

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

**Évaluation de la résistance du génome bactérien à l'irradiation
gamma et évaluation préliminaire d'un essai compétitif immuno-
fluorescent pour la détection de *Listeria monocytogenes***

Par

Stéphane Beauchamp

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Magister Scientiæ (M.Sc.)
en microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Examineur externe	Céline Morissette Institut des Nutraceutiques et des Aliments Fonctionnels. Université Laval
Examineur interne	Marie-Élise Parent Institut Armand-Frappier
Directeur de recherche	Monique Lacroix Institut Armand-Frappier
Codirecteur de recherche	Sabato D'Auria Italian National Research Council Institute of Protein Biochemistry

RÉSUMÉ

Le nombre de cas d'infections dues à des pathogènes alimentaires est en constante augmentation en raison de l'accroissement de la consommation des aliments prêts-à-manger. Cette problématique oblige l'industrie agro-alimentaire à adopter de nouvelles pratiques et de nouveaux procédés pour assurer non seulement la qualité nutritionnelle de leurs produits, mais aussi l'innocuité et la salubrité. Ainsi les industries alimentaires doivent détruire les microorganismes pathogènes et confirmer leur absence dans leurs produits. Différents traitements physiques ou chimiques sont appliqués aux ingrédients et aliments afin de contrôler la présence des bactéries pathogènes. Parmi ces traitements, l'irradiation gamma, qui présente une multitude d'avantages et d'applications, est l'une des technologies les plus étudiées. La confirmation que le contrôle des microorganismes est efficace se base sur l'utilisation de tests de détection pour déceler la présence des différents pathogènes dans les aliments de même qu'aux différents points critiques de la chaîne de production-transformation. Plusieurs recherches sont menées pour mettre au point de nouvelles méthodes de détection afin de pallier aux lacunes des méthodes déjà existantes. Ce projet de maîtrise vise dans un premier temps l'étude de la résistance relative de deux bactéries d'importance dans l'industrie alimentaire à l'irradiation gamma. Les dommages infligés au génome des bactéries *Escherichia coli* et *Listeria monocytogenes*, par l'irradiation gamma et UV-C, ont été évalués afin d'établir une relation entre la dose reçue et les dommages génomiques selon le type de bactérie. De façon générale, les résultats ont démontré une plus grande résistance à l'irradiation pour le génome de *L. monocytogenes* comparativement à celui d'*E. coli*. L'irradiation gamma s'est aussi avérée apte à induire les mêmes types de lésions à l'ADN que l'irradiation UV-C. Dans un deuxième temps, un test immunologique a été conçu pour détecter la bactérie *Listeria monocytogenes*. L'importance de cette bactérie dans l'industrie alimentaire et les récentes éclosions de listériose mettent en avant la nécessité de concevoir des méthodes de détection plus rapides et plus efficaces. Un test compétitif immuno-fluorescent a donc été mis au point pour permettre une détection spécifique de la bactérie en utilisant un anticorps monoclonal. Les résultats obtenus ont permis de démontrer que ce test immuno-fluorescent pourrait éventuellement être utilisé dans l'industrie pour la détection des bactéries pathogènes. Plusieurs étapes d'étalonnage et de normalisation restent toutefois à être effectuées.

ABSTRACT

The popularity for the ready-to-eat foods results in an increasing number of infections caused by foodborne pathogens. Food industries have to adopt new practices and new processes to ensure not only the nutritional quality of their products, but also the consumer's food safety. In general, food safety program starts with physical or chemical treatments which are applied to foods to control the presence of various harmful microorganisms. Among these treatments, gamma irradiation, which has many advantages and applications, is one of the most studied technologies. The efficacy of the control of microorganisms is then confirmed by using screening tests for the presence of different pathogens in food as well as on surfaces in the chain of production-processing. Several studies are constantly conducted to develop new detection methods to improve existing assays. This project aims first to study the relative resistance of two bacteria to gamma irradiation. The genomic damage induced in *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by gamma and UV-C radiation was evaluated to establish a relationship between the dose and damage in regard to the type of bacteria. In general, the results showed a higher resistance to irradiation for the genome of *L. monocytogenes* compared to that of *E. coli*. Gamma irradiation also proved able to induce the same types of DNA damage that UV-C irradiation. Then, an immunoassay was developed to detect *Listeria monocytogenes*. The importance of this bacterium in the food industry and recent listeriosis outbreaks justify the development of faster and more efficient methods of detection. A competitive immuno-fluorescent test was therefore developed to allow specific detection of bacteria using a monoclonal antibody. The results have shown that this immuno-fluorescent test could eventually be used in industry for the detection of pathogenic bacteria. Nevertheless, several stages of calibration and standardization remain to be done.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	IV
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES TABLEAUX	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XI
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
PREMIÈRE PARTIE : ÉVALUATION DE LA RÉSISTANCE DU GÉNOME BACTÉRIEN À L'IRRADIATION GAMMA	4
CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE	5
1.1. QU'EST-CE QUE LA RADIOACTIVITÉ?	5
1.2. RAYONS IONISANTS	5
1.3. RAYONS NON-IONISANTS	6
1.4. APPLICATIONS POTENTIELLES DE L'IRRADIATION GAMMA	6
1.5. APPLICATIONS POTENTIELLES DE L'IRRADIATION UV-C	8
1.6. MODE D'ACTION DE L'IRRADIATION GAMMA	9
1.6.1. <i>Effets directs et indirects</i>	9
1.6.2. <i>Effets biologiques</i>	11
1.7. MODE D'ACTION DE L'IRRADIATION UV	13
1.7.1. <i>Effets biologiques</i>	13
1.8. FACTEURS INFLUENÇANT LA RADIORÉSISTANCE BACTÉRIENNE.....	15
1.8.1. <i>La dose absorbée</i>	15
1.8.2. <i>La nature du microorganisme</i>	15
1.8.3. <i>La nature et les conditions du milieu</i>	16
1.8.4. <i>Les mécanismes de réparation de l'ADN</i>	16
1.8.5. <i>Protection contre les dommages oxydatifs</i>	18
1.9. LA BACTÉRIE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	19
1.9.1. <i>Description générale</i>	19
1.9.2. <i>Habitats naturels</i>	19
1.9.3. <i>Importance clinique</i>	20

1.9.4. Importance et problématique de la bactérie dans l'industrie agro-alimentaire.....	21
1.10. LA BACTÉRIE <i>ESCHERICHIA COLI</i>	22
1.10.1. Description générale	22
1.10.2. Importance clinique	22
1.10.3. Importance et problématique de la bactérie dans l'industrie agro-alimentaire.....	24
1.11. PROBLÉMATIQUE.....	25
1.11.1. Hypothèse	25
1.11.2. Objectif.....	25
1.11.3. Méthodologie.....	26
1.12. RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	27
1.13. CONCLUSION	28

CHAPITRE 2

ARTICLE 1: RESISTANCE OF THE GENOME OF <i>ESCHERICHIA COLI</i> AND <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> TO IRRADIATION EVALUATED BY THE INDUCTION OF CYCLOBUTANE PYRIMIDINE DIMERS AND 6-4 PHOTOPRODUCTS USING GAMMA AND UV-C RADIATIONS	29
--	-----------

DEUXIÈME PARTIE : MISE AU POINT D'UN TEST IMMUNO-FLUORESCENT POUR LA DÉTECTION RAPIDE DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENE</i>.....	40
---	-----------

CHAPITRE 3 : SYNTHÈSE	41
------------------------------------	-----------

3.1. MÉTHODES DE DÉTECTION CONVENTIONNELLES.....	41
3.2. MÉTHODES D'IDENTIFICATION RAPIDES	45
3.3. MÉTHODES BASÉES SUR LA RECONNAISSANCE DES ACIDES NUCLÉIQUES.....	46
3.3.1. Hybridation d'ADN	47
3.3.2. Réaction en chaîne de polymérase ou PCR	47
3.4. MÉTHODES RAPIDES DE DÉTECTION IMMUNOLOGIQUES	48
3.5. LE CHOIX DE L'ANTIGÈNE	50
3.6. LA PROTÉINE P60	51
3.7. PROBLÉMATIQUE.....	53
3.7.1. Hypothèse	53
3.7.2. Objectif.....	54
3.7.3. Méthodologie.....	54
3.8. RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	56

CHAPITRE 4

**ARTICLE 2: A NEW COMPETITIVE FLUORESCENCE IMMUNOASSAY FOR THE
DETECTION OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* 58**

RÉFÉRENCES..... 74

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Effet photoélectrique	9
Figure 2 : Effet Compton.....	10
Figure 3 : Formation des espèces réactives de l'oxygène dans la cellule.....	10
Figure 4 : Structure et composantes de l'ADN.....	12
Figure 5 : Réaction de Fenton.....	13
Figure 6 : Dimères de pyrimidine majoritairement retrouvés dans l'ADN suite à l'irradiation UV-C. Ils sont formés de liens covalents formant un (A) anneau cyclobutane (CPD) ou (B) un lien entre les carbones 6 et 4 (6-4PP).....	14
Figure 7 : Rate of CPD's and 6-4 PP's measured into pure DNA and DNA extracted from <i>L. monocytogenes</i> and <i>E. coli</i> after UV irradiation. Results were obtained by ELISA and are expressed in absorbance unit at 490 nm. Error bars represent the standard deviation.	37
Figure 8 : Rate of CPD's and 6-4 PP's measured into pure DNA and DNA extracted from <i>L. monocytogenes</i> and <i>E. coli</i> after gamma irradiation. Results were obtained by ELISA and are expressed in absorbance unit at 490 nm. Error bars represent the standard deviation.	37
Figure 9 : Protein separation of concentrated cell-free supernatants from overnight culture of various <i>Listeria</i> species by 10 % SDS-PAGE electrophoresis. Lanes: 1, Recombinant p60 protein; 2, <i>L. monocytogenes</i> HPB 2569; 3, <i>L. monocytogenes</i> HPB 2558; 4, <i>L. monocytogenes</i> HPB 1043; 5, <i>L. monocytogenes</i> HPB 2812; 6, <i>L. monocytogenes</i> HPB 2739; 7, <i>L. monocytogenes</i> HPB 2371; 8, <i>L. innocua</i>	69
Figure 10 : Western blot analysis of concentrated cell-free supernatants from overnight culture of various <i>Listeria</i> species using a monoclonal anti-p60 antibody. Lanes: 1, Recombinant p60 protein; 2, <i>L. monocytogenes</i> HPB 2569; 3, <i>L. monocytogenes</i> HPB 2558; 4, <i>L. monocytogenes</i> HPB 1043; 5, <i>L. monocytogenes</i> HPB 2812; 6, <i>L. monocytogenes</i> HPB 2739; 7, <i>L. monocytogenes</i> HPB 2371; 8, <i>L. innocua</i>	69
Figure 11 : Fluorescence immunoassay for detection of <i>L. monocytogenes</i> . Fluorescence emission was recorded at $\lambda_{em} = 576$ nm and is representative of the	

labeled antibody eluted from the column after incubation with cell-free supernatants from overnight culture of various *Listeria* species. Background signals represent the minimal and constant fluorescence emission after several washes. Excitation wavelength was at $\lambda_{\text{ex}} = 550 \text{ nm}$ 72

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Évaluation annuelle des cas de maladie d'origine alimentaire, des hospitalisations et des décès causés par certains pathogènes alimentaires aux États-Unis. (Mead <i>et al.</i> 1999).....	1
Tableau 2 : Sérotypes d' <i>E. coli</i> diarrhéiques fréquemment rencontrés et associés à des éclosions de gastro-entérites.	23
Tableau 3 : Différentiation des espèces de <i>Listeria</i> ¹	44
Tableau 4 : Reactivity of the monoclonal anti-p60 with supernatants from different <i>Listeria</i> strains by direct ELISA	70
Tableau 5 : Non-classical competition ELISA ^a designed to visualise the displacement of the monoclonal anti-p60 from the immobilized recombinant p60 protein to free p60 protein from supernatants.	71

LISTE DES ABRÉVIATIONS

6-4PP : photoproduits pyrimidine (6-4) pyrimidone

⁶⁰Co: Cobalt 60

A: alanine

ADN: acide désoxyribonucléique

AFNOR: Association Française de Normalisation

Ala: alanine

AOAC: Association of Analytical Communities

ARN: acide ribonucléique

ATCC: American Type Culture Collection

BER: base excision repair

BSA: bovine serum albumin

CAMP: Christie Atkins Munch-Petersen

CFU: colony forming unit

CPD: cyclobutane pyrimidine dimer

D. radiodurans: Deinococcus radiodurans

E: acide glutamique

E. coli: Escherichia coli

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

eV: électron-volt

FADH: flavine-adénine dinucléotide

FDA: Food and Drug Administration

FT-IR: Fourier transform infrared spectroscopy

Gln: glutamine

Glu: acide glutamique

Gy: Gray

HRP: horseradish peroxydase

iap: invasion associated protein

ISO: Organisation Internationale de Normalisation

K: lysine

keV: kiloélectron-volt

kGy: kilogray

KLH: keyhole limpet hemocyanin

Lys: lysine

NCTC: National collection of type cultures

NER: nucleotid excision repair

P: proline

PCR: polymerase chain reaction

PIPL-C: phosphatidylinositol phospholipase-C

Pro: Proline

pH: potential d'hydrogène

Q: glutamine

RT-PCR: real time polymerase chain reaction

T: thréonine

Thr: thréonine

USDA-FSIS: United States Department of Agriculture – Food Safety and Inspection Service

UV: ultra-violet

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les aliments contaminés par des microorganismes pathogènes constituent un des principaux vecteurs de transmission de maladies infectieuses. Les impacts économiques et sociaux des maladies d'origine alimentaire ne cessent de s'amplifier en engendrant des coûts importants et en faisant chaque année d'avantage de victimes. À elles seules, les bactéries sont responsables de 90% des cas de toxi-infections alimentaires contre 6% pour les virus et 1% pour les parasites (Bell, 1997). Chaque année aux États-Unis, environ 76 millions de personnes sont atteintes de maladies d'origine alimentaire et environ 5000 d'entre elles vont en mourir (OMS, 2007). Le tableau 1 démontre une estimation du nombre de cas de maladie d'origine alimentaire de même que le nombre cas d'hospitalisation et le nombre de décès causés par les pathogènes les plus communs.

Tableau 1 : Évaluation annuelle des cas de maladie d'origine alimentaire, des hospitalisations et des décès causés par certains pathogènes alimentaires aux États-Unis. (Mead et al. 1999)

Agent pathogène	Cas de maladie	Hospitalisation	Décès
Bactérie			
<i>Campylobacter</i> sp	1 963 141	10 539	99
<i>Clostridium perfringens</i>	248 520	41	7
<i>Escherichia coli</i> O157H7:	62 458	1 843	52
<i>Listeria monocytogenes</i>	2 493	2 298	499
<i>Salmonella</i> , non typhoïde	1 341 873	15 608	553
<i>Staphylococcus</i> d'origine alimentaire	185 060	1 753	2
<i>Vibrio cholerae</i> , toxigénique	49	17	0
<i>Vibrio vulnificus</i>	47	43	18
Parasite			
<i>Toxoplasma gondii</i>	112 500	2 500	375

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (1997), le coût des frais médicaux et des pertes en productivité engendrés par les toxi-infections alimentaires se chiffre à environ 35 milliards de dollars par an aux États-Unis. Le nombre de cas d'éclosion dus à ces bactéries est en constante augmentation et les facteurs pouvant contribuer à cette émergence sont nombreux. Les changements démographiques et comportementaux de l'homme, les modifications au niveau de l'industrie alimentaire dans la production et la

transformation, les voyages et le commerce international, le développement économique, le relâchement des mesures de santé publique de même que l'adaptation des microorganismes en sont des exemples (Altekruse *et al.*, 1997). Quoiqu'il en soit, le secteur agro-alimentaire doit s'investir d'avantage et remplir son rôle qui est essentiel pour la santé publique et surtout ne plus dépendre des facteurs économiques. La problématique de la contamination microbienne doit être maîtrisée par la mise en place d'une approche adaptée à chaque point critique de la chaîne de production, de transformation et de consommation. L'assurance de l'innocuité et de la salubrité des aliments passe par deux étapes fondamentales.

La première étape réside dans l'application de traitements physiques et chimiques, utilisés en combinaison, pour contrôler les microorganismes nuisibles dans les aliments transformés et prêts-à-manger pour ainsi en assurer la qualité et la durée de vie. Parmi la multitude de traitements disponibles, l'irradiation des aliments connaît un essor considérable depuis quelques années et est devenue l'une des technologies les plus étudiées dans le domaine alimentaire. Cette vague d'intérêt pour le développement de nouveaux procédés s'explique facilement. Les exigences des consommateurs vis-à-vis la qualité des produits qu'ils achètent obligent l'industrie alimentaire à adopter de nouvelles technologies et développer des stratégies pour répondre aux normes de qualité de plus en plus élevés. En effet, la préférence des consommateurs pour des produits ayant subis un minimum de transformation tout en étant exempts de conservateurs chimiques force l'élaboration de nouvelles procédures pour préparer et conserver les aliments. De plus, le contexte actuel de mondialisation des marchés et l'accroissement de la population fait grimper la demande alimentaire mondiale. Cette demande exige plus de transport et de manutention des aliments et augmente les risques de contamination par des microorganismes pathogènes ou responsables de la dégradation des denrées alimentaires. En dépit du fait que l'utilisation de l'irradiation comme traitement physique pour la décontamination des aliments soit approuvée par plusieurs organismes législatifs dans différents pays, l'impact de ce traitement et les mécanismes de résistance des microorganismes suscitent encore des interrogations.

La deuxième étape de l'assurance de l'innocuité des aliments repose sur le contrôle des produits et de leur environnement par le dépistage des pathogènes à différents points critiques de la chaîne de production-transformation. À ce titre,

l'utilisation de tests de détection rapides permettant de confirmer la présence ou l'absence des différents pathogènes alimentaires constitue le moyen le plus efficace. Il existe une grande variété de méthodes actuellement disponibles pour la détection et l'identification des principaux pathogènes alimentaires dans les aliments et dans l'environnement. Le développement de nouvelles méthodes est en perpétuelle évolution pour permettre de perfectionner les techniques et de pallier aux lacunes des méthodes déjà existantes.

Pour faciliter la compréhension du lecteur, ce mémoire se divise en deux parties, chacune traitant d'une des étapes susmentionnées nécessaires à assurer l'innocuité des aliments. La première partie porte sur l'évaluation de la résistance du génome bactérien à l'irradiation gamma et s'intéresse à la compréhension des facteurs pouvant jouer un rôle dans la survie des microorganismes suite à un traitement d'irradiation. Il y sera question de l'effet du type de bactérie (Gram positif ou Gram négatif) dans le maintien de l'intégrité du génome. Dans la deuxième partie, le développement d'une nouvelle méthode de détection de *Listeria monocytogenes* est présenté comme moyen d'assurer une meilleure sécurité alimentaire. Les expériences effectuées mettent d'avantage l'emphase sur la validation du fonctionnement du test plutôt que sur l'optimisation de celui-ci ou sur la procédure d'utilisation.

PREMIÈRE PARTIE : ÉVALUATION DE LA RÉSISTANCE DU GÉNOME BACTÉRIEN À L'IRRADIATION GAMMA

CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE

1.1. Qu'est-ce que la radioactivité?

La radioactivité est un phénomène physique naturel au cours duquel des noyaux atomiques instables se désintègrent en dégageant de l'énergie sous forme de rayonnements divers, pour se convertir en des noyaux atomiques plus stables. Les rayonnements ainsi émis sont appelés, selon le cas, rayons alpha (α), rayons bêta (β) ou rayons gamma (γ). L'irradiation consiste à exposer un objet à l'un ou l'autre de ces rayonnements. L'unité employée pour quantifier l'énergie des radiations est l'électron volt (eV) (Cooke *et al.*, 2003). En général, plus la valeur de l'énergie d'émission est élevée, plus la radiation parcourt une longue distance. La dosimétrie mesure la quantité d'énergie absorbée par un corps inerte ou vivant. L'unité de dosimétrie utilisée pour les objets est le Gray (Gy). Le Gray est la quantité d'énergie (Joule) déposée par unité de masse (kg) de matière irradiée. 1 Gray correspond à 1 joule kg⁻¹ (Moseley, 1989, Willemoti, 1996). Pour l'irradiation des aliments, les doses utilisées sont souvent caractérisées comme étant faibles (<1 kGy), moyennes (1-10 kGy) ou élevées (>10 kGy) (Willemoti, 1996).

1.2. Rayons ionisants

Les rayons α , β et γ sont tous de type ionisant. Les rayons ionisants interagissent avec la matière irradiée en créant des ions positifs et négatifs suite à un transfert d'énergie aux électrons. Lorsqu'un électron reçoit assez d'énergie, il peut être éjecté de son orbite créant ainsi une perte de charge négative. Un ion positif est donc formé. L'électron qui a été expulsé peut à son tour aller ioniser un autre atome environnant. Les rayons γ sont des rayonnements de type électromagnétique constitués de photons de haute énergie (>100 keV) émis à des longueurs d'ondes très courtes (<5 pm). Bien qu'ils possèdent un pouvoir ionisant plus faible que les α et les β , les rayons γ demeurent les plus pénétrants, sans toutefois modifier la structure des noyaux les empêchant ainsi d'induire de la radioactivité dans la matière irradiée. Ils sont par le fait même les seuls à être utilisés pour l'irradiation des aliments (Mahapatra *et al.*, 2005).

1.3. Rayons non-ionisants

Les rayons ultraviolets quant à eux, sont des rayonnements de type électromagnétiques formés d'un photon de faible énergie (3-124 eV) émis à des longueurs d'ondes entre 10 et 400 nm. Leur faible énergie ne leur confère pas de pouvoir ionisant mais ils peuvent tout de même avoir des effets très dommageables au sein d'une cellule vivante. Les rayons UV sont classés selon leur longueur d'onde et leur pouvoir de pénétration. De façon générale, on les divise en trois plages de longueur d'onde de la manière suivante : les UV-A (320-400 nm), les UV-B (280-320 nm) et les UV-C (200-280 nm). Dans la catégorie des UV-C, il y a aussi les V-UV pour "vacuum ultraviolet" (100-200 nm) et les X-UV pour "extreme ultraviolet" (10-100 nm) qui sont produits dans des conditions particulières et qui ont des utilités très spécifiques. Les rayons UV agissent sur la cellule en perturbant la structure de l'ADN et de l'ARN. Comme la longueur d'onde la plus absorbée par l'ADN est environ 260 nm, ce sont les rayons UV-C qui sont utilisés pour l'inactivation des microorganismes. La dose de rayonnement UV, aussi appelée la fluence, s'exprime généralement en mJ/cm^2 et représente la quantité d'énergie absorbé en Joule (J) par une surface de 1 cm^2 . Cette dose dépend de l'intensité du rayonnement qu'on appelle irradiance et qui s'exprime en $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ce qui correspond à l'énergie radiante totale appliquée sur une surface située à un mètre de la source. Une dose de $1 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ correspond à $1000 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ par seconde (T. N. Koutchma, 2009).

1.4. Applications potentielles de l'irradiation gamma

L'irradiation γ offre plusieurs applications potentielles selon le type d'aliment qu'on irradie et selon ce à quoi l'aliment est destiné. Les quatre applications principales sont la désinfestation, l'augmentation de la durée de vie, la décontamination et l'augmentation de la qualité de certains aliments (Rahman, 2007).

La désinfestation des aliments est une étape très importante qui survient après la récolte, notamment des fruits et des légumes, et elle implique souvent l'utilisation de produits chimiques. Elle a pour but de contrôler la présence d'insectes qui pourraient endommager le produit et en altérer l'aspect visuel. Il a été démontré qu'à une certaine

dose ($\approx 0,3$ kGy), on peut facilement procéder à la désinfestation des fruits (Willemoti, 1996).

L'augmentation de la durée de vie peut être abordée de trois façons selon l'effet recherché par l'irradiation. Tout d'abord, on peut, à des doses variant entre 0,02 et 0,15 kGy, inhiber la germination des pommes de terre, des oignons et de l'ail. On peut aussi ralentir le murissement et le vieillissement de certains fruits tropicaux comme la banane, les litchis, les avocats, la papaye et les mangues à des doses variant entre 0,12 et 0,75 kGy (Josephson *et al.*, 1982). La durée de vie des produits périssables comme le bœuf, la volaille et les fruits de mer peut aussi être augmentée en réduisant le nombre de microorganismes capables de les détériorer à des doses entre 2 et 3 kGy. On sait aussi que généralement, les fruits perdent progressivement leur résistance aux phytopathogènes à mesure qu'ils mûrissent. L'utilisation d'une faible dose d'irradiation (≤ 1 kGy) peut donc aider à maintenir une meilleure résistance des fruits en ralentissant le murissement et les microorganismes nuisibles sont du même coup diminués (Willemoti *et al.* 1996).

Le traitement par radiation à des doses variant entre 2 et 7 kGy, dépendamment des conditions d'irradiation et du type d'aliment, peut éliminer efficacement ou du moins diminuer considérablement le nombre de microorganismes pathogènes comme *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter sp.* et *E. coli* O:157H:7 (Farkas, 1998). Ce traitement qui vise à réduire le nombre de bactéries ou à les éliminer s'appelle la décontamination. À titre d'exemple, des études ont démontré qu'à des doses allant jusqu'à 4,5 kGy, on pouvait réduire la population de *Listeria monocytogenes* et de quatre autres espèces de *Listeria* dans le porc d'un facteur allant jusqu'à 10,1 log (Tart *et al.*, 1996). Les auteurs ont conclu que grâce à l'irradiation, les côtelettes de porc ne présentaient plus de pathogènes après une conservation de 7 jours à 7°C. Des résultats similaires ont été obtenus avec des légumes frais et des légumes coupés contaminés avec *L. monocytogenes* (Bari *et al.*, 2005).

L'amélioration de la qualité de certains produits est une autre application de l'irradiation qu'il ne faut pas négliger. Les graines de certaines plantes comme le soya sont une excellente source de protéines et de nutriments. On sait que dans les pays en voie de développement, les aliments riches en protéines sont rares rendant ainsi l'apport protéique difficile. Weber *et al.* (1977) ont proposé quelques plantes riches en protéines

pouvant être utilisées comme élément de solution. Or, bien que cette alternative soit profitable économiquement, il reste que les qualités nutritive et digestive des protéines végétales sont affectées par la présence de facteurs « antinutritifs » comme des inhibiteurs de protéases, inhibant notamment la trypsine et la chymotrypsine (Abu-Tarboush, 1998). Une étude a démontré qu'une dose de 10 kGy pouvait rendre les graines de soya plus digestes en détruisant ces inhibiteurs de protéases qui rendent la digestion des protéines plus difficiles. D'autres graines ont aussi été testées pour d'autres substances comme des inhibiteurs de l' α -amylase, des composés phénoliques ou des phytates qui diminuent notre capacité à les digérer (Abu-Tarboush, 1998). Les résultats démontrent une diminution de l'activité des substances inhibitrices et une augmentation de la digestion protéique *in vitro*. Lorsqu'on parle de qualité des aliments, cela concerne aussi l'ajout d'additifs chimiques qui sont souvent destinés à prolonger leur durée de conservation. L'utilisation de la radiation permet de réduire l'addition de substances comme les nitrites, les sulfites et le sel qui ne font pas toujours l'unanimité auprès des consommateurs. Il a aussi été démontré que l'irradiation pouvait servir à réduire ou à éliminer certains produits indésirables présents dans les aliments incluant les allergènes alimentaires (M. J. Kim *et al.*, 2002a, Lee *et al.*, 2000), les N-nitrosamines volatiles cancérigènes (Ahn *et al.*, 2002), les amines biogènes (J. H. Kim *et al.*, 2003) et réduire la toxicité du gossypol (Jo *et al.*, 2003).

1.5. Applications potentielles de l'irradiation UV-C

L'irradiation UV est utilisée dans l'industrie alimentaire pour différents usages. La principale application est la décontamination des surfaces des différents équipements utilisés dans les usines alimentaires. Par exemple, dans les usines de production fromagère ou de transformation de viande, plusieurs équipements sont décontaminés à l'aide de rayons UV-C en plus des méthodes usuelles de nettoyage. L'irradiation UV est aussi utilisée pour la décontamination des surfaces de convoyeur ou encore de plusieurs produits destinés à l'emballage comme des bouteilles, des bouchons, des films ou des cartons d'emballage. La décontamination par les UV-C ne vise toutefois pas seulement les surfaces lisses et les contenants d'emballage. Elle peut aussi être appliquée aux aliments directement même si peu de données sont disponibles pour cette application. En effet, la plupart des études sur l'utilisation des UV-C pour le contrôle des microorganismes concernent les milieux liquides ou l'air. Comme les

rayons UV-C sont peu pénétrants, leur utilisation est plus restreinte et l'efficacité du traitement dépend en grande partie de la nature et du relief de la surface (Gardner *et al.*, 2000, T. N. Koutchma, 2009).

L'une des applications potentielles pour le traitement direct des produits alimentaires est la décontamination des carcasses de viande suite à l'abattage. Quelques études ont déjà évalué le potentiel de l'irradiation UV pour la réduction du nombre de bactéries comme *Escherichia coli* et *Salmonella* sur la peau et la viande de porc (Wong *et al.*, 1998) de même que *Listeria monocytogenes* (T. Kim *et al.*, 2002b) et *Salmonella typhimurium* (Wallner-Pendleton *et al.*, 1994) sur la viande et les carcasses de volaille.

1.6. Mode d'action de l'irradiation gamma

1.6.1. Effets directs et indirects

Les effets des radiations γ sur le matériel biologique peuvent être directs ou indirects. Les effets directs sont le résultat du transfert d'énergie vers les molécules irradiées. Les radiations agissent donc directement sur les composantes cellulaires et causent des dommages. Cette action directe peut être causée par un effet photoélectrique (Figure 1). C'est lorsqu'un photon incident transfère toute son énergie à un électron orbital, généralement sur un des deux niveaux les plus internes. Si cette énergie est supérieure à l'énergie de liaison qui retient l'électron dans l'atome, il sera éjecté de l'atome et le rayon γ disparaît. L'électron ainsi éjecté pourra à son tour entrer en collision avec d'autres électrons et ioniser d'autres atomes.

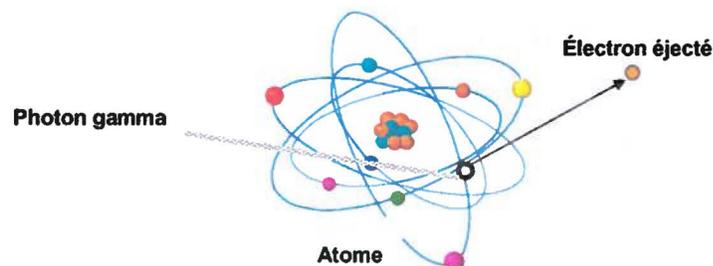


Figure 1 : Effet photoélectrique

L'action directe des radiations γ peut aussi être causée par l'effet Compton. Encore une fois, on parle ici de collision avec un photon et un électron. Par contre, contrairement à ce qui se produit dans l'effet photoélectrique, le photon ne disparaît pas. On peut comparer ce phénomène à deux boules de billard qui se frappent et qui suivent ensuite des trajectoires précises en fonction de l'angle d'impact et de l'énergie de la première boule. Si l'énergie du photon incident est très élevée par rapport à l'énergie de liaison de l'électron, une partie de l'énergie du photon sera transférée à l'électron qui sera éjecté de l'atome, puis le photon sera dévié (Figure 2) et sa longueur d'onde augmentée dû à sa perte d'énergie. On parle alors de photon diffusé. Ce dernier se propage dans la matière sans déposer d'énergie jusqu'à ce qu'il interagisse à nouveau avec un autre électron et finisse par être absorbé par l'effet photoélectrique.

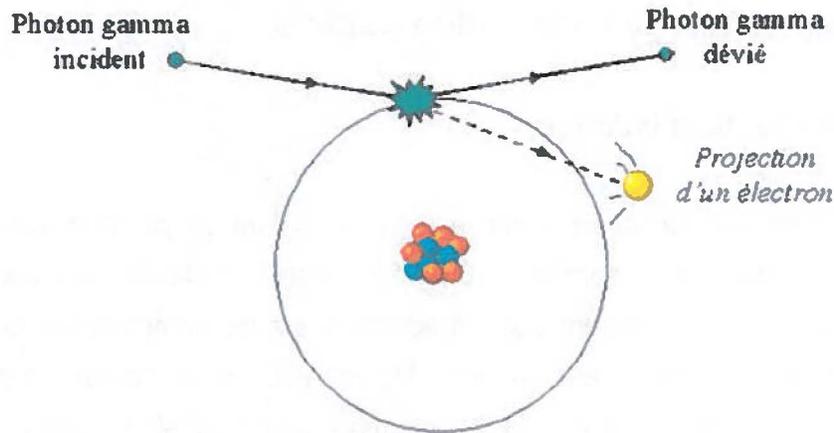


Figure 2 : Effet Compton

Les effets indirects surviennent, pour leur part, suite à la production de radicaux libres provoqués par la radiolyse de l'eau. Les principaux radicaux libres produits par l'irradiation sont l'hydroxyle ($\text{OH}\cdot$), l'hydrogène ($\text{H}\cdot$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le superoxyde ($\text{O}_2\cdot^-$) et les électrons hydratés (e^-_{aq}). On appelle ces composés des espèces réactives de l'oxygène (Imlay, 2003) (Figure 3).

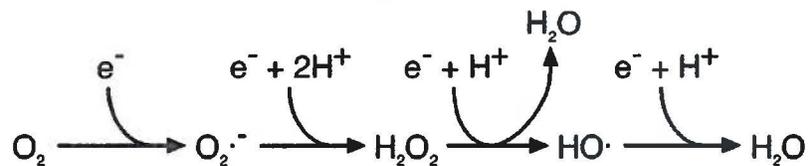


Figure 3 : Formation des espèces réactives de l'oxygène dans la cellule

Dans une cellule vivante, ces composés peuvent être très toxiques et causer des dommages à certaines molécules essentielles comme l'ADN et les protéines. On parle alors de dommage ou stress oxydatif.

1.6.2. Effets biologiques

Comme nous venons de le voir, les rayons ionisants sont capables de déloger les électrons de leur atome pour produire des ions. Au sein d'une molécule, ces changements peuvent causer des bris dans les liaisons chimiques ou en créer de nouvelles. Dans une cellule vivante, les molécules déterminantes susceptibles d'être endommagées sont l'ADN, l'ARN, les protéines et les lipides membranaires (Daly *et al.*, 2007, Willemoti, 1996). De tous les dommages engendrés par l'irradiation, ceux qui surviennent dans l'ADN sont généralement ceux qui ont le plus d'impact sur la viabilité des cellules. Ces dommages peuvent être des modifications chimiques au niveau des bases azotées, des insertions ou des délétions de nucléotides, des coupures simple ou double brin et l'apparition de liens covalents entre les nucléotides d'un même brin ou de brins différents (Le-Tien *et al.*, 2007). Trois raisons peuvent expliquer l'importance des dommages causés à l'ADN. Premièrement, le génome qui occupe la plus grande partie du volume de la cellule risque davantage d'être endommagé par les radiations. Deuxièmement, il y a peu de copies du génome comparativement aux autres molécules qui se retrouvent souvent en grande quantité. Il y a donc moins de chance que les fonctions des molécules d'ADN endommagées soient remplies par d'autres molécules intactes. Troisièmement, et la plus importante, le génome est chargé de réguler toutes les fonctions cellulaires. La perte de n'importe quelles portions du génome peut être catastrophique pour un organisme unicellulaire (Cox *et al.*, 2005). Daly (2007) a cependant émis l'hypothèse que pour un certain groupe de bactéries, le niveau de radiorésistance dépend directement du degré de dommage oxydatif infligé aux protéines. Il a présenté l'idée que les protéines, plutôt que l'ADN, sont la principale cible biologique des rayons ionisants et que la résistance extrême de certaines bactéries aux radiations est basée sur la protection des protéines. Il n'en reste pas moins que la majorité des études sur le sujet soutiennent le fait que l'ADN demeure la cible principale de l'irradiation (Cooke *et al.*, 2003, Mahapatra *et al.*, 2005, Sanchez-Reyes, 1992). L'ADN est une longue molécule constituée de deux brins complémentaires de nucléotides reliés entre eux pour former une structure hélicoïdale. Chaque nucléotide

est formé d'un sucre à cinq carbones, le désoxyribose, d'un groupement phosphate et de l'une des quatre bases azotées suivantes : la guanine et l'adénine qui sont les purines ou la cytosine et la thymine qui sont les pyrimidines. Dans chacun des brins, les nucléotides sont reliés entre eux par des liens 3'-5' phosphodiester formés par le groupement phosphate entre les désoxyriboses de chaque nucléotide. Les deux chaînes de nucléotides sont elles-mêmes reliées entre elles par des liaisons hydrogènes formées entre la cytosine et la guanine et entre l'adénine et la thymine spécifiquement.

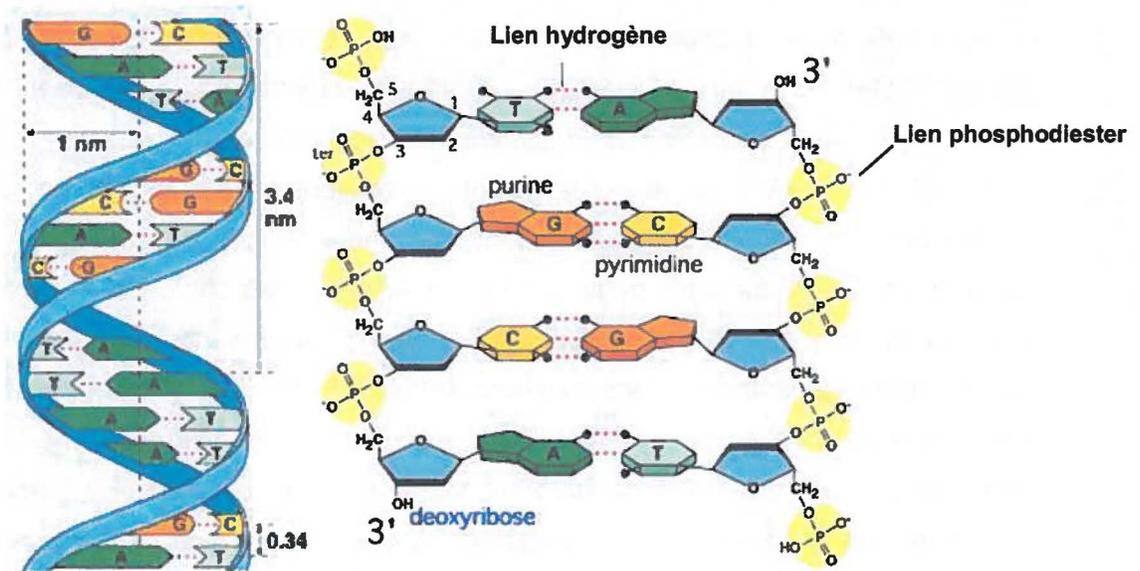


Figure 4 : Structure et composantes de l'ADN.

De toutes les espèces réactives de l'oxygène formé par l'irradiation, le radical qui possède le plus grand pouvoir oxydant est l'hydroxyle ($\text{OH}\cdot$). C'est le seul radical libre capable d'endommager directement la plupart des biomolécules de façon non spécifique (Daly, 2009). Il agit sur l'ADN en brisant les liens phosphodiester qui relient les nucléotides entre eux. La coupure d'un lien phosphodiester engendre une lésion simple brin. Ce type de lésion est facile à réparer et n'a pas de conséquences désastreuses pour la cellule. Par contre, si une autre lésion simple brin survient sur le brin opposé à proximité de l'autre, il se produit alors un bris double brin beaucoup plus difficile à réparer et potentiellement létal (Cox *et al.*, 2005). Bien que le radical $\text{OH}\cdot$ soit le plus dévastateur, la présence de H_2O_2 et d'ions superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ est aussi néfaste pour la cellule.

En effet, ces deux composés jouent un rôle déterminant dans la production de radical OH• par la réaction de Fenton (Figure 5).

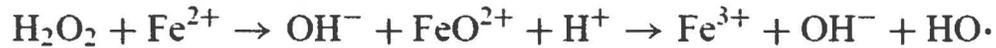


Figure 5 : Réaction de Fenton

Cette réaction est la décomposition du H₂O₂ par un ion ferreux (Fe²⁺) pour produire des OH•. En plus d'être l'un des précurseurs réactionnels, le H₂O₂ est capable d'endommager de façon modérée les protéines Fe-S (fer-souffre) libérant ainsi des ions de fer nécessaire à la réaction. Le superoxyde (O₂⁻) pour sa part, cible spécifiquement les groupements prosthétiques des protéines Fe-S pour libérer le Fe des protéines avec beaucoup plus d'efficacité que le H₂O₂ en raison de leur charge négative (Daly, 2009, Imlay, 2003).

1.7. Mode d'action de l'irradiation UV

1.7.1. Effets biologiques

Les rayons UV-C induisent différents types de dommages en agissant directement sur l'ADN et les protéines (Setlow *et al.*, 1964). Ceci est dû au fait que ces deux types de molécules absorbent de façon maximale les longueurs d'ondes correspondant aux UV-C c'est-à-dire 260 nm pour l'ADN et 280 nm pour les protéines. En plus de causer l'agrégation des protéines, les UV-C peuvent cliver les ponts disulfures (Chan *et al.*, 2006). Pour l'ADN, les photons qui sont absorbés peuvent causer l'excitation des bases pyrimidiques. Il peut alors s'ensuivre des réactions de dimérisation entre les bases adjacentes soit entre deux thymines, entre une thymine et une cytosine ou entre deux cytosines. Les deux types de dimères pyrimidiques les plus abondants sont les dimères de type cyclobutane (CPD) et les photoproduits pyrimidine (6-4) pyrimidone (6-4PP) (Figure 6) qui sont produits dans un ratio de 3 pour 1 respectivement (Moeller *et al.*, 2007, Sinha *et al.*, 2002).

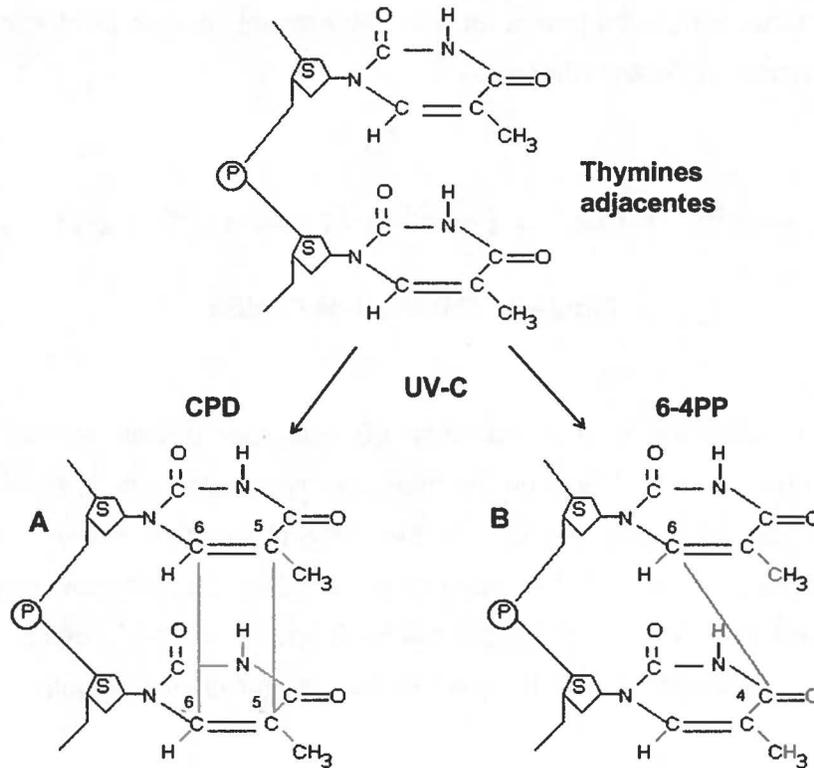


Figure 6 : Dimères de pyrimidine majoritairement retrouvés dans l'ADN suite à l'irradiation UV-C. Ils sont formés de liens covalents formant un (A) anneau cyclobutane (CPD) ou (B) un lien entre les carbones 6 et 4 (6-4PP).

Les lésions CPD et 6-4PP, lorsqu'elles sont formées, produisent une distorsion du brin d'ADN en induisant un léger repliement de 7-9° ou un coude de 44° (J. K. Kim *et al.*, 1995, C. I. Wang *et al.*, 1991). Ces distorsions interfèrent entre autres dans l'activité normale de l'ARN polymérase et de l'ADN polymérase, deux enzymes respectivement impliquées dans la synthèse protéique et dans la duplication du génome. Les fonctions vitales de la cellule qui sont ainsi affectées peuvent mener à l'introduction de mutations dans le génome ou à la mort cellulaire lorsque les dommages sont trop importants (Friedberg *et al.*, 1995).

1.8. Facteurs influençant la radiorésistance bactérienne

1.8.1. La dose absorbée

En règle générale, plus la dose d'irradiation est élevée, moins il y a de bactéries qui survivent à l'irradiation. La quantité de dommages cellulaires causés par l'irradiation est proportionnelle à la quantité d'énergie absorbée. Par exemple, pour une irradiation gamma, on sait qu'une dose de 5 kGy produit environ 200 bris double brins dans le chromosome de *Deinococcus radiodurans* (Cox *et al.*, 2005). Des doses trop fortes peuvent cependant altérer les qualités nutritionnelles et organoleptiques de certains aliments. Par conséquent, des doses suffisamment élevées pour atteindre l'effet biologique souhaité mais suffisamment basse pour préserver la qualité du produit sont généralement envisagées. Des combinaisons de traitements peuvent cependant permettre de réduire la dose nécessaire pour éliminer un pathogène, assurer l'innocuité et protéger en même temps les propriétés physico-chimiques et organoleptiques de l'aliment.

1.8.2. La nature du microorganisme

Les microorganismes ne présentent pas tous la même sensibilité à l'irradiation. Comme l'ADN est la principale cible des radiations, plus un organisme est complexe, plus il sera sensible. Ainsi, les virus sont plus difficiles à éliminer par irradiation que les insectes, et les parasites. Les bactéries ont une sensibilité intermédiaire dépendamment de leur espèce. Certaines possèdent des mécanismes qui leur permettent de faire face aux dommages infligés par les radiations les rendant ainsi plus résistantes. On doit donc tenir compte de ou des espèces microbiennes que l'on veut éliminer pour s'assurer d'utiliser une dose suffisante. À titre d'exemple, pour la bactérie *Deinococcus radiodurans*, 10% des cellules peuvent survivre à une dose aussi forte que 12 kGy alors que des doses de 0,07 et 0,7 Gy peuvent tuer 90% des cellules d'une population de *Shewanella oneidensis* et d'*Escherichia coli* respectivement (Ghosal *et al.*, 2005). La taille des cellules influence aussi la résistance à l'irradiation. Plus l'organisme qui est ciblé est petit, plus il sera résistant (Rahman, 2007). De plus, on sait que généralement, les bactéries à Gram positif sont plus résistantes que les bactéries à Gram négatif. Toutefois, des exceptions subsistent comme la cyanobactérie Gram négatif

Chroococcidiopsis qui est très résistante et *Micrococcus luteus*, une bactérie gram Gram positif très sensible. Le stade de croissance est aussi un élément déterminant de la radiorésistance. Les bactéries métaboliquement actives en phase logarithmique de croissance sont particulièrement sensibles tandis que les spores, qui sont des structures dormantes, sont beaucoup plus résistantes (Ghosal *et al.*, 2005, Mahapatra *et al.*, 2005).

1.8.3. La nature et les conditions du milieu

Les caractéristiques physiques des produits alimentaires varient énormément entre eux. La densité, le taux d'humidité ou la présence d'antioxydants sont des facteurs qui peuvent faire varier la radiosensibilité des microorganismes. La même bactérie peut donc être plus ou moins sensible selon l'aliment dans lequel elle se retrouve. Cela explique entre autres que *Salmonella typhimurium* ait une D_{10} plus élevée dans le bœuf haché (0,59 kGy) que dans le poulet (0,44-0,50 kGy) (Farkas, 1998, Mahapatra *et al.*, 2005). De plus, pour un même type de produit, notamment comme la laitue, chaque variété doit être prise de façon indépendante pour évaluer la dose nécessaire pour éliminer chaque pathogène. Niemira *et al.* (2003) ont révélé que la sensibilité de *Salmonella* varie significativement lorsqu'elle se retrouve dans la laitue Iceberg, la Boston, la Frisée ou la laitue rouge. On peut aussi dire qu'en général, les bactéries sont plus résistantes si elles sont irradiées dans un état congelé. La D_{10} de *Campylobacter jejuni* est de 0,16 kGy à 5°C et cette valeur augmente considérablement pour atteindre 0,32 kGy à -30°C dans le bœuf haché (Lambert *et al.*, 1984). Ce phénomène s'explique par le fait que la formation de radicaux libres est presque nulle si le produit est congelé, déshydraté ou séché. Puisque les radicaux libres sont formés par la radiolyse de l'eau, la contribution des effets indirects sera considérablement réduite en absence ou en présence d'une faible teneur en eau (Moseley, 1989).

1.8.4. Les mécanismes de réparation de l'ADN

Selon la dose de radiation absorbée, les dommages causés à l'ADN des bactéries peuvent être pris en charge et réparés par différents systèmes spécialisés. Le premier type de dommages survient lorsque les bases de l'ADN subissent des modifications chimiques dues au stress oxydatif. Les bases endommagées peuvent être identifiées, retirées et remplacées par deux mécanismes principaux : la réparation par

excision de base (BER) et la réparation par excision de nucléotide (NER) (Cooke *et al.*, 2003). Plusieurs enzymes doivent être impliquées pour que la réparation soit complète. Pour le système de réparation BER, la réparation se fait sur une seule base à la fois. Tout d'abord, une ADN glycosylase enlève la base endommagée pour ensuite permettre à une endonucléase de cliver le désoxyribose afin d'éliminer complètement la base endommagée. D'autres enzymes dont l'ADN polymérase et l'ADN ligase viennent remplacer la base manquante et suturer les deux brins d'ADN. Il existe plusieurs types de BER glycosylase qui agissent sur des bases endommagées spécifiques. Par exemple, chez *E. coli*, on connaît 3 glycosylases différentes: la formamidopyrimidine-ADN glycosylase qui enlève les purines oxydées, l'endonucléase III qui enlève les bases pyrimidiques oxydées et l'endonucléase VIII qui a sensiblement les mêmes substrats que l'endonucléase III (Burgess *et al.*, 2002). Pour le système de réparation NER, la réparation passe par l'excision d'un segment de plusieurs nucléotides encadrant la lésion sur le brin endommagé. Plusieurs facteurs protéiques sont aussi nécessaires à la réaction qui comprend 5 étapes générales: la reconnaissance de la zone endommagée, l'incision, l'excision, la synthèse de réparation et la ligation finale. Tout d'abord, la reconnaissance de la région endommagée se fait par un complexe protéique nommé UvrABC. Ce complexe a la capacité de reconnaître une gamme très large de dommages incluant les CPD et les 6-4PP. Le complexe protéique ainsi fixé permet à une endonucléase de se fixer et d'inciser la région endommagée qui est ensuite excisée. L'ADN polymérase et l'ADN ligase viennent ensuite réparer la région manquante (Van Houten, 1990).

L'ADN photolyase est une enzyme très importante pour la réparation des lésions de type dimère de pyrimidine. L'enzyme, capable de reconnaître spécifiquement les CPD (CPD photolyase) et les 6-4PP (6-4PP photolyase), répare les dommages en utilisant l'énergie de la lumière par une réaction appelée photoréactivation. L'ADN photolyase est une protéine monomérique flavine-dépendante ayant un poids moléculaire de 50 à 65 kDa. Il existe deux types d'enzyme selon le chromophore qu'elle contient: le 5,10-méthényltetrahydrofolate (type I) ou le 8-hydroxy-5-deazariboflavin (type II) qui ont des maximum d'absorption de 380 et 440 nm respectivement. Ces chromophores agissent comme des antennes pour capter les photons et transférer l'énergie d'excitation à un cofacteur, le flavine-adénine dinucléotide (FADH'). Ce

cofacteur, à l'état excité, donne un électron qui clive l'anneau cyclobutane réparant ainsi le dimère de pyrimidine (Sancar, 1994, Sinha *et al.*, 2002, Thoma, 1999).

Maintenant reconnu comme un mécanisme important de réparation de l'ADN, la recombinaison homologue fut initialement identifiée chez les bactéries comme un phénomène fondamental dans le maintien de la diversité génétique bactérienne. Elle est responsable en partie du maintien de l'intégrité du génome en réparant les lésions simple et double brin induites en grande quantité dans l'ADN par l'irradiation gamma. Elle survient entre deux séquences identiques sur deux molécules d'ADN différentes ou rapprochées sur la même molécule. Le schéma général de la recombinaison homologue est commun à tous les organismes étudiés à ce jour. Il s'agit d'une étape centrale d'invasion et d'échange d'un brin d'ADN catalysé par la protéine RecA ou un homologue. La recombinaison homologue débute par deux complexes enzymatiques qui préparent l'ADN afin d'obtenir un seul brin fixé à RecA. Le complexe RecFOR initie la réparation des bris simple brin et le complexe RecBCD initie celle des bris double brin. Plusieurs autres enzymes sont nécessaires dont une hélicase et une endonucléase (Kuzminov, 1999, Roca *et al.*, 1990, Rocha *et al.*, 2005).

1.8.5. Protection contre les dommages oxydatifs

Comme il a été discuté précédemment, les rayons gamma agissent de façon indirecte sur les composantes cellulaires en induisant la formation de radicaux libres ou espèces réactives de l'oxygène très toxiques pour la cellule. La neutralisation de ces radicaux libres peut se faire par la voie enzymatique ou non-enzymatique. Les deux principales enzymes impliquées dans la protection antioxydante sont la catalase et la superoxyde dismutase. Ces deux enzymes catalysent respectivement la dismutation du peroxyde et des ions superoxyde (O_2^-) (McCord *et al.*, 1971). Il a été démontré que lorsqu'un des gènes codant pour l'une ou l'autre de ces enzymes est inactivé chez *Deinococcus radiodurans*, la bactérie, qui est habituellement très résistante à l'irradiation, devient plus sensible (Markillie *et al.*, 1999). Parmi les antioxydants non-enzymatiques, le manganèse (Mn), qui s'accumule dans la bactérie *D. radiodurans* suite à l'irradiation, semble jouer un rôle clé contre le stress oxydatif (Daly *et al.*, 2004, Tian *et al.*, 2009). Certaines bactéries ont aussi la capacité de synthétiser certaines molécules

comme les vitamines D et E ou encore certains pigments comme les caroténoïdes aussi reconnus pour conférer une résistance contre le stress oxydatif (Lemee *et al.*, 1997, Melin *et al.*, 1999, P. Wang *et al.*, 1995).

1.9. La bactérie *Listeria monocytogenes*

1.9.1. Description générale

Listeria monocytogenes est un bâtonnet Gram positif non sporulé et non embranché qui mesure entre 0,5 et 2 µm de longueur par 0,4 à 0,5 µm de largeur. Les bâtonnets se présentent sous la forme isolée ou forment de courtes chaînes de 6 à 20 µm de long. La bactérie est mobile à 28°C grâce à des flagelles péritriches mais cette mobilité est grandement diminuée à 37°C. Bien que la température optimale de croissance se situe entre 30 et 37°C, la bactérie peut croître dans une gamme de température allant de 1 à 45°C, avec ou sans oxygène. Le genre *Listeria* compte cinq autres espèces: *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* et *L. grayi*. Seul *L. monocytogenes* et *L. ivanovii* sont considérés pathogènes. Contrairement à *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* n'est pas un pathogène humain mais animal seulement (Murray *et al.*, 2007, Schuchat *et al.*, 1991). Les souches de *Listeria monocytogenes* peuvent être classées selon un sérotype basé sur la présence d'un antigène somatique (O) et d'un antigène flagellaire (H) qui selon leur combinaison, peuvent mener à 13 sérotypes différents. Bien que les 13 sérotypes soient considérés potentiellement pathogènes, plus de 95% des isolats cliniques appartiennent aux sérotypes 1/2a, 1/2b et 4b. Le sérotype 4b est celui rencontré majoritairement dans les cas d'épidémie humaine tandis que le sérotype 1/2a est le plus souvent isolé des aliments et des usines de transformation alimentaire (Kérouanton *et al.*, 2010, Pan *et al.*, 2010).

1.9.2. Habitats naturels

Il a été démontré que les différentes espèces de *Listeria* sont très largement répandues dans l'environnement. *L. monocytogenes* a été isolé dans le sol (Welshimer, 1960), dans l'eau et dans le composte végétal (Weis *et al.*, 1975, Welshimer, 1968). En effet, dans une étude, Weis *et al.* (1975) ont décelé la bactérie dans 29% des 779 échantillons de plante et de sol et les sérotypes prédominants étaient 1/2b et 4b. Une

autre étude a démontré la capacité de la bactérie à survivre dans l'environnement à partir d'échantillons d'eau d'égout, de boue d'épuration et d'eau de rivière. Le dénombrement bactérien dans la boue d'épuration répandue sur un champ agricole est resté stable pendant plus de 8 semaines (Watkins *et al.*, 1981). Cette étude a confirmé l'implication potentielle de l'usage de matériel fécal, comme agent fertilisant agricole, dans certaines éclosions de listériose dont une survenue en Nouvelle-Écosse (Schlech *et al.*, 1983). La bactérie a aussi été retrouvée dans la nourriture animale, l'ensilage, la viande crue ou congelée, le lait cru, le fromage, les déchets d'abattoirs et dans plusieurs aliments prêt-à-manger comme les charcuteries, les salades de pâtes ou de riz, le poisson fumé à froid et les salades de thon. *L. monocytogenes* a aussi été isolé chez plusieurs espèces de mammifères, d'oiseaux, de poissons, de crustacés et d'insectes. Néanmoins, son habitat primaire reste le sol et le composte végétal. Puisqu'elle est grandement répandue dans l'environnement et qu'elle est en mesure de croître à 4°C, la bactérie *L. monocytogenes* peut facilement entrer dans la chaîne de production et de transformation alimentaires, persister et causer des maladies chez les personnes qui ingéreront les aliments contaminés (Murray *et al.*, 2007).

1.9.3. Importance clinique

Chez les sujets adultes, *L. monocytogenes* peut causer des méningites, des encéphalites et des septicémies. Des symptômes gastro-intestinaux ont aussi été observés chez certains individus ayant une atteinte systémique. *L. monocytogenes* peut aussi causer des gastroentérites fébriles qui surviennent chez des patients sans conditions particulières. Cela se produit généralement suite à l'ingestion d'un fort inoculum ($1,9 \times 10^5$ à 1×10^9 UFC/g ou ml) et dure en moyenne 2 jours. Parmi les symptômes on retrouve la fièvre, des diarrhées, des nausées, des maux de têtes et des douleurs aux articulations et aux muscles. Les personnes âgées et les personnes avec des conditions particulières diminuant leur immunité comme les gens ayant reçu une greffe, ceux atteints d'un lymphome ou de VIH sont particulièrement à risque. Dans de rares occasions, les personnes atteintes ne présentent aucune de ces conditions. Le tropisme de *L. monocytogenes* pour le système nerveux central mène à des maladies sévères causant la mort dans 20 à 50% des cas ou laisse des séquelles neurologiques chez certains survivants. Chez les femmes enceintes, *L. monocytogenes* peut causer une bactériémie s'accompagnant de symptômes pseudo grippaux qui, si elle n'est pas

traitée, peut mener à une placentite et/ou une amniotite suivie d'une infection du fœtus. Comme la bactérie est capable de traverser le placenta, elle peut causer un avortement spontané, un enfant mort-né ou une naissance prématurée.

1.9.4. Importance et problématique de la bactérie dans l'industrie agro-alimentaire

Dans la dernière décennie, plusieurs éclosions de gastroentérites fébriles associées à *L. monocytogenes* ont été rapportées. Les aliments en cause ont été le lait au chocolat, la salade de riz, la salade de thon, la truite fumée à froid, le «corned-beef» de bœuf et de jambon, le fromage et les charcuteries. La période d'incubation varie habituellement de quelques jours à deux ou trois mois. Il est donc souvent difficile d'associer les cas de maladie avec les aliments contaminés puisque les symptômes apparaissent parfois des mois après la consommation de l'aliment. Les cas de listériose sont observés majoritairement dans les pays industrialisés. Ils surviennent de façon sporadique ou épidémique. Dans les deux cas, les aliments contaminés constituent le mode de transmission le plus important. Quelques cas d'infections nosocomiales non associées aux aliments ont été décrits principalement dans les pouponnières dues à des infections croisées et à un cas de contamination d'huile minérale pour le bain. Le nombre de cas sporadiques de listériose dans les pays varie autour de 0,5 et 0,8 cas par 100 000 habitants. Durant une éclosion d'infection d'origine alimentaire, un nombre de 5 cas par 100 000 habitants peut être atteint. Les aliments impliqués sont souvent des aliments prêts-à-manger conservés à 4°C comme la salade de chou, le fromage, les pâtés, les charcuteries et les poissons fumés. Le problème majeur avec *L. monocytogenes* est qu'en dépit d'une quantité initiale négligeable et sans danger de bactéries, leur capacité à se multiplier à 4°C permet d'atteindre un nombre critique durant l'entreposage et la conservation. Ainsi, dans les produits prêts-à-manger qui sont consommés directement sans cuisson, les bactéries sont capables de causer la listériose (Murray *et al.*, 2007).

1.10. La bactérie *Escherichia coli*

1.10.1. Description générale

Escherichia coli est un bâtonnet Gram négatif, non sporulé, faisant partie de la grande famille des *Enterobacteriaceae*. Environ 95 % des souches sont mobiles grâce à des flagelles péritriches. La bactérie peut croître en présence ou en absence d'oxygène et se divise de façon optimale à 37°C (Coia, 1998, Murray *et al.*, 2007). Bien que le pH optimal de croissance soit autour de 7.4, certaines souches sont capables de résister à des pH aussi bas que 4 (Conner *et al.*, 1995). Le genre *Escherichia* compte six espèces toutes potentiellement pathogènes pour l'humain dont *E. coli* qui demeure la plus importante. La classification sérologique d'*E. coli*, tout comme celle de *L. monocytogenes*, est basée sur la présence d'un antigène somatique (O) et d'un antigène flagellaire (H). Bien que 181 antigènes O et 56 antigènes H ont été décrits, les combinaisons associées à des infections intestinales diarrhéiques sont toutefois limitées. *E. coli* est le plus fréquemment isolée du tractus intestinal des humains et des animaux. Elle constitue l'espèce dominante de la flore aérobie facultative intestinale. Sa présence dans l'eau est considérée comme un indice de contamination fécale (Murray *et al.*, 2007).

1.10.2. Importance clinique

Il existe plusieurs souches différentes d'*E. coli* pouvant causer une grande variété d'infections extra-intestinales et intestinales autant chez des personnes en santé que chez des personnes immuno-supprimées. Les infections extra-intestinales les plus fréquentes sont les infections du tractus urinaire, les bactériémies et les méningites. Ces types d'infections sont souvent causés par des bactéries provenant de la propre flore intestinale de l'individu qui se sont propagées jusqu'au site d'infection. Lors d'infections intestinales, les vecteurs principaux de transmission de la bactérie sont l'eau et les aliments contaminés. Les souches diarrhéiques d'*E. coli* sont divisées en cinq groupes selon leur pathogénicité. Le tableau 2 présente les sérotypes responsables d'éclotions de gastro-entérites classés selon les différents groupes d'*E. coli* diarrhéiques. Les *E. coli* entéroinvasives (ECEI) causent des syndromes dysentériques caractérisés par des diarrhées aqueuses, parfois sanguinolentes et muqueuses, accompagnées de fièvres,

de crampes abdominales et de nausées. Le mécanisme de pathogénèse des ECEI est similaire à celui de *Shigella*, un autre entéropathogène. Les *E. coli* entérotoxigéniques (ECET), associées aux diarrhées du voyageur, sont une cause importante d'infection dans les pays en développement, surtout chez les jeunes enfants. Les symptômes sont des diarrhées aqueuses et des crampes abdominales parfois accompagnées de maux de têtes et de nausées mais rarement de fièvre. Les *E. coli* enteropathogènes (ECEP) quant à elles, sont associées à des diarrhées infantiles majoritairement dans les pays en développement. Elles ne produisent pas d'entérotoxines et ne sont pas invasives. Les symptômes sont souvent sévères et prolongés et se traduisent par des diarrhées non sanguinolentes, des vomissements et de la fièvre. Ces symptômes sont typiques d'une infection à ECEP chez les bébés et les jeunes enfants.

Tableau 2 : Sérotypes d'*E. coli* diarrhéiques fréquemment rencontrés et associés à des éclosions de gastro-entérites.

ECET	ECEP	ECEI	ECEH	ECEA
O6:NM	O55:NM	O124:H30	O26:NM	O44:H18
O6:H16	O55:H6	O143:NM	O26:H11	
O8:H9	O111:NM	O164:NM	O103:H2	
O25:NM	O111:H2	ONT:NM	O104:H21	
O27:NM	O114:NM		O111:NM	
O27:H7	O114:H2		O111:H2	
O27:H20	O119:H6		O111:H8	
O49:NM	O125:H21		O113:H21	
O63:H12	O127:NM		O118:H2	
O78:H12	O127:H6		O121:H19	
O128:H7	O128:H2		O145:NM	
O148:H28	O142:H6		O157:NM	
O153:H45	O157:H45		O157:H7	
O159:NM				
O159:H20				
O169:NM				
O169:H41				

NM: Ne possède pas d'antigènes flagellaires car non mobile. NT: Non typable.

Il y a aussi les *E. coli* entéroaggrégatives (ECEA) qui ont été associées à une panoplie de manifestations cliniques incluant des périodes de diarrhées endémiques chez des enfants autant dans des pays pauvres que des pays industrialisés, des diarrhées épidémiques, des cas de diarrhées du voyageur et des cas de diarrhée persistante chez des patients atteints du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Des douleurs abdominales et de la fièvre accompagnent généralement ce type d'infection. Le

cinquième groupe est constitué des *E. coli* entérohémorragiques (ECEH) productrices de Shiga toxine. *E. coli* O157:H7, qui est le sérotype le plus fréquemment rencontré lors des cas de diarrhée causés par une souche d'*E. coli*, est aussi responsable de la majorité des cas de syndrome hémolytique et urémique. En effet, environ 4% des patients infectés par une souche d'*E. coli* O157:H7 ou O157:non mobile va développer un syndrome hémolytique et urémique, une condition caractérisée par une anémie hémolytique, une thrombocytopénie et une insuffisance rénale aiguë. *E. coli* O157:H7 et les autres sérotypes de ECEH peuvent causer de légères diarrhées non sanguinolentes jusqu'à de sévères diarrhées sanguinolentes ou colites hémorragiques accompagnées dans les deux cas de crampes abdominales (Murray *et al.*, 2007).

1.10.3. Importance et problématique de la bactérie dans l'industrie agro-alimentaire

Les sérotypes *E. coli* O157:H7 et O157:NM qui font partie des ECEH sont les plus souvent rencontrés en Amérique du Nord et en Europe. Chaque année, ces deux sérotypes sont responsables d'environ 73 000 cas de maladie et 60 décès aux États-Unis. Ils colonisent les espèces bovines destinées à l'industrie laitière et à la boucherie faisant ainsi de la viande hachée, le principal vecteur de transmission de la bactérie responsable de la majorité des éclosions de la maladie. Les autres aliments ayant déjà été impliqués dans des éclosions d'*E. coli* sont le lait non pasteurisé, les saucisses, le rôti de bœuf, l'eau du robinet non chlorée, le cidre de pomme, les légumes crus et les légumes racines. Tous les produits pouvant être en contact avec de l'eau contaminée sont potentiellement à risque. Comme la dose infectieuse est inférieure à 200 CFU, la transmission entre personne devient possible. Plusieurs cas associés à ce type de transmission ont été identifiés dans des écoles, des centres de soins de longue durée et des garderies (Murray *et al.*, 2007).

1.11. Problématique

L'application de mesures visant l'amélioration de la qualité microbiologique des denrées alimentaires demande une rigueur et une bonne connaissance des différents procédés pour assurer des résultats optimaux. Plusieurs traitements chimiques et physiques sont actuellement utilisés en combinaison pour contrôler les microorganismes pouvant nuire à la santé des consommateurs ou à la qualité des aliments. Parmi ces traitements, l'irradiation des aliments suscite de plus en plus d'intérêt et fait l'objet de plusieurs recherches ayant pour objectif d'étendre son utilisation en élaborant de nouvelles applications. Adoptée en 1980 par un comité international, l'irradiation est maintenant reconnue comme une méthode de décontamination permettant de prolonger la durée de vie des aliments et de contrôler les pathogènes alimentaires. A l'instar des autres traitements existants, les microorganismes ne démontrent pas tous la même sensibilité. C'est pour cette raison que des études portant sur la compréhension des mécanismes de résistance doivent être effectuées.

1.11.1. Hypothèse

De façon générale dans la littérature, les bactéries à Gram positif ont été rapportées comme étant plus résistantes à l'irradiation que les bactéries à Gram négatif. L'hypothèse de cette étude suggère que le contexte cellulaire d'une bactérie à Gram positif ou à Gram négatif permet de préserver plus ou moins efficacement l'intégrité du génome bactérien et ce, indépendamment des mécanismes de réparation post-irradiation.

1.11.2. Objectif

Nous avons voulu dans cette première partie déterminer l'impact de l'irradiation sur les génomes des bactéries à Gram positif et négatif pour ensuite comparer leur résistance. L'objectif est d'évaluer la résistance relative initiale des génomes bactériens à l'irradiation. En ne disposant pas de période de récupération post-irradiation, les

bactéries irradiées n'ont pas la possibilité de réparer les dommages causés dans leur ADN. La résistance brute du génome bactérien peut ainsi être évaluée et servir à comparer le degré de résistance du génome des bactéries à Gram positif et négatif.

Les détails de l'expérimentation, les résultats et la discussion sont présentés de façon détaillée dans l'article du chapitre 2. En voici les grandes lignes.

1.11.3. Méthodologie

Comme l'ADN est la principale cible de l'irradiation, ou du moins, celle qui est la plus déterminante pour la survie de la cellule, l'expérience concerne exclusivement cette composante cellulaire. Les bactéries choisies sont *Escherichia coli* et *Listeria monocytogenes*, deux bactéries importantes dans le secteur agroalimentaire dont l'une à Gram négatif et l'autre à Gram positif respectivement.

L'expérience a été menée au préalable avec des rayons UV-C puisqu'ils sont reconnus pour induire des CPD et des 6-4PP dans l'ADN. Les bactéries ont été irradiées avec différentes doses d'UV-C avant l'extraction immédiate de l'ADN sans période de récupération post-irradiation. La présence de CPD et de 6-4PP a ensuite été mesurée dans l'extrait d'ADN par ELISA en utilisant des anticorps monoclonaux anti-CPD et anti-6-4PP. Ceci a permis de comparer et de valider la technique ELISA utilisée pour mesurer les lésions par irradiation gamma. De l'ADN pur a aussi été irradié et analysé par ELISA pour établir un seuil minimal de résistance de l'ADN dans un contexte non cellulaire. Il est important de noter que la quantité d'ADN utilisée pour les analyses ELISA a été normalisée à une concentration donnée quelle que soit la bactérie. L'expérience a ensuite été effectuée en utilisant différentes doses d'irradiation gamma afin de déterminer si ce type de radiation pouvait induire des lésions CPD et 6-4PP.

1.12. Résultats et discussion

Les résultats obtenus confirment bien la capacité des rayons UV-C d'induire des lésions de type CPD et 6-4PP dans l'ADN. Dans tous les cas, que ce soit pour l'ADN pur ou pour celui extrait des bactéries, les CPD sont majoritairement produits comme l'indique la littérature (Sinha *et al.*, 2002, Waterworth *et al.*, 2002). Il a été démontré que l'irradiation gamma pouvait aussi induire mais dans une moindre mesure la dimérisation des bases pyrimidiques. Des résultats antérieurs pouvaient aussi nous le laisser croire. En effet, une étude par FT-IR sur l'ADN irradié de *Pantoea agglomerans* a révélé l'apparition de nouveaux liens covalents entre les nucléotides; les liens étant de même nature que ceux produits lors de l'irradiation UV. Rien n'indiquait par contre qu'il s'agissait bien de CPD ou de 6-4PP (Le-Tien *et al.*, 2007).

Lors de l'irradiation avec les rayons UV-C et gamma, le génome de *L. monocytogenes* s'est montré plus résistant que celui d'*E. coli*, lui-même légèrement plus résistant que l'ADN pur. Ces résultats concordent avec les données recueillies dans la littérature qui indiquent que les doses d'irradiation gamma nécessaires pour tuer les bactéries *E. coli* et *L. monocytogenes* sont de 1,3 et 3,5 kGy respectivement (Caillet *et al.*, 2008). Cette résistance variable entre les deux bactéries, évaluée sans période de récupération post-irradiation, suggère que le type de paroi et la composition de la membrane cellulaire jouent un rôle déterminant dans la radiorésistance bactérienne. L'analyse des modifications qui surviennent au sein de ces deux composantes cellulaires chez *E. coli* et *L. monocytogenes* suite à l'irradiation gamma, pourrait expliquer en partie la variabilité de la radiorésistance d'une espèce à l'autre (Caillet *et al.*, 2006, Caillet *et al.*, 2005). Il n'est pas exclu, selon notre interprétation, qu'une partie des dommages oxydatifs soit dirigée vers ces composantes et soit en quelque sorte absorbée, ce qui permettrait la préservation de l'intégrité du génome prolongeant par le fait même la survie de la cellule.

L'autre facteur qui peut influencer la résistance des bactéries à l'irradiation est la structure du nucléoïde. Le nucléoïde se définit comme étant la forme condensée qu'adopte le génome des procaryotes en association avec certaines protéines. Il a été démontré que le degré de condensation du nucléoïde pouvait être associé à la radiorésistance (Zimmerman *et al.*, 2005). Chez la bactérie *D. radiodurans*, la protéine HU produite par le gène *hbs* est essentielle au repliement de l'ADN qui adopte une

forme hautement condensée suite à une exposition au rayon gamma. Chez les mutants ayant un gène *hbs* inactif, la résistance est considérablement diminuée et la mort cellulaire survient plus rapidement suite à une irradiation (Nguyen *et al.*, 2009). À la lumière de ces observations, il serait pertinent de comparer la structure du nucléoïde d'*E. coli* et de *L. monocytogenes* avant et après l'irradiation pour déterminer si ce facteur joue un rôle crucial dans la résistance de ces deux bactéries.

1.13. Conclusion

Les résultats obtenus démontrent que l'ADN de *Listeria monocytogenes* est moins affecté par l'irradiation UV-C et gamma que celui de *Escherichia coli* à dose égale, lorsqu'on regarde les lésions de type CPD et 6-4PP. Suite à l'irradiation, l'ADN pur a subi un taux de lésions encore plus élevé que celui des deux bactéries ce qui démontre bien que dans un contexte cellulaire, l'ADN est protégé contre l'irradiation. Comme l'extraction de l'ADN a été faite immédiatement après les traitements d'irradiation, les mécanismes de réparation de l'ADN n'ont pas joué dans la radiorésistance de ces deux bactéries. Il serait très intéressant d'étudier la conformation et le niveau de compaction du nucléoïde de ces deux bactéries avant et après irradiation pour déterminer si ce facteur est déterminant dans la protection de l'ADN contre l'irradiation.

CHAPITRE 2
ARTICLE 1: RESISTANCE OF THE GENOME OF
ESCHERICHIA COLI* AND *LISTERIA MONOCYTOGENES
TO IRRADIATION EVALUATED BY THE INDUCTION OF
CYCLOBUTANE PYRIMIDINE DIMERS AND 6-4
PHOTOPRODUCTS USING GAMMA AND UV-C
RADIATIONS

Résistance du génome d'*Escherichia coli* et de *Listeria monocytogenes* à l'irradiation évaluée par l'induction de dimères de pyrimidines de type cyclobutane et de photoproduits de type pyrimidine (6-4) pyrimidone en utilisant les radiations gamma et UV-C

Stéphane Beauchamp¹, Monique Lacroix¹

¹ Laboratoires de Recherche en Sciences appliquées de l'alimentation, Centre d'Irradiation du Canada, INRS-Institut Armand-Frappier

Contributions des auteurs

Stéphane Beauchamp a réalisé toutes les expériences et rédigé le manuscrit scientifique.

Monique Lacroix était la directrice scientifique et la coordonnatrice du projet de recherche. Elle a supervisé l'élaboration des protocoles et a révisé le manuscrit.

Article soumis le 21 juin 2011 dans Radiation Physics and Chemistry

Accepté le 2 novembre 2011

Résumé

L'effet des radiations gamma et UV-C sur la production de dimères de pyrimidine de type cyclobutane (CPD) et de photoproduits de type pyrimidine 6-4 pyrimidone (6-4PPs) dans l'ADN a été étudié afin de comparer la résistance naturelle du génome entre une bactérie à Gram positif et une bactérie à Gram négatif. Une solution d'ADN pur et les bactéries *Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli* ont été irradiées à l'aide de rayons gamma et UV-C. L'ADN extrait des bactéries et les échantillons d'ADN purs ont ensuite été analysés par ELISA en utilisant des anticorps monoclonaux anti-CPD et anti-6-4PPs. Les résultats montrent que les rayons gamma, ainsi que les rayons UV-C, induisent la formation de CPD et de 6-4PPs dans l'ADN. Suite à l'irradiation UV-C, les ADN des trois échantillons ont démontré une susceptibilité différente à la formation de CPD ($P \leq 0,05$). L'ADN pur était le plus sensible alors que le génome de *L. monocytogenes* a été le plus résistant. Suite à l'irradiation UV-C, le génome de *L. monocytogenes* a été le seul à montrer une résistance importante contre la formation de 6-4 PP ($P \leq 0,05$). Cependant, l'ADN pur et le génome de la bactérie *E. coli* n'ont pas montré de différence significative dans leur sensibilité ($P > 0,05$) à former les deux types de lésions après l'irradiation gamma, tandis que le génome de *L. monocytogenes* a montré une résistance contre la formation de CPD et 6-4 PP.

Abstract

The effect of gamma and UV-C irradiation on the production of cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and 6-4 photoproducts (6-4PPs) in DNA was investigated to compare the natural resistance of the genome of a Gram-positive bacterium and a Gram-negative bacterium against irradiation. Solution of pure DNA and bacterial strains *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* were irradiated using gamma and UV-C rays. Extracted DNA from bacteria and pure DNA samples were then analysed by ELISA using anti-CPDs and anti-6-4PPs monoclonal antibodies. The results show that gamma rays, as well as UV-C rays, induce the formation of CPDs and 6-4PPs in DNA. During UV-C irradiation, the three samples showed a difference in their sensitivity against formation of CPDs ($P \leq 0.05$). Pure DNA was the most sensitive while the genome of *L. monocytogenes* was the most resistant. Also during UV-C irradiation, the genome of *L. monocytogenes* was the only one to show a significant resistance against formation of 6-4 PP ($P \leq 0.05$). During gamma irradiation, for both types of lesion, pure DNA and the genome of *E. coli* did not show significant difference in their sensitivity ($P > 0.05$) while the genome of *L. monocytogenes* showed a resistance against formation of CPDs and 6-4 PPs.

Keywords: Gamma irradiation, UV-C irradiation, cyclobutane pyrimidine dimers, 6-4 photoproducts, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*

Introduction

Ultraviolet light (UV) and gamma radiations are used in the food industry for different purposes because of their germicidal property. These two physical preservation methods are used to extend shelf life of foods and to protect against food-borne pathogens and spoilage microorganisms. Whether during UV or gamma irradiation, all the different types of microorganisms do not show the same sensitivity to irradiation treatment. Radiosensitivity of different microorganisms depends on multiple factors including the presence of resistance mechanisms like DNA repair systems (Blasius *et al.*, 2008), protection against oxidative damages (Daly *et al.*, 2004, Markillie *et al.*, 1999, Tian *et al.*, 2009) and particular organisation and conformation of the genetic material (Levin-Zaidman *et al.*, 2003, Lieber *et al.*, 2009, Nguyen *et al.*, 2009). Usually, Gram-negative bacteria, including common food spoilage microorganisms and enteric species, including pathogens, are more sensitive to irradiation than are Gram-positive bacteria (Mahapatra *et al.*, 2005).

UV rays are electromagnetic radiation type consisting of low energy photon (3 to 6 eV) emitted at wavelengths between 200 and 400 nm. UV light is a non-ionizing radiation that kills microorganisms by disrupting their DNA or RNA structures inducing several types of damage. The most damaging wavelength remains around 260 nm (UV-C) which is the peak of light absorption for pure DNA. UV radiation induces two of the most abundant mutagenic and cytotoxic lesions such as cyclobutane-pyrimidine dimers (CPDs) and 6-4 photoproducts (6-4PP's) (Fig. 6). During UV irradiation, CPDs are the most abundant lesions produced in the genome (Matsunaga *et al.*, 1993, Mitchell *et al.*, 1987). For a living cell, the slightest damage to DNA can affect its development and survival. Both types of lesions impinge on vital cellular functions, including transcription, DNA replication and cell cycle progression. Their persistence in the genetic material also increases the chance of fixation into mutations (Friedberg *et al.*, 1995).

Gamma irradiation is also used to control the proliferation of microorganisms in a wide variety of products. Gamma rays are electromagnetic radiation type consisting of high energy photons (>100 keV) emitted at very short wavelengths (<0,005 nm). A gamma radiation dose which corresponds to the amount of energy absorbed by an inert body is expressed in Gray (Gy). The Gray is the amount of energy (Joule) deposited per mass unit (kg) of irradiated material. A dose of 1 Gy equals 1 Joule kg⁻¹ (Moseley, 1989). UV rays also consist of photons but compared to them, gamma rays have a greater energy and are more penetrative (Mahapatra *et al.*, 2005). Microbial inactivation by gamma radiation occurs due to two main mechanisms: direct interaction of the radiation with cell components and indirect action from radiolytic products such as hydroxyl radicals (OH•), H⁺ and superoxide anions (O₂⁻) (Farkas, 1997, Imlay, 2003, Sonntag, 1987). These radiolytic products, formed through the ionizing power of gamma rays, are called reactive oxygen species (ROS) and contribute greatly to cellular damage (Cadenas, 1989). The primary target of gamma radiation appears to be chromosomal DNA, although it has been reported that effects on RNA, cytoplasmic membrane and proteins may also play a role (Cooke *et al.*, 2003, Daly *et al.*, 2007, Mahapatra *et al.*, 2005, Melin *et al.*, 2001, Willemoti, 1996). Like UV rays, the DNA damage caused by gamma irradiation generally has the greatest impact on the viability of cells. Types of damage include chemical changes in the nitrogenous bases, insertions or deletions of nucleotides, single or double strand breaks and the emergence of covalent bonds between nucleotides (Le-Tien *et al.*, 2007).

Until now, CPD lesions and 6-4 PPs were known to be caused mainly by exposure to UV rays. Few studies have been done to investigate the nature of the modifications induced by gamma rays on DNA other than DNA-strand cleavage and none of them have shown a relationship between gamma rays, CPDs and 6-4 PPs. In a study by FT-IR on the chemical composition of DNA irradiated with gamma rays, authors have shown that new covalent bonds were formed within the DNA molecules and also suggest that there is formation of inter-strand bonds similar to the inter-strand dimeric photoproducts caused by UV rays (Douki *et al.*, 2003, Le-Tien *et al.*, 2007). However, there is no evidence that these modifications mentioned by Le-Tien *et al.* (2007) correspond to CPD lesions or 6-4 PPs. The aim of this paper is firstly to demonstrate whether the gamma rays can induce CPDs and 6-4 PPs. Then, by measuring the amount of lesions produced in DNA, we compared the natural resistance of the genome of a Gram-positive

bacterium and a Gram-negative bacterium against UV-C and gamma irradiation without post-irradiation recovering time.

Material and Methods

Bacterial strains and growth conditions

Escherichia coli 25922 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) and *Listeria monocytogenes* HPB 2812 1/2a (Health Canada, St-Hyacinthe, Québec, Canada) were individually grown in trypticase soy broth (TSB; Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) at 37°C from the stock cultures maintained at -80°C in brain-heart infusion (BHI; Becton Dickinson) broth containing 10% glycerol. One milliliter of each culture was incubated at 37°C for 24 h in TSB (15 ml). The cultures were centrifuged at 1300 g for 15 min and resuspended in fresh TSB (15 ml) before being incubated at 37°C long enough to obtain cultures in log phase growth.

Preparation of pure DNA solution

The solution of salmon testes DNA (Sigma, Deisenhofen, Germany) was prepared according to the manufacturer's standards. TE buffer (10 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA) was used to dissolve the lyophilized DNA. The DNA concentration was determined with the Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) by measuring the absorbance at 260 nm and was adjusted at 1 mg/ml with TE buffer before irradiation.

UV irradiation

One milliliter of the DNA solution (1 mg/ml) and one milliliter of each log phase bacterial cultures were irradiated at 254 nm in an irradiation chamber (Dr. Gröbel UV-Elektronik GmbH, model BS-04, Ettlingen, Germany) containing eight UV-C fluorescent lamps (TUV F17T8 18W, Philips Electronic, Amsterdam, Netherland). Samples were treated at doses of 0, 1, 3, 10, 30, 70, 100 mJ/cm² in order to evaluate the level of CPD and 6-4 PP lesions formed in DNA. The control of the irradiation doses was provided by the irradiation controller UV-MAT and the radiometer UV-C sensors #810 010 0184 (Dr. Gröbel UV-Elektronik GmbH, Ettlingen, Germany).

Gamma irradiation

One milliliter of the DNA solution (1 mg/ml) and one milliliter of each log phase bacterial cultures were irradiated with doses of 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5, 2.5 and 5 kGy. A UC-15A irradiator (Nordion International Inc., Kanata, Ontario, Canada) equipped with ^{60}Co source was used to deliver radiation at a dose rate of 15.6 kGy h^{-1} . This irradiator was certified by the National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, MD, USA), and the dose rate was established using a correction for decay of source. Amber Perspex 3042D dosimeter (Atomic Energy Research Establishment, Harwell, Oxfordshire, UK) were used to validate the dose distributions. The irradiation treatment was carried out at the Canadian Irradiation Centre (Laval, Québec, Canada) at room temperature (20°C).

Bacterial DNA extraction

After irradiation treatment, bacterial cultures were kept on ice and DNA extraction was performed immediately with the Genomic DNA prep Kit for Bacteria (Feldan Bio, Québec, Qc, Canada) according to the manufacturer's standards. The DNA concentration was determined with the Nanodrop 1000 and was adjusted at $1 \mu\text{g/ml}$ with TE buffer.

ELISA

The irradiated pure DNA solution was diluted with TE buffer to obtain a concentration of $1 \mu\text{g/ml}$. Pure DNA solution and DNA extracted from bacteria were denatured at 100°C in a water bath for 10 minutes and chilled rapidly in an ice bath for 15 minutes. A sample of $50 \mu\text{l}$ of denatured DNA was added in the polystyrene flat-bottom microtiter plates pre-coated with a 0.003% protamine sulphate solution. Three wells were used for each dose. After drying completely overnight in a 37°C incubator, the plates were washed with PBS containing 0.05% of tween 20 (PBS-T). A blocking solution of bovine serum albumin (BSA) 3% was used to avoid non-specific antibody binding. The plates were sequentially incubated with TDM-2 antibody specific for CPDs or 64M-2 specific for 6-4 PPs (Cosmo Bio Co, Tokyo, Japan) and then with a horseradish peroxidase (HRP) labelled secondary antibody (Biolynx inc., Brockville, Ontario). Each antibody was diluted as directed by the suppliers. After washing with

PBS-T, TMB substrate solution (Biolynx inc.) was added to the plates and incubated for 30 minutes at 37°C. Absorbance at 490 nm was measured using a microplate reader after the addition of 2M H₂SO₄ (Hada *et al.*, 2000, Komatsu *et al.*, 1997). A control was performed without using the primary antibodies (data not shown). The results indicate that there was no non-specific interaction between the secondary antibodies and the other reagents in microplates.

Experimental design and statistical analysis

Samples were separated into 2 groups: (i) control (no irradiation treatment) and (ii) irradiated samples. All measurements were performed in triplicate (n=3). Analysis of variance (ANOVA) and Duncan's multiple-range test were performed for statistical analysis by using PASW Statistics 18.0 software (IBM Corporation, Somers, NY, USA). Differences between means were considered to be significant at a 5% level.

Results and discussion

Induction of CPDs and 6-4 PPs by UV-C and gamma rays

The first analyses were made with pure DNA solution. This allowed the direct effects of the radiations on DNA to be observed without the influence of other cellular components and it served as a benchmark to evaluate the resistance of the bacterial genome. After various doses of UV-C, ELISA revealed as expected, the formation of a high amount of CPDs and a lower amount of 6-4 PPs in a ratio of about 3:1 (Fig. 7). These results are consistent with the data found in literature (Sinha *et al.*, 2002, Waterworth *et al.*, 2002). With regard to gamma rays, the irradiation also led to the formation of CPDs and 6-4 PPs but in a smaller proportion than UV. The level of both types of lesions was about three times less abundant (Fig. 8). These results suggest that the appearance of new covalent bonds observed in DNA after gamma irradiation by Le-Tien and *al.* (2007) can be due to the formation of CPDs and 6-4 PPs. That would mean that gamma rays, in addition to the effects already known, would act somewhat like UV rays by inducing the dimerization of pyrimidine bases.

*Natural resistance of the genome of *L. monocytogenes* and *E. coli**

During UV irradiation, the three samples showed a difference in their sensitivity against formation of CPDs ($P \leq 0.05$). Pure DNA was the most affected while the genome of *L. monocytogenes* was distinguished largely by containing about 35% less CPDs than the genome of *E. coli* at doses higher than 3 J/cm² (Fig. 7). Also during UV irradiation, the genome of *L. monocytogenes* was the only one to show a significant resistance against formation of 6-4 PPs ($P \leq 0.05$) by containing about 10% less 6-4 PPs than the genome of *E. coli* and pure DNA at doses higher than 3 J/cm² (Fig. 7).

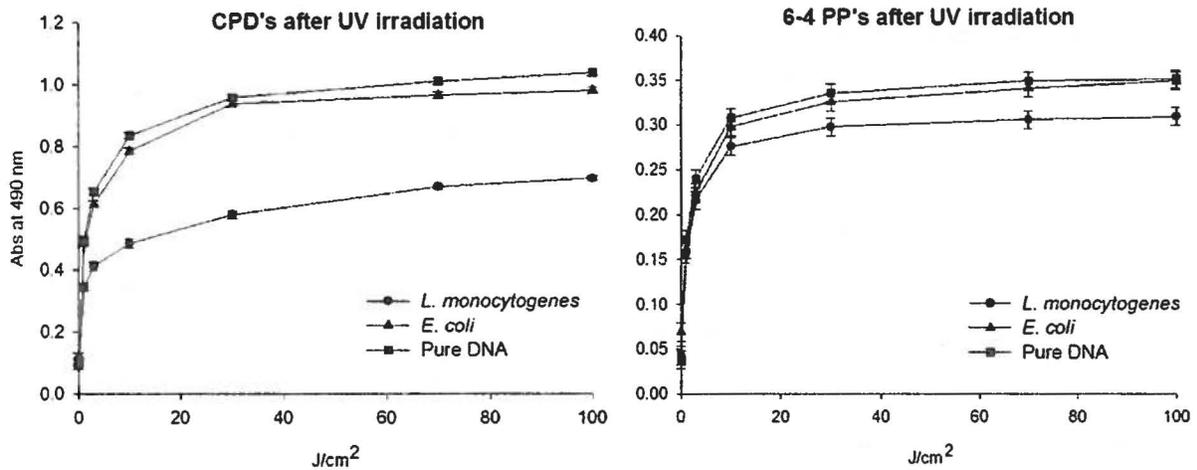


Figure 7 : Rate of CPD's and 6-4 PP's measured into pure DNA and DNA extracted from *L. monocytogenes* and *E. coli* after UV irradiation. Results were obtained by ELISA and are expressed in absorbance unit at 490 nm. Error bars represent the standard deviation.

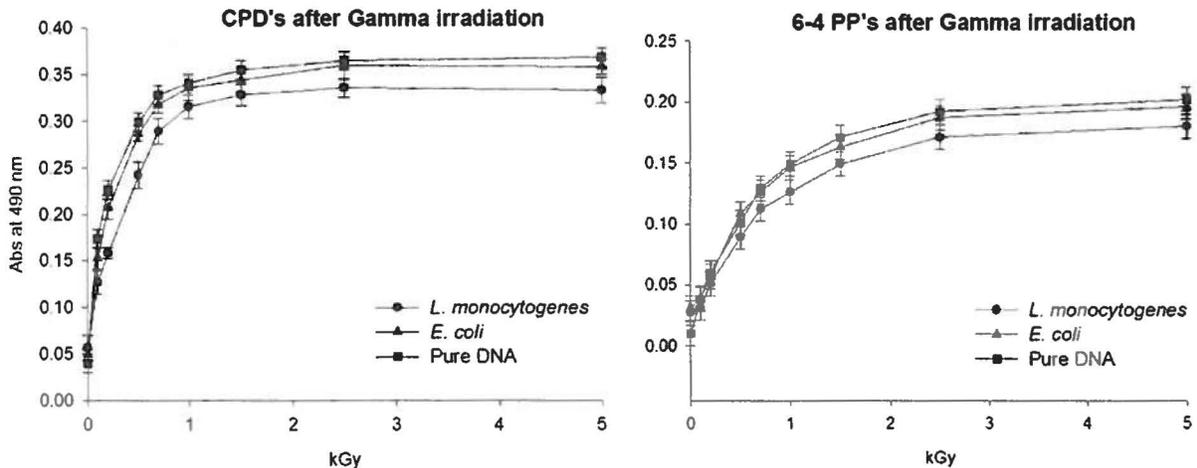


Figure 8 : Rate of CPD's and 6-4 PP's measured into pure DNA and DNA extracted from *L. monocytogenes* and *E. coli* after gamma irradiation. Results were obtained by ELISA and are expressed in absorbance unit at 490 nm. Error bars represent the standard deviation.

During gamma irradiation, for both types of lesion, pure DNA and the genome of *E. coli* did not show significant difference in their sensitivity ($P > 0.05$). For the genome of *L. monocytogenes*, the resistance against formation of CPDs was more noticeable between 0.1 and 0.7 kGy with at least 16% less CPDs than *E. coli*. For doses higher than 0.7 kGy, this resistance decreased and the rate of CPDs was about 7% less abundant (Fig.8). For the 6-4 PPs, the resistance was constant and the genome of *L. monocytogenes* always showed about 10% less 6-4 PPs than *E. coli* (Fig. 8).

These results are consistent with our expectations because *L. monocytogenes* is generally more resistant to gamma and UV irradiation than *E. coli* (Caillet *et al.*, 2006, Caillet *et al.*, 2005, Guerrero-Beltran *et al.*, 2005). It is therefore not surprising that the genome of *L. monocytogenes* always seems to be less affected by irradiation. However, it must be remembered that there was no post-irradiation recovering time. It means that all the mechanisms of DNA repair were not involved in maintaining genome integrity. Indeed, we know that during a period following the irradiation, the genome is repaired by the enzymatic cellular machinery (Oguma *et al.*, 2001, Sinha *et al.*, 2002). In this study, the DNA extraction was achieved immediately after the irradiation process so the results reveal the gross resistance of the genome. To explain the difference between the resistances of the genomes, it is likely that the nucleoid structure plays an important role. The nucleoid is a condensed structure formed by the bacterial chromosome in association with proteins. A strong nucleoid condensation is associated with a better radioresistance in bacteria. An examination of the nucleoids of members of the genera *Deinococcus* and *Rubrobacter* revealed a high degree of genome condensation, whereas the nucleoid is uniformly distributed in *E. coli* (Blasius *et al.*, 2008). Moreover, as Gram-positive bacteria are generally more radioresistant than Gram-negative bacteria, it can be assumed that the cell wall plays certainly a role in protecting the cell during irradiation.

Conclusion

Our results showed that gamma radiation can induce dimerization of pyrimidine nucleotides into DNA but at a lower rate than UV-C radiation. The genome of *L. monocytogenes* is naturally more resistant to gamma and UV-C irradiations than the genome of *E. coli* without post-irradiation recovering time. The genome of *E. coli* does

not show significant resistance to gamma and UV irradiations compared to pure DNA except for the formation of CPD's induced by UV-C irradiation without post-irradiation recovering time.

**DEUXIÈME PARTIE : ÉVALUATION PRÉLIMINAIRE D'UN
ESSAI COMPÉTITIF IMMUNO-FLUORESCENT POUR LA
DÉTECTION DE *LISTERIA MONOCYTOGENES***

CHAPITRE 3 : SYNTHÈSE

3.1. Méthodes de détection conventionnelles

Il existe plusieurs méthodes normalisées actuellement disponibles pour la détection et l'identification de *L. monocytogenes* dans les aliments et les prélèvements provenant de l'environnement et d'animaux malades. Ces méthodes dites conventionnelles permettent l'isolement en culture pure de l'organisme et constituent la référence vis-à-vis des autres méthodes qui doivent être validées en fonction de celles-ci. La sensibilité de ces méthodes a d'ores et déjà été démontrée en plus de ne nécessiter aucun matériel coûteux et sophistiqué. Néanmoins, les méthodes conventionnelles comportent leur lot d'inconvénients tels que des temps d'incubation relativement longs selon les protocoles, les multiples manipulations nécessaires, l'utilisation de plusieurs produits chimiques, réactifs et milieux de cultures différents, la croissance d'autres microorganismes contaminants pouvant masquer la présence du pathogène ainsi que l'éventualité de passer à côté de l'organisme recherché en raison de possibles variantes atypiques présentes chez ce dernier (Gasanov *et al.*, 2005, Janzten *et al.*, 2006, Paolig *et al.*, 2005).

L'isolement de la bactérie *Listeria monocytogenes* nécessite l'utilisation d'agents sélectifs et de procédures d'enrichissement pour favoriser sa croissance tout en inhibant celle des microorganismes non recherchés. L'ajout de ces agents sélectifs permet de réduire le délai nécessaire à la croissance de la bactérie tout en facilitant l'interprétation des résultats. Ces composants sélectifs sont par exemple: l'acriflavine, qui inhibe la croissance des autres bactéries à Gram positif; l'acide nalidixique et la colistine, qui inhibent la croissance des bactéries à Gram négatif; et la cycloheximide, qui inhibe la croissance des champignons. Plusieurs autres composés à spectre plus étendu sont aussi utilisés comme le céfotétan, la fosfomycine, le chlorure de lithium, le phényléthanol, la ceftazidime, la polymyxine B et le moxalactame (Hitchins, 1998, Janzten *et al.*, 2006). Une autre caractéristique importante des milieux en usage pour l'isolement de *Listeria* est l'ajout d'esculine. Toutes les espèces de *Listeria* sont capables d'hydrolyser l'esculine grâce à l'enzyme β -D-glucosidase. L'ajout d'esculine et d'ions ferriques sous forme de citrate de fer dans le milieu de culture résulte en la formation d'une couleur noire lorsque le 6,7-dihydroxycoumarine, un produit de

l'hydrolyse de l'esculine aussi appelé esculétine, se conjugue aux ions ferriques (Janzten *et al.*, 2006).

Plusieurs méthodes pour l'isolement de *Listeria monocytogenes* ont été reconnues par différentes organisations à des fins de réglementation internationale. Les plus importantes sont la *Food and Drug Administration* (FDA) (Hitchins, 1998), la méthode officielle de l'*Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (Horwitz, 2000), la norme ISO 11290 (International Organization for Standardization., 1996a, International Organization for Standardization., 1996b) et la méthode du département de l'agriculture des États-Unis d'Amérique – Services d'inspection et de sécurité alimentaire (USDA-FSIS) (United States. Food Safety and Inspection Service. Microbiology Division., 2009). Selon la nature de l'échantillon à analyser, l'une ou l'autre de ces méthodes sera plus appropriée. Le « *International Organization for Standardization Technical Committee ISO/TC 34, Agricultural Food Products, Subcommittee SC 9, Microbiology* » a déterminé que la méthode ISO Standard 11290 parties 1 et 2 pouvait être utilisée pour la détection de *L. monocytogenes* dans une très grande variété de produits alimentaires et que, bien qu'il reconnait que cette méthode puisse parfois ne pas être appropriée, il recommande qu'elle soit utilisée chaque fois que cela est possible. Les méthodes FDA et AOAC sont quant à elles utilisées pour le lait et les produits laitiers alors que la méthode USDA-FSIS est recommandée pour les viandes rouges, la volaille, les œufs et ces produits dérivés ainsi que les échantillons environnementaux.

La première étape, celle de l'isolement, vise l'obtention de l'organisme ciblé en culture pure sous forme de colonies sur des milieux gélifiés à base d'agar. Les échantillons destinés à l'analyse doivent être représentatifs de l'aliment, incluant la surface externe et l'intérieur. Une quantité de 25 g ou 25 ml d'échantillon est généralement nécessaire. Pour les échantillons environnementaux, le programme d'échantillonnage doit être basé sur les expériences antérieures et inclure les endroits qui se sont avérés de bons indicateurs de contamination. Le prélèvement s'effectue à l'aide d'éponges destinées à cet effet que l'on frotte sur les surfaces à analyser. Comme certains produits peuvent contenir une charge bactérienne relativement faible ou encore être contaminés par une flore endogène plus ou moins riche, l'étalement direct, bien que relativement facile et rapide, n'est pas souhaitable. Les méthodes conventionnelles possèdent donc toutes une étape d'enrichissement basée sur l'utilisation de milieux de

culture liquides contenant des agents sélectifs. Les méthodes FDA et ISO utilisent en plus une étape de pré-enrichissement qui permet la récupération des cellules endommagées ou moribondes alors que dans les méthodes USDA-FSIS et AOAC, les échantillons sont directement incubés dans le milieu d'enrichissement. Dans la méthode FDA, le pré-enrichissement se fait à 30°C pendant 4 heures dans un bouillon trypticase-soja additionné d'extrait de levure. La méthode ISO utilise un bouillon contenant des agents sélectif mais en demi concentration, le bouillon Fraser-demi, à 30°C pendant 24h. Les échantillons sont ensuite enrichis pendant 24 à 72 heures à 30, 35 ou 37°C selon la méthode. La méthode FDA utilise un bouillon trypticase-soja contenant de l'extrait de levure, de l'acriflavine, de l'acide nalidixique, et du cycloheximide, qu'on appelle aussi *Listeria enrichment broth* (LEB). La méthode USDA-FSIS s'effectue en deux étapes : l'enrichissement primaire est fait dans un milieu développé par l'université du Vermont (UVM) qui contient de l'acide nalidixique et de l'acriflavine; l'enrichissement secondaire est réalisé dans un bouillon Fraser contenant de l'acide nalidixique, de l'acriflavine et du chlorure de lithium. La méthode ISO propose l'utilisation du bouillon Fraser à concentration entière contrairement à l'étape de pré-enrichissement. La méthode AOAC requiert un enrichissement sélectif dans un bouillon trypticase-soja contenant de l'acriflavine, de l'acide nalidixique, et du cycloheximide.

Après l'étape d'enrichissement sélectif, les cultures sont ensuite étalées sur différents milieux sélectifs et différentiels gélosés permettant l'isolement de colonies présumées de *Listeria monocytogenes*. La gélose Oxford est utilisée dans toutes les méthodes sauf pour la méthode USDA-FSIS qui emploie une gélose Oxford modifiée (MOX). En plus de contenir plusieurs agents sélectifs, la gélose Oxford contient de l'esculine et du citrate de fer. Les colonies de *Listeria sp.* apparaissent ainsi noires et entourées d'un halo noir. Les méthodes FDA et ISO emploient en plus de la gélose Oxford du chlorure/phényléthanol/moxalactame de lithium ou gélose PALCAM, qui contient aussi de l'esculine et du citrate de fer. Il existe aussi certains milieux de culture dit chromogéniques, qui permettent l'isolement et l'identification de *L. monocytogenes*. La gélose ALOA (Agar *Listeria* according to Ottaviani et Agosti) est la plus connue et est désormais incluse dans les méthodes USDA-FSIS et ISO. D'autres milieux chromogéniques avec des formulations légèrement différentes sont aussi vendus sous plusieurs autres noms commerciaux. Le principe sous-tendant l'emploi du milieu gélosé ALOA se base sur la présence du gène de virulence *plcA*, présent chez *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* et *L. seeligeri*. Le gène *plcA* code pour la synthèse de la

phosphatidylinositol-phospholipase C (PIPL-C) (Gouin *et al.*, 1994) qui est responsable de l'hémolyse visible sur gélose au sang de mouton (Notermans *et al.*, 1991). Le clivage du phosphatidylinositol par la PIPL-C produit un précipité blanc formé d'acides gras insoluble dans l'eau. Ce précipité forme donc un halo opaque autour des colonies de *Listeria* qui sont hémolytiques. Ottaviani *et al.* (1997) ont combiné ce principe de détection avec un substrat chromogénique, le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucopyranoside, qui produit une coloration turquoise lorsqu'il est clivé par la β -D-glucosidase. Toutes les espèces de *Listeria* produisent donc des colonies turquoise alors que les colonies de *L. monocytogenes* et *L. ivanovii* produisent en plus un halo blanc distinct (Reissbrodt, 2004).

Une fois l'étape d'isolement complétée, les colonies typiques de *Listeria sp.* obtenues sur les différentes géloses sélectives et différentielles sont ensuite sélectionnées et identifiées à l'espèce. Une panoplie de tests peut être utilisée dont la catalase, la coloration de Gram, la mobilité, l'hémolyse, l'utilisation de certains sucres et le test de Christie-Atkins-Munch-Peterson ou test de CAMP (Tableau 3).

Tableau 3 : Différentiation des espèces de *Listeria*¹

Espèces	Hémolyse	Production d'acide		Test de CAMP		PIPL-C ²
		L-Rhamnose	D-Xylose	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>	
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-	+
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	(+)	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-	-
<i>L. grayi</i>	-	V	-	-	-	-

V : variable; (+) : réaction faible; + : > 90% réactions positives; - : pas de réaction.

¹Adapté de Murray *et al.* (2007) et Janzén *et al.* (2006)

²Sur gélose ALOA ou autres milieux similaires

Le test de CAMP est très utile pour différencier les différentes espèces de *Listeria* entre elles. Il est utilisé dans les méthodes ISO et AOAC et est considéré comme optionnel dans celles de l'USDA-FSIS et de la FDA. Le test est simple à effectuer et facile à interpréter. Il consiste à ensemencer une souche de *Staphylococcus aureus* β -hémolytique (Souche ATCC 49444 ou 25923, Souche NCTC 7428 ou 1803) et de *Rhodococcus equi* (Souche ATCC 6939, Souche NCTC 1621) en un seul trait en traçant des lignes parallèles sur une gélose au sang de mouton assez éloignées l'une

de l'autre. Les souches à tester et les souches témoins sont ensuite ensemencées, toujours en un seul trait, mais de façon perpendiculaire entre les deux organismes indicateurs sans y toucher (1 à 2 mm de distance). Après une incubation de 24-48 heures à 35°C, une réaction positive est visible par une zone de β -hémolyse à l'intersection entre les souches testées et la souche indicatrice (McKellar, 1994). Dans le cas de l'identification de *Listeria monocytogenes*, un test de CAMP positif se traduit par une zone d'hémolyse augmentée en forme de tête de flèche. La méthode USDA-FSIS recommande aussi l'utilisation d'un disque de β -lysine disponible commercialement pour tester l'activité hémolytique des différentes souches de *Listeria*, au lieu du test de CAMP traditionnel. Il s'agit d'un disque imprégné de β -lysine de *S. aureus* qu'on dépose sur une gélose au sang de mouton à proximité d'une strie de la bactérie à tester. Le disque remplace en quelque sorte la strie de *S. aureus*.

Un autre test permet aussi de confirmer que la souche de *Listeria* testée n'est pas l'espèce *monocytogenes*. L'alanyle peptidase est une enzyme produite par toutes les espèces de *Listeria* sauf *L. monocytogenes*. Un test colorimétrique simple permet de visualiser l'activité hydrolytique de cette enzyme en utilisant des disques contenant les substrats DL-alanine- β -naphthylamide et D-alanine-*p*-nitroanilide. Un test positif oriente l'identification vers une autre espèce (Clark *et al.*, 1997).

3.2. Méthodes d'identification rapides

Certaines compagnies ont conçu des systèmes, automatisés dans certains cas, pour faciliter et accélérer le processus d'identification. Par exemple, MICRO-ID *Listeria* (Organon Teknika Corp) est un système qui a été validé par l'AOAC (méthode 992.18) pour l'identification présomptive des espèces de *Listeria* à partir d'aliments et d'échantillons environnementaux. Cette alternative aux tests biochimiques conventionnels est basée sur le fait que l'inoculum testé contient différentes enzymes pouvant être détectées après 24 heures à 37°C. Un code numérique est alors obtenu selon le profil des réactions en plus des résultats du test CAMP et des caractéristiques hémolytiques qui sont réalisés séparément.

Le système Vitek Automicrobic (bioMérieux Vitek, inc.) est un système automatique d'identification microbiologique qui peut aussi être utilisé pour la différenciation des espèces de *Listeria*. Il a aussi été validé par l'AOAC (méthode

992.19). Ce système comprend une chambre d'incubation avec un lecteur optique et un ordinateur. Des dispositifs d'identification contenant chacun 30 tests biochimiques sont remplis d'une suspension bactérienne puis incubés dans la chambre d'incubation. Les réactions biochimiques sont analysées par l'ordinateur qui les compare avec une banque de données pour ensuite donner une identification probable selon un pourcentage. Les tests de CAMP, d'hémolyse et/ou de réduction des nitrates peuvent s'avérer nécessaires pour l'identification de certaines souches tel que décrit dans la méthode FDA.

D'autres méthodes commercialement disponibles pour l'identification des espèces de *Listeria* comprennent la galerie API LISTERIA (bioMérieux), le MICROBACT 12L (Microgen), le système MicroLog (Biolog), le Sherlock Microbial Identification System (MIS) (Microbial ID; basé sur les profils d'acides gras) et le système Walk/Away (MicroScan) (Janzten *et al.*, 2006).

3.3. Méthodes basées sur la reconnaissance des acides nucléiques

Les différentes méthodes basées sur la reconnaissance d'acides nucléiques sont conçues pour détecter des séquences de nucléotides dans l'ADN ou l'ARN, qui sont spécifiques au microorganisme recherché. Dans le cas de *Listeria monocytogenes*, ces séquences sont généralement des gènes ou des parties de gènes qui sont associés à la virulence de la bactérie. Parmi ceux-ci, on retrouve le gène *hlyA*, qui code pour une hémolysine (Kaur *et al.*, 2010), les gènes *inlA* et *inlB*, codant pour des internalines nécessaires à l'invasion de certaines cellules par la bactérie (Khelef *et al.*, 2006), le gène *prfA*, codant pour une protéine qui régule l'activation de certains gènes de virulence, le gène *iap*, codant pour la protéine p60 associée à l'invasion des cellules (Liu, 2006), le gène *actA*, codant pour une protéine qui induit la polymérisation des filaments d'actine et le gène *mpl*, codant pour une métalloprotéase (Kaur *et al.*, 2010). Certaines méthodes ciblent aussi l'ARN 16S qui est un constituant des ribosomes procaryotes (M. Zunabovic *et al.*, 2011a) dont la séquence est hautement conservée chez chaque espèce. Les deux principes de reconnaissance des acides nucléiques généralement employés pour la détection de *L. monocytogenes* sont l'hybridation d'ADN et la réaction en chaîne de polymérase (le PCR). Un certain nombre de méthodes a été

développé pour la détection de la bactérie dans les aliments dont quelques-unes, disponibles commercialement, ont été validées par un ou plusieurs organismes.

3.3.1. Hybridation d'ADN

L'hybridation d'ADN est un phénomène de biologie moléculaire, basé sur les propriétés d'appariement complémentaire entre les nucléotides. Les différentes techniques permettent de mettre en évidence la présence de séquences nucléotidiques spécifiques en utilisant des fragments d'acide nucléique complémentaires. Le test GENE-TRAK *Listeria* (GENE-TRAK™ Systems) est une méthode d'hybridation colorimétrique validée par l'AFNOR et par l'AOAC (méthode 993.09) et utilisée pour les produits laitiers, les viandes et les produits de la mer. En raison des réactions faussement positives, les échantillons positifs doivent être confirmés par des méthodes de référence. Le test GeneQuench® *Listeria monocytogenes* Test Kit (Neogen) est semblable au test précédent et est aussi validé par l'AOAC (Baylis *et al.*, 2000). Le test AccuProbe® *Listeria monocytogenes Confirmatory Test* (Gen-Probe) est basé sur l'hybridation de sondes d'ADN marquées à des séquences spécifiques d'ARN ribosomales uniques à *L. monocytogenes* (Ninet *et al.*, 1992). Cette méthode est validée par l'AFNOR. La FDA emploie une méthode qu'ils ont baptisé AD713 (Hill *et al.*, 2001). Cette méthode utilise deux sondes correspondant aux gènes *iap* et *hly*. La sonde oligonucléotidique AD13 est spécifique au gène *hly* tandis que la sonde synthétique AD07 l'est pour le gène *iap*. La combinaison des deux sondes (d'où le nom AD713) permet une détection efficace tout en évitant les faux négatifs causés par des mutations silencieuses dans les gènes (changement au niveau des nucléotides qui n'altère pas la fonction du gène mais qui peut interférer dans la fixation de la sonde).

3.3.2. Réaction en chaîne de polymérase ou PCR

Le PCR est une technique qui permet d'amplifier un ou plusieurs gènes spécifiques pour permettre d'en faire la détection. Cette amplification permet d'atteindre un niveau de sensibilité supérieur comparativement aux techniques d'hybridation ou encore de détection immunologiques. Il existe une panoplie de méthodes de détection qui utilisent le PCR (Levin, 2003) et quelques-unes ont été approuvées. L'USDA-FSIS a adopté le système BAX® *L. monocytogenes* Detection System (DuPont-Qualicon)

comme nouvelle méthode de détection dans les échantillons enrichis de viande et de volaille. Une étude comparative entre le système BAX® et les méthodes de référence normalisées a conclu que la technique était aussi bonne et parfois meilleure (Silbernagel *et al.*, 2004) que les méthodes conventionnelles.

D'autres méthodes commercialement disponibles comprennent le test PCR FoodProof® *Listeria monocytogenes* (Bioteccon Diagnostics), le test PCR PROBELIA™ (Sanofi Diagnostics), le kit de détection LightCycler® *L. monocytogenes* (Roche/Bioteccon), le GeneVision® Rapid Pathogen Detection System (Warnex) et le TaqMan® *L. monocytogenes* Detection Kit (Applied Biosystems). Alors que la majeure partie des techniques décrites précédemment permet la détection qualitative de la bactérie, la technique de PCR en temps réel (RT-PCR) permet quant à elle de quantifier la bactérie dans un échantillon. Encore une fois, plusieurs méthodes ont été mises au point et elles représentent un bon potentiel pour une utilisation de routine (Berrada *et al.*, 2006, Hough *et al.*, 2002, Koo *et al.*, 2003, Nogva *et al.*, 2000, Oravcova *et al.*, 2006, Rodriguez-Lazaro *et al.*, 2009, Rodriguez-Lazaro *et al.*, 2004a, Rodriguez-Lazaro *et al.*, 2004b, Rodriguez-Lazaro *et al.*, 2005a, Rodriguez-Lazaro *et al.*, 2004c, Rodriguez-Lazaro *et al.*, 2005b, Rudi *et al.*, 2005).

3.4. Méthodes de détection immunologiques

L'utilisation d'anticorps monoclonal ou polyclonal pour la détection bactérienne est grandement répandue et peut prendre plusieurs formes. Le principe de l'ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) est sans contredit celui qui est le plus utilisé sur le marché. Il n'en demeure pas moins que le succès des méthodes immunologiques, peu importe le principe, repose sur le choix de l'antigène et la spécificité des anticorps. Il existe plusieurs méthodes immunologiques disponibles commercialement pour l'identification de *Listeria monocytogenes* et celles qui seront mentionnées ici ont été validées pour un ou plusieurs systèmes de validation reconnus (Janzten *et al.*, 2006, Sewell *et al.*, 2003, M. Zunabovic *et al.*, 2011a).

Le *Listeria*-Tek (Organon Teknika Corp.) est une méthode officielle de l'AOAC (méthode 994.03) mise au point pour la détection de *Listeria sp.* dans les produits laitiers, les produits de la mer et les viandes. L'anticorps monoclonal utilisé dans cette technique ELISA peut donner des réactions croisées avec les espèces de *Listeria* non

pathogènes. Ce n'est donc pas un test de confirmation. Les cultures présumées positives doivent être isolées sur des milieux sélectifs et confirmées par des tests biochimiques conventionnels selon la méthode FDA.

La méthode ELISA de TLVIA (TECRA® *Listeria Visual Immunoassay*) disponible chez TECRA International Pty Ltd est une méthode officielle de l'AOAC (méthode 995.22) et utilise un anticorps polyclonal. Elle permet la détection de *Listeria sp.* dans les produits laitiers, les produits de la mer, les viandes (sauf la viande hachée crue) et les légumes à feuilles. Cependant, les cultures enrichies présumées positives doivent être confirmées par la méthode conventionnelle FDA.

La méthode immuno-enzymatique Assurance® *Listeria* qui emploie un anticorps polyclonal est aussi une méthode officielle de l'AOAC (méthode 996.14). Elle permet la détection de *Listeria sp.* dans les produits laitiers, les viandes rouges, le porc, les produits de la volaille, les fruits, les fruits à coques, les produits de la mer, les pâtes, les légumes, les fromages, la nourriture pour animaux, les œufs et le chocolat. La confirmation par la méthode conventionnelle FDA est aussi nécessaire. La trousse est disponible chez BioControl Systems Inc.

Une autre méthode officielle de l'AOAC (méthode 997.03), le test VIP Gold™ pour *Listeria*, peut être utilisé pour les produits laitiers, la viande rouge, le porc, la volaille, les produits de la mer, les fruits, les légumes, les pâtes, le chocolat, les œufs, et la farine animale. Ce test qui est basé sur un principe d'immuno-précipitation est disponible chez BioControl Systems Inc. et les échantillons positifs doivent être confirmés par la méthode FDA.

La compagnie bioMérieux offre une méthode automatisée validée par l'association française de normalisation (AFNOR) selon le schéma de L'*European Microbiological Methods Assessment Scheme* (EMMAS). C'est aussi une méthode officielle de l'AOAC (méthode 999.06) qui est utilisée pour la détection des antigènes de *Listeria sp.* dans les produits laitiers, les légumes, les produits de la mer, les viandes crues et la volaille. Cette méthode immunologique utilise une technologie ELFA (enzyme-linked fluorescent assay) et est réalisée avec l'appareil automatisé VIDAS®. Une confirmation par la méthode FDA est nécessaire.

D'autres méthodes immunologiques validées selon des systèmes officiels sont aussi disponibles et elles comprennent le Transia Plate *Listeria* ELISA (Transia

Diffchamb), validé par l'AFNOR; le système ELISA automatisé EIAFOSS *Listeria* (Foss Electric), validé par l'AOAC Research Institute; la méthode immuno-chromatographique REVEAL for *Listeria* (Neogen Corporation), validée par l'AOAC Research Institute; la méthode immuno-chromatographique Clearview *Listeria* RApid Test (Oxoid), validée par l'AFNOR, EMMAS et l'AOAC Research Institute et le système d'immuno-séparation magnétique Listertest (Vicam), validé par l'AOAC Research Institute (Baylis *et al.*, 2000).

3.5. Le choix de l'antigène

L'efficacité des tests de détection basés sur la reconnaissance d'un antigène par un anticorps dépend de plusieurs facteurs. Outre le principe du test ou le type d'anticorps utilisé, le choix de l'antigène demeure le facteur le plus déterminant dans la conception d'un test immunologique. Il doit être soigneusement effectué et doit répondre à différents critères. Tout d'abord, l'antigène choisi doit être spécifique à l'organisme visé par la détection. L'expression de l'antigène chez les différentes souches d'une même espèce doit être connue et bien déterminée. Par exemple, chez *L. monocytogenes*, il existe une variabilité antigénique entre les différents sérotypes et même entre les différentes souches au sein d'un même sérotype. Si l'expression de l'antigène choisi varie trop d'une souche à l'autre, l'efficacité du test de détection peut être grandement compromise en présentant des réactions faussement positives. Le niveau d'expression de l'antigène doit aussi être pris en considération. Il a été démontré que lorsque certains microorganismes sont exposés à des stress environnementaux, l'expression de certains antigènes peut être affectée (Hahm *et al.*, 2006). Dans l'industrie alimentaire, les bactéries sont constamment soumises à différents stress comme un pH acide, des températures de réfrigération ou de congélation, de fortes concentrations en sels, des atmosphères modifiées, des produits chimiques de décontaminations, etc. On peut donc s'attendre à ce que le taux d'expression d'un antigène choisi chez une bactérie dans des conditions de culture données, soit différent lorsque cette bactérie est exposée à un ou plusieurs stress. L'expression de certains gènes chez *L. monocytogenes* qui sont sous le contrôle du régulateur transcriptionnel PrfA illustre bien ce phénomène. Les gènes de virulence *hly*, *plcA*, *mpl*, *actA* et *plcB* font partie d'un îlot de pathogénicité dont la transcription est initiée par la protéine PrfA. Durant une croissance à basse température, très peu de protéines PrfA sont produites rendant ainsi les gènes de virulence inactifs alors que l'expression de PrfA est maximale à 37°C (Janzten *et al.*, 2006, Scotti *et al.*,

2007). On pourrait donc s'attendre à ce qu'un test de détection immunologique ayant pour cible une protéine issue d'un de ces gènes de virulence soit négatif si le test est effectué sur des bactéries provenant d'un échantillon réfrigéré.

L'immunogénicité de l'antigène ou la capacité à induire une réponse immunologique forte est primordiale pour la production des anticorps. L'antigène doit donc être reconnu par le système immunitaire de l'espèce animale choisie pour qu'une production efficace d'anticorps s'en suive. La réponse immunologique dépend notamment de l'espèce animale utilisée, du degré de similitude entre l'antigène et les molécules de l'hôte et surtout de la nature physico-chimique de l'antigène, à savoir s'il s'agit d'une protéine ou d'un autre type de molécule, sans oublier sa taille et sa structure (Kindt *et al.*, 2007). Certains antigènes devront subir quelques modifications afin de devenir immunogènes. Par exemple, certains peptides ou autres types de molécules pourront être jumelées à une protéine de haut poids moléculaire hautement immunogène pour ainsi être reconnus par le système immunitaire. La protéine KLH (keyhole limpet hemocyanin) est souvent utilisée à cet effet (Niman *et al.*, 1983, Shieh *et al.*, 2001).

Les anticorps produits seront sélectionnés sur leur efficacité à reconnaître rapidement et très spécifiquement l'antigène chez la ou les souches bactériennes recherchées. Des réactions croisées avec d'autres espèces du même genre ou même entre deux genres différents, peuvent parfois survenir, entraînant ainsi des réactions faussement positives. Il faut donc s'assurer que les anticorps produits reconnaîtront seulement les antigènes du microorganisme pathogène à détecter.

3.6. La protéine p60

Parmi les cibles immunologiques potentielles chez *Listeria monocytogenes*, la protéine extracellulaire p60 s'avère être une excellente candidate. En plus d'être hautement immunogène, elle est produite en grande quantité par la bactérie dans le surnageant de culture (Bubert *et al.*, 1994). Cette protéine d'environ 480 acides aminés et d'un poids moléculaire de 60 kDa est codée par le gène *iap* (invasion-associated protein) et n'est pas sous le contrôle du régulateur transcriptionnel PrfA comme certains gènes de virulence. Le contrôle de l'expression du gène *iap* s'effectuerait plutôt au

niveau post-transcriptionnel (Kohler *et al.*, 1991). Bien que le fonctionnement et le rôle exact de la protéine p60 ne soient pas tout à fait connus, plusieurs fonctions y sont associées. L'étude de la souche de *Listeria monocytogenes* mutante RIII, qui produit considérablement moins de protéine p60, a démontré une baisse marquée de la virulence de la bactérie chez la souris infectée et une perte de sa capacité d'envahir les cellules fibroblastiques murines 3T6. De plus, le mutant RIII produit des colonies rugueuses et les cellules sont disposées en longues chaînes tout en étant limitées par des septums qui ne se séparent pas. L'ajout de protéine p60 dans le milieu de culture permet aux cellules du mutant RIII de se séparer et d'adopter une forme normale en plus de recouvrer partiellement sa capacité d'envahir les cellules 3T6 (Bubert *et al.*, 1992b, Kohler *et al.*, 1991, Kuhn *et al.*, 1989). D'autres résultats suggèrent que la protéine p60 possède une activité muréine hydrolase essentielle à la survie de la bactérie, de même qu'une activité bactériolytique dans certaines conditions (Wuenschel *et al.*, 1993).

L'analyse de la séquence d'acides aminés de la protéine p60 déduite à partir du gène *iap* révèle que la protéine est riche en résidus basiques (point isoélectrique de 9.3) et qu'elle contient un domaine constitué d'une répétition de 19 Thr-Asn (Kohler *et al.*, 1990). Des tests d'hybridation d'ADN et des études immunologiques ont démontré l'existence de gènes apparentés au gène *iap* et de protéines correspondantes semblables à la protéine p60 chez toutes les espèces de *Listeria* non pathogènes (Bubert *et al.*, 1992a, Bubert *et al.*, 1992b). Ainsi, les anticorps produits contre la protéine p60 entière présentent des réactions croisées avec les protéines apparentées des autres espèces de *Listeria*. Des régions variables et des régions constantes ont néanmoins été identifiées au sein des séquences de la protéine p60 des différentes espèces de *Listeria*. La portion située entre les résidus 291 et 307 inclusivement est très variable chez les espèces non pathogènes mais reste constante chez toutes les souches de *L. monocytogenes*. Les anticorps dirigés contre un segment de cette portion de la protéine (résidus 291 à 301), dont la séquence est Gln-Gln-Gln-Thr-Ala-Pro-Lys-Ala-Pro-Thr-Glu, sont spécifiques à *Listeria monocytogenes* et ne démontrent pas de réaction croisées avec les autres espèces du même genre (Bubert *et al.*, 1994). Il s'agit donc d'une excellente cible potentielle pour un test de détection immunologique.

3.7. Problématique

L'utilisation de méthodes efficaces pour la détection bactérienne dans l'industrie alimentaire est déterminante pour assurer non seulement la sécurité des consommateurs, mais aussi pour permettre d'offrir des denrées alimentaires de qualité et ainsi répondre aux exigences de plus en plus contraignantes du marché. Bien que les méthodes conventionnelles soient fiables et éprouvées, plusieurs inconvénients leurs ont été associés et reconnus. Pour cette raison, de nouvelles méthodes de détection voient sans cesse le jour pour tenter de pallier ces différents inconvénients. Cependant, ces nouvelles méthodes ne sont pas non plus sans faille. Les méthodes basées sur la reconnaissance des acides nucléiques peuvent être très coûteuses en usage routinier et requièrent des équipements et de la main d'œuvre spécialisés (Velusamy *et al.*, 2010b). De plus, les différentes matrices alimentaires peuvent parfois causer des problèmes lors de l'extraction de l'ADN et même inhiber la réaction d'amplification des gènes. La plupart des méthodes ne permettent pas non plus de faire la distinction entre les bactéries mortes et les bactéries vivantes ce qui peut compliquer l'interprétation des résultats (Lazcka *et al.*, 2007). Pour les méthodes basées sur la détection immunologique, la principale lacune des tests disponibles est le manque de spécificité des anticorps. Des résultats faussement positifs causés par les réactions croisées avec les autres espèces de *Listeria* rallongent le processus de détection et rendent nécessaire la confirmation par des tests conventionnels. Des coûts et des délais supplémentaires sont conséquemment engendrés pour n'obtenir finalement qu'un résultat négatif. Il ne faut pas non plus négliger le fait que certains tests immunologiques manquent de sensibilité et que certains contaminants peuvent interférer dans la réaction antigène-anticorps (Meng *et al.*, 2002).

3.7.1. Hypothèse

Le choix de l'antigène est primordial pour éviter les réactions croisées et ainsi éliminer les réactions faussement positives. La portion constituée des acides aminés 291 à 301 de la protéine p60 dont la séquence est Gln-Gln-Gln-Thr-Ala-Pro-Lys-Ala-Pro-Thr-Glu, représente une cible très spécifique à *Listeria monocytogenes*. Il est donc possible de concevoir un essai immunologique spécifique en utilisant ce peptide comme

antigène pour produire les anticorps nécessaires au développement d'un test de détection.

3.7.2. Objectif

La deuxième partie de ce projet de maîtrise a pour objectif la conception d'un test immunologique pour la détection de la bactérie *Listeria monocytogenes* utilisable dans l'industrie agro-alimentaire. Le test devra être spécifique à l'espèce *L. monocytogenes* et devra être facile à utiliser en requérant un minimum de manipulation et de réactifs.

Les détails de l'expérimentation, les résultats et la discussion sont présentés de façon détaillée dans l'article du chapitre 4. En voici les grandes lignes.

3.7.3. Méthodologie

L'élaboration d'un test immunologique débute par la production des anticorps. Pour ce faire, il faut sélectionner l'antigène contre lequel seront dirigés les anticorps produits et déterminer le type d'anticorps à produire c'est-à-dire monoclonaux ou polyclonaux. Malgré que la préparation et la sélection des hybridomes pour la production des anticorps monoclonaux soient plus dispendieuses à produire a priori, ces anticorps présentent plusieurs avantages par rapport aux anticorps polyclonaux. Notamment, comme ils sont spécifiques à un seul épitope et qu'ils proviennent d'un seul clone d'hybridomes, les anticorps monoclonaux sont généralement plus indiqués pour la conception d'un test de détection spécifique. De plus, la production commerciale d'anticorps monoclonaux en grande quantité à partir des hybridomes sélectionnés est relativement facile à réaliser en culture cellulaire et ne nécessite pas l'utilisation d'animaux de laboratoire. La culture d'hybridomes est plus efficace et moins coûteuse à long terme. Pour toutes ces raisons, nous avons donc choisi d'utiliser des anticorps monoclonaux pour la conception du test. Le choix de l'antigène s'est inspiré des travaux de Bubert *et al.* (1994) qui ont identifié une courte séquence d'acides aminés située dans la protéine p60 *L. monocytogenes* qui est spécifique à cette espèce. Ce peptide, dont la séquence est Gln-Gln-Gln-Thr-Ala-Pro-Lys-Ala-Pro-Thr-Glu, a été synthétisé en prenant soin d'ajouter un résidu cystéine à l'extrémité N-terminal pour le coupler à la

protéine KLH via son groupement thiol (-SH) pour permettre une bonne réponse immune chez la souris.

Les anticorps produits ont ensuite été testés pour vérifier leur spécificité. Des épreuves de Western blot et des ELISA ont été réalisées sur des surnageants de culture de différentes espèces de *Listeria* contenant la protéine p60. Ces tests ont permis de vérifier que les anticorps reconnaissent bien la protéine p60 de *L. monocytogenes* et non celle des espèces de *Listeria* non pathogènes.

Après la vérification de la spécificité de la reconnaissance des anticorps, le test immunologique a été développé d'après l'essai mis au point par De Champdore *et al.* (2007) pour la détection d'une mycotoxine, la patuline, dans les aliments. Il s'agit d'un test immunologique compétitif utilisant des anticorps marqués à la fluorescence. Le test est exécuté dans une colonne contenant des billes de sépharose (45 à 165 µm de diamètre) sur lesquelles sont fixés les anticorps marqués via l'antigène correspondant. En ce qui nous concerne, cet antigène correspondant est une protéine p60 recombinante produite par *E. coli* qui a été fixée à la matrice de sépharose. La colonne ainsi préparée est conservée et prête à l'emploi. L'échantillon à tester qui est constitué du surnageant d'une culture bactérienne provenant d'un aliment ou d'une surface de travail, est circulé à travers la colonne. Si l'échantillon contient une certaine quantité de protéine p60 provenant de la bactérie *L. monocytogenes* en culture, il y aura une compétition entre la p60 de la culture et la p60 recombinante pour la liaison avec les anticorps marqués dans la colonne. Durant la période d'incubation, une certaine proportion des anticorps sera donc captée par les protéines p60 libres provenant de l'échantillon et les complexes antigène-anticorps sont récoltés à la sortie de la colonne. Une simple lecture au fluorimètre permet de visualiser si des anticorps ont été entraînés ou non. La mesure de la fluorescence est comparée avec la mesure du bruit de fond qui correspond à la fluorescence résiduelle lorsque l'échantillon ne contient pas de protéine p60. Si l'augmentation de la fluorescence est significative, le test est positif pour la présence de *L. monocytogenes*. Au préalable, avant la conception de la colonne, le principe de compétition a été testé par une épreuve d'ELISA de compétition modifiée. Dans cette épreuve, la protéine p60 recombinante a été fixée au fond des puits d'une microplaque ELISA et ensuite incubée avec une quantité donnée d'anticorps monoclonaux anti-p60 pour permettre leur liaison. Les surnageants de culture des différentes souches de *Listeria* ont ensuite été incubés dans les puits et lavés. Les

anticorps qui ont été liés par les antigènes libres du surnageant sont éliminés par les lavages. L'ajout d'un anticorps secondaire dirigé contre les anticorps monoclonaux de souris permet de visualiser que le signal des puits incubés avec la p60 des surnageants est donc diminué du à la compétition.

3.8. Résultats et discussion

Les résultats obtenus pour les tests de spécificité de l'anticorps monoclonal produit ont démontré que les protéines p60 du surnageant de culture des souches de *Listeria monocytogenes* HPB 2569, HPB 2558, HPB 1043, HPB 2812, HPB 2739 et HPB 2371 sont reconnues par l'anticorps alors qu'il n'y aucune réaction avec le surnageant de culture de *Listeria innocua*. Ces résultats, combinés à ceux obtenus par Bubert *et al.* (1994) confirment bien que des anticorps dirigés contre le peptide synthétique Gln-Gln-Gln-Thr-Ala-Pro-Lys-Ala-Pro-Thr-Glu sont spécifiques pour la détection de *L. monocytogenes*.

L'épreuve d'ELISA de compétition modifiée a permis de démontrer que les protéines p60 provenant du surnageant de culture des différentes souches de *Listeria monocytogenes* sont capables de déplacer les anticorps qui sont déjà fixés à la protéine p60 recombinante. Ces résultats représentent la réaction de compétition qui se produit dans la colonne de détection.

Pour l'essai compétitif de détection à l'aide de la colonne de sépharose, toutes les souches de *L. monocytogenes* testées ont pu être détectées alors que *L. innocua* n'a produit aucune réaction positive. Les échantillons à analyser avaient été incubés préalablement 18 heures avec un inoculum de départ théorique d'une UFC.

3.9. Conclusion

L'anticorps monoclonal produit s'est avéré très spécifique pour détecter les souches de *L. monocytogenes* testées. Cette caractéristique confirme le concept de ce test de détection immunologique. Bien que le fonctionnement du concept ait été démontré, il reste encore plusieurs étapes d'optimisation à effectuer avant l'obtention d'un essai fonctionnel et utilisable en industrie. Plusieurs paramètres devront être testés pour déterminer entre autres la quantité d'anticorps à inclure dans la colonne, le format

final de colonne à adopter, le temps d'incubation, la recherche d'éventuelles interactions avec certaines substances ou produits alimentaires, etc.

CHAPITRE 4

ARTICLE 2: A NEW COMPETITIVE FLUORESCENCE IMMUNE ASSAY FOR DETECTION OF *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Un nouveau test immunologique à fluorescence pour la détection de *Listeria monocytogenes*.

Stéphane Beauchamp¹, Sabato D'Auria², Anna Pennacchio², Monique Lacroix¹

¹ Laboratoires de Recherche en Sciences appliquées de l'alimentation, Institut des Nutraceutiques et des Aliments Fonctionnels (INAF), Centre d'Irradiation du Canada, INRS-Institut Armand-Frappier.

² Laboratory for Molecular Sensing, IBP-CNR, Via Pietro Castellino 111, 80131 Naples, Italy

Contribution des auteurs

Stéphane Beauchamp a réalisé les manipulations et la rédaction de l'article.

Monique Lacroix : directrice de recherche, responsable scientifique et coordonnatrice du projet de recherche. Elle a participé aux discussions, à la préparation des expériences et à la correction de l'article.

Sabato d'Auria : co-directeur de recherche, élaboration des méthodes de recherche et correction de l'article.

Anna Pennacchio : participation à l'élaboration des protocoles et correction de l'article.

Article soumis le 5 septembre 2012 dans Analytical Methods

Accepté le 13 octobre 2012

Résumé

Un nouveau test immunologique compétitif a été conçu en utilisant un anticorps monoclonal spécifique marqué avec un fluorophore. Une séquence peptidique spécifique et hautement conservée de 11 acides aminés provenant de la protéine p60 de *L. monocytogenes* a été synthétisée et utilisée pour la production d'un anticorps monoclonal anti-p60. Cet anticorps a permis la conception d'un test de détection capable de dépister une quantité théorique de 1 UFC de *L. monocytogenes* après seulement 18 heures d'incubation avec un minimum de manipulation. Le test est basé sur la compétition entre la protéine p60 recombinante et la p60 de *L. monocytogenes* présente dans l'échantillon pour la liaison à une concentration donnée d'anticorps. Une colonne contenant une matrice de sépharose a permis d'immobiliser la protéine p60 recombinante sur laquelle se lie l'anticorps monoclonal fluorescent. Au cours de l'incubation avec l'échantillon à analyser, la p60 de la culture crée une compétition pour la liaison à l'anticorps fixé pour éventuellement former des complexes solubles. Une augmentation de la fluorescence dans l'éluat de la colonne indique la présence de complexes solubles, donc un résultat positif. Aucune réactivité croisée n'a été observée avec les espèces de *Listeria* non-pathogènes et chaque sérotype de *L. monocytogenes* a pu être détecté alors que certaines autres méthodes immunologiques montrent souvent une réactivité croisée et de faux négatifs.

Abstract

A new competitive immunoassay has been designed using a specific monoclonal antibody labeled with a fluorophore. A specific and highly conserved peptide of 11 amino acids from the protein p60 of *L. monocytogenes* has been synthesised and used for the production of a monoclonal anti-p60. This antibody was used in the conception of a detection test able to detect 1 CFU of *L. monocytogenes* after only 18 hours of incubation with a minimum of manipulation. The test is based on a competition principle between the recombinant p60 protein and the p60 from *L. monocytogenes* present in the sample. A column containing a sepharose matrix was used to immobilize the recombinant p60 protein and the labeled monoclonal antibody which is captured by the p60 from the sample when added to the column. An increase of the fluorescence signal in the eluate means a positive result. No cross-reactivity was observed with non-pathogenic *Listeria* species and each serotype of *L. monocytogenes* can be detected whereas some other immunological methods show cross-reactivity and false negative.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, immune assay, food detection

Introduction

Listeria monocytogenes is an important foodborne pathogen involved in several outbreaks around the world resulting in considerable economic and human losses. Its widespread presence in the environment and its persistence in food plants lead to a labored control for this microorganism. *L. monocytogenes* is a Gram-positive, rod-shaped facultative anaerobic bacterium. This microbe can grow in a wide range of temperatures (1°C to 45°C) between pH 4.6 and 9.5 and at a water activity as low as 0.92 (Gandhi *et al.*, 2007). It finds favorable growth conditions on floors, drains and equipment within food industry premises, notably in the cold and wet atmosphere of refrigerated rooms where only psychrotrophic bacteria can survive (Carpentier *et al.*, 2011). In a review published in 2004, few studies are mentioned in which persistence of *L. monocytogenes* is demonstrated (Møretrø *et al.*, 2004). Refrigerated and ready-to-eat foods constitute thereby a potential risk for contamination (Donnelly, 2001, Ha *et al.*, 2005). To counter cross-contaminations, the control of the environment by detecting the bacteria on the working surfaces and instruments, could be an important tool. Several well-known outbreaks and food recalls due to *L. monocytogenes* (Klontz *et al.*, 2000, MacDonald *et al.*, 2001, Olsen *et al.*, 2001, Todd *et al.*, 2011) combined with the high case-fatality rate of 20-30% (Swaminathan *et al.*, 2007) have increased the need for more rapid, sensitive, and specific methods for detection of this bacterium not only in food, but also in the working environment.

L. monocytogenes is a widespread microorganism that can be readily isolated from a number of sources, such as soil, water, meat, and vegetables (Chung *et al.*, 2007, Magnani *et al.*, 2004). Thus, the bacterium can easily be introduced in the human food chain and it becomes difficult to avoid contamination. Many reliable and accurate culture methods and media have been already developed for the detection of *L. monocytogenes* (Velusamy *et al.*, 2010a, Marija Zunabovic *et al.*, 2011b). However, these methods remain laborious, time-consuming and involve complicated procedures (Balakrishna *et al.*, 2010, Barbuddhe *et al.*, 2008, Drake *et al.*, 2006, Hao *et al.*, 1987, McClain *et al.*, 1988). Some standard methods for the detection of *L. monocytogenes* can require up to 7 days to yield results, as they rely on the ability of microorganisms to

multiply to visible colonies (Velusamy *et al.*, 2010a). Existing DNA detection based methods are also expensive.

To overcome the difficulty of recovering *L. monocytogenes* in the presence of non-pathogenic *Listeria* species and increase the sensitivity of the detection, several PCR-based methods have been developed. These PCR methods (Balakrishna *et al.*, 2010, Drake *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2010, Marija Zunabovic *et al.*, 2011b) provide sensitive, specific, and reproducible detection of pathogenic bacteria. Despite showing valuable advantages, the fact remains that the limitations of applying PCR techniques cannot be disregarded. Among them, there is the presence of inhibitory substances (Lantz *et al.*, 1994, Simon *et al.*, 1996), complexity of matrices, sample preparation and DNA extraction procedures (Agersborg *et al.*, 1997, Marija Zunabovic *et al.*, 2011b). Moreover, from an industrial point of view, routine detection of microbes using PCR can be expensive as it requires specialized equipment and qualified workers to carry out the tests. On the other hand, methods based on antigen-antibody bindings constitute a good alternative for detection of foodborne pathogens. The field of immunology-based methods provides very powerful analytical tools for a wide range of targets including bacterial cells, spores, viruses and toxins (Iqbal *et al.*, 2000). Only for *L. monocytogenes*, few immunology-based methods already exist (Chen *et al.*, 2006, Churchill *et al.*, 2006, Gangar *et al.*, 2000, Hibi *et al.*, 2006, Hudson *et al.*, 2001, Jung *et al.*, 2003, Magliulo *et al.*, 2007, Sewell *et al.*, 2003, Shim *et al.*, 2007, Yu *et al.*, 2004). Various antibody types and formats are available for immune detection. These include conventional and heavy chain antibodies, as well as polyclonal, monoclonal or recombinant antibodies. While polyclonal antibodies are limited both in terms of their specificity and abundance, monoclonal antibodies are often more useful for specific detection because they provide an indefinite supply of single antibodies directed against a single and unique epitope. The progress of hybridoma techniques and the emergence of recombinant antibody phage display technology have led to more sensitive, specific, reproducible and reliable immunological detection with many commercial immunoassays adapted for a variety of microbes and their products (Leonard *et al.*, 2003).

The protein p60 of *L. monocytogenes*, which is encoded by the *iap* (invasion-associated protein) gene, is considered an important virulence factor, although the exact

role of the protein is not completely known (Bubert *et al.*, 1992b, Kuhn *et al.*, 1989). Mutants of *L. monocytogenes*, which impair synthesis of p60, show a rough-colony morphology (R mutants) and are strikingly attenuated in virulence in mice. These mutants have also lost the capability of invading 3T6 mouse fibroblasts and form particularly long cell chains. Treatment of these mutants with partially purified p60 from wild-type *L. monocytogenes* restores their invasiveness and cell morphology.

The p60 protein could be a potential target for an immunological detection because of its high abundance in the culture supernatant and its high immunogenicity (Bubert *et al.*, 1994, Yu *et al.*, 2004). Nevertheless, it has been shown that an antiserum raised against the whole p60 is not appropriate for a specific detection of *L. monocytogenes*, since cross-reactivity occurred with p60-related proteins in the culture supernatant of all *Listeria* species (Bubert *et al.*, 1992a). For this reason, the production of antibodies using p60 protein should be directed against an epitope, which is specific to *L. monocytogenes*. Many attempts have been made to produce *Listeria*-specific antibodies but in most cases, the potential was limited by the cross-reactivity with non-pathogen *Listeria* species or by the non-recognition of certain *L. monocytogenes* strains, which is not suitable for a specific immunodetection (Hearty *et al.*, 2006). In a previous work, a short hydrophilic peptide of eleven amino acids (QQQTAPKAPTE) named PepD has been identified within the p60 protein to be a highly conserved region specific to all *L. monocytogenes* strains. The polyclonal antibodies raised against this peptide showed a highly specific recognisance for the p60 protein of all stains of *L. monocytogenes* tested and no cross-reactivity with non-pathogen *Listeria* spp.. The results of this experiment allow us to consider this small peptide a good target for the development of an immune-detection test. However, due to the possible low titers of the polyclonal antibodies, a large amount of the precipitated protein was necessary to perform the analysis. Moreover, from a standpoint of a manufacturer producing a detection test using these antibodies, the repeated production of enough polyclonal antibodies may be demanding. Considering all of these limitations, the production of a monoclonal antibody using the same peptide of eleven amino acids specific to the p60 of *L. monocytogenes* was chosen. The aim of this study was to develop a competitive fluorescence immunoassay for the detection of *L. monocytogenes* using a p60 monoclonal antibody.

Material and methods

Synthetic peptide, monoclonal antibody and recombinant P60 production

The peptide synthesis and the production of the anti-P60 monoclonal antibody were carried out by the company GenScript USA inc., NJ, USA. First, the antigenic peptide PepD (QQQTAPKAPTE) derived from p60 of *L. monocytogenes* (accession number AEO02672 in the NCBI protein database), was synthesized by stepwise solid-phase peptide synthesis (SPPS) with an additional N-terminal cysteine residue for coupling (Bubert *et al.*, 1994). Synthetic peptide was purified by reverse-phase HPLC and coupled via the SH group of the N-terminal cysteine residue to the keyhole limpet hemocyanin (KLH) carrier protein in order to stimulate the immune response. Five Balb/c mice have been inoculated by intra peritoneal injection with 25-100 µg of conjugated peptide emulsified in TiterMax adjuvant for primary immunization and boosted 3 times with 12.5-50 µg of the conjugated peptide also emulsified in TiterMax adjuvant, on days 14, 35 and 63. Cell fusion, subcloning of positive parental clones and expansion of positive subclones were screened by ELISA. Monoclonal antibodies from the hybridoma culture supernatant were purified using a protein A/G affinity column. ELISA and Western blot were performed to determine the purity, the concentration and the reactivity of the final antibody. Recombinant P60 protein has also been produced by the company Genscript. The pUC57 DNA plasmid was transformed into competent *E. coli* BL21 (DE3). The recombinant P60 protein has been purified by nickel column via polyhistidine-tag. Final protein concentration was found to be 0.531 mg·ml⁻¹ as determined by Bradford protein assay with BSA as a standard. A purity of about 80% was estimated by a Coomassie blue-stained sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

Bacterial strains and growth conditions

Several strains of *Listeria* were used in this experiment: *L. monocytogenes* 2812, *L. monocytogenes* 1043 and *L. monocytogenes* 2569 (serotype 1/2a), *L. monocytogenes* 2558, *L. monocytogenes* 2739 and *L. monocytogenes* 2371 (serotype 1/2b), *L. innocua* LSPQ 3285 (purchased from Laboratoire de Santé Publique du Québec, Ste-Anne-de-BelleVue, Québec, Canada). 1 ml of the fresh culture of all the

strains were subcultured in 9 ml of Tryptic Soy Broth (TSB, Difco Laboratory, Detroit, MI) at 37°C under stirring. Culture supernatants were collected after centrifugation at 5500 rpm during 10 minutes followed by a filtration using a 0.25 µm syringe filter (Sarstedt, Montreal, Quebec) in order to obtain cell-free supernatants.

ELISA experiments

Protein samples were prepared as follows: recombinant p60 protein was diluted with coating buffer (9 mM N_2CO_3 , 0.02 M NaHCO_3 , 1 mM NaN_3 , pH 9.6) to obtain a concentration of $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. For bacterial samples, 50 µl of cell-free supernatants from overnight cultures was diluted with 50 µl of coating buffer. The coating of recombinant protein and supernatants was performed in microplates (LockWell, Maxisorp from Nunc) overnight at 4°C (100 µl per well). After coating, the plates were washed three times (10 min per washing) with washing buffer (PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , pH 7.4) containing 0.05% Tween 20) and blocked with 5% skim milk in PBS 1 hour at 37°C. The plates were sequentially incubated with the monoclonal IgG anti-p60 ($18 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) and then with a horseradish peroxidase (HRP) labelled secondary antibody (Biolynx inc., Brockville, Ontario) diluted as directed by the supplier. Both antibodies were diluted with diluting buffer (washing buffer containing 1% skim milk). For colorimetric reaction, 100 µl of enzyme substrate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) (Biolynx inc., Brockville, Ontario) was added and the plates were incubated 10 minutes at room temperature. Absorbance at 450 nm was measured using a microplate reader after the addition of 50 µl of 2M H_2SO_4 . For all ELISA experiments, two negative controls were performed using a sample of BSA and fresh TSB culture media (data not shown).

A second ELISA was done to validate the competition principle of the test. An amount of 0.1 µg of recombinant p60 protein diluted in 100 µl of the coating buffer was primarily coated in each well overnight at 4°C. After coating, the plates were washed three times (10 minutes per washing) with washing buffer and blocked with 5% skim milk in PBS 1 hour at 37°C. Monoclonal IgG anti-p60 ($18 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) was then added in each well and incubated 1 hour at 37°C. After another washing step, samples of 100 µl of each cell-free supernatant from the different *Listeria* strains were incubated in wells for

15 minutes at room temperature. The assay was then finalized as described above with the secondary antibody and the TMB substrate.

Western blot experiments

Cell-free supernatants from overnight cultures (4 ml) were concentrated by a factor of 66 after filtration through a 30 kDa Amicon Ultra centrifugal filter unit (Millipore, Ontario, Canada), diluted 1:1 with Laemmli sample buffer (Bio-Rad Laboratories, Ontario, Canada) and heated at 100°C for 5 minutes. Protein separation was achieved by SDS-PAGE in 10% polyacrylamide gels. Transfer onto nitrocellulose membranes was performed overnight at 4°C. Membranes were blocked for 1 hour at room temperature under stirring in blocking buffer (PBS containing 5% skim milk). After three washings with PBS 0.05% Tween 20 (10 min per washing under stirring), the membranes were incubated with monoclonal IgG anti-p60 (0.4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) for 1 hour at room temperature, washed three times as described above and then incubated with a horseradish peroxidase (HRP) labelled secondary antibody (Biolynx inc.) diluted as directed by the supplier, for 1 hour at room temperature. The membranes were washed three times and then developed with the western blotting detection reagent Amersham ECL before being exposed to a photographic film (GE Healthcare Life Sciences, Québec, Canada). Recombinant P60 protein was used as a positive control.

Labeling of monoclonal IgG

A 0.5 ml sample of monoclonal anti-p60 IgG in 50 mM sodium borate buffer, pH 8.5 (2.0 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) was labelled using a Dylight 550 Antibody labeling kit (Thermo Fisher Scientific inc., IL, USA). The labeling was achieved according to the supplier instructions. The degree of labelling (DOL), as calculated from the absorbance values at $\lambda = 280$ and 557 nm, by applying a correction factor label absorption at $\lambda = 280$ nm, was found to be 2.88.

Affinity column preparation

The affinity column was obtained by conjugating recombinant p60 protein with activated CH-Sepharose 4B (Sigma, Deisenhofen, Germany) as follows. One gram of

dry resin powder was suspended in 200 ml of cold 1mM HCl. The swollen resin was filtered in a polystyrene column (4mL, Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ont.) and washed with cold 1mM HCl. A 3 ml sample of p60 protein ($0.531 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) was dialysed in 1 litre of 0.1 M sodium bicarbonate, pH 8.0, containing 0.5 M NaCl overnight at 4°C using a dialysis membrane of 3500 Da. Dialysed protein was mixed with the resin at 4°C overnight under slow inversion. After the coating, excess active groups were blocked with 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0 for 1 hour. To remove unbounded protein, the resin was washed successively with cold 0.1 M sodium bicarbonate (30ml), 0.05 M Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 8.0 (30 ml), 0.05 M sodium acetate, 0.5 M NaCl, pH 4.0 (30 ml), PBS, pH 7.4 (30 ml) and stored in PBS containing 0.05% sodium azide at 4°C. The stored column was then washed 5 times with PBS. A 0.5 ml sample of labeled monoclonal IgG and a volume of 1.5 ml of PBS was added to the resin and incubated over night at 4°C under inversion to fix the IgG on recombinant p60 protein. The resin was washed with PBS until the fluorescence signal returned to the minimum level ($\lambda = 550 \text{ nm}$ excitation, $\lambda = 576 \text{ nm}$ emission).

Detection of L. monocytogenes

A volume of 1 ml of the fresh culture of each bacterial strain was subcultured in 10 ml of TSB for 18 hours at 37°C and successively diluted by serial dilutions with sterile physiological water (0.85 % NaCl). 0.1 ml of each dilution was plated on trypticase soy agar (TSA, Difco Laboratory, Detroit, MI) in order to achieve a bacterial count. The right volume was calculated to obtain a theoretical amount of 1 CFU that has been inoculated in 10 ml of TSB for another 18 hours at 37°C. The cell-free supernatant from this last 18 hours culture (2 ml) was incubated with the resin for 10 minutes at room temperature under inversion. At the end of the incubation, 2 ml of flow-through containing the free p60-IgG-fluorophore complexes was harvested from the column. The fluorescence emission signal of this flow-through was measured at $\lambda_{em} = 576 \text{ nm}$ with an excitation wavelength of $\lambda_{ex} = 550 \text{ nm}$ and compared with the fluorescence signal of the background which corresponds to the residual fluorescence signal after the last wash of the column before the incubation with the bacterial sample. The column was then washed several times with PBS until the fluorescence signal returned to a minimum and constant level before being reused for another assay.

Results and discussion

Western blot analysing with monoclonal IgG anti-p60

The anti-p60 produced was tested to determine whether it was suitable for the specific detection of the *L. monocytogenes* p60 protein. For this purpose, a Western blot analysis with the supernatant proteins of various *Listeria* strains was performed. The six strains of *L. monocytogenes* used for the experiment belong to two of the three serotypes responsible for up to 96% of the cases of human listeriosis (Tompkin, 2002). *L. innocua* was used as non-pathogenic *Listeria* specie. The protein pattern of the culture supernatants obtained by SDS-PAGE is shown in Figure 9. A 60 kDa protein band is clearly visible for each of the strains which corresponds to the protein p60 or the p60-related protein of *L. innocua* (Bubert *et al.*, 1994). The important background on the gel and the large amount of protein bands are due to the fact that supernatants concentrated by a factor of 66 were used to reach a sufficient concentration of p60 protein that allowing its visualization on the gel. As shown on Figure 10, the monoclonal anti-p60 reacted specifically with the p60 protein of *L. monocytogenes* whereas no cross reactivity with the p60-related protein of *L. innocua* could be observed. These results are consistent with those obtained by Bubert *et al.* (1994) and it can be assumed, based on their results, that the monoclonal antibody used in this study, raised against the same PepD, is highly specific and can recognise all of the 13 serotypes of *L. monocytogenes* evaluated in this study.

Detection of native p60 protein in supernatants by ELISA

While the Western blot analysis allows verifying the recognition of denatured proteins by antibodies, an ELISA test performed with fresh supernatants allows verifying the recognition of native proteins. The possibility that the epitope is inaccessible when the protein is in its native form cannot be excluded. Therefore, it is important to perform both of these tests in order to confirm the detection of the epitope in the native and denatured form.

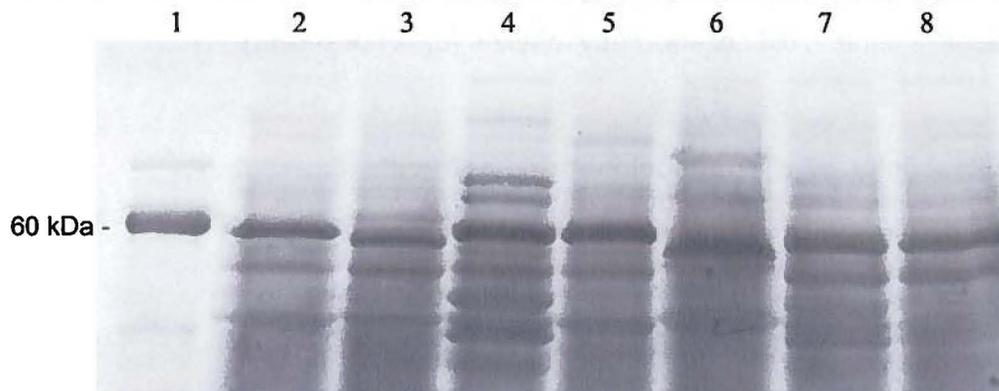


Figure 9 : Protein separation of concentrated cell-free supernatants from overnight culture of various *Listeria* species by 10 % SDS-PAGE electrophoresis. Lanes: 1, Recombinant p60 protein; 2, *L. monocytogenes* HPB 2569; 3, *L. monocytogenes* HPB 2558; 4, *L. monocytogenes* HPB 1043; 5, *L. monocytogenes* HPB 2812; 6, *L. monocytogenes* HPB 2739; 7, *L. monocytogenes* HPB 2371; 8, *L. innocua*.

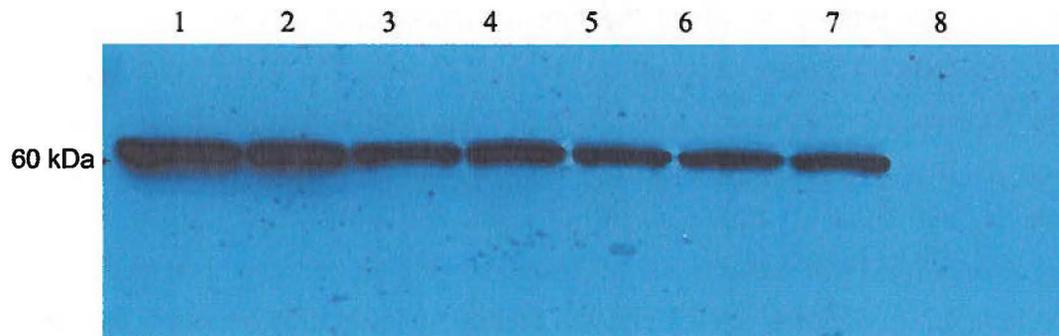


Figure 10 : Western blot analysis of concentrated cell-free supernatants from overnight culture of various *Listeria* species using a monoclonal anti-p60 antibody. Lanes: 1, Recombinant p60 protein; 2, *L. monocytogenes* HPB 2569; 3, *L. monocytogenes* HPB 2558; 4, *L. monocytogenes* HPB 1043; 5, *L. monocytogenes* HPB 2812; 6, *L. monocytogenes* HPB 2739; 7, *L. monocytogenes* HPB 2371; 8, *L. innocua*.

Direct ELISA tests were performed with fresh cell-free culture supernatants of the different strains of *Listeria*. Since ELISA is more sensitive than Western blot, it was achieved with non-concentrated supernatants. Results are shown in Table 4 and it can be seen that the monoclonal anti-p60 recognized all the *L. monocytogenes* strains tested while it presented no cross-reaction with the supernatant of non-pathogenic *L. innocua*.

The recombinant p60 protein was used as a positive control and fresh TSB broth alone, used as negative control, did not show any reaction (data not shown).

Table 4 : Reactivity of the monoclonal anti-p60 with supernatants from different *Listeria* strains by direct ELISA

Organism	Optical density
<i>Listeria innocua</i>	0.088
<i>Listeria monocytogenes</i>	
HPB 2812	1.022
HPB 1043	0.961
HPB 2569	1.123
HPB 2558	0.962
HPB 2739	1.113
HPB 2371	0.865

Validation of the principle of the test by ELISA

The detection test is based on a principle of competition between the recombinant p60 protein, to which the labeled monoclonal anti-p60 is fixed in the column, and the p60 protein secreted by bacterial strains. The determinant factor that underpins the success of the test is the ability of these fixed antibodies of being naturally displaced by competition on the free p60 protein from bacterial culture sample after its injection in the column. The amount of antibodies transferred depends on the concentration of free p60 protein. The new antibody-free p60 protein complexes can be harvested at the end of the column and the fluorescence rate is measured. In order to verify whether the antibodies can be transferred, a competition ELISA has been designed to recreate what happens in the column. However, it is not a classical competition ELISA since both of the antigens were not added at the same time. First, 0.1 µg of recombinant p60 protein was coated in each well on which a certain amount of antibodies was then fixed. A volume of supernatant from the *Listeria* culture was added to each well and incubated 15 minutes at room temperature to allow the antibodies to get transferred on the free p60 protein from supernatants. These new antibody-free p60 protein complexes were washed and the lost in the initial amount of antibodies is revealed by a diminution of the optical density after the reaction with a secondary antibody. The results of this competition ELISA show that supernatants providing from *L. monocytogenes* cultures can dislodge antibodies from their initial position while the

supernatant from *L. innocua* cannot (Tab. 5). It means that the antibodies recognise only the p60 protein in the supernatant of the *L. monocytogenes* strains and that this protein can capture a certain amount of antibodies already fixed on a recombinant p60 protein. The same experiment was also performed with supernatants diluted by half to see if the diminution of the optical density would be less important. This is indeed what has been observed and all these results confirm that the competition principle can be applied in the column for the detection test.

Table 5 : Non-classical competition ELISA^a designed to visualise the displacement of the monoclonal anti-p60 from the immobilized recombinant p60 protein to free p60 protein from supernatants.

Supernatant added	Optical density
none	1.239
Recombinant p60 (0.1 µg)	0.623
<i>Listeria innocua</i>	1.241
<i>Listeria innocua</i> diluted	1.229
<i>Listeria monocytogenes</i>	
HPB 2812	0.661
HPB 2812 diluted	0.996
HPB 1043	0.593
HPB 1043 diluted	0.983
HPB 2569	0.701
HPB 2569 diluted	1.086
HPB 2558	0.638
HPB 2558 diluted	1.018
HPB 2739	0.777
HPB 2739 diluted	1.070
HPB 2371	0.663
HPB 2371 diluted	1.069

^a First, a quantity of 0.1 µg of recombinant p60 protein was coated in each well on which a certain amount of antibodies was then fixed. A volume of supernatant from *Listeria* culture was added to each well and incubated 15 minutes at room temperature to allow the antibodies to get transferred on the free p60 protein from supernatants. The loss in the initial amount of antibodies is revealed by a diminution of the optical density after the reaction with the secondary antibody.

Detection of L. monocytogenes

The preparation of the column was carried out by fixing the labeled monoclonal anti-p60 to the recombinant p60 protein, which is immobilized on a Sepharose 4B matrix. The detection of the bacteria is possible due to the displacement of the labeled monoclonal anti-p60 by the p60 protein secreted by *L. monocytogenes*. Displaced

fluorescent antibodies are measured by fluorescence emission in the eluate and represent a measure of the amount of free p60 protein in supernatant and thus, if the initial sample was contaminated by *L. monocytogenes*. Before testing any sample, the column was washed several times with neutral buffer until the fluorescence signal of the eluate was minimal and constant. This signal was considered as the background. A volume (2 ml) of cell-free supernatants from an 18 hours culture inoculated with a theoretical amount of 1 CFU was added to the column and incubated 10 minutes at room temperature. A 2 ml eluate fraction was collected and the fluorescence emission was measured and compared with the background signal. A significant increase in fluorescence signal means that *L. monocytogenes* was present in the initial sample. The increase of fluorescence signal for each bacterial strain is shown in Figure 11. For each strain of *L. monocytogenes* tested, a significant increase in fluorescence emission was observed compared to the background whereas the signal for *L. innocua* remained constant.

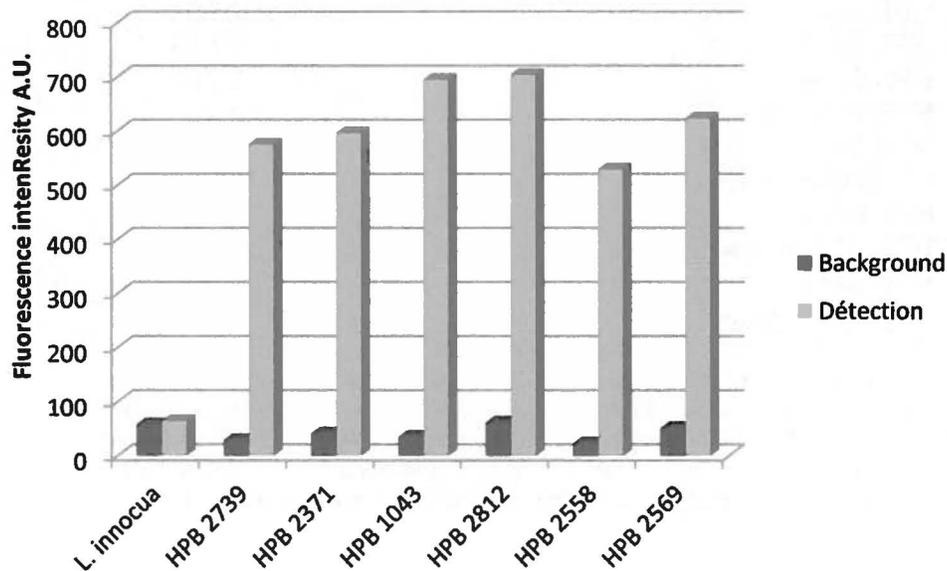


Figure 11 : Fluorescence immunoassay for detection of *L. monocytogenes*. Fluorescence emission was recorded at $\lambda_{em} = 576$ nm and is representative of the labeled antibody eluted from the column after incubation with cell-free supernatants from overnight culture of various *Listeria* species. Background signals represent the minimal and constant fluorescence emission after several washes. Excitation wavelength was at $\lambda_{ex} = 550$ nm.

Conclusion

In conclusion, a monoclonal antibody has been produced using a small 11 amino acid peptide which the sequence is highly conserved in the protein p60 of *L. monocytogenes*. Our results showed that this antibody is very specific to the p60 protein of *L. monocytogenes* and presents no cross-reactivity with p60-related protein of non-pathogenic *Listeria* species. This antibody was successfully used into the conception of a competitive fluorescent immunoassay for the detection of *L. monocytogenes*. The method consisted in the fixation of the labeled monoclonal anti-p60 on a recombinant p60 protein which is immobilized on a Sepharose 4B matrix. The addition of a cell-free supernatant from a bacterial culture containing secreted p60 protein induces the displacement of the antibody, which results in an increase in fluorescence signal of the eluate at the emission wavelength of the fluorophore. The assay allowed the detection of the 6 strains of *L. monocytogenes* tested after only 18 hours of incubation with a theoretical initial inoculum of 1 CFU. No false positive with *L. innocua* was observed and thus, this assay represents a promising way to develop a sensitive, specific and rapid detection test, not only for *L. monocytogenes*, but also for many other pathogens. Other experiments are in progress for the optimization of the test and also for the establishment of a standardized procedure applicable in the industry.

Acknowledgements

This research was supported by the Minister of Economic Development, Innovation and Export Trade, International Program (MDEIE). S. Beauchamp was also supported by a fellowship from Nature Research and Technology: International Training Program. The project was also partially funded by the CNR project "Conoscenze integrate per sostenibilità e innovazione del Made in Italy agroalimentare (CISIA)" to A.P. and S.D.

RÉFÉRENCES

- Abu-Tarboush Hamza M. (1998) Irradiation Inactivation of Some Antinutritional Factors in Plant Seeds. *J Agr Food Chem* 46(7):2698-2702.
- Agersborg A., Dahl R. & Martinez I. (1997) Sample preparation and DNA extraction procedures for polymerase chain reaction identification of *Listeria monocytogenes* in seafoods. *Int J Food Microbiol* 35(3):275-280.
- Ahn H. J., Yook H. S., Rhee M. S., Lee C. H., Cho Y. J. & Byun M. W. (2002) Application of Gamma Irradiation on Breakdown of Hazardous Volatile N-Nitrosamines. *Journal of Food Science* 67(2):596-599.
- Altekruse S. F., Cohen M. L. & Swerdlow D. L. (1997) Emerging foodborne diseases. *Emerg Infect Dis* 3(3):285-293.
- Balakrishna K., Murali H. S. & Batra H. V. (2010) A Novel Multiplex Polymerase Chain Reaction for Simultaneous Detection of *Yersinia Enterocolitica*, *Staphylococcus Aureus*, *Aeromonas* and *Salmonella* from Chicken Meat and Milk Samples. *J Food Safety* 30(2):263-275.
- Barbuddhe S. B., Parihar V. S., Danielsson-Thm M. L. & Tham W. (2008) Isolation and characterization of *Listeria* species from tropical seafoods. *Food Control* 19(6):566-569.
- Bari M. L., Nakauma M., Todoriki S., Juneja V. K., Isshiki K. & Kawamoto S. (2005) Effectiveness of irradiation treatments in inactivating *Listeria monocytogenes* on fresh vegetables at refrigeration temperature. *J Food Prot* 68(2):318-323.
- Baylis Chris, Betts R. P., Campden & Chorleywood Food Research Association. & Campden & Chorleywood Food Research Association Group. (2000) *The catalogue of rapid microbiological methods*. Campden & Chorleywood Food Research Association Group, Chipping Campden, 4th. 69 p. p
- Bell R. G. (1997) Distribution and sources of microbial contamination on beef carcasses. *J Appl Microbiol* 82(3):292-300.
- Berrada H., Soriano J. M., Pico Y. & Manes J. (2006) Quantification of *Listeria monocytogenes* in salads by real time quantitative PCR. *Int J Food Microbiol* 107(2):202-206.
- Blasius M., Sommer S. & Hubscher U. (2008) *Deinococcus radiodurans*: what belongs to the survival kit? *Crit Rev Biochem Mol Biol* 43(3):221-238.
- Bubert A., Kohler S. & Goebel W. (1992a) The homologous and heterologous regions within the *iap* gene allow genus- and species-specific identification of *Listeria* spp. by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 58(8):2625-2632.
- Bubert A., Kuhn M., Goebel W. & Kohler S. (1992b) Structural and functional properties of the p60 proteins from different *Listeria* species. *J Bacteriol* 174(24):8166-8171.
- Bubert A., Schubert P, Kohler S, Frank R & Goebel W (1994) Synthetic peptides derived from the *Listeria monocytogenes* p60 protein as antigens for the generation of polyclonal antibodies specific for secreted cell-free *L. monocytogenes* p60 proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(9):3120-3127.

- Burgess Sarah, Jaruga Pawel, Dodson M. L., Dizdaroglu Miral & Lloyd R. Stephen (2002) Determination of Active Site Residues in Escherichia coli Endonuclease VIII. *Journal of Biological Chemistry* 277(4):2938-2944.
- Cadenas E. (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 58:79-110.
- Caillet S. & Lacroix M. (2006) Effect of gamma radiation and oregano essential oil on murein and ATP concentration of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 69(12):2961-2969.
- 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(5):1384-1391.
- 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.
- Carpentier B. & Cerf O. (2011) Review--Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *Int J Food Microbiol* 145(1):1-8.
- Chan H. L., Gaffney P. R., Waterfield M. D., Anderle H., Peter Matthiessen H., Schwarz H. P., Turecek P. L. & Timms J. F. (2006) Proteomic analysis of UVC irradiation-induced damage of plasma proteins: Serum amyloid P component as a major target of photolysis. *FEBS letters* 580(13):3229-3236.
- Chen C. S. & Durst R. A. (2006) Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* with an array-based immunosorbent assay using universal protein G-liposomal nanovesicles. *Talanta* 69(1):232-238.
- Chung D. H., Shim W. B., Choi J. G., Kim J. Y., Yang Z. Y., Lee K. H., Kim M. G., Ha S. D., Kim K. S., Kim K. Y., Kim C. H., Ha K. S. & Eremin S. A. (2007) Production of monoclonal antibody against *Listeria monocytogenes* and its application to immunochromatography strip test. *J Microbiol Biotechnol* 17(7):1152-1161.
- Churchill R. L., Lee H. & Hall J. C. (2006) Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food. *J Microbiol Methods* 64(2):141-170.
- Clark A. G. & McLaughlin J. (1997) Simple color tests based on an alanyl peptidase reaction which differentiate *Listeria monocytogenes* from other *Listeria* species. *J Clin Microbiol* 35(8):2155-2156.
- Coia John E. (1998) Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 20(1):1-9.
- Conner D E & Kotrola J S (1995) Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. *Appl Environ Microb* 61(1):382-385.
- Cooke M. S., Evans M. D., Dizdaroglu M. & Lunec J. (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *Faseb J* 17(10):1195-1214.
- Cox M. M. & Battista J. R. (2005) *Deinococcus radiodurans* - the consummate survivor. *Nature reviews. Microbiology* 3(11):882-892.
- Daly M. J. (2009) A new perspective on radiation resistance based on *Deinococcus radiodurans*. *Nature reviews. Microbiology* 7(3):237-245.

- Daly M. J., Gaidamakova E. K., Matrosova V. Y., Vasilenko A., Zhai M., Leapman R. D., Lai B., Ravel B., Li S. M. W., Kemner K. M. & Fredrickson J. K. (2007) Protein oxidation implicated as the primary determinant of bacterial radioresistance. *Plos Biol* 5(4):769-779.
- Daly M. J., Gaidamakova E. K., Matrosova V. Y., Vasilenko A., Zhai M., Venkateswaran A., Hess M., Omelchenko M. V., Kostandarithes H. M., Makarova K. S., Wackett L. P., Fredrickson J. K. & Ghosal D. (2004) Accumulation of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance. *Science* 306(5698):1025-1028.
- De Champdore M., Bazzicalupo P., De Napoli L., Montesarchio D., Di Fabio G., Cocozza I., Parracino A., Rossi M. & D'Auria S. (2007) A new competitive fluorescence assay for the detection of patulin toxin. *Analytical chemistry* 79(2):751-757.
- Donnelly C. W. (2001) *Listeria monocytogenes*: a continuing challenge. *Nutr Rev* 59(6):183-194.
- Douki T., Laporte G. & Cadet J. (2003) Inter-strand photoproducts are produced in high yield within A-DNA exposed to UVC radiation. *Nucleic Acids Res* 31(12):3134-3142.
- Drake M., Isonhood J. & Jaykus L. A. (2006) Upstream sample processing facilitates PCR detection of *Listeria monocytogenes* in mayonnaise-based ready-to-eat (RTE) salads. *Food Microbiol* 23(6):584-590.
- Farkas J. (1997) Physical methods of food preservation. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, M.P. Doyle LRB, And T.J. Montville (Édit.) ASM Press, Washington, D.C. p 497-519
- Farkas J. (1998) Irradiation as a method for decontaminating food. A review. *Int J Food Microbiol* 44(3):189-204.
- Friedberg E. C., Walker G. C. & Siede W. (1995) *DNA repair and mutagenesis*. WH Freeman and Company, San Francisco
- Gandhi M. & Chikindas M. L. (2007) *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int J Food Microbiol* 113(1):1-15.
- Gangar V., Curiale M. S., D'Onorio A., Schultz A., Johnson R. L. & Atrache V. (2000) VIDAS enzyme-linked immunofluorescent assay for detection of *Listeria* in foods: collaborative study. *J AOAC Int* 83(4):903-918.
- Gardner D. W. & Shama G. (2000) Modeling UV-induced inactivation of microorganisms on surfaces. *J Food Prot* 63(1):63-70.
- Gasarov U., Hughes D. & Hansbro P. M. (2005) Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiol Rev* 29(5):851-875.
- Ghosal D., Omelchenko M. V., Gaidamakova E. K., Matrosova V. Y., Vasilenko A., Venkateswaran A., Zhai M., Kostandarithes H. M., Brim H., Makarova K. S., Wackett L. P., Fredrickson J. K. & Daly M. J. (2005) How radiation kills cells: survival of *Deinococcus radiodurans* and *Shewanella oneidensis* under oxidative stress. *FEMS Microbiol Rev* 29(2):361-375.

- Gouin E., Mengaud J. & Cossart P. (1994) The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovii*, an animal pathogen, and *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic species. *Infect Immun* 62(8):3550-3553.
- Guerrero-Beltran J. A. & Barbosa-Canovas G. V. (2005) Reduction of *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in apple juice by ultraviolet light. *J Food Process Eng* 28(5):437-452.
- Ha S. D., Park S. Y., Choi J. W., Yeon J., Lee M. J., Chung D. H., Kim M. G., Lee K. H., Kim K. S., Lee D. H., Bahk G. J., Bae D. H., Kim K. Y. & Kim C. H. (2005) Predictive modeling for the growth of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, NaCl, and pH. *J Microbiol Biotechnol* 15(6):1323-1329.
- Hada M., Hino K., Buchholz G., Goss J., Wellmann E. & Shin M. (2000) Assay of DNA photolyase activity in spinach leaves in relation to cell compartmentation-evidence for lack of DNA photolyase in chloroplasts. *Biosci Biotechnol Biochem* 64(6):1288-1291.
- Hahm B. K. & Bhunia A. K. (2006) Effect of environmental stresses on antibody-based detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and *Listeria monocytogenes*. *J Appl Microbiol* 100(5):1017-1027.
- Hao D. Y., Beuchat L. R. & Brackett R. E. (1987) Comparison of media and methods for detecting and enumerating *Listeria monocytogenes* in refrigerated cabbage. *Appl Environ Microbiol* 53(5):955-957.
- Hearty S., Leonard P., Quinn J. & O'Kennedy R. (2006) Production, characterisation and potential application of a novel monoclonal antibody for rapid identification of virulent *Listeria monocytogenes*. *J Microbiol Methods* 66(2):294-312.
- Hibi K., Abe A., Ohashi E., Mitsubayashi K., Ushio H., Hayashi T., Ren H. & Endo H. (2006) Combination of immunomagnetic separation with flow cytometry for detection of *Listeria monocytogenes*. *Anal Chim Acta* 573-574:158-163.
- Hill W.E. , Datta A.R., Feng P., Lampel K.A. & Payne W.L. (2001) Identification of Foodborne Bacterial Pathogens by Gene Probes. *Bacteriological Analytical Manual*, 24). <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm072659.htm#authors>
- Hitchins A. D. (1998) *Listeria monocytogenes*. *Bacteriological Analytical Manual, US Food and Drug Administration, AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.* p 10.01-10.11. <http://books.google.ca/books?id=S4ROPgAACAAJ>
- Horwitz W. (2000) AOAC Official Method 993.12. *Listeria monocytogenes* in Milk and Dairy Products. Selective Enrichment and Isolation Method. *Official methods of analysis of AOAC International*, AOAC international Gaithersburg, MD, 17th Ed Vol 1. p 138-141
- Hough A. J., Harbison S. A., Savill M. G., Melton L. D. & Fletcher G. (2002) Rapid enumeration of *Listeria monocytogenes* in artificially contaminated cabbage using real-time polymerase chain reaction. *J Food Protect* 65(8):1329-1332.
- Hudson J. A., Lake R. J., Savill M. G., Scholes P. & McCormick R. E. (2001) Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in ham samples using immunomagnetic separation followed by polymerase chain reaction. *J Appl Microbiol* 90(4):614-621.

- Imlay J. A. (2003) Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol* 57:395-418.
- International Organization for Standardization. (1996a) Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 1: Detection method, International Standard ISO 11290-1. Geneva, Switzerland).
- International Organization for Standardization. (1996b) Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 2: Enumeration method, International Standard ISO 11290-2. Geneva, Switzerland
- Iqbal S. S., Mayo M. W., Bruno J. G., Bronk B. V., Batt C. A. & Chambers J. P. (2000) A review of molecular recognition technologies for detection of biological threat agents. *Biosens Bioelectron* 15(11-12):549-578.
- Janzten M. M., Navas J., Corujo A., Moreno R., Lopez V. & Martinez-Suarez J. V. (2006) Review. Specific detection of *Listeria monocytogenes* in foods using commercial methods: from chromogenic media to real-time PCR. *Span J Agric Res* 4(3):235-247.
- Jo C., Yook H. S., Lee M. S., Kim J. H., Song H. P., Kwon J. S. & Byun M. W. (2003) Irradiation effects on embryotoxicity and oxidative properties of gossypol dissolved in methanol. *Food and Chemical Toxicology* 41(10):1329-1336.
- Josephson Edward S. & Peterson Martin S. (1982) *Preservation of food by ionizing radiation*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Jung Y. S., Frank J. F. & Brackett R. E. (2003) Evaluation of antibodies for immunomagnetic separation combined with flow cytometry detection of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 66(7):1283-1287.
- Kaur S., Malik S. V., Bhilegaonkar K. N., Vaidya V. M. & Barbuddhe S. B. (2010) Use of a phospholipase-C assay, in vivo pathogenicity assays and PCR in assessing the virulence of *Listeria* spp. *Vet J* 184(3):366-370.
- Kérouanton Annaëlle, Marault Muriel, Petit Laetitia, Grout Joël, Dao Trinh Tam & Brisabois Anne (2010) Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. *J Microbiol Meth* 80(2):134-137.
- Khelef N., Lecuit M., Bierne H. & Cossart P. (2006) Species specificity of the *Listeria monocytogenes* InlB protein. *Cell Microbiol* 8(3):457-470.
- Kim J. H., Ahn H. J., Kim D. H., Jo C., Yook H. S., Park H. J. & Byun M. W. (2003) Irradiation Effects on Biogenic Amines in Korean Fermented Soybean Paste During Fermentation. *Journal of Food Science* 68(1):80-84.
- Kim J. K., Patel D. & Choi B. S. (1995) Contrasting structural impacts induced by cis-syn cyclobutane dimer and (6-4) adduct in DNA duplex decamers: implication in mutagenesis and repair activity. *Photochem Photobiol* 62(1):44-50.
- Kim M. J., Lee J. W., Yook H. S., Lee S. Y., Kim M. C. & Byun M. W. (2002a) Changes in the Antigenic and Immunoglobulin E-Binding Properties of Hens Egg Albumin with the Combination of Heat and Gamma Irradiation Treatment. *J Food Protect* 65(7):1192-1195.

- Kim T., Silva J. L. & Chen T. C. (2002b) Effects of UV irradiation on selected pathogens in peptone water and on stainless steel and chicken meat. *J Food Prot* 65(7):1142-1145.
- Kindt T.J., Goldsby R.A., Osborne B.A. & Kuby J. (2007) *Kuby immunology*. WH Freeman,
- Klontz K. C., Wong S., Street D. & Delgado S. I. (2000) Recalls of foods and cosmetics due to microbial contamination reported to the US Food and Drug Administration. *J Food Protect* 63(8):1113-1116.
- Kohler S., Bubert A., Vogel M. & Goebel W. (1991) Expression of the iap gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* is controlled on the posttranscriptional level. *J Bacteriol* 173(15):4668-4674.
- Kohler S., Leimeisterwachter M., Chakraborty T., Lottspeich F. & Goebel W. (1990) The Gene Coding for Protein P60 of *Listeria-Monocytogenes* and Its Use as a Specific Probe for *Listeria-Monocytogenes*. *Infection and immunity* 58(6):1943-1950.
- Komatsu Y., Tsujino T., Suzuki T., Nikaido O. & Ohtsuka E. (1997) Antigen structural requirements for recognition by a cyclobutane thymine dimer-specific monoclonal antibody. *Nucleic Acids Res* 25(19):3889-3894.
- Koo K. & Jaykus L. A. (2003) Detection of *Listeria monocytogenes* from a model food by fluorescence resonance energy transfer-based PCR with an asymmetric fluorogenic probe set. *Appl Environ Microb* 69(2):1082-1088.
- Kuhn M. & Goebel W. (1989) Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. *Infect Immun* 57(1):55-61.
- Kuzminov A. (1999) Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 63(4):751-813, table of contents.
- Lambert J. D. & Maxcy R. B. (1984) Effect of Gamma Radiation on *Campylobacter jejuni*. *Journal of Food Science* 49(3):665-667.
- Lantz Pär-Gunnar, Hahn-Hägerdal Bärbel & Rådström Peter (1994) Sample preparation methods in PCR-based detection of food pathogens. *Trends in Food Science & Technology* 5(12):384-389.
- Lazcka O., Del Campo F. J. & Munoz F. X. (2007) Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosens Bioelectron* 22(7):1205-1217.
- Le-Tien C., Lafortune R., Shareck F. & Lacroix M. (2007) DNA analysis of a radiotolerant bacterium *Pantoea agglomerans* by FT-IR spectroscopy. *Talanta* 71(5):1969-1975.
- Lee Ju Woon, Yook Hong Sun, Lee Kyong Haeng, Kim Jae Hun, Kim Woo Jung & Byun Myung Woo (2000) Conformational changes of myosin by gamma irradiation. *Radiation Physics and Chemistry* 58(3):271-277.
- Lemee L., Peuchant E., Clerc M., Brunner M. & Pfander H. (1997) Deinoxanthin: A new carotenoid isolated from *Deinococcus radiodurans*. *Tetrahedron* 53(3):919-926.
- Leonard Paul, Hearty Stephen, Brennan Joanne, Dunne Lynsey, Quinn John, Chakraborty Trinad & O'Kennedy Richard (2003) Advances in biosensors for

- detection of pathogens in food and water. *Enzyme and Microbial Technology* 32(1):3-13.
- Levin-Zaidman S., Englander J., Shimoni E., Sharma A. K., Minton K. W. & Minsky A. (2003) Ringlike structure of the *Deinococcus radiodurans* genome: a key to radioresistance? *Science* 299(5604):254-256.
- Levin R. E. (2003) Application of the polymerase chain reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in foods: A review of methodology. *Food Biotechnol* 17(2):99-116.
- Li Z. G., Chen W., Yang Y. W. & Deng W. (2010) Development of the PCR kit for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in food. *J Food Agric Environ* 8(3-4):96-99.
- Lieber A., Leis A., Kushmaro A., Minsky A. & Medalia O. (2009) Chromatin organization and radio resistance in the bacterium *Gemmata obscuriglobus*. *J Bacteriol* 191(5):1439-1445.
- Liu D. (2006) Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of medical microbiology* 55(Pt 6):645-659.
- MacDonald P. D., Whitwam R. E., Boggs J. D., Reardon J. W., Saah R. R., Beatty M., Sobel J., Graves L. M., Hunter S. B. & MacCormack J. N. (2001) Outbreak of listeria-associated birth complications linked with homemade Mexican-style cheese, North Carolina, 2000. *Clin Infect Dis* 33(7):1236-1236.
- Magliulo M., Simoni P., Guardigli M., Michelini E., Luciani M., Lelli R. & Roda A. (2007) A rapid multiplexed chemiluminescent immunoassay for the detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* pathogen bacteria. *J Agric Food Chem* 55(13):4933-4939.
- Magnani M., Amagliani G., Brandi G., Omiccioli E., Casiere A. & Bruce I. J. (2004) Direct detection of *Listeria monocytogenes* from milk by magnetic based DNA isolation and PCR. *Food Microbiol* 21(5):597-603.
- Mahapatra A. K., Muthukumarappan K. & Julson J. L. (2005) Applications of ozone, bacteriocins and irradiation in food processing: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45(6):447-461.
- Markillie L. M., Varnum S. M., Hradecky P. & Wong K. K. (1999) Targeted mutagenesis by duplication insertion in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*: radiation sensitivities of catalase (*katA*) and superoxide dismutase (*sodA*) mutants. *J Bacteriol* 181(2):666-669.
- Matsunaga T., Hatakeyama Y., Ohta M., Mori T. & Nikaido O. (1993) Establishment and characterization of a monoclonal antibody recognizing the Dewar isomers of (6-4)photoproducts. *Photochem Photobiol* 57(6):934-940.
- McClain D. & Lee W. H. (1988) Development of USDA-FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. *J Assoc Off Anal Chem* 71(3):660-664.
- McCord J. M., Keele B. B., Jr. & Fridovich I. (1971) An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68(5):1024-1027.

- McKellar R. C. (1994) Use of the CAMP test for identification of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 60(12):4219-4225.
- Melin A. M., Perromat A. & Deleris G. (2001) Sensitivity of *Deinococcus radiodurans* to gamma-irradiation: a novel approach by Fourier transform infrared spectroscopy. *Arch Biochem Biophys* 394(2):265-274.
- Melin A. M., Perromat A. & Délérís G. (1999) Pharmacologic application of FTIR spectroscopy: Effect of ascorbic acid-induced free radicals on *Deinococcus radiodurans*. *Biospectroscopy* 5(4):229-236.
- Meng J. & Doyle M. P. (2002) Introduction. Microbiological food safety. *Microbes Infect* 4(4):395-397.
- Mitchell D. L. & Rosenstein B. S. (1987) The use of specific radioimmunoassay to determine action spectra for the photolysis of (6-4) photoproducts. *Photochem Photobiol* 45(6):781-786.
- Moeller R., Stackebrandt E., Douki T., Cadet J., Rettberg P., Mollenkopf H. J., Reitz G. & Horneck G. (2007) DNA bipyrimidine photoproduct repair and transcriptional response of UV-C irradiated *Bacillus subtilis*. *Archives of microbiology* 188(4):421-431.
- Møretrø T. & Langsrud S. (2004) *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms* 1(02):107-121.
- Moseley B.E.B. (1989) Ionizing radiation: action and repair. *Mechanisms of action of food preservation procedures*, Gould GW (Édit.) Elsevier Applied Science, Londre. p 43
- Murray Patrick R., Baron Ellen Jo & Microbiology American Society for (2007) *Manual of clinical microbiology*. ASM Press, Washington, D.C., 9th. 502 p
- Nguyen H. H., de la Tour C. B., Toueille M., Vannier F., Sommer S. & Servant P. (2009) The essential histone-like protein HU plays a major role in *Deinococcus radiodurans* nucleoid compaction. *Mol Microbiol* 73(2):240-252.
- Niemira B. A., Fan X., Sokorai K. J. & Sommers C. H. (2003) Ionizing radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes* ATCC 49594 and *Listeria innocua* ATCC 51742 inoculated on endive (*Cichorium endiva*). *J Food Prot* 66(6):993-998.
- Niman H.L., Houghten R.A., Walker L.E., Reisfeld R.A., Wilson I.A., Hogle J.M. & Lerner R.A. (1983) Generation of protein-reactive antibodies by short peptides is an event of high frequency: implications for the structural basis of immune recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80(16):4949.
- Ninet B., Bannerman E. & Bille J. (1992) Assessment of the Accuprobe *Listeria monocytogenes* culture identification reagent kit for rapid colony confirmation and its application in various enrichment broths. *Appl Environ Microbiol* 58(12):4055-4059.
- Nogva H. K., Rudi K., Naterstad K., Holck A. & Lillehaug D. (2000) Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk. *Appl Environ Microb* 66(10):4266-4271.
- Notermans S. H., Dufrenne J., Leimeister-Wachter M., Domann E. & Chakraborty T. (1991) Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to

- distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. *Appl Environ Microbiol* 57(9):2666-2670.
- Oguma K., Katayama H., Mitani H., Morita S., Hirata T. & Ohgaki S. (2001) Determination of pyrimidine dimers in *Escherichia coli* and *Cryptosporidium parvum* during UV light inactivation, photoreactivation, and dark repair. *Appl Environ Microbiol* 67(10):4630-4637.
- Olsen S. J., Evans M. C., Hunter S., Reddy V., Kornstein L., Mackenzie W. R., Lane K., Bidol S. A., Stoltman G., Frye D. M., Lee I., Hurd S., Gerber D., Jones T. F., Laporte T. N., Dewitt W., Graves L. M., Wiedmann M., Schoonmaker-Bopp D. J., Huang A. J., Vincent C., Bugenhagen A., Corby J., Carloni E. R., Holcomb M., Woron R., Zansky S. M., Dowdle G., Smith F., Ahrabi-Fard S., Ong A. R., Tucker N., Hynes N. A. & Mead P. (2001) Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infections linked to deli turkey meat. *Clin Infect Dis* 33(7):1237-1237.
- Oravcova K., Kaclikova E., Krascenicsova K., Pangallo D., Brezna B., Siekel P. & Kuchta T. (2006) Detection and quantification of *Listeria monocytogenes* by 5' -nuclease polymerase chain reaction targeting the *actA* gene. *Letters in Applied Microbiology* 42(1):15-18.
- Ottaviani F., Ottaviani M. & Agosti M. (1997) Differential agar medium for *Listeria monocytogenes*. *Ind Aliment-Italy* 36(361):888-&.
- Pan Y., Breidt F. & Gorski L. (2010) Synergistic Effects of Sodium Chloride, Glucose, and Temperature on Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* Serotype 1/2a and 4b Strains. *Appl Environ Microb* 76(5):1433-1441.
- Paolig C., Bhunia A. K. & Bayles D. O. (2005) *Listeria monocytogenes*. *Foodborne pathogens: microbiology and molecular biology*, Caister Academic Pr. p 295-325
- Rahman Shafiur (2007) *Handbook of food preservation*. CRC Press, Boca Raton, 2nd. xvii, 1068 p. p
- Reissbrodt R. (2004) New chromogenic plating media for detection and enumeration of pathogenic *Listeria* spp. - an overview. *Int J Food Microbiol* 95(1):1-9.
- Roca A. I. & Cox M. M. (1990) The RecA protein: structure and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 25(6):415-456.
- Rocha Eduardo P. C., Cornet Emmanuel & Michel Bénédicte (2005) Comparative and Evolutionary Analysis of the Bacterial Homologous Recombination Systems. *PLoS genetics* 1(2):e15.
- Rodriguez-Lazaro D., D'Urso O. F., Poltronieri P., Marsigliante S., Storelli C. & Hernandez M. (2009) A filtration-based real-time PCR method for the quantitative detection of viable *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in food samples. *Food Microbiol* 26(3):311-316.
- Rodriguez-Lazaro D., Hernandez M. & Pla M. (2004a) Simultaneous quantitative detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* using a duplex real-time PCR-based assay. *Fems Microbiol Lett* 233(2):257-267.
- Rodriguez-Lazaro D., Hernandez M., Scotti M., Esteve T., Vazquez-Boland J. A. & Pla M. (2004b) Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by real-time PCR: Assessment of *hly*, *iap*, and *lin02483* targets and AmpliFluor technology. *Appl Environ Microb* 70(3):1366-1377.

- Rodriguez-Lazaro D., Jofre A., Aymerich T., Garriga M. & Pla M. (2005a) Rapid quantitative detection of listeria monocytogenes in salmon products: Evaluation of pre-real-time PCR strategies. *J Food Protect* 68(7):1467-1471.
- Rodriguez-Lazaro D., Jofre A., Aymerich T., Hugas M. & Pla M. (2004c) Rapid quantitative detection of Listeria monocytogenes in meat products by real-time PCR. *Appl Environ Microb* 70(10):6299-6301.
- Rodriguez-Lazaro D., Pla M., Scotti M., Monzo H. J. & Vazquez-Boland J. A. (2005b) A novel real-time PCR for Listeria monocytogenes that monitors analytical performance via an internal amplification control. *Appl Environ Microb* 71(12):9008-9012.
- Rudi K., Naterstad K., Dromtorp S. M. & Holo H. (2005) Detection of viable and dead Listeria monocytogenes on gouda-like cheeses by real-time PCR. *Letters in Applied Microbiology* 40(4):301-306.
- Sancar A. (1994) Structure and function of DNA photolyase. *Biochemistry* 33(1):2-9.
- Sanchez-Reyes A. (1992) A simple model of radiation action in cells based on a repair saturation mechanism. *Radiation research* 130(2):139-147.
- Schlech W. F., 3rd, Lavigne P. M., Bortolussi R. A., Allen A. C., Haldane E. V., Wort A. J., Hightower A. W., Johnson S. E., King S. H., Nicholls E. S. & Broome C. V. (1983) Epidemic listeriosis--evidence for transmission by food. *N Engl J Med* 308(4):203-206.
- Schuchat A., Swaminathan B. & Broome C. V. (1991) Epidemiology of Human Listeriosis. *Clin Microbiol Rev* 4(2):169-183.
- Scotti M., Monzó H.J., Lacharme-Lora L., Lewis D.A. & Vázquez-Boland J.A. (2007) The PrfA virulence regulon. *Microbes Infect* 9(10):1196-1207.
- Setlow J. K. & Duggan D. E. (1964) The Resistance of Micrococcus Radiodurans to Ultraviolet Radiation. I. Ultraviolet-Induced Lesions in the Cell's DNA. *Biochimica et biophysica acta* 87:664-668.
- Sewell A. M., Warburton D. W., Boville A., Daley E. F. & Mullen K. (2003) The development of an efficient and rapid enzyme linked fluorescent assay method for the detection of Listeria spp. from foods. *Int J Food Microbiol* 81(2):123-129.
- Shieh J.J., Liang C.M., Chen C.Y., Lee F., Jong M.H., Lai S.S. & Liang S.M. (2001) Enhancement of the immunity to foot-and-mouth disease virus by DNA priming and protein boosting immunization. *Vaccine* 19(28):4002-4010.
- Shim W. B., Choi J. G., Kim J. Y., Yang Z. Y., Lee K. H., Kim M. G., Ha S. D., Kim K. S., Kim K. Y., Kim C. H., Ha K. S., Eremin S. A. & Chung D. H. (2007) Production of monoclonal antibody against Listeria monocytogenes and its application to immunochromatography strip test. *J Microbiol Biotechnol* 17(7):1152-1161.
- Silbernagel K., Jechorek R., Barbour W. M. & Mrozinski P. (2004) Evaluation of the BAX (R) system for detection of Listeria monocytogenes in foods: Collaborative study. *Journal of Aoac International* 87(2):395-410.
- Simon M. C., Gray D. I. & Cook N. (1996) DNA Extraction and PCR Methods for the Detection of Listeria monocytogenes in Cold-Smoked Salmon. *Appl Environ Microbiol* 62(3):822-824.

- Sinha R. P. & Hader D. P. (2002) UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci* 1(4):225-236.
- Sonntag C. von (1987) *The chemical basis of radiation biology*. London
- Swaminathan B. & Gerner-Smidt P. (2007) The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect* 9(10):1236-1243.
- T. N. Koutchma Larry J. Forney, Carmen I. Moraru (2009) *Ultraviolet light in food technology Principles and applications*. CRC press. 278 p
- Tart, R. Rodrigo, Murano Elsa A. & Olson Dennis G. (1996) Survival and Injury of *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* and *Listeria ivanovii* in Ground Pork Following Electron Beam Irradiation. *J Food Protect* 59(6):596-600.
- Thoma F. (1999) Light and dark in chromatin repair: repair of UV-induced DNA lesions by photolyase and nucleotide excision repair. *EMBO J* 18(23):6585-6598.
- Tian B., Sun Z., Shen S., Wang H., Jiao J., Wang L., Hu Y. & Hua Y. (2009) Effects of carotenoids from *Deinococcus radiodurans* on protein oxidation. *Lett Appl Microbiol* 49(6):689-694.
- Todd E. C. D. & Notermans S. (2011) Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 22(9):1484-1490.
- Tompkin R. B. (2002) Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *J Food Prot* 65(4):709-725.
- United States. Food Safety and Inspection Service. Microbiology Division. (2009) 8.07 Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Egg, and Environmental Samples. *Microbiology laboratory guidebook*, The Division : For sale by the U.S. G.P.O., Supt. of Docs., Washington, D.C., 3rd Ed. p 1-20. <http://www.fsis.usda.gov/OPHS/microlab/mlgbook.htm>
- Van Houten B. (1990) Nucleotide excision repair in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 54(1):18-51.
- Velusamy V., Arshak K., Korostynska O., Oliwa K. & Adley C. (2010a) An overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors. *Biotechnol Adv* 28(2):232-254.
- Velusamy V., Arshak K., Korostynska O., Oliwa K. & Adley C. (2010b) An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotechnology Advances* 28(2):232-254.
- Wallner-Pendleton E. A., Sumner S. S., Froning G. W. & Stetson L. E. (1994) The use of ultraviolet radiation to reduce *Salmonella* and psychrotrophic bacterial contamination on poultry carcasses. *Poult Sci* 73(8):1327-1333.
- Wang C. I. & Taylor J. S. (1991) Site-specific effect of thymine dimer formation on dAn.dTn tract bending and its biological implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(20):9072-9076.
- Wang P. & Schellhorn H. E. (1995) Induction of resistance to hydrogen peroxide and radiation in *Deinococcus radiodurans*. *Canadian Journal of Microbiology* 41(2):170-176.

- Waterworth W. M., Jiang Q., West C. E., Nikaido M. & Bray C. M. (2002) Characterization of Arabidopsis photolyase enzymes and analysis of their role in protection from ultraviolet-B radiation. *J Exp Bot* 53(371):1005-1015.
- Watkins J. & Sleath K. P. (1981) Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from Sewage, Sewage Sludge and River Water. *J Appl Bacteriol* 50(1):1-9.
- Weber C.W., Berry, JW., Philip, I. (1977) Citrullin, apodanthera, cucurbita and hibiscus seed protein. *Food Technology* 31:182-183.
- Weis J. & Seeliger H. P. (1975) Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Applied microbiology* 30(1):29-32.
- Welshimer H. J. (1960) Survival of *Listeria monocytogenes* in soil. *J Bacteriol* 80:316-320.
- Welshimer H. J. (1968) Isolation of *Listeria monocytogenes* from vegetation. *J Bacteriol* 95(2):300-303.
- Willemot C. Marcotte, M. Deschenes, L. (1996) Ionizing radiation for preservation of fruits. *Processing fruits: Science and Technology*, Technomic Publishing Company, Lancaster, PA. Vol 1. p 221
- Wong E., Linton R. H. & Gerrard D. E. (1998) Reduction of *Escherichia coli* and *Salmonella senftenberg* on pork skin and pork muscle using ultraviolet light. *Food Microbiol* 15(4):415-423.
- Wuenscher M.D., Köhler S., Bubert A., Gerike U. & Goebel W. (1993) The *iap* gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity. *Journal of bacteriology* 175(11):3491-3501.
- Yu K. Y., Noh Y., Chung M., Park H. J., Lee N., Youn M., Jung B. Y. & Youn B. S. (2004) Use of monoclonal antibodies that recognize p60 for identification of *Listeria monocytogenes*. *Clin Diagn Lab Immunol* 11(3):446-451.
- Zimmerman J. M. & Battista J. R. (2005) A ring-like nucleoid is not necessary for radioresistance in the *Deinococcaceae*. *BMC microbiology* 5:17.
- Zunabovic M., Domig K. J. & Kneifel W. (2011a) Practical relevance of methodologies for detecting and tracing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and manufacture environments - A review. *Lwt-Food Sci Technol* 44(2):351-362.
- Zunabovic Marija, Domig Konrad J. & Kneifel Wolfgang (2011b) Practical relevance of methodologies for detecting and tracing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and manufacture environments – A review. *LWT - Food Science and Technology* 44(2):351-362.

