, Skinner KG, Friedman JH, Eaton KA, Friedman DI (2013)** Prophage Induction Is Enhanced and Required for Renal Disease and Lethality in an EHEC Mouse Model. *PLOS Pathogens* 9(3):e1003236
- Urbain WM (1986)** Meats and poultry. " In: Urbain WM, editor . Food irradiation Orlando, Fla: Academic Press 124-144.
- Uyttendaele M, Franz E, Schlüter O (2015)** Food Safety, a Global Challenge. Tchounwou PB ed. *Int J Environ Res Public Health*. 13(1):67.
- Van Boxstael S, Habib I, Jacxsens L, De Vocht M, Baert L, Van De Perre E, Rajkovic A, Lopez-Galvez F, Samplers I, Spanoghe P, De Meulenaer B, Uyttendaele M (2013)** Food safety issues in fresh produce: Bacterial pathogens, viruses and pesticide residues indicated as major concerns by stakeholders in the fresh produce chain. *Food Control* 32(1):190-197
- Vareille M, de Sablet T, Hindre T, Martin C, Gobert AP (2007)** Nitric oxide inhibits Shiga-toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:10199-10204.
- Wade JT, Reppas NB, Church GM, Struhl K (2005)** Genomic analysis of LexA binding reveals the permissive nature of the *Escherichia coli* genome and identifies unconventional target sites. *Genes & Development* 19(21):2619-2630
- Wagner PL, Neely MN, Zhang X, Acheson DW, Waldor MK, Friedman DI (2001)** Role for a phage promoter in Shiga toxin 2 expression from a pathogenic *Escherichia coli* strain. *J Bacteriol* 183:2081–2085.
- Wagner PL, Waldor MK (2002)** Bacteriophage Control of Bacterial Virulence. *Infection and Immunity* 70(8):3985-3993
- Wagner PL, Livny J, Neely MN, Acheson DW, Friedman ID, Waldor MK. (2002)** Bacteriophage control of Shiga toxin 1 production and release by *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 44:957–970

- Walkling-Ribeiro M, Noci F, Cronin DA, Riener J, Lyng JG, Morgan DJ (2008)** Reduction of *Staphylococcus aureus* and quality changes in apple juice processed by ultraviolet irradiation, pre-heating and pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering* 89(3):267-273
- Wan J, Coventry J, Swiergon P, Sanguansri P, Versteeg C (2009)** Advances in innovative processing technologies for microbial inactivation and enhancement of food safety pulsed electric field and low-temperature plasma. *Trends in Food Science & Technology* 20(9):414-424
- Wang G, Zhao T, Doyle Mp (1997)** Survival and Growth of *Escherichia coli* O157:H7 in Unpasteurized and Pasteurized Milk. *Journal of Food Protection* 60(6):610-613
- Wang X, Kim Y, Ma Q, Hong SH, Pokusaeva K, Sturino JM, Wood TK (2010)** Cryptic prophages help bacteria cope with adverse environments. *Nat Commun* 1: 147
- Wang Z, Ma Y, Zhao G, Liao X, Chen F, Wu J, Chen J, Hu X (2006)** Influence of Gamma Irradiation on Enzyme, Microorganism, and Flavor of Cantaloupe (*Cucumis melo* L.) Juice. *Journal of Food Science* 71(6):M215-M220
- Weisberg RA, Landy A (1983)** In Hendrix, RW, Roberts, JW, Stahl, FW and Weisberg, RA (eds), *Lambda II*. Cold Spring Harbour: CSHL: p. 145-174
- Wertman KF, Mount DW (1985)** Nucleotide sequence binding specificity of the LexA repressor of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 163(1):376-384
- Wesche AM, Gurtler JB, Marks BP, Ryser ET (2009)** Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *J Food Prot* 72(5):1121-1138
- White O, Eisen JA, Heidelberg JF, Hickey EK, Peterson JD, Dodson RJ, Haft DH, Gwinn ML, Nelson WC, Richardson DL, Moffat KS, Qin H, Jiang L, Pamphile W, Crosby M, Shen M, Vamathevan JJ, Lam P, McDonald L, Utterback T, Zalewski C, Makarova KS, Aravind L, Daly MJ, Minton KW, Fleischmann RD, Ketchum KA, Nelson KE, Salzberg S, Smith HO, Craig J, Venter, Fraser CM (1999)** Genome Sequence of the Radioresistant Bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science* 286(5444):1571-1577
- Wick LM, Qi W, Lacher DW, Whittam TS (2005)** Evolution of Genomic Content in the Stepwise Emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Bacteriology* 187(5):1783-1791
- Woodgate R, Ennis DG (1991)** Levels of chromosomally encoded Umu proteins and requirements for in vivo UmuD cleavage. *Molecular and General Genetics* MGG 229(1):10-16
- World Health Organisation W (2006)** The Use of Irradiation for Food Quality and Safety. Institute of Food Science and Technology Information Statement. the Food and Agricultural Organisation and Codex Alimentarius group2007–2015. http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/en/
- Yang W (2011)** Surviving the Sun: Repair and bypass of DNA UV lesions. *Protein Science* 20(11):1781-1789
- Yoh M, Frimpong EK, Voravuthikunchai SP, Honda T (1999)** Effect of subinhibitory concentrations of antimicrobial agents (quinolones and macrolide) on the production of verotoxin by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Canadian Journal of Microbiology* 45(9):732-739

- Yousef Alikhani M, Arikawa K, Meraz I M, Nishikawa Y, Ogasawara J, Hase A., ... Savarino, S. J. (2005)** Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. Pakistan Journal of Biological Sciences, 9(8):493-503.
- Zahradka K, Slade D, Bailone A, Sommer S, Averbeck D, Petranovic M, Lindner AB, Radman M (2006)** Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans*. Nature 443:569
- Zhang L, Lu Z, Wang H (2006)** Effect of gamma irradiation on microbial growth and sensory quality of fresh-cut lettuce. International Journal of Food Microbiology 106(3):348-351
- Zhang W, Bielaszewska M, Kuczius T, Karch H (2002)** Identification, Characterization, and Distribution of a Shiga Toxin 1 Gene Variant in *Escherichia coli* Strains Isolated from Humans. Journal of Clinical Microbiology 40(4):1441-1446
- Zhang X, McDaniel AD, Wolf LE, Keusch GT, Waldor MK, Acheson DW (2000)** Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. J Infect Dis 181: 664-670
- Zharkov DO (2008)** Base excision DNA repair. Cellular and Molecular Life Sciences 65(10):1544-1565
- Zheng M, Wang X, Templeton LJ, Smulski DR, LaRossa RA, Storz G (2001)** DNA Microarray-Mediated Transcriptional Profiling of the *Escherichia coli* Response to Hydrogen Peroxide. Journal of Bacteriology 183(15):4562-4570
- Zeng X, Lin J.** Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. Front Microbiol 2013;4:128
- Zhu MJ, Mendonca A, Ismail HA, Ahn DU (2008)** Effects of Irradiation on Survival and Growth of *Listeria monocytogenes* and Natural Microflora in Vacuum-Packaged Turkey Hams and Breast Rolls. Poultry Science 87(10):2140-2145