

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

Étude des mécanismes de radiorésistance de la bactérie
Pantoea agglomerans

Par
Dominic Dussault

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

Jury d'évaluation

Examineur interne	Claude Dupont, Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Amanda Minnaar, University of Pretoria
Directeur de recherche	Monique Lacroix, Institut Armand-Frappier
Codirecteur de recherche	Tien Canh Le ¹ , Laboratoires Mauve Inc.

© droits réservés de Dominic Dussault, 2008

¹ Professeur associé

Résumé

Dans un contexte d'une population sans cesse grandissante et de la diminution des terres arables, la production alimentaire doit être de plus en plus efficace pour assurer un meilleur rendement. Avec la mondialisation de l'alimentation, les distances parcourues par les denrées sont augmentées, ce qui accroît les risques de contamination et de dégradation. Pour palier à cette problématique, il est primordial de trouver de nouvelles technologies afin d'accroître la salubrité alimentaire. De meilleurs procédés de conservation des aliments tels l'irradiation ionisante peut s'avérer une solution judicieuse. Dans cette optique, l'étude des mécanismes de radiorésistance bactérienne s'avère intéressante afin d'améliorer les procédés de fabrication et de conservation. L'objectif de ce projet de maîtrise était la compréhension des mécanismes de résistance bactérienne face à ce traitement de pasteurisation à froid. En 2004, Lacroix et Lafortune ont isolé une souche de bactérie résistant à une dose d'irradiation gamma de 7 kGy. Ce microorganisme fut identifié comme étant *Pantoea agglomerans*. Cette entérobactérie est 5 fois plus radiotolérante qu'*Escherichia coli* et est présente dans la flore de certains végétaux; il est donc possible de la retrouver dans les aliments contenant des légumes frais. Pour ces raisons, *P. agglomerans* a servi de modèle dans cette étude.

Les résultats obtenus ont montré que plusieurs mécanismes sont responsables de la résistance ou de l'adaptation au stress causée par l'irradiation. Selon la littérature, l'effet léthal de l'irradiation serait provoqué par l'oxydation massive des protéines bactériennes. D'après les résultats obtenus, l'irradiation par des rayons gamma semble augmenter la concentration de pigments caroténoïdiens. Toutefois, la concentration n'est pas nécessairement toujours liée à la radiorésistance bactérienne. De plus, la concentration en acides gras composant la membrane bactérienne semble être influencée par ce traitement. Une augmentation des acides gras insaturés ayant un pouvoir antioxydant pouvant provenir d'une modification enzymatique bactérienne a pu aussi être observée. Les résultats ont aussi montré que l'irradiation a un effet significatif sur la composition en muropeptides composant le peptidoglycane. Enfin, certains mécanismes de protéines chaperonnes, plus précisément GroEL/GroES et DnaK/DnaJ/GrpE, sont

induits suite à l'exposition aux rayons ionisants. En conclusion, les mécanismes de radiorésistance ne semblent pas spécifiques aux stress causés par l'irradiation ionisante. Le processus selon lequel l'irradiation déclencherait un dispositif de radiorésistance typique chez la bactérie semble être plutôt associé à l'activation de plusieurs mécanismes de défenses de la cellule incluant les machines d'adaptation cellulaires répondant aux stress environnementaux.

Étudiant

Directeur de recherche

Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier ma directrice de recherche, Prof. Monique Lacroix, pour m'avoir donné ma chance et m'avoir permis de découvrir ma passion pour la recherche. Également, je ne peux pas passer sous silence la contribution de mon co-directeur, Dr. Tien Canh Le, pour m'avoir conseillé tout au long de mes études de maîtrise. Merci à tous les membres, passés et présents, du Laboratoire Resala. Mathieu, Mélanie, Gilbert, Stéphane, Stéphane, Jae Joon, tous mes stagiaires, les employés de la compagnie MDS Nordion, tous mes amis, Tom et ma mère Carole. Enfin, sans l'appui financier accordé par le CRSNG à ce projet cette recherche n'aurait pu voir le jour.

Table des matières

Résumé	ii
Remerciements	iv
Liste des figures	vii
Liste des tableaux	viii
Liste des abréviations	ix
Introduction	1
Chapitre I : Revue bibliographique	3
1. L'irradiation	3
1.1 Généralité	3
1.2 Mode d'action	4
1.2 Pourquoi utiliser l'irradiation ionisante dans l'alimentation?	7
1.3 Les applications commerciales alimentaires	8
1.4 La réglementation alimentaire	8
1.4.1 Les fruits, légumes et épices	9
1.4.2 Les viandes et poissons	9
1.5 Les autres applications	10
1.6 Les combinaisons de traitements	11
2. La radiorésistance bactérienne	11
La D ₁₀	11
2.1 Résistance aux rayons γ chez les microorganismes	12
2.2 La cellule viable mais non cultivable	13
2.3 Les mécanismes d'actions de la radiorésistance bactérienne	14
3. Les composantes internes et la membrane bactériennes	16
3.1 Le peptidoglycane	18
3.2 Les acides gras	20
3.2.1 Les phospholipides	21
3.2.2 Les triacylglycérols	24
3.3 Les caroténoïdes	25
3.4 Les exopolysaccharides	27
3.5 L'ADN bactérien	27
3.5.1 L'ARNr 16S	28
3.6 Les protéines de stress	29
3.6.1 GroEL/GroES	30
3.7 L'ATP cellulaire	32
4. <i>Pantoea agglomerans</i>	33
4.1 Caractérisation	33
5. La problématique	34
5.1 Hypothèse	35
5.2 Objectifs	35
5.3 Moyens pour atteindre les objectifs	36
Chapitre II : Approche expérimentale	38
Souches bactériennes	38
Dénombrement bactérien	38
Séquençage du gène codant pour l'ARNr 16 S	39
Évaluation de la concentration bactérienne selon la densité optique	41

Détection d'un stade de CVNC	41
Chapitre III : Résultats	42
Caractérisation des souches bactériennes.....	42
Détection d'un stade de CVNC	42
Séquençage du gène codant pour l'ARNr 16 S.....	43
Évaluation de la concentration bactérienne selon la densité optique	45
Article 1: Carotenoids influence on radiotolerance of <i>Pantoea agglomerans</i> , a plant pathogen	46
Article 2: Effect of γ -irradiation on membrane fatty acids and peptidoglycan's muropeptides of <i>Pantoea agglomerans</i> , a plant pathogen	66
Article 3: Influence of γ -irradiation on heat shock proteins of <i>Pantoea agglomerans</i> , a yellow pigmented phytopathogen.....	92
Chapitre IV : Discussion	107
Détection d'un stade de CVNC	107
Confirmation des souches bactériennes	108
Synthèse des articles scientifiques	108
Bibliographie	110

Liste des figures

	Page
Figure 1: Le radura, symbole international de l'irradiation montrant qu'un aliment a été irradié.	4
Figure 2: Création des espèces réactives de l'oxygène dans la cellule.	5
Figure 3 : La réaction chimique de Fenton	6
Figure 4: Tétrade de quatre cellules de la bactérie <i>Deinococcus radiodurans</i> .	15
Figure 5: Schéma représentant la structure de la paroi d'une bactérie Gram négative	17
Figure 6: Schéma représentant la structure de la paroi d'une bactérie Gram positive	17
Figure 7: Schéma représentant la structure du peptidoglycane	19
Figure 8: Schéma représentant la structure moléculaire de l'acide stéarique (A), un acide gras saturé, et de l'acide oléique, un acide gras insaturé (B)	20
Figure 9: Schéma représentant la structure moléculaire d'un phospholipide	21
Figure 10: Représentation de l'action enzymatique de la désaturase sur un acide gras saturé	23
Figure 11: Schéma représentant la structure moléculaire d'un triacylglycérol	24
Figure 12: Représentation d'une molécule de β -carotène	25
Figure 13: Structure de l'ADN et de ses composantes	27
Figure 14: Mécanisme d'action du complexe GroEL/ES lors du repliement des protéines	30
Figure 15: Mécanisme d'action du complexe DnaK/DnaJ/GrpE lors du repliement des protéines	31

Liste des tableaux

	Page
Tableau I: Croissance de 2 souches de la bactérie <i>P. agglomerans</i> (ATCC 49174 et provenant de carottes irradiée à 7 kGy) après 24 h d'incubation à 30 °C préalablement soumises à différentes doses d'irradiation	42
Tableau II: Liste des microorganismes ayant obtenus la plus grande homologie de séquence codant pour l'ARNr 16S suite à la comparaison de base de données GenBank	43

Liste des abréviations

A	adénine
ADN	acide déoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
ARN _m	acide ribonucléique messenger
ARN _r	acide ribonucléique ribosomal
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	adénosine triphosphate
BLAST	(<i>basic local alignment search tool</i>)
C	cytosine
CVNC	cellule viable non cultivable
dATP	déoxyadénosine triphosphate
dCTP	déoxycytidine triphosphate
dGTP	déoxyguanosine triphosphate
dNTP	déoxyribonucléoside triphosphate
dTTP	déoxythymidine triphosphate
EPS	exopolysaccharide (s)
G	force de la gravité
G	guanine
Gy	gray (s)
GGPP	géranylgéranyl pyrophosphate
hsp	protéine du choc thermique (<i>heat shock protein</i>)
kDa	kiloDalton (s)
kGy	kilogray (s)
LSPQ	Laboratoires de santé publique du Québec
M	molaire (s)
mM	millimolaire (s)
mmol	millimole (s)
p/v	poids/volume
pb	paire (s) de bases

PCR	réaction en chaîne de la polymérase (<i>polymerase chain reaction</i>)
pmol	picomole (s)
rad	dose de radiation absorbée (<i>radiation absorbed dose</i>)
T	thymine
TAG	triacylglycérols
TBE	(<i>tris hydroxymethyl aminomethane/boric acid/ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
TSA	gélose de soya trypsique (<i>trypsic soy agar</i>)
TSB	bouillon de soya trypsique (<i>trypsic soy broth</i>)
U	unité (s)
UFC	unité formatrice de colonie
UV	ultraviolet
σ^{32}	sous unité de la polymérase à ARN sigma 32
σ^{70}	sous unité de la polymérase à ARN sigma 70

les mots en italique représentent l'équivalent anglais

Introduction

Déjà 10 000 ans avant notre ère, la conservation des aliments était une préoccupation importante pour la race humaine. Les moyens de conservations privilégiés étaient le froid, la chaleur, le séchage et la salaison. La plupart des techniques utilisées furent découvertes grâce au mode de recherche essais et erreurs. Suite au développement des méthodes scientifiques et des agents responsables de la détérioration des aliments, des actions réfléchies ont permis d'élaborer des nouvelles technologies augmentant les temps de conservation des aliments.

Dans un contexte d'une population sans cesse grandissante et d'une mondialisation des marchés, les contaminations des denrées alimentaires par des microorganismes pathogènes ou responsables de la détérioration des aliments, prennent de plus en plus d'importance. Plus de 200 différentes maladies sont transmises par les aliments. Aux États-Unis, 76 millions de maladies sont d'origine alimentaire et causent 325 000 hospitalisations et plus de 5000 décès chaque année (Mead *et al.*, 1999). Toutefois, les exigences des consommateurs pour des aliments frais et minimalement modifiés s'avèrent de vrais casse-têtes pour les industriels contemporains.

Les techniques antimicrobiennes actuelles sont efficaces pour éliminer les microorganismes mais ont plusieurs conséquences sur les qualités organoleptiques de l'aliment et sur la santé humaine. C'est pourquoi, depuis les deux dernières décennies, un intérêt marqué a été démontré pour les technologies d'inactivation douces des microorganismes, modifiant minimalement l'apparence physique de l'aliment, tels l'irradiation ionisante, les ultrasons sous fortes pressions atmosphériques, les hautes pressions hydrostatiques et les champs électriques pulsés. Les nouvelles tendances cherchent à diminuer l'utilisation des traitements antimicrobiens agressifs (i.e. la chaleur) pour les utiliser en combinaison avec les technologies légères et ainsi produire des produits plus attrayants pour les consommateurs.

L'irradiation ionisante, produit entre autre par la désintégration de l'atome radioactif $^{60}\text{Cobalt}$, est une des sources utilisées pour l'irradiation des produits alimentaires. En 1997, l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture, l'Organisation Mondiale de la Santé et l'Agence Internationale de l'Énergie Atomique conclurent à la suite des observations faite par un groupe de recherche que l'irradiation des aliments combinée à des bonne pratiques de fabrications pouvait être utilisée pour assurer l'innocuité des aliments. Toutefois, ces conclusions sont seulement des recommandations et la réglementation reste la responsabilité de chaque nation en ce qui concerne les sphères d'activités de son utilisation. Certains gouvernements sont plus réticents à approuver l'utilisation de cette technologie et préfèrent appliquer le principe de précaution vu les pressions négatives de la population et attendent la production d'études supplémentaires pour assurer l'innocuité de cette technologie.

Même si l'utilisation de l'irradiation ionisante en tant que traitement de décontamination est approuvée par plusieurs organismes, il reste plusieurs questions non-résolues en ce qui concerne les moyens de résistances des microorganismes face à ce stress. Une connaissance plus approfondie des mécanismes d'actions produisant l'effet bactéricide permettrait de mieux doser l'utilisation de ce traitement et permettrait de réduire les effets néfastes sur les produits traités. Ainsi, une utilisation plus intelligente et une combinaison de traitements bactéricides permettraient d'obtenir une efficacité de décontamination optimale et de meilleures qualités organoleptiques.

Chapitre I : Revue bibliographique

1. L'irradiation

1.1 Généralité

L'irradiation peut se décrire par l'exposition d'un produit à des rayonnements produits par la dégradation de particules radioactives. Il existe deux types d'irradiation : l'irradiation ionisante et non-ionisante. L'irradiation peut être appliquée sous forme d'un champ magnétique (non-ionisante) ou par le bombardement d'ions (ionisante). Dans le domaine alimentaire, on utilise une source d'irradiation ionisante pour traiter les aliments. Les sources d'irradiation ionisante permises sont l'isotope radioactif Cobalt 60 (^{60}Co), l'isotope Césium 137 (^{137}Cs), des électrons accélérés par un canon à électrons (10 MeV maximum) ou des rayons X (5 MeV maximum). Le niveau de rayonnement absorbé par un objet se mesure en Gray (Gy) ou en dose de radiation absorbée (rad) où 100 rad équivaut à 1 Gy où 1 Gy équivaut à un 1 J kg^{-1} (Manas et Pagan, 2005). La dose d'irradiation est mesurée en fonction du temps d'exposition et celui-ci est calculé en fonction de la puissance de la source. La plupart des irradiateurs commerciaux utilisent le ^{60}Co comme source de rayons γ de haute énergie. Les rayons γ sont composés de photons de haute énergie ($> 100 \text{ keV}$) émis par le noyau d'un atome radioactif. Ces rayons ont assez d'énergie pour déloger des électrons sur les atomes des molécules des aliments afin de produire un effet antimicrobien mais toutefois son énergie est trop faible pour affecter le noyau d'un atome ($< \text{MeV}$) et par le fait même ne peut rendre la nourriture radioactive. Les accélérateurs à électrons possèdent des filtres empêchant l'exposition des aliments aux particules ayant une énergie supérieure à 10 MeV. Les particules émises par le Co^{60} ont une énergie de 1.13 et 1.33 MeV et sont donc par le fait même sécuritaire pour l'irradiation des aliments (Mahapatra, Muthukumarappan et Julson, 2005).

L'irradiation est un moyen de stériliser, de pasteuriser (réduire le niveau de la flore endogène (virus, bactéries, levures, moisissures)), de désinsectiser et d'inhiber la

germination de plusieurs produits. Dans l'industrie alimentaire, l'irradiation est principalement utilisée pour assurer l'innocuité (éliminer les pathogènes), augmenter le temps de conservation (durée de vie) par la diminution de la flore microbienne endogène de certains aliments mais aussi pour la désinsectisation et l'inhibition de la germination. La durée de vie d'un produit peut se traduire par le temps maximal de conservation avant d'observer une dégradation non

acceptable tant au niveau des risques pour la santé humaine que pour ses qualités organoleptiques. L'irradiation ionisante permettra à l'exportateur de rejoindre des points de ventes de plus en plus loin de son lieu de production. De plus, les risques pour la santé humaine s'en trouvent réduits. Le terme pasteurisation à froid est aussi un synonyme de l'irradiation lorsqu'utilisé pour réduire la flore microbienne d'un aliment. Vue l'importance de l'opinion publique, on utilise ce terme car il ne suscite pas les craintes de la population qui sont normalement reliées à l'utilisation de produits associés à l'énergie nucléaire (Manas et Pagan, 2005). Au Canada, un aliment ne peut être irradié sans l'approbation de Santé Canada. Lorsque l'aliment est irradié, il doit nécessairement comporter sur son étiquette le signe du Radura (Figure 1). Il est impossible que le matériel irradié devienne radioactif car le processus d'irradiation ne permet pas que les produits soient en contact avec la source radioactive et de plus l'énergie émanant du ^{60}Co et du ^{137}Cs n'est pas suffisamment élevée pour rendre les éléments radioactifs. En ce qui concerne les accélérateurs à électron et les machines émettant des rayons X, des contraintes réglementaires sont imposées pour éviter ce genre d'incident.



Figure 1: Le Radura, symbole international de l'irradiation montrant qu'un aliment a été irradié.

1.2 Mode d'action

Au niveau de la bactérie, l'irradiation agit principalement en induisant des dommages à l'ADN des micro-organismes et ce de plusieurs façons. Premièrement, l'ADN occupe plus d'espace que tout autre molécule dans la cellule donc elle est touchée

plus fréquemment par les rayons. Deuxièmement, le génome est présent en très petit nombre, normalement un seul exemplaire par cellule, et il y a très peu de redondance dans les gènes qu'il encode ce qui le rend très vulnérable. Troisièmement, le matériel génétique régule toutes les activités cellulaires, donc dans les microorganismes unicellulaires la perte de certaines séquences de nucléotides encodant pour des gènes essentiels résulte en des conséquences fatales. L'irradiation peut endommager l'ADN des cellules de façon directe et indirecte. La façon directe formera des gonflements et des cassures au niveau de l'ADN suite à l'absorption de l'énergie de l'irradiation. Cet évènement produira des cassures au niveau de la liaison reliant les nucléotides entre eux. La façon indirecte quant à elle produira des radicaux libres provenant de l'hydrolyse de l'eau. Les radicaux libres attaqueront l'ADN et les autres composantes de la cellule en produisant un stress oxydatif comparable au stress oxydatif observé suite à la création d'espèces endogènes résultantes du métabolisme aérobique. Dans les conditions optimales de croissance, le métabolisme de la cellule produit une certaine quantité de radicaux libres, mais la cellule possède des mécanismes de protection afin de les neutraliser. Certaines molécules de la cellule ont le pouvoir de diminuer les effets négatifs des espèces oxydatives telles que les enzymes antioxydantes (i.e. la peroxydase, la catalase et la superoxide dismutase) et les antioxydants non-enzymatiques (i.e. la vitamine A et E et le manganèse). Les radicaux libres produits par l'irradiation sont principalement composés de radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$), hydrogène ($\text{H}\cdot$) et d'électrons hydratés (e^-_{aq}) (Figure 2).

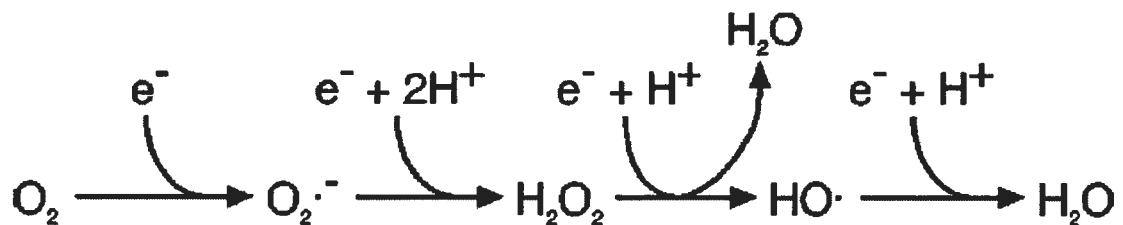


Figure 2: Création des espèces réactives de l'oxygène dans la cellule (adapté de Imlay, 2003)

Le radical OH• réagit avec le squelette de l'ADN qui est composé de sucre et de groupement phosphate. Les radicaux hydroxyles élimineront l'atome d'hydrogène présent sur le sucre et cette élimination aura pour effet de briser le lien phosphodiester reliant les nucléotides l'un à l'autre. Conséquemment, la coupure du lien phosphodiester aura pour effet de produire une coupure de l'ADN simple brin. La plupart des lésions simple brin sont réparées sans conséquences désastreuses pour la cellule. Toutefois, si une autre coupure du même type survient sur le brin d'ADN opposé non loin de l'autre, il y aura cassure double brins de l'ADN. Ces cassures double brins sont plus difficiles à réparer efficacement donc elles sont plus létales (Cox et Battista, 2005). Les radicaux hydroxyles peuvent aussi former des composés toxiques pour la cellule en présence d'O₂. Le dioxygène, en présence de radicaux hydroxyles, produira du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et des ions superoxydes O₂⁻ (Figure 3). Le seul radical libre qui peut directement endommager la plupart des biomolécules est le OH•. Mais toutefois, cette affirmation ne rend pas pour autant inoffensif les autres radicaux libres. Par exemple, le H₂O₂ produira le radical OH• grâce à la réaction de Fenton (Figure 3) et aura les mêmes conséquences fatales que les radicaux OH• produits par l'irradiation (Imlay, 2003).

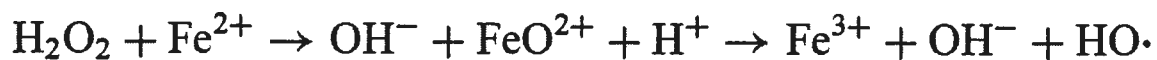


Figure 3 : La réaction de Fenton

Les récentes recherches laissent croire que les dommages directs à l'ADN produit par des rayons gamma résultant de l'irradiation ionisante sont responsables de seulement 20 % des dégâts et que les métabolites secondaires issues de l'irradiation provoquent 80 % du reste des ravages. Par exemple, la bactérie *Shewanella oneidensis*, qui possède des systèmes complexes de réparations de l'ADN ne peut pas survivre à une dose de 70 Gy, une dose qui ne produit pas plus qu'une cassure double brins par génome bactérien. De plus, l'irradiation ionisante à forte dose produit le même nombre de cassures double brins chez *S. oneidensis* que chez *Deinococcus radiodurans*, une bactérie pouvant résister à des doses de 10 kGy (Ghosal *et al.*, 2005). Donc, cette découverte peut laisser croire à des

mécanismes capables d'induire une radiorésistance en réparant les dommages produits ou en limitant l'effet des dommages encourus. C'est donc pour cette raison que l'étude des dommages oxydatifs (indirects) provoqués par les radiations γ , est très importante. Il est à noter que les dommages causés par l'irradiation ionisante sont similaires à ceux créés par la dessiccation. La dessiccation produit de multiples cassures doubles brins sur le génome bactérien. Par exemple, une déshydratation pendant 6 semaines de la bactérie *D. radiodurans*, produira en moyenne 60 cassures doubles brins. Les bactéries qui possèdent une bonne résistance à l'irradiation possèdent aussi une bonne résistance à la dessiccation (Fredrickson *et al.*, 2008).

1.2 Pourquoi utiliser l'irradiation ionisante dans l'alimentation?

L'irradiation est un moyen supplémentaire de contrôler la qualité microbiologique des aliments. Il a l'avantage d'être utilisé à froid (sans augmentation de chaleur), sur le produit emballé prêt à la distribution limitant ainsi les contaminations croisées. On utilise cette technique depuis le début des années 1940 dans le domaine alimentaire. Cette technologie a été appliquée dans ce secteur d'activité pour la première fois pour le traitement des aliments destinés à l'armée lors de la deuxième guerre mondiale. À ce moment, les rayons X étaient la source utilisée. Suite à la venue de cette nouvelle technologie prometteuse, l'industrie découvrit plusieurs applications potentielles à ce traitement. Les principales raisons pour lesquelles l'irradiation ionisante est utilisée dans le domaine de l'alimentation sont : le contrôle des pathogènes, la réduction de la charge microbienne, la désinfestation des insectes, l'inhibition de la germination des racines et la prolongation de la durée de conservation des denrées périssables (Mahapatra, Muthukumarappan et Julson, 2005). Toutefois, la réduction des coûts pour les entreprises est tout aussi importante et permet d'assurer la viabilité et la prospérité de leurs opérations. Les moyens conventionnels de conservation des aliments, comme la chaleur et le froid, sont très énergivores et peuvent altérer les qualités organoleptiques du produit fini. De plus, l'emballage de certains aliments les rend impénétrable à tout traitement antimicrobien. L'irradiation est un traitement physique de conservation qui peut

s'effectuer sur un produit frais, réfrigéré ou congelé. De plus, il est appliqué sur le produit emballé et est réalisé à un coût raisonnable pour l'industrie alimentaire. Pour ces raisons, l'irradiation peut s'avérer être une solution pour conter les maladies d'origines alimentaires. De plus, dans un contexte d'une forte croissance de la population mondiale et de la capacité de production alimentaire limitée de la planète, l'optimisation de la distribution des aliments pourrait être ainsi améliorée en augmentant leur durée de vie.

1.3 Les applications commerciales alimentaires

À ce jour, l'irradiation est permise au Canada sur un nombre restreint d'aliments. Santé Canada est responsable de l'approbation des denrées pouvant être irradiées à des doses minimales et maximales devant être utilisées pour traiter un aliment en particulier. L'annexe 1094 du règlement sur les Aliments et Drogue du gouvernement du Canada, stipule qu'avant d'autoriser le procédé d'irradiation sur d'autres aliments, une étude théorique approfondie doit être menée par Santé Canada sur l'innocuité chimique, toxicologique et microbiologique et la conservation des qualités nutritionnelles des aliments ainsi traités. Le requérant d'une demande d'approbation pour l'utilisation de l'irradiation doit fournir les données afin que Santé Canada évalue sa demande. Santé Canada ne réalisera pas les études afin de démontrer l'innocuité du produit. À ce jour, l'oignon, la pomme de terre, le blé, la farine, la farine de blé entier, les épices entières ou moulues et les assaisonnements déshydratés sont les seuls aliments pouvant être irradiés au Canada (Lacroix, 2005).

1.4 La réglementation alimentaire

Au Canada, la réglementation est stricte et gère tous les aspects de l'irradiation des aliments. Santé Canada, l'Agence Canadienne de l'Inspection des Aliments et la Direction Générale des Produits de Santé et des Aliments est responsable de la rédaction et de la mise à jour du code canadien de pratiques recommandées pour l'irradiation des aliments. Les raisons permettant d'utiliser l'irradiation afin de contrôler certains points

critiques des chaînes de productions alimentaires diffèrent d'un produit à l'autre et la réglementation sur l'irradiation des aliments varie d'un pays à l'autre. Toutefois, l'Organisation Mondiale de la Santé, l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agence Internationale de l'Énergie Atomique émettent régulièrement des recommandations sur l'utilisation de l'irradiation ionisante dans le secteur de l'alimentation. La réglementation décrite dans la prochaine section concerne les lois en vigueur sur les produits vendus pour la consommation humaine au Canada.

1.4.1 Les fruits, légumes et épices

D'abord, seulement l'oignon, la pomme de terre, le blé, la farine, la farine de blé entier, les épices entières ou moulues et les assaisonnements déshydratés peuvent être irradiés. Plusieurs aliments sont en cours d'approbation par Santé Canada en ce qui concerne le droit de les irradier avant leur mise en marché. La mangue, les crevettes, le bœuf, le poulet font partie de cette pétition en cours. Le ^{60}Co , les accélérateurs d'électrons et les rayons X sont les sources d'irradiation qui seront permises pour l'irradiation de ces denrées. La désinfestation de la mangue est souhaitable pour éliminer les problèmes liés aux infections de ce fruit particulièrement causées par la mouche à fruit et le bruche de mangue. Ainsi, suite aux diverses études, la réglementation obligera les compagnies à utiliser une dose minimale de 0.25 kGy et une dose maximale d'au plus 1.5 kGy, ce qui permettra de bien traiter les deux problématiques : La durée de vie et les infections du fruit (Lacroix, 2005). L'utilisation de l'irradiation comme traitement de désinfestation aura pour effet d'éliminer l'utilisation d'autres techniques plus dangereuses pour les manipulateurs ou plus énergivores tel que la fumigation.

1.4.2 Les viandes et poissons

À ce jour, l'irradiation des viandes et poissons est interdite au Canada. Toutefois, l'irradiation de ce type d'aliment ne saurait tarder car, l'amendement proposé en 2002 sur la législation de l'irradiation, prévoit l'ajout de quelques produits à la liste des aliments

pouvant être irradiés. Un premier type de viande proposé est la volaille. Le terme volaille comprend toutes les parties du poulet, de la dinde, de la poule à bouillir, du canard, du faisan, de l'oie et du poulet de Cornouailles autant dans son état frais que congelé. En utilisant autant le ^{60}Co , le ^{137}Cs , les rayons X ou l'accélérateur d'électrons, il sera possible d'irradier la viande à une dose minimale de 1.5 kGy et à une dose maximale de 3 kGy. Cette irradiation aura pour but de contrôler les organismes pathogènes, de réduire la charge microbienne totale et de prolonger la durée de conservation de l'aliment. Les crevettes forment le deuxième groupe étant en attente d'une approbation. Ce groupe englobe toutes les espèces de crevettes comestibles autant sous leur forme préemballées, fraîches, congelées, préparées et déshydratées. Pour traiter cet aliment, l'utilisation du ^{60}Co , le ^{137}Cs , les rayons X ou l'accélérateur d'électrons sera permis. L'utilisation de doses minimales de 1.5 kGy et de 3.5 kGy pour la dose maximale sera préconisée. Toutefois, l'utilisation d'une dose maximale de 5 kGy sera permise pour les crevettes congelées. Lorsque les aliments sont irradiés dans un état congelé, la dégradation des qualités organoleptiques est moins importante que lorsqu'ils sont irradiés au dessus du point de congélation. Ce traitement permet de prolonger la durée de vie des crevettes refroidies à 4 °C et permettra de réduire grandement le nombre de bactéries pathogènes dans le produit du consommateur et diminuera grandement l'impact la flore microbienne introduite lors de l'emballage du produit. Un dernier groupe de viande a été proposé, le bœuf haché. Le règlement vise à autoriser l'irradiation du bœuf haché frais et refroidi ou congelé dans son emballage définitif de vente afin de mieux contrôler les infections alimentaires par *Escherichia coli* O157:H7. L'irradiation ionisante servira à réduire le nombre d'organismes pathogènes, à diminuer la flore microbienne totale et à augmenter la durée de vie du produit. Il sera permis d'utiliser des doses de 1.5 à 4.5 kGy pour la viande fraîche et refroidie et des doses de 2 à 7 kGy pour la viande congelée.

1.5 Les autres applications

L'utilisation de l'irradiation n'est pas seulement utile dans le domaine alimentaire. Étant donné son grand pouvoir pénétrant et sa possibilité de stériliser les objets, plusieurs

objets à usage unique peuvent être stérilisés sans avoir à subir un traitement thermique ou chimique intense. La stérilisation de plusieurs instruments médicaux est réalisée par l'irradiation ionisante. Des doses de plus de 25 kGy sont utilisées pour la stérilisation (Amaechi, Higham et Edgar, 1998). L'irradiation peut être aussi utile pour créer de nouveaux polymères en modifiant d'une façon covalente les liens entre les molécules (Ohan et Dunn, 2003).

1.6 Les combinaisons de traitements

Pour optimiser l'effet de l'irradiation, il peut être souhaitable de combiner plusieurs traitements pouvant réduire la population bactérienne de l'aliment. La combinaison de l'irradiation à l'addition de certains composés emballés sous air ou sous atmosphère contrôlée permet d'utiliser des doses d'irradiation plus faible et d'obtenir un meilleur taux de destruction des microorganismes tout en limitant les impacts sur les qualités organoleptiques des aliments. L'ajout de composés naturels tels que les huiles essentielles de cannelle, de sarriette et d'origan a sensibilisé la bactérie *Listeria monocytogenes* à l'irradiation- γ en diminuant la dose nécessaire pour l'éliminer lorsque inoculée sur des carottes emballées sous air ou sous atmosphère modifiée (60% O₂, 30% CO₂ et 10% N₂) (Caillet *et al.*, 2006). D'autres résultats similaires ont été observés sur la combinaison de traitements avec le carvacrol (Chiasson, Borsa et Lacroix, 2005).

2. La radiorésistance bactérienne

La D₁₀

Afin de bien utiliser l'irradiation pour le contrôle de la population bactérienne de certains aliments, il est nécessaire de quantifier la dose d'irradiation nécessaire pour éliminer chaque type de bactéries. Le taux d'inactivation bactérien engendré par

l'irradiation peut être décrit par une courbe mathématique de premier degré : $\log(n/n_0) = -(1/D_{10}) \times D$ (van Gerwen *et al.*, 1999). Dans cette équation n représente la population restante après irradiation et n_0 représente la population initiale. De l'autre côté de l'équation, le D représente la dose d'irradiation et le paramètre D_{10} se réfère à la dose nécessaire pour réduire la population bactérienne de 1 log ou 90 % de la population initiale. Ainsi, la résistance bactérienne est estimée par la présente équation : $D_{10} = (\log(n/n_0) \times D)^{-1}$. L'estimation de la sensibilisation de la population bactérienne face à l'irradiation se base sur une résistance moyenne de toutes les cellules présentes. Il est donc normal qu'à très faible et à très forte dose la cinétique du taux de mortalité bactérien ne suit pas le même modèle mathématique. C'est donc pour cette raison que l'évaluation de la D_{10} doit se faire dans la partie linéaire de la courbe. Le paramètre de la D_{10} est un bon paramètre pour évaluer la résistance des bactéries car celui-ci reste constant lorsque toutes les conditions d'expérimentations sont les mêmes. Le milieu de culture, la température de croissance et la dose d'irradiation, la phase de croissance où la bactérie a été irradié, le pourcentage d'humidité lors du traitement et la source d'irradiation utilisée sont parmi les paramètres qui influencent la D_{10} (van Gerwen *et al.*, 1999).

2.1 Résistance aux rayons γ chez les microorganismes

En général, les virus sont plus résistants que les bactéries, les bactéries sont plus résistantes que les champignons et les champignons sont plus résistants que les cellules eucaryotes. Les bactéries Gram positives sont plus résistantes que les bactéries Gram négatives. Certaines exceptions à la règle ont toutefois été notées. Par exemple, la cyanobactérie Gram négative *Chroococcidiopsis* est très résistante à l'irradiation tandis que la bactérie Gram positive *Micrococcus luteus* est peu résistante (Ghosal *et al.*, 2005). L'état dans laquelle la cellule se trouve est très important car les cellules végétatives sont moins résistantes que les spores. Toutefois, certaines bactéries dans leur état végétatif peuvent être plus résistantes que d'autres bactéries dans leur état sporulé. Par exemple, *Deinococcus radiodurans* possède une D_{10} d'environ 10.5 kGy alors que les spores bactériennes possèdent une D_{10} moyenne de 2.5 kGy. La phase de croissance dans

laquelle la bactérie se trouve peut aussi influencer sa radiorésistance. Certaines bactéries sont plus sensibles à l'irradiation lors de leur phase de croissance exponentielle que lors de la phase stationnaire. Des bactéries du même genre et de la même espèce ne possèdent pas nécessairement le même niveau de radiorésistance. Lorsque les bactéries subissent un traitement d'irradiation alors qu'elles sont gelées, les cellules végétatives ont une D10 de 2 à 5 fois plus élevée tandis que l'effet sur les spores est plus mitigé en faisant varier positivement de quelques pourcents seulement leur niveau de résistance. Ceci est dû au fait que les radicaux libres sont moins mobiles lorsque la température est plus faible. La présence d'oxygène dans le milieu d'irradiation augmentera aussi l'effet létal de l'irradiation tandis qu'au contraire l'absence d'oxygène diminuera son effet mortel (van Gerwen *et al.*, 1999).

2.2 La cellule viable mais non cultivable

En présence de certains stress environnementaux (irradiation, changement de température, choc osmotique, variation de pH et manque de nutriments), les bactéries peuvent perdre l'habilité de croître sur les milieux de cultures conventionnels en entrant dans un stade de vie où la cellule est viable mais non cultivable (CVNC) tout en maintenant un métabolisme minimalement actif. Ce stade de vie peut protéger la cellule contre des stress environnementaux qui sont léthals lorsque la machinerie cellulaire est pleinement active. Il est possible que la bactérie retourne à un métabolisme cellulaire (stade de vie) normal et on nomme ce phénomène la résurrection cellulaire (Pitonzo, Amy et Rudin, 1999). De plus, il a été démontré que plusieurs bactéries (*Vibrio vulnificus*, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, *Escherichia coli* entérotoxigénique, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Legionella pneumophila*, *Shigella dysenteriae*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus* et *Enterococcus* spp.) possèdent un stade CVNC (Du *et al.*, 2007). Certaines levures possèdent aussi un stade de CVNC lorsque les conditions nécessaires sont présentes (Divol et Lonvaud-Funel, 2005). Selon une étude réalisée en 2003, une reprise de la croissance de la salmonelle sur des cuisses de poulet 12 jours après l'irradiation de la viande par des rayons γ (Mahrouf *et*

al., 2003) a été observée. Selon les mêmes auteurs, une reprise de la croissance de la bactérie *Pantoea agglomerans* sur des carottes 20 jours après l'irradiation des légumes par des rayons γ a également été observée (Lacroix et Lafortune, 2004). Ce phénomène n'est pas nouveau mais la découverte récente de ce type de manifestation bactérienne mérite une grande attention.

2.3 Les mécanismes d'actions de la radiorésistance bactérienne

La radiorésistance peut se décrire par la facilité de la bactérie à survivre à une dose d'irradiation ionisante. En général, les bactéries du type Gram positif sont beaucoup plus résistantes que les bactéries Gram négatives sans que l'on sache toutefois la raison de cette résistance (van Gerwen *et al.*, 1999). La bactérie *Deinococcus radiodurans* est une des bactéries les plus radiorésistantes connues. Cette bactérie Gram positif peut résister à des doses d'irradiation supérieures à 10 kGy. L'origine de l'évolution de la résistance des microorganismes face à l'irradiation semble être une conséquence indirecte de l'évolution de la résistance à la sécheresse. L'évolution des systèmes de résistance à l'irradiation semblait peu probable vu l'absence de source d'irradiation ionisante à forte dose dans la nature. Toutefois, des nouvelles recherches en bioinformatique semblent redonner de la force à la théorie de l'évolution directe de la radiorésistance. Des recherches dans des sédiments profondément enfouis dans la croûte terrestre et où les niveaux d'irradiation- γ y sont plus élevés, semblent démontrer une augmentation de la présence de bactéries fortement résistantes à l'irradiation ionisante (Sghaier *et al.*, 2007). Plusieurs mécanismes peuvent être responsables de cette radiorésistance. Une partie de la composition de la membrane cellulaire pourrait jouer un rôle dans la survie face à l'irradiation mais les machineries cellulaires responsables de la réparation de l'ADN et de la neutralisation des composés toxiques pour la cellule semblent aussi très importantes.

À ce jour, les causes qui sont responsables de la radiorésistance ne sont pas connues. Il a été noté qu'il existe une corrélation entre le ratio Mn/Fe et la radiorésistance. Plus ce ratio est élevé plus la bactérie est résistante. Toutefois les indices

laissent croire que la survie du microorganisme dépend de son habilité à pouvoir diminuer le niveau de radicaux libres dans son organisme, soit en les neutralisant ou soit en modifiant son métabolisme cellulaire afin d'utiliser des voies enzymatiques produisant très peu de radicaux libres. Ainsi, l'effet des radicaux libres diminués, les mécanismes de réparation de l'ADN peuvent agir sans subir d'interférences (Ghosal *et al.*, 2005). D'autres recherches ont observé la présence d'une protéine (PrpA) jouant un rôle crucial dans la survie de *D. radiodurans* (Figure 4) face à l'irradiation. Cette protéine jouerait un rôle dans un mécanisme de réparation de l'ADN inductible par l'irradiation en réparant des séquences non-homologues (Narumi *et al.*, 2004). Il est à noter que cette protéine ne semble pas présente chez d'autres types de microorganismes. Certains chercheurs, ont démontré qu'il est possible d'augmenter la radiorésistance d'un microorganisme à l'irradiation en l'exposant plusieurs fois à des doses d'irradiations sublétales (Levanduski et Jaczynski, 2008).

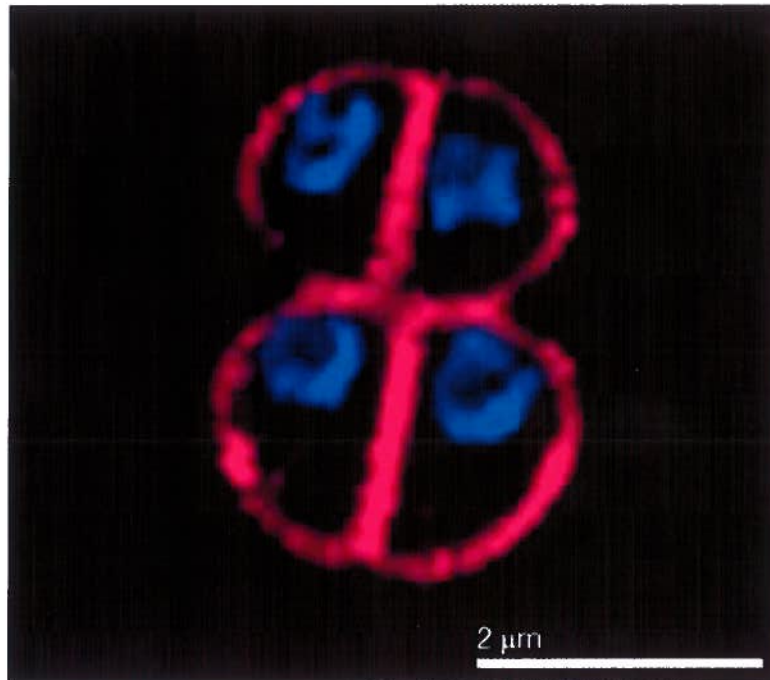


Figure 4: Tétrade de quatre cellules de la bactérie *Deinococcus radiodurans*. La membrane cellulaire est colorée en rouge et l'ADN est coloré en bleu. (Adapté de Cox et Battista, 2005).

3. Les composantes internes et la membrane bactériennes

La composition de la membrane bactérienne comporte plusieurs éléments distincts (peptidoglycane, acides gras des phospholipides, caroténoïdes, protéines et autres) pouvant influencer son degré de radiorésistance. La composition de la paroi des bactéries Gram négatives est plus complexe que celle des Gram positives. Pour les Gram –, une mince couche de peptidoglycane se situe dans l'espace périplasmique entre deux bicouches de phospholipides. La bicouche externe (membrane externe) contient des lipopolysaccharides du côté externe, des porines transmembranaires, des protéines (internes, externe et transmembranaires) et des lipoprotéines de Braun de son côté interne. Certaines lipoprotéines de Braun, environ le tiers, sont liées de façon covalente au peptidoglycane. La bicouche interne contient elle aussi des protéines (Figure 5). Pour les Gram +, la paroi est composée d'une large couche de peptidoglycane, d'un espace périplasmique et d'une membrane plasmique entourant le cytoplasme. Le peptidoglycane

contient des acides téchoïques (appelé lipotéchoïques lorsqu'elles sont reliées au phospholipides de la membranes plasmique) (Figure 6) (Prescott, Harley et Klein, 2003).

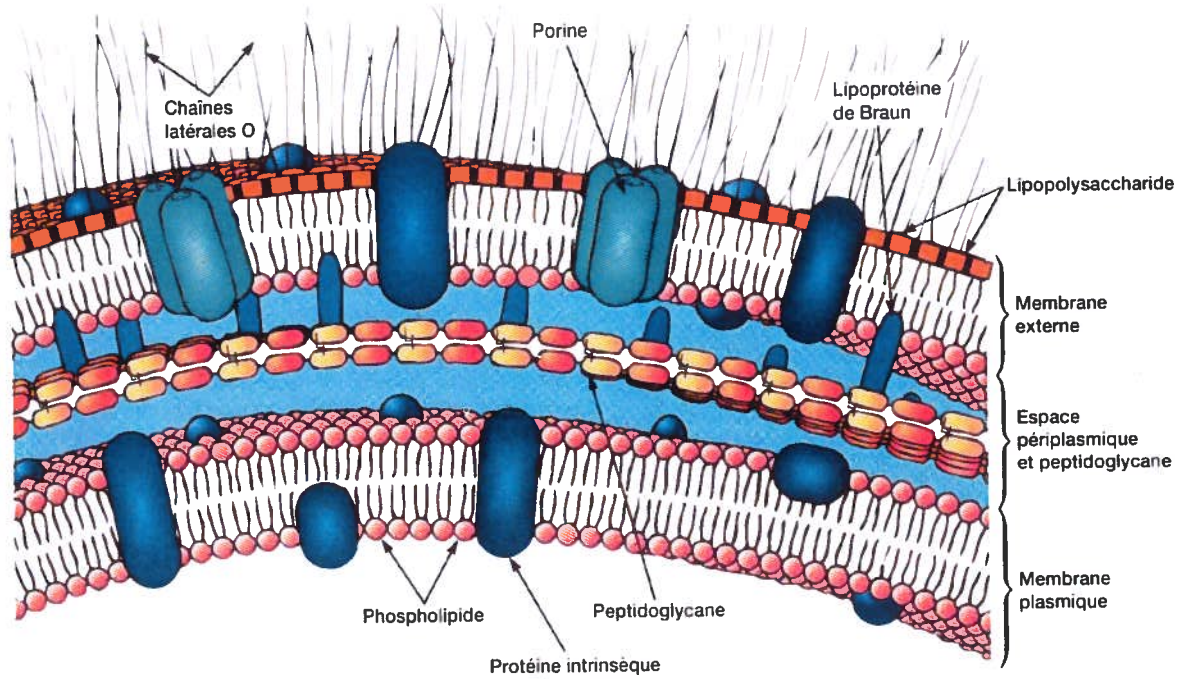


Figure 5: Schéma représentant la structure de la paroi d'une bactérie Gram négative (adapté de Prescott, Harley et Klein, 2003)

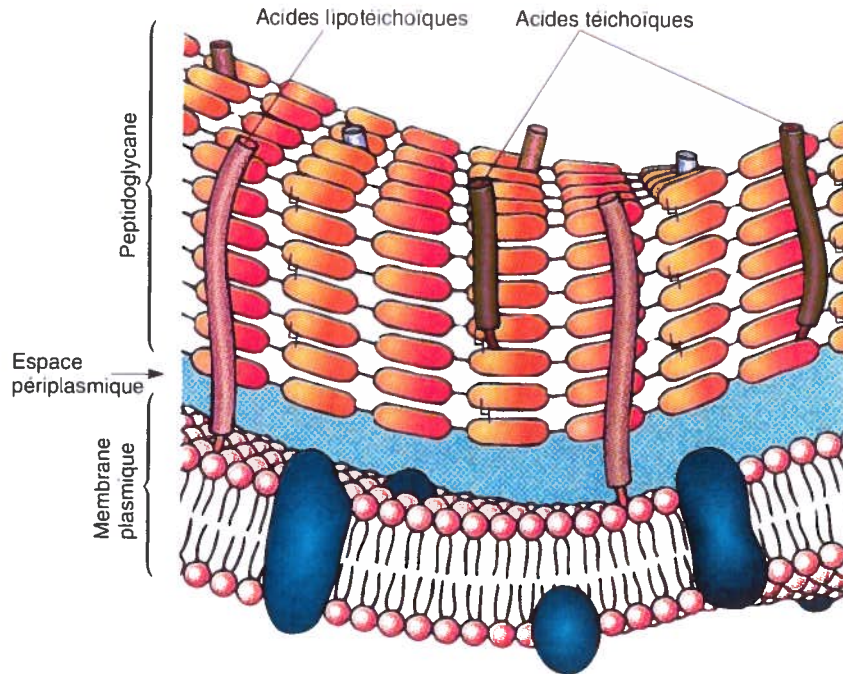


Figure 6: Schéma représentant la structure de la paroi d'une bactérie Gram positive (adapté de Prescott, Harley et Klein, 2003)

3.1 Le peptidoglycane

Le peptidoglycane, ou muréine, compose la paroi des bactéries. Toutefois, dans le règne des eucaryotes, il est possible de retrouver cette structure chez les organismes contenant des cyanelles. On nomme l'espèce représentant ce groupe, les glaucocystophytes (Pfanzagl *et al.*, 1996). Les bactéries Gram + ont une paroi composée majoritairement d'une couche de peptidoglycane d'une épaisseur de 20 à 80 nm. Les bactéries Gram – possèdent une couche de peptidoglycane d'une épaisseur 2 à 7 nm en plus d'une membrane externe. La muréine est un énorme polymère composé de plusieurs sous-unités reliées entre-elles. Ce polymère contient deux dérivés de sucre : la N-acétylglucosamine et l'acide N-acétylmuramique qui est relié à un peptide. Le squelette du peptidoglycane se compose d'une alternance entre la N-acétylglucosamine et l'acide N-acétylmuramique qui sont reliés entre eux par un lien β , 1→4. Des peptides composés de quatre acides aminés de conformation D et L en alternance sont liés au groupe carboxyle de l'acide N-acétylmuramique et permet de relier les différentes chaînes

glycosidiques entre elles. La liaison entre les chaînes de sucre peut être directe grâce aux liaisons interpeptidiques ou peut requérir l'utilisation d'intermédiaires agissant en tant que pont interpeptidique. Cet intermédiaire est aussi composé d'acides aminés (Figure 7). Les bactéries Gram – possèdent peu de ponts interpeptidiques comparativement aux bactéries Gram +. La structure de la muréine en forme de filet donne une rigidité à la paroi bactérienne pour lui permettre de résister à des pressions osmotiques supérieures tout en lui conférant une élasticité et une porosité lui permettant de laisser passer certaines molécules à travers la paroi bactérienne jusqu'au cytoplasme (Prescott, Harley et Klein, 2003). De plus, la muréine dicte la forme de la cellule et est intimement impliquée dans la division cellulaire. À l'extérieur de la membrane cytoplasmique, deux types d'activités se produisent en ce qui concerne la synthèse du peptidoglycane. Premièrement, des glycotransférases s'occupent de catalyser la formation de la chaîne linéaire de sucres et deuxièmement des transpeptidases catalysent la formation de ponts interpeptidiques entre les térapeptides. Les transpeptidases sont les molécules visées par les antibiotiques composants le groupe des β -lactames telle que la pénicilline (van Heijenoort, 2001).

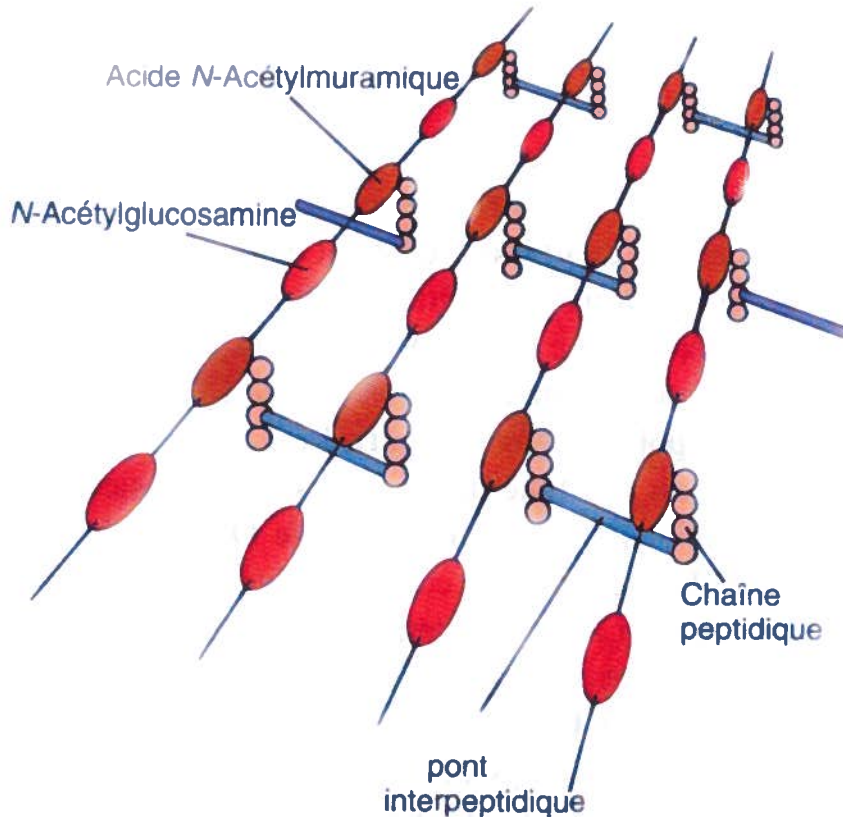


Figure 7: Schéma représentant la structure du peptidoglycane (adapté de Prescott, Harley et Klein, 2003)

3.2 Les acides gras

La structure moléculaire des acides gras se compose de deux régions chimiquement distinctes. Il y a une longue chaîne de carbone qui est hydrophobe et qui n'est pas chimiquement réactive. À l'autre bout de la molécule, se tient un groupe carboxyle (COOH) qui se comporte comme un acide (Figure 8). Le groupe carboxyle porte une charge négative en solution (COO⁻), est très hydrophile et est chimiquement très réactif. La plupart des acides gras que l'on retrouve dans la cellule sont liés d'une manière covalente à d'autres molécules par la partie carboxyle de l'acide gras. Tous les acides gras ont tous cette même structure de base. Toutefois, ils se différencient par la longueur de la chaîne carbonée et la position et le nombre de doubles liens carbone-

carbone sur la chaîne. Chaque double lien C=C réduira d'un atome la teneur en hydrogène de la molécule. Ces différenciations influencent son degré de saturation (Alberts, 2002). Plus la chaîne de carbone est longue et saturée, plus le point de fusion de l'acide sera élevé. Dans la nomenclature, on décrit les acides gras en nommant le nombre de carbone, où le carbone numéro 1 est le carbone du groupe carboxyle, le nombre de double liaison et leurs positions. L'acide oléique qui comporte 18 carbones et une double liaison au 9^e carbone s'écrira 18:1 Δ^9 selon cette nomenclature. La cellule utilise les acides gras comme réserve d'énergie et elle les utilise pour former sa membrane cytoplasmique (Horton *et al.*, 2002).

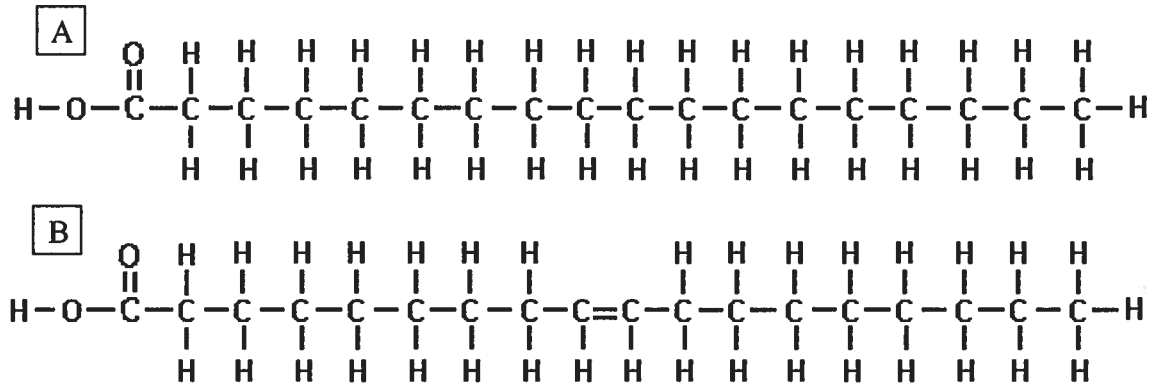


Figure 8: Schéma représentant la structure moléculaire de l'acide stéarique (A), un acide gras saturé, et l'acide oléique (B), un acide gras insaturé (B)

3.2.1 Les phospholipides

Dans la cellule bactérienne, les phospholipides sont les molécules majoritaires comportant des acides gras car ils forment la membrane cytoplasmique. Les phospholipides se composent de deux chaînes d'acides gras, variant en longueur de 14 à 24 carbones, via les liens esters entre la partie carboxyle et un groupement glycérol. Le glycérol est à son tour relié à un groupement phosphate hydrophile et le groupement phosphate se lie à un groupement hydrophile qui en général se compose de la choline

(Figure 9) (Horton *et al.*, 2002). Cette arrangement moléculaire permet au phospholipide d'avoir une partie hydrophobe et une autre hydrophile ce qui leur donne la propriété d'être amphipatique. Grâce à cette propriété, la membrane cytoplasmique pourra être formée d'une bicouche de phospholipides où les groupements hydrophobes auront une orientation vers l'intérieur de la membrane et les têtes hydrophiles pointeront vers l'extérieur de la membrane. Les différences de conformations des phospholipides (longueur de la chaîne et le nombre de doubles liens C=C) permettent d'obtenir une membrane cytoplasmique compacte et fluide. Donc, grâce à ces interactions hydrophobes et hydrophiles, toute brèche dans la membrane pourra être réparée sans que la cellule ne fournisse aucun effort (Alberts, 2002). Les acides gras désaturés jouent un rôle important dans la fluidité de la membrane (Aguilar et de Mendoza, 2006).

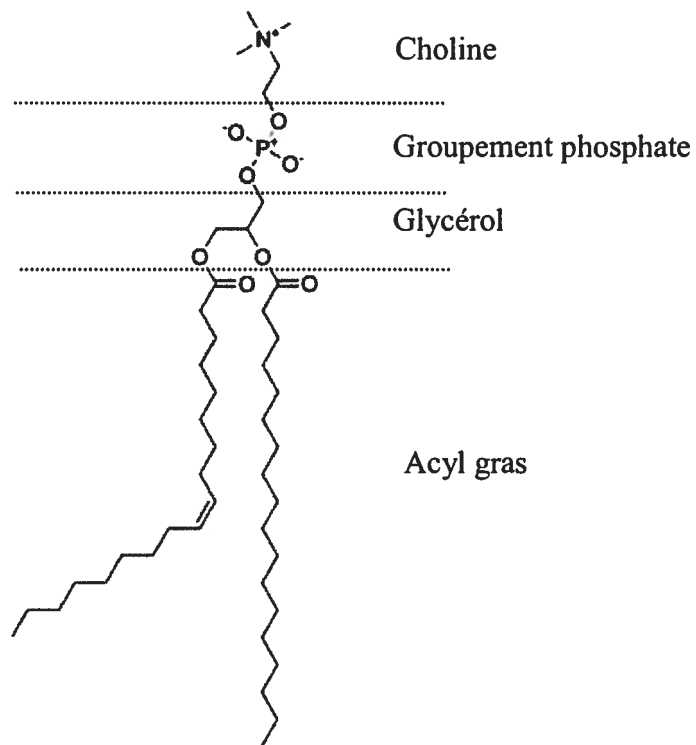


Figure 9: Schéma représentant la structure moléculaire d'un phospholipide. Un des acides gras possède une insaturation (à gauche) et l'autre est saturé (à droite).

Il a été démontré que les bactéries peuvent modifier le type d'acides gras composant leur membrane cytoplasmique pour augmenter son taux de survie lorsqu'elles sont confrontées à des stress environnementaux comme les variations de température, variations de pH, des concentrations élevées d'éthanol et à une pression osmotique excessive (Di Pasqua *et al.*, 2006). Des recherches ont aussi démontrées que l'irradiation produite par des rayons ultraviolets peut modifier la composition membranaire en acides gras des bactéries (Gupta *et al.*, 2007).

Un groupe d'enzymes capable de la désaturation des acides gras joue un rôle important dans la composition des acides gras membranaires. On nomme ces enzymes les désaturases. Elles sont responsables de la production des acides gras désaturés à partir d'acides gras saturés ou déjà désaturés (Figure 10). La production d'acides gras insaturés est régulée par un mécanisme de rétroaction négative. La présence d'acide gras désaturés, le produit des désaturases, induira un signal qui diminuera la synthèse des gènes nécessaire à la production. Une sonde (DesK) détectant la fluidité membranaire régule la phosphorylation d'un activateur de la transcription (DesR). Lorsque celui-ci est suffisamment phosphorylé, le facteur de transcription se lie à l'ADN et la transcription débute. Par exemple, lorsque *Bacillus subtilis* est cultivé à des températures suboptimales, les lipides de sa membrane deviennent plus rigides et ainsi sa membrane devient moins fluide. Suite à ce stress, une adaptation suivra et une augmentation des la proportion des acides gras insaturés permettra de restaurer la fluidité membranaire normale. *B. subtilis* possède une seule désaturase. La synthèse de cette désaturase est faiblement active lorsque la bactérie est cultivée à des températures optimales de croissance mais fortement augmentée quand elle est exposée à un choc thermique au froid. Des mécanismes d'adaptation similaires existent chez les eucaryotes unicellulaires et multicellulaire (Aguilar et de Mendoza, 2006).

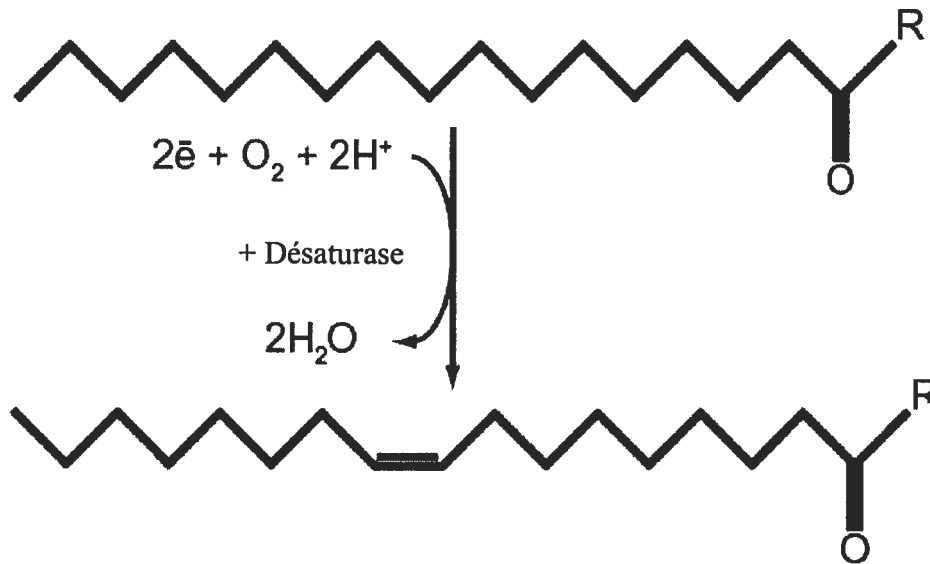


Figure 10: Représentation de l'action enzymatique de la désaturase sur un acide gras saturé (adaptée de Aguilar et de Mendoza, 2006)

3.2.2 Les triacylglycérols

Les triacylglycérols (TAG) sont une très bonne façon d'emmagasiner de l'énergie pour la cellule car, poids pour poids, les TAG donne 6 fois plus d'énergie que le glucose. Cette molécule se compose de trois chaînes reliées par une molécule de glycérol (Figure 11) (Alberts, 2002). L'accumulation de TAG va permettre à la cellule de se protéger des effets néfastes causés par la présence d'une concentration élevée d'acides gras libre dans le cytosol. Les TAG serviront de dépôts non-toxiques pour la cellule. Sous cette forme (associés) les acides n'ont pas l'effet toxique qui est généralement associé à la forme dissociée (Waltermann, Stoveken et Steinbuchel, 2007).

d'isoprène à 5 carbones provenant généralement de la voie de biosynthèse des isoprénoïdes. Par la suite, la fusion des unités à 5 carbones, la tête de l'un s'attache à la queue de l'autre, pour former une unité de 20 carbones, le géranylgeranyl pyrophosphate (GGPP). En terminant, la fusion de deux GGPP produira la molécule de 40 carbones, la phytoène. Le phytoène sert généralement de précurseur pour la synthèse des autres caroténoïdes. La production de caroténoïdes de 30 carbones implique la fusion de deux unités de farnesyl pyrophosphate (FPP), provenant de la combinaison de 3 isoprènes au lieu de 4, ce qui remplacera les unités GGPP. Pour la synthèse de caroténoïdes de plus de 40 carbones, les unités isoprène de 5 carbones supplémentaires seront greffées au squelette déjà conçu de 40 carbones (Cheng, 2006).

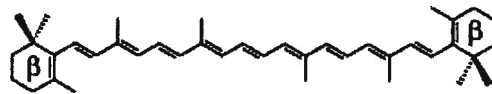


Figure 12: Représentation d'une molécule de β -carotène (adapté de Inoue, 2004)

Les principales fonctions des caroténoïdes chez les organismes vivants sont de : produire un pigment de couleur attrayante, protéger l'hôte contre les radicaux libres produit en présence de lumière et d'autres molécules comme la chlorophylle, les hèmes et la protoporphyrine IX et jouer un rôle dans la synthèse de molécules importantes pour la différenciation cellulaire. Le β -carotène étant un précurseur de la vitamine A, démontre son importance dans les organismes ne pouvant la synthétiser (Armstrong et Hearst, 1996). Une bactérie possédant des caroténoïdes est plus résistante à l'irradiation- γ qu'un mutant incolore ne produisant pas de caroténoïdes (Carbonneau *et al.*, 1989). Il est possible d'augmenter la production de caroténoïdes d'un microorganisme en modifiant les conditions de culture (Khodaiyan *et al.*, 2007). Des études de populations microbiennes dans des sites naturels exposé à un niveau de radiation γ plus élevé que la moyenne ont montré une plus grande proportion de bactéries produisant des caroténoïdes (Asker, Beppu et Ueda, 2007). Des analyses épidémiologiques chez l'humain ont démontré qu'une diète comprenant plus de caroténoïdes diminue les risques de développer certaines maladies dégénératives comme le cancer, les maladies cardiovasculaires et les maladies

ophtalmologiques. L'effet préventif de cette molécule a été associée à son effet antioxydant (Stahl et Sies, 2003).

3.4 Les exopolysaccharides

Par définition, un exopolysaccharide (EPS) est une chaîne de polysaccharides composée de ramifications d'unités répétitives de sucres ou de dérivés de sucres. Les sucres les plus fréquemment retrouvés dans les EPS sont le glucose, le galactose et le rhamnose. Les EPS sont sécrétés dans le milieu extracellulaire et ne sont pas attachés de façon permanente à la surface de la cellule (Welman et Maddox, 2003). Une souche de *P. agglomerans* produisant un EPS a été découverte. Ce polysaccharide soluble dans l'eau comporte une forte activité antioxydante. Cette activité antioxydante est aussi attribuée à la résistance accrue de cette souche de *P. agglomerans* à l'irradiation par des rayons UV (Wang *et al.*, 2006).

3.5 L'ADN bactérien

Lors de l'exposition à l'irradiation, l'ADN (Figure 13) est soumise à plusieurs changements. Les conséquences peuvent être une modification d'une base azoté, une insertion ou une délétion d'un nucléotide, une coupure simple ou double brin (une coupure apparaissant sur chaque brin d'ADN et à quelques bases d'intervalle) et une apparition de liens covalents entre les nucléotides d'un même brin (dimère de pyrimidine). Si ces types de dommages ne sont pas réparés adéquatement et si les modifications sont situées sur une partie du chromosome codant pour un gène essentiel à la survie bactérienne, la bactérie mourra. Toutefois, si les dommages se situent sur des gènes non essentiels, la bactérie deviendra mutante mais elle sera toujours viable et capable de se répliquer (Le-Tien *et al.*, 2006).

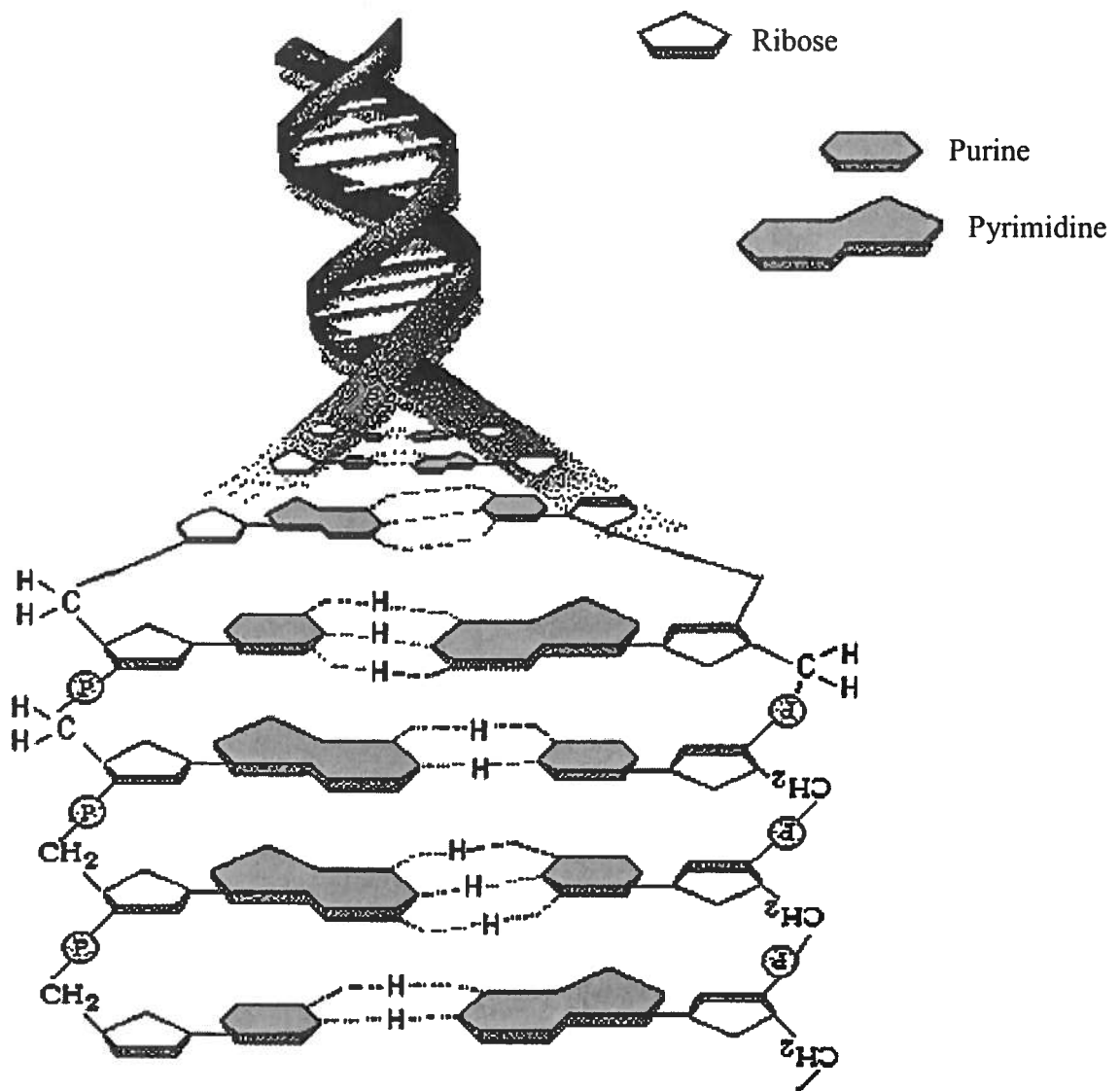


Figure 13: Structure de l'ADN et de ses composants (adapté de accessexcellence.org)

3.5.1 L'ARNr 16S

Les premiers ouvrages de classification des microorganismes se basaient principalement sur le phénotype. Suite à l'évolution de la microbiologie, il devenait évident que des microorganismes possédant des caractéristiques semblables ne devaient pas avoir une même origine évolutive. Grâce à la découverte de l'ADN et de ses fonctions, il devint plus facile de tracer la relation phylogénique entre les espèces. C'est

pourquoi de nos jours, par une méthode plutôt simple, une classification juste et définitive des microorganismes peut être effectuée. Le séquençage d'une partie du génome codant pour l'ARNr 16S, une sous unité composant le ribosome des procaryotes. Le séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S est une technique fiable, rapide et peu dispendieuse pour l'identification d'une espèce bactérienne; c'est pourquoi elle est très utilisée dans la plupart des laboratoires d'analyses. La séquence d'ADN codant pour l'ARNr 16S est une séquence hautement conservée au cours de l'évolution des espèces et elle contient des variations de séquences de nucléotides spécifiques à l'espèce et au genre de la bactérie. Suite au séquençage, la séquence d'ADN obtenue est comparée à une base de donnée tel que: la Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms (RIDOM) (<http://www.ridom.com>, University of Wuerzburg, Germany), la Ribosomal Database project (<http://www.rdp.cme.msu.edu/index.jsp>, RDP-II, version 9.26, Michigan State University, USA), GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Blast 2.2.10, National Institute of Health, USA) et la MicroSeq 500 database (Applied Biosystems, versions 1.4.1 and V1.0, Foster City, CA, USA) (Ruppitsch *et al.*, 2007). Une homologie de séquence de 97 % ou plus permettra de confirmer qu'il s'agit de la même espèce à laquelle la séquence a été comparée (Janda et Abbott, 2007).

3.6 Les protéines de stress

L'activité métabolique d'une protéine est reliée à sa forme tridimensionnelle plutôt qu'à sa forme linéaire. La plupart du temps, le repliement des protéines est un phénomène qui se fait de façon spontanée sans l'aide d'intermédiaires. Toutefois, le repliement de certaines protéines requiert l'utilisation par la cellule de protéines chaperonnes pour assurer la bonne structure tridimensionnelle des polypeptides qu'elle synthétise. Un mauvais repliement protéique aurait pour conséquence d'inactiver la protéine et pourrait même inactiver d'autres protéines en s'agréant à celles-ci. Cette affirmation est d'autant plus vraie lors de stress environnementaux comme les élévations de température qui ont tendance à dénaturer les protéines. Deux familles de chaperonnes moléculaires (hsp 60 et hsp 70) composent majoritairement le système de repliement

protéique assisté des organismes vivants. La quantité de protéines chaperonnes synthétisée dépend principalement de la conformation dans laquelle se trouve l'ARN polymérase. Pour synthétiser les ARN messagers codant pour des protéines, le noyau de l'ARN polymérase doit se lier à un facteur sigma, il en existe 6 différents chez *E. coli*. Le facteur σ^{70} est le facteur prédominant lorsque la bactérie est dans un environnement idéal de croissance. Cette liaison permettra à la polymérase de se lier à des séquences spécifiques sur le génome bactérien et d'enclencher la transcription de l'ADN. Le facteur σ^{32} est un régulateur de la réponse au choc thermique. Lors d'un choc thermique, le niveau de σ^{32} augmentera et le cœur de la polymérase à ARN aura tendance à se lier d'avantage au facteur σ^{32} qu'au facteur σ^{70} . Ainsi, la production de certaines protéines se trouve augmentée. Certains sites de liaisons sur l'ADN peuvent être liés autant le facteur σ^{32} et σ^{70} (Wade *et al.*, 2006), donc les protéines essentielles à la survie bactérienne ne se trouveront pas influencées.

3.6.1 GroEL/GroES

La protéine du choc thermique GroEL (hsp60) est constituée de 14 sous-unités identiques de 57 kD. La principale fonction de cette protéine est la liaison à certaines chaînes polypeptidiques sans structure tertiaire. Cette association aura pour conséquence de prévenir les associations non spécifiques avec d'autres molécules, de replier adéquatement la protéine cible sous sa bonne conformation tridimensionnelle et d'empêcher sa dégradation prématurée par les protéases intracellulaires (Marchenko *et al.*, 2006). La protéine du choc thermique GroES est constituée de 7 sous-unités identiques de 10 kD. L'association de GroEL et de GroES est nécessaire pour que le complexe ait une activité. Ce complexe de chaperonne agit sur les protéines complètement synthétisées. Son activité est ATP dépendante et l'hydrolyse de l'ATP est reliée au relargage du substrat correctement replié de la poche du complexe (Figure 14).

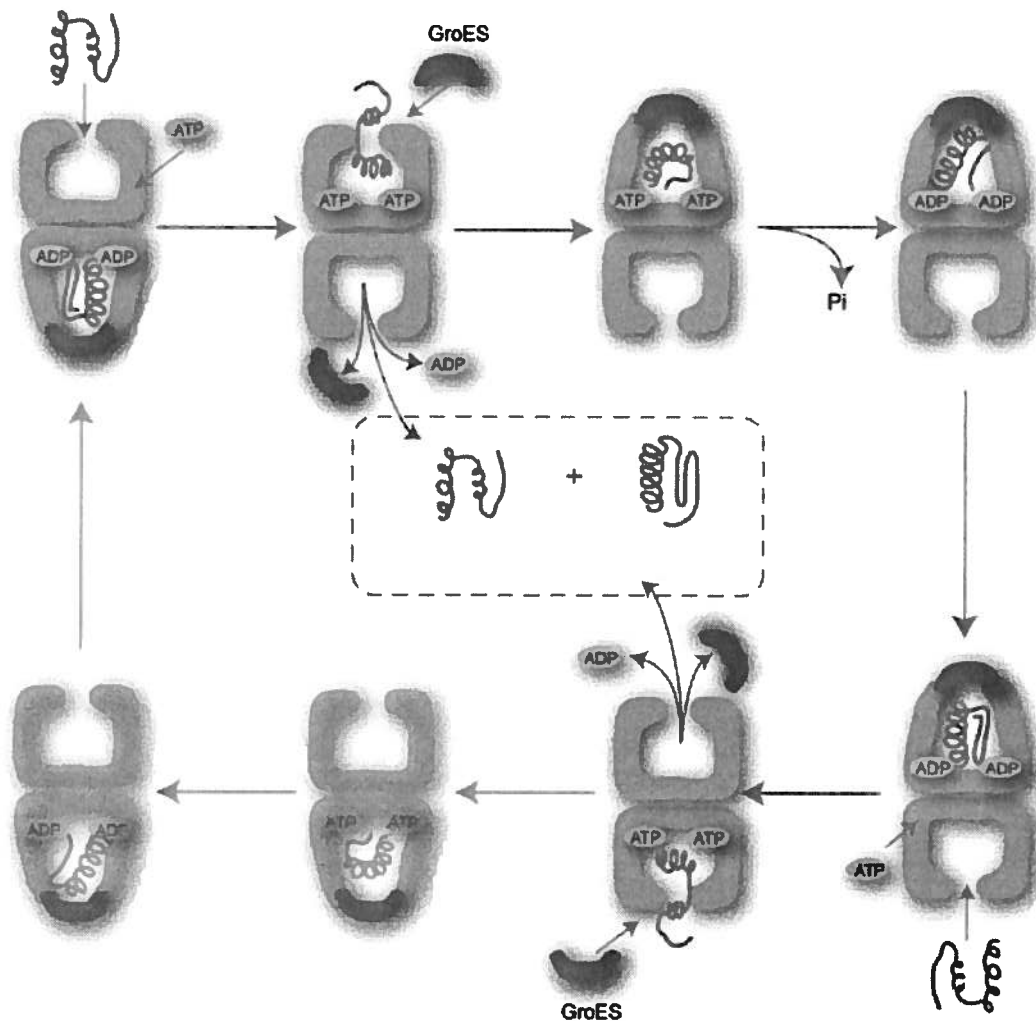


Figure 14: Mécanisme d'action du complexe GroEL/ES lors du repliement des protéines (adaptée de Lin et Rye, 2006).

3.6.2 DnaK/DnaJ/GrpE

Connue aussi sous le nom de hsp70 cette famille de protéines chaperonnes contient plusieurs types différents de DnaK. DnaK fait partie d'une machinerie cellulaire nécessitant les protéines DnaJ et GrpE. Cette protéine chaperonne agit principalement au début de la vie du peptide car elle se lie à une partie de celui-ci alors que sa synthèse n'est même pas terminée contrairement au complexe GroES/EL qui englobe complètement le peptide après sa synthèse. Son activité est ATP dépendante et l'hydrolyse de l'ATP par celle-ci est associée au relâchement du substrat correctement replié par les complexe (Figure 15) (Genevaux, Georgopoulos et Kelley, 2007).

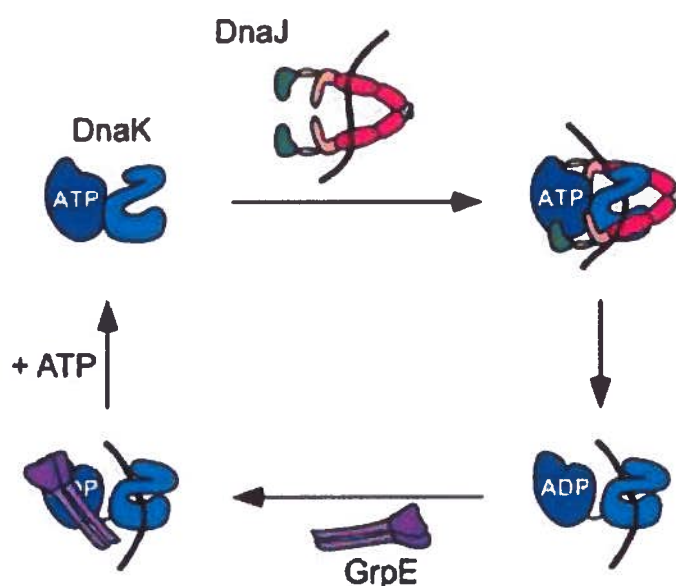


Figure 15: Mécanisme d'action du complexe DnaK/DnaJ/GrpE lors du repliement des protéines (adapté de Genevaux, Georgopoulos et Kelley, 2007)

3.7 L'ATP cellulaire

L'observation des concentrations d'ATP intracellulaire et extracellulaire permet d'étudier les cellules ayant un métabolisme actif. Un relargage d'ATP dans le milieu extracellulaire démontre une défaillance au niveau de la paroi cellulaire et l'incapacité des bactéries à réparer les dommages encourus (Caillet, Shareck et Lacroix, 2005). La

quantification de cette molécule permet d'évaluer rapidement le niveau d'activité microbiologique du milieu donnée. L'utilisation de cette technique dans l'industrie alimentaire est une alternative efficace aux méthodes microbiologiques traditionnelles pour faire l'évaluation des lots de matières premières (Frundzhyan et Ugarova, 2007).

4. *Pantoea agglomerans*

Une description générale des différentes composantes de *P. agglomerans* permettra de cibler les différents mécanismes de radiorésistance potentiels de la bactérie. Sa relation phylogénique envers les autres *Enterobacteriaceae* lui permet d'être une bonne candidate pour les études de radiorésistance car plusieurs pathogènes d'origine alimentaire font partie de cette famille. Les résultats obtenus pourront possiblement être retrouvés chez les autres membres de cette famille.

4.1 Caractérisation

Au cours des années, la bactérie a changé de nom plusieurs fois. Découverte en 1888 par Beijerinck, *Bacillus agglomerans* fut son premier nom. Ensuite, en 1972, Ewing et Fife renommèrent la bactérie *Enterobacter agglomerans* (Edwards, Baque et Tang, 2004). C'est au courant des années 1990 que la bactérie prendra son nom définitif de *Pantoea agglomerans*. Avant l'apparition des techniques de biologie moléculaire pour établir les relations phylogéniques, *Pantoea agglomerans* était nommée parfois sous le nom d'*Erwinia herbicola* (Becker-Hapak *et al.*, 1997).

P. agglomerans fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Cette famille de bactéries se compose de bacilles Gram négatifs, anaérobies facultatifs, oxydase négatif et fermentant le glucose (Bartelt, 2000). *P. agglomerans* est un bacille mobile de 1 à 3 µm de longueur par 0.5 à 1.3 µm de largeur. Sa capacité à produire des colonies de couleur jaune est variable parmi les différentes souches. Cette bactérie à une meilleure croissance lorsqu'elle est incubée à 30°C. On retrouve principalement cette bactérie sur des plantes,

des fleurs, des graines, des légumes, dans l'eau et le sol et sur la nourriture. Toutefois, il est possible d'isoler certaines souches chez les animaux (blessure, sang, urine, organe interne). La plupart des cas d'infections chez l'humain sont de nature opportuniste. En 1970, la bactérie a été impliquée dans l'infection de 378 patients dont 40 sont morts dans 25 hôpitaux canadiens et américains à la suite de la contamination de sacs de soluté destinés à la perfusion des patients. Les infections en milieux hospitaliers sont peu fréquentes et la majorité de celles-ci proviennent de cellules végétatives présentes à la surface du matériel médical, tel les cathéters, provoquant des altérations des barrières naturelles du corps humain (Cruz, Cazacu et Allen, 2007). Cependant, la majorité de ses impacts négatifs peuvent être observés chez les végétaux. Un exemple de sa pathogénicité est l'augmentation de la température de congélation de certain liquide (de -10°C à -4°C). Cette aptitude augmentera grandement les dommages dû au gel sur les végétaux (Wang *et al.*, 2006).

5. La problématique

L'assurance de l'innocuité des produits alimentaires demande une application rigoureuse des techniques permettant la réduction de la croissance des microorganismes pathogènes altérant les qualités organoleptiques. Plusieurs techniques de contrôles de la flore microbienne sont déjà bien établies, mais avec les conditions de mondialisation actuelles, il est nécessaire d'améliorer l'efficacité des contrôles mis en place par l'application du concept de l'effet barrière. C'est dans cette optique que dans les années 1980, un comité international a reconnu l'utilisation de l'irradiation des aliments en tant que méthode de décontamination afin d'augmenter la durée de vie de la nourriture. La résistance au traitement d'irradiation est variable selon les microorganismes, c'est donc pourquoi, des études de caractérisation et de compréhension des mécanismes de résistances de différents organismes est de mise.

5.1 Hypothèse

L'hypothèse de travail stipule que la radiorésistance est directement reliée aux propriétés antioxydantes, à la composition membranaire et aux propriétés de détoxification et de réparation des molécules endomagées de la bactérie. Une étude comparative entre des témoins irradiés et non-irradiés démontre l'utilité de certaines composantes de la cellule face à la radiorésistance. La bactérie *Pantoea agglomerans* servira de model pour cette étude.

5.2 Objectifs

- a) Évaluer la sensibilité à l'irradiation- γ de deux souches de *P. agglomerans* dans un bouillon nutritif dans les conditions optimales de croissance.
- b) Évaluer la présence d'une dose d'irradiation- γ pouvant induire un stade de CVNC chez deux souches de la bactérie *P. agglomerans* dans en milieu liquide et dans les conditions optimales de croissance.
- c) Observer l'effet de l'irradiation- γ sur les pigments caroténoïdiens de deux souches de la bactérie *P. agglomerans* dans un bouillon nutritif dans les conditions optimales de croissance.
- d) Déterminer l'effet de l'irradiation- γ sur les acides gras membranaires de deux souches de la bactérie *P. agglomerans* dans un bouillon nutritif dans les conditions optimales de croissance.
- e) Évaluer l'effet de l'irradiation- γ sur les muropeptides de deux souches de la bactérie *P. agglomerans* dans un bouillon nutritif dans les conditions optimales de croissance.

- f) Analyser l'effet de l'irradiation- γ sur la synthèse de trois protéines de stress de deux souches de la bactérie *P. agglomerans* dans un bouillon nutritif dans les conditions optimales de croissance.

5.3 Moyens pour atteindre les objectifs

- a) La sensibilité à l'irradiation- γ des deux souches de *P. agglomerans* (ATCC 49174 et une souche isolée de carottes irradiées) sera déterminée par l'évaluation de la D_{10} en irradiant à différentes doses (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 et 3.5 kGy) des bouillons nutritifs TSB préalablementensemencés par les bactéries. Un dénombrement bactérien suivra le traitement d'irradiation.
- b) La présence du stade CVCN suite à l'exposition aux rayons γ sera observée chez deux souches de la bactérie *P. agglomerans* en irradiant à différentes doses (3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5 kGy) des bouillons nutritifs TSB préalablementensemencés par les bactéries. Suite au traitement d'irradiation, les bouillons sont incubés à la température optimale de croissance. L'apparition de turbidité dans les tubes dans les premières 24 h démontre une résistance du microorganisme au traitement et une apparition de la turbidité après une période de 24 h signifie une récupération d'un stade de CVNC. Les bouillons sont incubés pour une durée de 3 mois.
- c) L'effet de l'irradiation- γ sur les pigments caroténoïdiens de deux souches de la bactérie *P. agglomerans* (non-irradiée, irradiée à 1 kGy et à 3.5 kGy) sera examiné par l'extraction des pigments et leur quantification par spectrophotométrie selon la méthode de Hundle *et al.* (1991). Afin d'observer d'autres changements potentiels, le pouvoir antioxydant de chaque extraits sera réalisé en étudiant la capacité des caroténoïdes à neutraliser les espèces réactives de l'oxygène produite à la suite de l'électrolyse de l'eau selon la méthode de Caillet, Salmiéri et Lacroix (2006).

- d) L'effet de l'irradiation- γ sur les acides gras membranaires de deux souches de la bactérie *P. agglomerans* (non-irradiée, irradiée à 1 kGy et à 3.5 kGy) sera évalué par l'extraction des lipides bactériens et la quantification des acides gras *trans*-méthylés en chromatographie en phase gazeuse selon la méthode de Evans *et al.* (1998).
- e) L'effet de l'irradiation- γ sur les mucopeptides de deux souches de la bactérie *P. agglomerans* (non-irradiée, irradiée à 1 kGy et à 3.5 kGy) sera étudié suite à l'extraction de la paroi bactérienne, la digestion enzymatique et la séparation des peptides par HPLC en phase inverse selon la méthode de Caillet, Shareck et Lacroix (2005).
- f) L'analyse de l'effet de l'irradiation- γ sur la synthèse de trois protéines de stress (GroEL, GroES et DnaK) de deux souches de la bactérie *P. agglomerans* (non-irradiée, irradiée à 1 kGy et à 3.5 kGy) débutera par l'extraction des protéines totales. La présence des protéines spécifiques sera observée en effectuant un immunobuvardage de type western en utilisant des anticorps spécifiques pour chaque protéine. Les images obtenues seront soumises à une épreuve analysée par densitométrie afin de déterminer la quantité des protéines.

Chapitre II : Approche expérimentale

Souches bactériennes

La souche bactérienne *Pantoea agglomerans* ATCC 49174 utilisée lors des expériences provient de l'American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginie, États-Unis). La souche de *Pantoea agglomerans* carotte provient de carottes irradiées à 7 kGy au Centre d'irradiation du Canada (CIC) (Laval, Québec, Canada) (Lacroix et Lafortune, 2004). Les souches bactériennes ont été conservées à -80 °C sous forme d'aliquotes de 1 ml dans du bouillon de soja tryptique (TSB) (EMD Chemicals Inc., San Diego, Californie, États-Unis) contenant du glycérol (10 %; v/v). Une première pré-culture (1/10) à 30 °C de 24 h dans 10 ml de TSB a été effectuée à partir de ces aliquotes. Un transfert a été effectué dans un bouillon TSB (1/100) pour un second cycle de croissance dans les mêmes conditions de croissance que mentionnées précédemment afin d'obtenir une culture bactérienne contenant environ 10^9 UFC/ml. Lors de cette seconde incubation, les souches ont été placées dans un incubateur agitateur G24 (New Brunswick scientific co. Inc., Edison, New Jersey, États-Unis).

Dénombrement bactérien

Afin d'évaluer la concentration bactérienne d'une suspension, le nombre d'UFC est déterminé. Une solution contenant les bactéries est diluée 1/10 successivement dans de l'eau peptonée (EMD) (0,1%; p/v). Un volume de 100 µl de chaque dilution est ajouté sur une gélose TSA stérile. Des billes de verres stériles de 5 mm de diamètre (5 à 8) ont été ajoutées à la gélose et les plats de Pétri ont été agités. Ensuite, les billes ont été retirées et les géloses ont été incubées en position inversée dans un incubateur à 30 °C. Après l'incubation, le nombre de colonies est compté.

Séquençage du gène codant pour l'ARN_r 16 S

L'identité des souches bactériennes a été confirmée par le séquençage d'une partie du génome codant pour l'ARN_r 16S. La première étape consistait à amplifier la partie codante par une réaction de la polymérase en chaîne (PCR). Une solution mère d'un volume de 50 µl total contenant 32.5 µl d'eau MiliQ stérile, 5 µl de tampon de réaction pour Taq polymérase (10x) (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, États-Unis), 5 µl de MgCl₂ (25 mM) (New England Biolabs), 1 µl de dNTP (2.5 mM) (dATP, dCTP, dGTP et dTTP; 100 mM de chaque) (New England Biolabs), 3 µl d'amorce pA (10 pmol/µl) (Sigma-Genosys Canada, Oakville, Ontario, Canada), 3 µl d'amorce pH (10pmol/µl) (Sigma-Genosys), 0.5 µl de Taq polymerase (5U/µl) (New England Biolabs) est nécessaire pour chaque amplification. Une colonie bactérienne a été prélevée sur une gélose à l'aide d'un cure-dent stérile et a été ajoutée à 50 µl du mélange à PCR. Un thermocycleur Biometra (Montreal Biotech, Dorval, Québec, Canada) a été utilisé pour faire l'amplification de l'ADN selon le programme suivant : 95°C pendant 5 minutes suivi de 30 cycles de : 95°C pendant 45 secondes, 55°C durant 45 secondes et 72°C durant 1 minute. Un dernier cycle à 72°C pendant 7 minutes a terminé le programme. Par la suite, les échantillons ont été conservés à 4°C jusqu'au moment de la récupération des échantillons par le manipulateur.

Séquence de l'amorce pA: 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'

Séquence de l'amorce pH: 3' AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA 5'

La prochaine étape a consisté à vérifier le bon fonctionnement de l'amplification en observant la présence d'un fragment d'ADN d'une longueur d'environ 1500 pb dans la solution amplifiée. Pour ce faire, la solution contenant les amplicons a été chargée sur un gel d'agarose (1.5 %; p/v). Le gel a été fabriqué en ajoutant 1.5 g d'agarose (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Ontario, Canada) à 100 ml de TBE (tris hydroxyméthyle aminométhane 89 mM, acide borique 89 mM, EDTA 2 mM) et la solution a été chauffée pendant 2 minutes à intensité maximale au four à microondes. Par la suite, 5 µl d'une solution de bromure d'éthidium (1 %; p/v) (Sigma-Aldrich) ont été ajoutés à l'agarose

fondue. Le standard de poids moléculaire 1 kb plus (Invitrogen Canada Inc., Burlington, Ontario, Canada) a été utilisé à titre comparatif. Un volume de 10 µl d'échantillon a été mélangé à 1 µl de tampon de chargement BlueJuice 10 × (Invitrogen) et le mélange a été chargé sur le gel. La migration s'est déroulée à 150 V dans un appareil d'électrophorèse horizontal Apollo (CLP, San Diego, Californie, États-Unis) pendant une heure. Ensuite, le gel a été visualisé sous le rayonnement d'une lumière UV TrueView 300 (Bio/Can Scientific Inc., Mississauga, Ontario, Canada) afin d'observer la présence d'une bande d'ADN à une longueur approximative de 1500 pb.

Pour de meilleurs résultats lors de l'étape du séquençage la bande correspondante devait être purifiée. Pour ce faire, la bande a été extraite manuellement du gel à l'aide d'un embout de pipette (1000 µl) inversé. L'ADN contenue dans le gel a été ensuite purifié à l'aide de la trousse commerciale: Illustra GFXTM PCR DNA and gel band purification (GE Healthcare Bio-sciences Inc., Baie d'Urfé, Québec, Canada). La méthode consistait à purifier l'ADN en captant celle-ci sur une colonne contenant une matrice de fibre de verre spécifique. Tous les autres contaminants (agarose, protéines et sels) ne pouvant s'accrocher à la colonne ont été éliminés lors de l'ajout du tampon de lavage. L'élution avec 50 µl d'eau MilliQ a permis de décrocher l'ADN purifié de la colonne. L'ADN purifié a été visualisé sur gel d'agarose tel que décrit précédemment pour assurer sa présence et sa concentration suffisante pour l'étape du séquençage séquençage.

L'ADN a été séquençé par le service offert par le Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill (Montréal, Québec, Canada). La séquence de nucléotides ainsi obtenue, a été soumise à une épreuve de comparaison de base de données GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Le pourcentage d'homologie entre l'ADN amplifié et celui de la base de données a permis d'identifier précisément les microorganismes.

Évaluation de la concentration bactérienne selon la densité optique

Une courbe standard a été réalisée afin d'évaluer le nombre d'UFC après une incubation de 24 h dans le TSB. Les bactéries ont été incubées tel que décrit précédemment. Les bactéries ont été récoltées par centrifugation à $2000 \times g$ pendant 10 minutes à 4 °C et lavées à l'aide de saline (0.85 %; p/v) stérile. Ensuite, le culot bactérien a été resuspendu dans l'eau saline (0.85 %; p/v). La solution a été ensuite diluée afin d'obtenir cinq dilutions ayant une densité optique entre 0,2 et 1,2 à une longueur d'onde de 600 nm. La densité optique de chaque solution a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre DMS 100 (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). La concentration bactérienne a été déterminée dans chaque tube de dilution. Les données ont été insérées dans le chiffrier informatique Excel (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, États-Unis) et une équation mathématique de premier degré ($y = mx + b$) a été obtenue à partir de la courbe de tendance produite par le programme.

Détection d'un stade de CVNC

Un volume de 250 µl d'une suspension bactérienne a été ajouté à des tubes stériles contenant 25 ml de TSB stérile. Par la suite, les tubes ont été irradiés à différentes doses et les bouillons ont été placés dans un incubateur à 30 °C. La croissance a été observée en examinant l'apparition de turbidité dans les tubes.

Chapitre III : Résultats

Caractérisation des souches bactériennes

La caractérisation des deux souches de la bactérie *P. agglomerans* (ATCC 49174 et provenant de carottes irradiée à 7 kGy) est la première étape permettant de réaliser des analyses sur les mécanismes de radorésistances. La dose de sensibilisation 1 kGy (environ 1/3 de la dose létale) et la dose létale 3.5 (dose pour laquelle les microorganismes ne peuvent pas se multiplier) sont les conditions expérimentales retenues pour les analyses.

Détection d'un stade de CVNC

La croissance de 2 souches de la bactérie *P. agglomerans* (ATCC 49174 et provenant de carottes irradiée à 7 kGy) après 24 h d'incubation à 30 °C préalablement soumises à différentes doses d'irradiation (3.0 à 3.5 kGy) est illustrée dans le tableau I. Suite à l'irradiation à 3.1 et 3.2 kGy il y avait dans tous les cas reprise de la croissance bactérienne après 24 h d'incubation. Toutefois, l'irradiation à 3.3 et 3.4 kGy n'a pas démontré une croissance bactérienne dans tous les réplicats de l'expérimentation. Ainsi, les tubes ne présentant aucune croissance étaient incubés pour une période supplémentaire. Lorsqu'irradiée à 3.5 kGy aucune croissance des microorganismes n'a pu être observée.

L'absence de croissance dans des tubes irradiées (3.3, 3.4 et 3.5 kGy) contenant un milieu de culture inoculé avec 2 souches de la bactérie *P. agglomerans* (ATCC 49174 et provenant de carottes irradiée à 7 kGy) après 3 mois d'incubation à 30°C et ne présentant aucune croissance durant les 24 premières heures d'incubation a été observée.

Tableau I: Croissance de 2 souches de la bactérie *P. agglomerans* (ATCC 49174 et provenant de carottes irradiée à 7 kGy) après 24 h d'incubation à 30 °C préalablement soumises à différentes doses d'irradiation

	doses d'irradiation en kGy					
	3.0	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5
ATCC 49174	+	+	+	±	±	-
provenant de carottes	+	+	+	±	±	-

+, croissance; ±, croissance occasionnelle; -, absence de croissance

La croissance occasionnelle signifie que à cette dose d'irradiation, certains échantillons démontrent une croissance après le traitement et d'autres non.

Séquençage du gène codant pour l'ARNr 16 S

Afin de confirmer l'identité du microorganisme identifié lors de la reprise de la croissance (croissance observée après une période plus longue qu'à l'habitude) sur des carottes irradiées à 7 kGy, une partie du génome de la bactérie a été séquencée. Les résultats obtenus suite à la comparaison des séquences à celles disponibles dans la base de données du programme GenBank sont présentés dans le Tableau II.

Tableau II: Liste des microorganismes ayant obtenus la plus grande homologie de séquence codant pour l'ARNr 16S suite à la comparaison de base de données GenBank

A)

microorganismes	% d'homologie de séquence
<i>Pantoea agglomerans</i> strain TMPSB-P1	97%
<i>Enterobacter agglomerans</i> strain A40	97%
<i>Pantoea agglomerans</i> strain P25	97%
<i>Enterobacter agglomerans</i> strain A65	97%

B)

microorganismes	% d'homologie de séquence
<i>Pantoea agglomerans</i> strain TMPSB-P1	99%
<i>Pantoea agglomerans</i> strain MM2	99%
<i>Pantoea agglomerans</i> strain FL1	99%
<i>Pantoea agglomerans</i> strain Pa850T	99%
<i>Pantoea agglomerans</i> strain EPS125	99%
<i>Pantoea agglomerans</i> strain DSM 3493	99%
<i>Enterobacter agglomerans</i> strain A57	99%

C)

microorganismes	% d'homologie de séquence
<i>Pantoea agglomerans</i> strain PGHL1	95%
<i>Pantoea agglomerans</i> strain PGHL22	95%
<i>Pantoea</i> sp. 2-2-SS-001	95%
<i>Pantoea agglomerans</i> strain BJ-Tobacco	95%

D)

microorganismes	% d'homologie de séquence
<i>Enterobacter agglomerans</i> strain A17	98%
<i>Enterobacter agglomerans</i> strain A83	98%
<i>Pantoea agglomerans</i> strain ATCC 27155	98%
<i>Enterobacter agglomerans</i> strain A84	98%

A; *Pantoea agglomerans* ATCC 40174 avec l'amorce PA, B; *Pantoea agglomerans* ATCC 40174 avec l'amorce pH, C; bactérie provenant de carottes irradiées avec l'amorce pA, D; bactérie provenant de carottes irradiées avec l'amorce pH

Évaluation de la concentration bactérienne selon la densité optique

Afin d'obtenir une évaluation rapide de la population bactérienne d'un culot bactérien, une courbe de tendance de premier degré a été estimée. Pour la souche de *P. agglomerans* isolée de carottes irradiées l'équation $y = 0.703x + 8.086$ représente la densité bactérienne en fonction de la densité optique dans l'eau saline (0.85 %; p/v) et pour la souche de *P. agglomerans* ATCC 49174 l'équation $y = 0.718x + 8.069$ représente la densité bactérienne en fonction de la densité optique dans l'eau saline (0.85 %; p/v).

Article 1: Carotenoids influence on radiotolerance of *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen

D. Dussault¹, S. Caillet¹, C. Le Tien² and M. Lacroix^{1*}

¹ Canadian Irradiation Centre and Research Laboratories in Sciences Applied to Food, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Quebec, Canada;

² Laboratoires Mauves inc., Selkirk, Pointe-Claire, Quebec, Canada;

Running title: *P. agglomerans* radiotolerance

Publié dans le Letters in Applied Microbiology 47 (2008) 208–213

*Corresponding author. Professor Monique Lacroix, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7 Tel.:1-450-687-5010 #4489; fax: 1-450-686-5501; E-mail address: monique.lacroix@iaf.inrs.ca

Contributions des auteurs

J'ai imaginé, mis au point, réalisé toutes les expériences et rédigé le manuscrit scientifique. Le Dr. Stephane Caillet a participé aux discussions scientifiques et il m'a aussi prodigué plusieurs conseils très utiles sur les manipulations dans ces expériences. Il a révisé le manuscrit. Le Dr. Tien Canh Le a participé aux discussions scientifiques du projet et a révisé le manuscrit. La Prof. Monique Lacroix était la responsable scientifique et la coordinatrice du projet de recherche. De plus, la Prof. Lacroix a supervisé l'élaboration des protocoles, les discussions scientifiques entourant ce projet et elle a révisé le manuscrit.

Résumé en français

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de l'irradiation- γ sur la composition en caroténoïdes de deux souches bactériennes de l'*Enterobacteriaceae Pantoea agglomerans*. Les souches de *P. agglomerans* ATCC 49174 et RL1 ont été utilisées pour cette étude. Des irradiations successives ont été employées pour étudier la radiotolérance bactérienne. Les caroténoïdes totaux ont été obtenus à la suite d'extractions multiples utilisant le chloroforme/méthanol (2:1), ont été quantifiés en mesurant la densité optique à 453 nm et l'activité antioxydante des extraits a été mesurée par une méthode colorimétrique. L'étude des D_{10} a été menée en utilisant un irradiateur commercial UC-15A chargé avec du ^{60}Co . Un décompte bactérien de plusieurs dilutions a été fait suite aux traitements d'irradiation. La souche ATCC 49174 irradiée a 1 kGy produit 4.3 fois plus de caroténoïdes que le contrôle tandis que l'augmentation était de 2.9 fois pour la souche RL1. Toutefois, il n'y avait pas de différences significatives entre les valeurs des D_{10} des bactéries irradiées et non-irradiées. En conclusion, l'augmentation de la production de caroténoïdes est influencée par l'irradiation- γ mais l'augmentation de caroténoïdes n'influence pas la tolérance des bactéries face à l'irradiation. D'après nos connaissances, cette étude est la première à démontrer l'effet de l'irradiation- γ sur la production de caroténoïdes bactériens.

Abstract

Aims: The aim of this study was to evaluate the effect of γ radiation on the carotenoid content of two strains of the *Enterobacteriaceae*: *Pantoea agglomerans*. **Methods and results:** *P. agglomerans* strain ATCC 49174 and RL1 were used for this study. Successive radiation treatments were performed to study the radiotolerance. Total carotenoids were obtained by multiple extraction using chloroform/methanol (2:1), quantified by measuring the optical density at 453 nm and their antioxidant activity measured by a colorimetric method. The D_{10} studies were conducted using a UC-15A irradiator loaded with ^{60}Co . Bacterial counts from various dilutions were carried out after irradiation. Strain ATCC 49174 irradiated at 1 kGy produced 4.3 times more carotenoids than the control whereas carotenoid synthesis increased by 2.9 fold in the strain RL1. However, there was no significant difference for the D_{10} values. **Conclusion:** Carotenoid increased production is influenced by γ radiation but does not modify the tolerance to radiations. **Significance and impact of the study:** To our knowledge, this is the first study to demonstrate the effects of γ radiation on carotenoid production levels.

Keywords: *Pantoea agglomerans*, radiation, carotenoid, radioresistance, VBNC

Introduction

To produce long lasting food, proper conservation treatments must be applied to the product before its packaging. Bacteria have many mechanisms to counter the bactericidal effects of these methods. One of these mechanisms induces a state in which the cell is “viable but nonculturable” (VBNC) on common microbiological media (Oliver 2005). In that state bacteria are undetectable when using the standard detection methods. Radiation treatments can be used to reduce significantly the load of bacteria in food (Lafortune et al. 2005). The mechanisms which give the means of protection for the bacteria to this stress are not well understood. Radiation produces many reactive oxygen species (ROS) such as superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals. Radiations influence the cell principally by inducing damage to its DNA. Only 20 % of the damage to the DNA is caused by the direct effect of irradiation, the majority of damage is believed to be caused by ROS produced by radiation (Ghosal et al. 2005). Some molecules have the ability to diminish the negative effects of the ROS such as anti-oxidative enzymes (i.e. peroxidase, catalase and superoxide dismutase) or non-enzymatic systems (i.e. vitamins A and E, accumulation high level of Mn). *Deinococcus radiodurans*, produces a red carotenoid pigment and is extremely resistant to ionizing radiation (White et al. 1999). It has been reported that a colorless mutant of *Deinococcus radiodurans* that failed to produce carotenoid was less resistant to radiations (Tian et al. 2007). Carotenoids are valuable non-enzymatic quenchers of ROS, especially of cytotoxic singlet oxygen 1O_2 (Schmidt 2004). That highly radioresistant bacterium is not commonly found in food but other microorganisms responsible for foodborne illness such as the *Enterobacteriaceae* might be using similar mechanisms to resist cold

pasteurization treatment. *P. agglomerans* is a member of the *Enterobacteriaceae* producing a yellow carotenoid pigment also known as a carotenoids (Bergey et al. 2001). This bacterium is closely related to *Escherichia coli* but is up to 5 times more radiotolerant (Le-Tien et al. 2006). It has been shown that cloned carotenoid genes allowing the production of the pigment in *E. coli* protected against the damaging effects of ultraviolet radiation (Tuveson et al. 1988). It has been reported that carotenoid producing microorganisms are more often isolated in areas known for its high natural radioactivity (Asker et al. 2007). In a preliminary work of Lacroix and Lafortune (2004), a resistant bacterium in a probable VBNC state which was identified as *P. agglomerans* strain RL1. Thus it was hypothesized that the carotenoids play a significant role in the radioresistance and during the recovery from the VBNC state.

The objective of this study was to evaluate the effect of γ radiation on the carotenoids content of *P. agglomerans* strain American Type Culture Collection ATCC 49174 (used as a control) and strain RL1 to highlight the relation between carotenoids and radioresistance of *P. agglomerans*. The antioxidant properties of the carotenoid extracts were analyzed in order to determine whether γ radiation had an effect on the free radical scavenging capacity of carotenoids. At last the content in carotenoids per cell was modified to investigate if the concentration had any effect on radioresistance.

Materials and methods

Organisms and Growth condition. *P. agglomerans* strain ATCC 49174 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) and a strain RL1 previously isolated from irradiated carrots at 7 kGy by Lacroix and Lafortune (2004) and identified by comparing

the sequence of the 16S rDNA with DNA sequences from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database using the standard nucleotide–nucleotide homology search Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) were subcultured (1.0 %, v/v) in tryptic soy broth (TSB, Difco Laboratories, Detroit, USA) at 30 °C for 24 h from the stock culture maintained at –80 °C in TSB containing glycerol (20 %, w/v). Prior to the experiment, 1 ml of culture was incubated for 24 h at 30 °C in TSB to obtain a working culture containing approximately 10^9 CFU ml⁻¹. The bacterial culture was centrifuged at 2,000 × g for 15 min at 4 °C, washed with NaCl (0.85 %, w/v), resuspended in 1 l of TSB and incubated for 24 h preceding the irradiation treatments. For the bacteria irradiated multiple times a portion of the irradiated cells was poured into fresh TSB and allowed to grow as described earlier before applying the next irradiation treatment. The bacteria were initially cultured without agitation unless specified for some parts of the experiment.

Irradiation. The bacterial cultures were irradiated with a mean dose of 1 kGy to create damaged cells and with a mean dose of 3.5 kGy to kill cells. A portion of the irradiated cells was poured into fresh TSB and allowed to grow as described in the previous paragraph before extraction of the carotenoids. Bacteria were irradiated several times at 1 kGy to study their radioresistance and between each irradiation cells were reincubated in new TSB broth for 24 h before the analysis. A UC-15A irradiator (MDS Nordion international Inc., Kanata, Ontario, Canada) equipped with a ⁶⁰Cobalt source was used to deliver radiation at a mean rate of 16.2 kGy h⁻¹. This irradiator was certified by the National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, Md.), and the dose rate was established using a correction for decays of source. Amber Oersoex 3042D (Atomic

Energy Research Establishment, Harwell, Oxfordshire, UK) was used to validate the doses distributions. The radiation treatment was carried out at the Canadian Irradiation Centre (Laval, Quebec, Canada) at room temperature (20 °C).

D₁₀ determination. A volume of 5 ml of culture broth of each strain of *P. agglomerans* was grown for 24 h and irradiated at various doses ranging from 0 to 3.5 kGy with 0.5 kGy steps. After irradiation, various dilutions in peptone water (0.1 %, w/v) (Difco Laboratories) were prepared, pour-plated in tryptic soy agar (TSA, Difco Laboratories) and incubated at 30 °C for 48 h for bacterial counts. The determination of the D₁₀ following single and multiple 1 kGy irradiation, was conducted after reincubation of irradiated culture in new TSB as described previously.

Extraction of carotenoids. A modification of the procedure described by Hundle *et al.* (1991) was used for determination of crude carotenoid content in *P. agglomerans*. For standardization of quantification, the bacterial count was evaluated before irradiation by measuring the absorbance of the suspension with the reading of the absorbance at 600 nm using a spectrophotometer (DMS 100 S, Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) and comparing values to a predefined standard curve for each strain. The irradiated culture broth of each microorganism were centrifuged for 15 min at 8000 × g. The pellet was washed twice with saline (0.85 %, w/v) and then resuspended in the same solution. The washed bacterial pellet was resuspended in chloroform/methanol (2:1) using a mechanical vortexer (Vortex Genie, Fisher scientific Ltd., Nepean, ON, Canada). The resulting mixture was then centrifuged 15 min at 2000 × g. The supernatant was collected and the pellet was resuspended in chloroform/methanol (2:1) for a second extraction as described. Both supernatants were pooled and some of the solvent was evaporated under

a stream of nitrogen. After evaporation the resulting carotenoid extract was standardized by adjusting all extracts to the same volume with chloroform/methanol (2:1). Extracts were kept frozen at -20 °C for further analysis.

Quantification of carotenoids. Quantification of the carotenoids was evaluated by measuring the optical density using a spectrophotometer at 453 nm. The values were compared to those obtained in a standard curve established with β -carotene (7.5 – 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Ontario). Results were expressed as femtograms of carotenoid cell⁻¹.

Evaluation of the antioxidant properties. The antioxidant properties of the carotenoid extracts were evaluated using a modified version described by Caillet *et al* (2006). One ml of the carotenoid extract previously diluted in ethanol was placed in an electrolysis cell containing 3 ml of 70 % ethanol 0.15 mol l⁻¹ NaCl. After 1 min electrolysis (10 mA DC, 400 V) 200 μl of solution was poured in a spectrophotometer cell followed by the addition of 2 ml of *N,N*-diethyl-*p*-phenylenediamine (2.5 %, w/v) (DPD; Sigma-Aldrich). The generated ROS and their by-products reacted with DPD to produce a red coloration that was measured at 515 nm using a spectrophotometer. The antioxidant capacity of the extract is equivalent to its ability in inhibiting oxidative species accumulation and thus in limiting DPD oxidation. The antioxidant activity (AA) was calculated using this equation:

$$\text{AA (\%)} = [1 - [(A_{\text{sample}} - A_{0\%}) / (A_{100\%} - A_{0\%})]] \times 100$$

where A_{sample} is the sample absorbance, $A_{0\%}$ the negative control absorbance (corresponding to the extract in a non-electrolyzed NaCl solution) and $A_{100\%}$ the positive control absorbance (corresponding to an electrolyzed NaCl solution). The degree of

discoloration indicated the scavenging potential of the carotenoid extracts. A standard curve was done with Trolox® (acid-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic; Sigma-Aldrich Ltd, Oakville, ON, Canada) ($R^2 = 0.9916$) and the results were expressed as mmol l^{-1} equivalent Trolox per μg of carotenoids.

Statistical analysis. An analysis of variance and Duncan's multiple-range tests were employed to analyze statistically all results. Student's *t* test was utilized with the analysis of variance and paired comparisons. Differences between means were considered significant at $P \leq 0.05$. Stat-Packets Statistical Analysis software (SPSS Base 10.0, SPSS, Inc., Chicago, Ill.) was used for the analysis. For each measurement of carotenoid content and antioxidant properties, six replicates of each sample were tested, the D_{10} were made in duplicate and the compared agitation measurements were made in triplicate.

Results

The D_{10} values of *P. agglomerans* obtained from the strain ATCC 49174 and the strain RL1 are given in Table 1. This experiment was carried out in parallel in order to investigate whether there was a difference between the strain which has never been submitted under the radiation stress and the one isolated from carrots after irradiation at 7 kGy (Lacroix and Lafortune, 2004). Data analysis has shown that there was no significant difference for D_{10} values suggesting that they have the same radiosensitivity level. In this case, the dose necessary to decrease 1 bacterial log of this bacterium was about 0.39 kGy as compared to another member of the *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* ATCC 25922, that showed a D_{10} values of 0.11 (data not shown) under the same experimental

conditions. Also, it was found that there was no difference between the D_{10} values of the bacteria whether it was pre-irradiated or not (Table 1).

With regards, the effects of γ radiation on the production of carotenoids by the two strains of *P. agglomerans* are shown in figure 1. The basal level (non-irradiated strains) of carotenoids synthesis for the strain ATCC 49174 and RL1 was 21.56 ± 2.67 and 30.66 ± 1.02 fg cell⁻¹, respectively. After treatments by irradiation at 1 kGy, a significant increase ($P \leq 0.05$) of carotenoid levels was observed for both strains of *P. agglomerans*: 92.13 ± 11.69 fg cell⁻¹ for the strain ATCC 49174 and 89.13 ± 14.86 fg cell⁻¹ for the strain RL1. In comparison with control (non-irradiated), irradiation at 1 kGy increased carotenoid levels which were about 4.3 times higher for the strain ATCC 49174 and 2.9 times higher for the strain RL1 (Figure 1). However, successive irradiation at 1 kGy or at 3.5 kGy showed same level of pigment as the non irradiated control.

The antioxidant properties of the carotenoid extracts are shown in Table 2. Antioxidant properties of the extracts were investigated to observe the possible modification in the molecular species of the carotenoid produced. Modification of the antioxidant activity of the standardized extract could indicate a change in the type of carotenoid extracted. Results obtained by γ irradiation treatment at 1 kGy showed a significant decrease ($P \leq 0.05$) of the antioxidant activity of the total carotenoids extract for the strain RL1. However, no significant difference was observed for treatments with repetitive doses at 1 kGy and single dose at 3.5 kGy. In this case, it seems that carotenoid production was independent of antioxidant activity.

Another important factor noticed in this experiment was that the carotenoid production can be affected by agitation during incubation. Figure 2 presents carotenoid

quantity of *P. agglomerans* from ATCC 49174 and strain RL1 with or without agitation. *P. agglomerans* ATCC 49174 incubated under agitation produced 5.69 times more carotenoids and the strain RL1 was about of 1.56 times greater. However, no significant difference with regards for D_{10} value was noticed between the bacteria cultured with or without agitation (Table 1).

Discussion

The *P. agglomerans* bacterial strains ATCC 49174 and RL1 were used to investigate the effects of γ radiation on the total carotenoid content of the bacteria. To our knowledge, this is one of the first descriptions of γ radiation effects on the synthesis of bacterial carotenoid pigments. Indeed, the carotenoid production can be influenced by the environment in which the bacteria are cultured (Khodaiyan et al. 2007). Since radiation can produce many ROS, the radical scavenging capacity of the carotenoid (Schmidt 2004) could play a significant role in the protection of bacteria against deleterious effect of ROS and contribute to radioresistance. It is known that a minimal concentration of carotenoid plays a beneficial role in the resistance to radiation (Tian et al. 2007). Although an increase in the production of carotenoids in the cell did not make a noticeable change in regards for the D_{10} value (Table 1). The reason of this phenomenon could be explained by the presence of high concentration of ROS which exceed the endogenous scavenging capacity of the bacterial cells available in order to neutralize them. It was noticed that carotenoid concentration seemed to reach a maximum production of about 90 fg cell^{-1} (Figure 1) with our experimental procedure. In this case, it is possible that the production of carotenoid pigment in the bacteria is probably not a

main cause of radioresistance. In addition, according to Ghosal et al. (2005), damage caused by radiation is not all due to ROS (Ghosal et al. 2005). This hypothesis emphasizes the deleterious effects of γ photons which is independent of non-enzymatic or enzymatic antioxidant systems.

For instance, scavenging of these radicals by the pigments induces a secondary metabolite that might play a role in the bacterial survival. It is not known if these secondary metabolites play a role in altering the radiotolerance when they are present in high doses. Also, some authors have suggested that the carotenoids might have a prooxidant capacity in certain conditions (Stahl and Sies 2003). The increased level of carotenoids was less important in the strain RL1, 2.9 compared to 4.3 fold increase, but it could be explained by a significantly ($P \leq 0.05$) higher basal level of production. Gamma irradiation treatments with repetitive doses at 1 kGy have shown that the bacteria were unable to produce more carotenoid pigments. It is of interest to mention that under critical conditions caused by γ radiation, the production of necessary quantity of carotenoids is limited due to the need of large amount of energy. Selection could occur for the bacteria producing only the necessary amount of carotenoid.

Evaluation of the antioxidant activity of the total carotenoid extract did not show any change after γ irradiation treatments at various doses. Evaluation of the antioxidant activity was done only to the carotenoid extract so that other changes to the cell (i.e. enzymatic activations) would not modify the carotenoid effects observed. Although a significant decrease of scavenging capacity for the strain RL1 was observed, this change could be due to inactive carotenoid pigments resulting from reaction with ROS. Additionally, since this phenomenon was observed only for the strains RL1, the

radiotolerance of this bacterium is possibly due to the direct utilization of carotenoids found in the carrot. Carotenoids from the carrots could scavenge the excess of ROS surrounding the cell and would permit the bacteria to survive greater oxidative stress than in TSB broth where no major antioxidant is present. It is also known that some types of carotenoid have various antioxidant activity (Stahl and Sies 2003). According to our results on antioxidant activity, we could hypothesize that the carotenoid composition of the strain ATCC 49174 was not affected by irradiation while the carotenoid composition of the strain RL1 seemed to be modified after treatments.

Acknowledgment

This research was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). We also thank MDS Nordion for the radiation operations.

References

- Asker, D., Beppu, T. and Ueda, K. (2007) Unique diversity of carotenoid-producing bacteria isolated from Misasa, a radioactive site in Japan. *Appl Microbiol Biotechnol* 77, 383-392.
- Bergey, D.H., Garrity, G.M., Staley, J.T. and Boone, D.R. (2001) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York: Springer.

Caillet, S., Salmiéri, S. and Lacroix, M. (2006) Evaluation of free radical-scavenging properties of commercial grape phenol extracts by a fast colorimetric method *Food Chem* **95**, 1-8.

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. and Daly, M.J. (2005) How radiation kills cells: survival of *Deinococcus radiodurans* and *Shewanella oneidensis* under oxidative stress. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 361-375.

Hundle, B.S., Beyer, P., Kleinig, H., Englert, G. and Hearst, J.E. (1991) Carotenoids of *Erwinia herbicola* and an *Escherichia coli* HB101 strain carrying the *Erwinia herbicola* carotenoid gene cluster. *Photochem Photobiol* **54**, 89-93.

Khodaiyan, F., Razavi, S.H., Emam-Djomeh, Z., Mousavi, S.M. and Hejazi, M.A. (2007) Effect of culture conditions on canthaxanthin production by *Dietzia natronolimnaea* HS-1. *J Microbiol Biotechnol* **17**, 195-201.

Lacroix, M. and Lafortune, R. (2004) Combined effects of gamma irradiation and modified atmosphere packaging on bacterial resistance in grated carrots (*Daucus carota*). *Radiat Phys Chem* **71**, 77-80.

Lafortune, R., Caillet, S. and Lacroix, M. (2005) Combined effects of coating, modified atmosphere packaging, and gamma irradiation on quality maintenance of ready-to-use carrots (*Daucus carota*). *J Food Protect* **68**, 353-359.

Le-Tien, C., Lafortune, R., Shareck, F. and Lacroix, M. (2006) DNA analysis of a radiotolerant bacterium *Pantoea agglomerans* by FT-IR spectroscopy. *Talanta* **71**, 1969-1975.

Oliver, J.D. (2005) The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol (Seoul, Korea)* **43 Spec No**, 93-100.

Schmidt, R. (2004) Deactivation of O₂(¹Δg) Singlet Oxygen by Carotenoids: Internal Conversion of Excited Encounter Complexes. *J Phys Chem* **108**, 5509-5513.

Stahl, W. and Sies, H. (2003) Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Aspects Med* **24**, 345-351.

Tian, B., Xu, Z., Sun, Z., Lin, J. and Hua, Y. (2007) Evaluation of the antioxidant effects of carotenoids from *Deinococcus radiodurans* through targeted mutagenesis, chemiluminescence, and DNA damage analyses. *Biochim Biophys Acta* **1770**, 902-911.

Tuveson, R.W., Larson, R.A. and Kagan, J. (1988) Role of cloned carotenoid genes expressed in *Escherichia coli* in protecting against inactivation by near-UV light and specific phototoxic molecules. *J Bacteriol* **170**, 4675-4680.

White, O., Eisen, J.A., Heidelberg, J.F., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Dodson, R.J., Haft, D.H., Gwinn, M.L., Nelson, W.C., Richardson, D.L., Moffat, K.S., Qin, H., Jiang, L., Pamphile, W., Crosby, M., Shen, M., Vamathevan, J.J., Lam, P., McDonald, L., Utterback, T., Zalewski, C., Makarova, K.S., Aravind, L., Daly, M.J., Minton, K.W., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A., Nelson, K.E., Salzberg, S., Smith, H.O., Venter, J.C. and Fraser, C.M. (1999) Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science (New York, NY)* **286**, 1571-1577.

Table 1: D₁₀ values of *P. agglomerans* obtained from strain ATCC 49174 and from strain RL1 under various conditions

	control without agitation	with agitation ¹	1 kGy without agitation ²
ATCC 49174	0.39 kGy	0.39 kGy	0.38 kGy
RL1	0.41 kGy	0.39 kGy	0.39 kGy

¹ The bacteria were grown using same parameters as the control but under agitation. ² D₁₀ was evaluated after a recovery of 24h in fresh TSB following a radiation at 1 kGy. D₁₀ values were done in duplicate.

Table 2: Antioxidant activity (mmol l⁻¹ eq Trolox μg⁻¹ of carotenoids) of total carotenoids extracts of *P. agglomerans* from strain ATCC 49174 and strain RL1¹.

strains	Non irradiated		1 kGy		2 × 1 kGy ²		3 × 1 kGy ³		3.5 kGy	
ATCC 49174	0.23	± 0.02 ^{ab}	0.23	± 0.02 ^{ab}	0.23	± 0.01 ^{ab}	0.24	± 0.01 ^b	0.21	± 0.02 ^a
RL1	0.24	± 0.02 ^b	0.20	± 0.01 ^a	0.24	± 0.01 ^b	0.22	± 0.01 ^b	0.22	± 0.02 ^b

¹ The values are the means ± standard deviation of six replicates and those within a row that bear the same letter are not significantly different (P>0.05).

² The dose has been applied twice.

³ The dose has been applied three times.

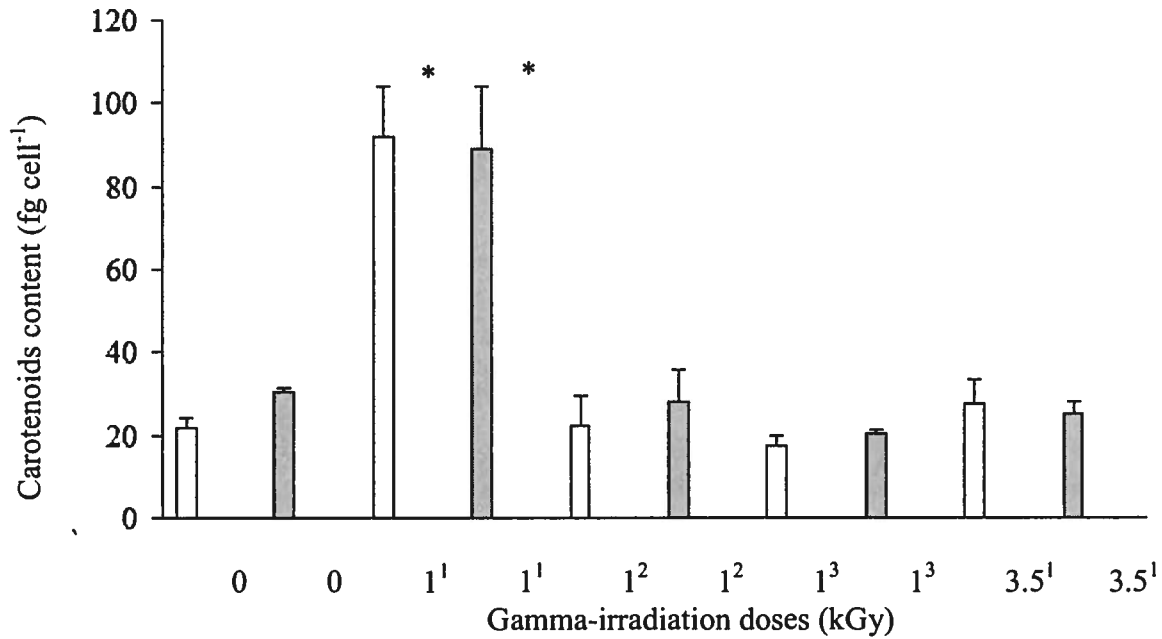


Figure 1: Effect of γ radiation on carotenoids of *P. agglomerans* strain ATCC 49174 and strain RL1.

(□), strain ATCC 49174; (■), strains RL1.

¹ Single-dose gamma-irradiation. ² Single-dose applied twice. ³ Single-dose applied three times.

The carotenoids values are the means of a triplicate \pm standard deviation and those bearing * are significantly different ($P \leq 0.05$) as the non irradiated control.

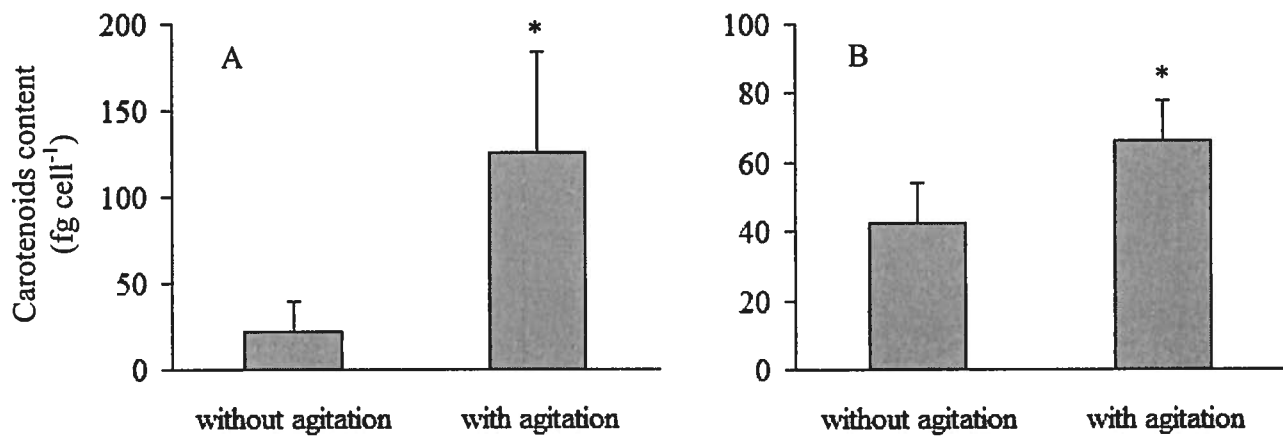


Figure 2: Effect of agitation during bacterial growth on carotenoids synthesis for *P. agglomerans* strain ATCC 49174 (A) and strain RL1 (B).

The carotenoid values are the means of a triplicate \pm standard deviation and those bearing * are significantly different ($P \leq 0.05$) as the non agitated control.

Article 2: Effect of γ -irradiation on membrane fatty acids and peptidoglycan's mucopeptides of *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen

D. Dussault¹, S. Caillet¹, C. Le Tien² and M. Lacroix^{1*}

¹ Canadian Irradiation Centre and Research Laboratories in Sciences Applied to Food, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Quebec, Canada;

² Laboratoires Mauves inc., Selkirk, Pointe-Claire, Quebec, Canada;

Running title: *P. agglomerans* radiotolerance

Soumis le 27 mai 2008 au Journal of Applied Microbiology

Corrections soumises le 26 septembre au Journal of Applied Microbiology

*Corresponding author. Professor Monique Lacroix, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7 Tel.:1-450-687-5010 #4489; fax: 1-450-686-5501; E-mail address: monique.lacroix@iaf.inrs.ca

Contributions des auteurs

J'ai adapté le protocole pour l'analyse des peptidoglycanes, j'ai mis au point le protocole pour l'analyse des acides gras, j'ai réalisé toutes les expériences et rédigé le manuscrit scientifique. Le Dr. Stephane Caillet a mis au point le protocole pour l'analyse des peptidoglycanes et a participé aux discussions scientifiques. Le Dr. Tien Canh Le a participé aux discussions scientifiques du projet et a révisé le manuscrit. La Prof. Monique Lacroix était la responsable scientifique et la coordinatrice du projet de recherche. De plus, la Prof. Lacroix a supervisé l'élaboration des protocoles, les discussions scientifiques entourant ce projet et elle a révisé le manuscrit.

Résumé en français

Le but de cette étude était d'évaluer l'effet de l'irradiation- γ sur le contenu en acides gras et en mucopeptides de deux souches de l' *Enterobacteriaceae*: *Pantoea agglomerans*. Les souches de *P. agglomerans* ATCC 49174 et RL1 ont été utilisées pour cette étude. Des traitements d'irradiation- γ (1 et 3.5 kGy) ont été utilisés pour étudier la radiotolérance. Les lipides totaux ont été obtenus par des extractions multiples en utilisant du méthanol/chloroforme (2:1) et ont été quantifiés par la CPG. Les mucopeptides ont été purifiés par des digestions enzymatiques successives et ont été analysés par HPLC en utilisant une colonne C18 phase inverse. Des modifications significatives ($P \leq 0.05$) ont été remarquées aux acides gras de la membrane et aux mucopeptides du peptidoglycane. En conclusion, l'irradiation- γ cause des modifications importantes à la paroi bactérienne et les modifications observées pourraient jouer un rôle important dans la survie bactérienne face à ce stress environnemental.

Abstract

Aims: The aim of this study was to evaluate the effect of γ -irradiation on the fatty acids and muropeptides content of two strains of an *Enterobacteriaceae*: *Pantoea agglomerans*.

Methods and results: *P. agglomerans* strains ATCC 49174 and RL1 isolated from irradiated carrots were used for this study. Radiation treatments (1 and 3.5 kGy) were performed to study the radiotolerance. Total lipids were obtained by multiple extractions using methanol/chloroform (2:1) and were quantified by GC. Muropeptides were purified by successive enzymatic digestions and analyzed using a reverse phase C₁₈ column in HPLC. A significant ($P \leq 0.05$) modification of the bacterial wall was noticed for the membrane fatty acids composition and the muropeptides. **Conclusion:** Effects of irradiation on the bacterial membrane is noticeable and could play an important role on the cellular response and ability to survive this harsh environment. **Significance and impact of the study:** To our knowledge, it is the first study to demonstrate the effects of ionizing irradiation on the modification of the fatty acids and one of the few to confirm its effects on the muropeptides of the peptidoglycan.

Keywords: *Pantoea agglomerans*, radiation, fatty acid, radiotolerance, VBNC, muropeptides, peptidoglycan

Introduction

Gamma-irradiation has long been used for decontamination and/or sterilization of food products to improve product safety and shelf life. Even if low-dose irradiation (≤ 3 kGy) is effective in destroying most bacteria, it does not prevent the growth of certain radiation resistant strain such as *Deinococcus radiodurans* which requires higher irradiation doses up to 20 to 40 kGy to destroy this microorganism. The mechanisms by which prokaryotes become resistant to ionizing-radiation are not known, and this resistance cannot be explained as an adaptation to environmental radiation. Natural sources of ionizing radiation on Earth emit at very low levels (Rainey et al. 2005) making it impossible to generate the acute doses to which these organisms show resistance. Other than its DNA repairing abilities, it has been suggested that the extreme radioresistance of *D. radiodurans* was due to other mechanisms such as carotenoid pigments production, accumulation of Mn^{2+} , intervention of enzymatical systems (i.e. superoxide dismutase) which contribute to compensate for the stress generated by reactive oxygen species (ROS) produced by ionizing radiation and the metabolism (Imlay 2003).

These ROS produced by irradiation are generally superoxide (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radicals (OH^\bullet) and can affect the whole cell by inducing damages to its DNA and other important molecules such as the proteins and lipids (Ghosal et al. 2005). The ROS can induce lipid peroxidation and reduce the membrane fluidity (Cabiscol et al. 2000). Some molecules have the ability to diminish the harmful effects of the ROS such as anti-oxidative enzymes (i.e. peroxidase, catalase and superoxide dismutase) or non-enzymatic systems (i.e. vitamins A and E, accumulation high level of Mn^{2+}). One of these protective mechanism against irradiation deleterious

effects is the induce of a “viable but nonculturable” (VBNC) state on common microbiological media (Oliver 2005). Work of Lacroix and Lafortune (2004) has observed a resistant bacterium in a probable VBNC state that was identified as *Pantoea agglomerans*. *P. agglomerans* is an *enterobacteriaceae* like *Escherichia coli* but is up to 5 times more radiotolerant (Le-Tien et al. 2006). Nowadays, ionizing radiations studies seem to show that protein oxidation is the main cause to the inability to recover and repair damages observed after such a stress (Daly et al. 2007). It is of interest to note that unsaturated fatty acids (UFA) have the ability to scavenge the ROS (Imlay 2003). In this context, as reported by Di Pasqua et al. (2006), bacteria are able to modify the fatty acid composition of their membrane when challenged by environmental stress such as variation of temperature, pH, osmotic pressure and ethanol concentration. Although, bacterial cytoplasmic membranes can compensate for modified growth conditions by a process known as homeoviscous adaptation which adapt the membrane so it can retain it's fluidity as the environment changes (Signoretto et al. 2000). Exposition to UV radiations has also produced modifications of the membrane fatty acids (Gupta et al. 2007). Some enzymes known as fatty acid desaturases have been proposed for such modification. It was also demonstrated that these enzymes are not produced under normal conditions but environmental stress induce their production (Aguilar and de Mendoza 2006).

The bacterial walls are composed of an important structure responsible for the resistance to the osmotic stress and typical shape. This structure is named peptidoglycan or murein. The murein is made of multiple glycans strands, composed of alternating β 1,4-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) and N-acetylmuramic acid (MurNAc) residues,

cross-linked by small peptides to form a 3 dimensional sacculus surrounding the cytoplasmic membrane. Between different bacterial species the structure of the glycan chains does not seem to change but the muropeptides responsible for the cross-link show many variations when the microorganism is submitted to different growth condition such as temperature shift. The muropeptides are composed of more than 50 different types in *E. coli* when it is exposed to various growth condition (Vollmer and Bertsche 2007). Other studies have demonstrated the effect of γ -irradiation on the composition of the muropeptides of *E. coli*. Irradiation does not disrupt the membrane integrity but the peptides responsible for the connections between the glycans chains are modified (Caillet et al. 2005). Thus it was hypothesized that the modification of membrane fatty acids, muropeptides and bacterial enzymes induction after radiations treatments play a significant role in the radioresistance and in the recovery of bacteria during the VBNC state.

The objective of this study was to evaluate the effect of gamma radiation on the fatty acid content of *P. agglomerans strain* from American Type Culture Collection ATCC 49174 (used as a non-irradiated control) and strain RL1 isolated from irradiated carrots in order to highlight the relation between the modification of the fatty acids composition of the bacterial membrane and the radioresistance. The degree of unsaturation of the fatty acids composing the bacterial membrane was also evaluated to demonstrate the global effects of the modifications.

Materials and methods

Microorganisms and growth condition. *P. agglomerans* strain ATCC 49174 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) and strain RL1, previously isolated from irradiated carrots at 7 kGy by (Lacroix and Lafortune 2004) and identified by comparing the sequence of the 16S rDNA with DNA sequences from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database using the standard nucleotide-nucleotide homology search Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Bacteria were subcultured in tryptic soy broth (1.0 %, v/v) (TSB, Difco Laboratories, Detroit, USA) at 30 °C for 24 h from the stock culture maintained at -80 °C in TSB containing glycerol (20 %, w/v). Prior to the experiment, 1 ml of culture was incubated through one cycle of 24 h at 30 °C in TSB to obtain a working culture containing approximately 10^9 CFU ml⁻¹. The bacterial culture was centrifuged at $2,000 \times g$ for 15 min at 4 °C and washed with NaCl (0.85 %, w/v) and then resuspended in 1 l of TSB and incubated for 24 h preceding the irradiation treatments.

Irradiation. The bacterial cultures (50 ml) were irradiated at a mean dose of 1 kGy to create damaged cells and with a mean dose of 3.5 kGy to kill cells. An underwater irradiator (UC-15A) (MDS Nordion international Inc., Kanata, Ontario, Canada) equipped with a ⁶⁰Cobalt source was used to deliver radiations at a mean dose rate of 16.2 kGy h⁻¹. This irradiator was certified by the National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, Md.), and the dose rate was established using a correction for decays of source. Amber Oersoex 3042D (Atomic Energy Research Establishment, Harwell, Oxfordshire, UK) was used to validate the doses distributions. The radiation

treatment was carried out at the Canadian Irradiation Centre (Laval, Quebec, Canada) at room temperature (20 °C).

Lipids extraction. Total lipids were extracted as described by Evans (Evans et al. 1998) with slight modification. Practically, the bacterial cultures were centrifuged at 2500 × g for 15 min and resulting bacterial pellet was washed twice using NaCl (0.85 %, w/v). The pellet was then resuspended in 5 ml of sterile distilled water and a volume of 9.5 ml of methanol/chloroform (2:1, v/v) was added. The mixture was shaken 1 min on a mechanical vortexer and left untouched for 2 h. Thereafter, the mixture was centrifuged at 2500 × g for 5 min. The supernatant (SN1) was retained by decantation. The pellet was resuspended in 12 ml of methanol/chloroform/water (2:1:0.8; v/v/v) and the extraction was operated as described previously for SN1 to obtain supernatant 2 (SN2). The supernatants (SN1 and SN2) were combined and a volume of 7 ml of chloroform/water (1:1) was added. The mixture was allowed to separate in 2 phases and the lower phase containing the lipids was harvested. The chloroform was then evaporated under a stream of nitrogen and the resulting precipitate was resuspended in hexane. The resulting solution was stored at -20 °C until further analysis.

Methylation of fatty acid. Lipid samples were *trans*-methylated for analysis of their acyl groups using fatty acyl methyl ester (FAME) form using a modified method provided by Supelco guideline T496125B (Supelco, Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Ontario). A sample of 1 ml of total lipid extract was combined in a sealed glass screw cap with 2 ml of Boron Trifluoride (BF₃) in methanol (14 %, w/w) containing 250 mg of sodium sulfate. Then the solution was heated at 60 °C for 10 min. After cooling down at room temperature, 1 ml of MiliQ water and the same volume of hexane was

added into vessel. The upper phase was retained and dried under a stream of nitrogen. The fatty acids extract was resuspended in a minimal volume of hexane. The sample was stored at -20 °C until further analysis.

Gas liquid chromatography. The FAME were analyzed using a Varian 3400 gas chromatograph (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) equipped with a flame ionization detector (FID) fitted with a fused silica capillary column Equity-1 30 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm of film thickness (Supelco). A volume of 1 µl of sample was injected using the following operation temperature program: injector at 270 °C; detector at 290 °C; initial oven at 70 °C for 1 min.; ramp 1, 15 °C min⁻¹ to 150 °C; ramp2; 10 °C min⁻¹ to 280 °C and hold for 15 min. The FAME peaks were identified by comparison to those of a standard FAME solution (Supelco, 37 component FAME standards). The peaks were integrated with the Varian Star Chromatography Workstation version 5 (Varian Inc.). The areas of the peaks of interest were added together, and individual peaks were expressed as a percentage of this total.

Cell wall preparation. Bacterial cell walls were prepared as described by (Signoretto et al. 2000) to analyze the muropeptides. A volume of 1 l of bacterial culture in stationary growth phase was quickly chilled in an ice-ethanol bath until the temperature dropped below 10 °C. Cells were harvested by centrifugation for 15 min at 2500 × g at 4 °C, and the resulting pellet was washed in phosphate buffer (10 mmol l⁻¹, pH 7.2) at the same temperature. The pellet was then transferred into sodium dodecyl sulfate (SDS, 4 %, w/v) solution maintained at 100 °C and was incubated for 30 min under stirring. The cell walls were concentrated and washed with distilled water. Cell walls were then broken using a cell disrupter (FastPREP, model FP 120, Qbiogene, Inc.,

Carlsbad, CA, USA) containing glass beads (0.2 mm) and regulated at speed 4 for 60 s. The suspension was then centrifuged at $5000 \times g$ for 2 min to remove the glass beads and the unbroken cells. The resulting supernatant containing the cell walls was centrifuged for 30 min at $30\,000 \times g$ at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Preparation of peptidoglycan. The peptidoglycan preparation was done as described by (Signoretto et al. 2000). Bacterial walls were treated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 100 mmol l^{-1} Tris HCl (pH 7.5) with α -amylase ($100\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$; EC 3.2.1.1, Sigma). After 2 h, DNase ($10\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$; EC 3.1.21.1, Sigma) and RNase ($50\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$; EC 3.1.27.5, Sigma) were added with 20 mmol l^{-1} MgSO_4 and incubated for 2 h. The suspension was then treated with trypsin ($100\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$; EC 3.4.21.4, Sigma) in the presence of 10 mmol l^{-1} CaCl_2 for 16 h. The enzymes in SDS (1 %, w/v) were inactivated by heating at $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min. Cell walls were collected, washed and freeze-dried. Cell walls were resuspended in 100 mmol l^{-1} $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ and treated with alkaline phosphatase ($50\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$; EC 3.1.3.1, Sigma) for 16 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. The enzymes were inactivated by heating at $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min, the peptidoglycan was collected by centrifugation for 60 min at $45000 \times g$ at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ and washed twice with distilled water. The pure peptidoglycans were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Preparation and separation of the muropeptides by high performance liquid chromatography (HPLC). Muropeptides were obtained as described by (Glauner 1988). The peptidoglycan (1 mg ml^{-1}) was digested for 16 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in presence of muromidase ($20\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$; EC 3.2.1.17, Sigma) dissolved in 12.5 mmol l^{-1} phosphate buffer (pH 5.5) containing sodium azide (0.02 %, w/v). Clarification of the suspension indicated complete digestion of the peptidoglycan. The samples were heated at $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min and then centrifuged for 5 min in an Eppendorf centrifuge. The resulting supernatant was

diluted with an equal volume of 0.5 mol l⁻¹ borate buffer (pH 9.0) and then immediately reduced with 15 mg of sodium borohydride for 15 min at room temperature. The pH value of the solution was adjusted to 2.0 with *ortho*-phosphoric acid to stop the reaction. The samples were stored at -20 °C. The HPLC analyses were performed using a ProStar 230 (Varian inc.) equipped with a ternary pump delivery system, a Rheodyne injection valve (Waters, Ltd., Dorval, Quebec, Canada) and a ProStar 330 diode-array UV/Vis detector (Varian). Integration and data elaboration were performed with the Star Chromatography Workstation software (Varian). A Lichrosorb RP18 column (5 µm, 250 by 4 mm; Varian) was used. All solvents were filtered on 0.45-µm-pore-size filter disk (Millipore Canada, Ltd., Etobicoke, Ontario, Canada) and degassed by filtration under vacuum. A gradient elution was carried out using the following solvent systems: i) mobile phase A includes methanol (5%, v/v) in 100 mmol l⁻¹ phosphate buffer (pH 2.5) and 0.3 ppm sodium azide; ii) mobile phase B contains methanol (30%, v/v) in 100 mmol l⁻¹ phosphate buffer (pH 2.5) and 0.3 ppm sodium azide. The column was eluted over 150 min at a flow rate of 0.5 ml min⁻¹ with a linear gradient, starting 10 min after injection, from 5 to 30 % of the same composition of mobile phase. A column oven (Waters) was used to maintain the temperature of the column at 52 °C. For each sample, a volume of 200 µl was injected after filtration through a 0.45 µm pore-size filter disk. The eluted compounds were read by spectrophotometry at 206 nm. Peaks were separated in 11 fractions which the first ten consisted of ten minutes intervals of the run and the eleventh one was comprised of the remaining area after a hundred minutes till the end of the run.

Statistical analysis. An analysis of variance and Duncan's multiple-range tests were employed to analyze statistically all results. Student's *t* test was utilized with the

analysis of variance and paired comparisons. Differences between means were considered significant at $P \leq 0.05$. Stat-Packets Statistical Analysis software (SPSS Base 10.0, SPSS, Inc., Chicago, Ill.) was used for the analysis. The study was done in two replicates and for each replicate, 3 samples were injected into the columns.

Results

Modifications were investigated by GLC analysis of FAMES extracted from the cells after an exposure to γ -irradiation. This experiment was carried out in parallel in order to investigate whether there was a difference between the strain which has never been submitted under the radiation stress and the strain RL1 isolated from carrots after irradiation at 7 kGy (Lacroix and Lafortune 2004). The fatty acids composition of *P. agglomerans* obtained from the strain ATCC 49174 and the strain RL1 are shown in Figure 1 and Figure 2. Data analysis has shown that there were significant changes ($P \leq 0.05$) in the fatty acids (FA) composition of the bacterial membrane for the two strains irradiated at 1 kGy and 3.5 kGy in comparison to the control (non-irradiated). It is of interest to note that irradiation at low doses induced less modifications.

For the strain ATCC 49174, the irradiation treatment modified the FA by diminishing the percentage of the UFA in the membrane. At 1 kGy, the saturated fatty acids (SFA) with 18 carbons chain length (C_{18}) increased at the expense of the C_{16} SFA. At 3.5 kGy, a decreasing of the concentration of the UFA were noticed. This decrease was due to the lowering of the C_{16} containing one insaturation ($C_{16:1}$), the lowering of the C_{18} containing one insaturation ($C_{18:1}$) and the increase of the C_{18} SFA.

For the strain RL1 the radiations had a contrary effect on the lipids. The composition in fatty acids of this strain showed an increase of the UFA following the treatments. At 1 kGy the shift seemed to take place in the length of the FA chain itself. The concentration of the C₁₈ FA diminished while de C₁₇ FA increased. At 3.5 kGy the shift to a smaller carbon chain seemed to take place but in a smaller proportion. The C₁₈ and C_{20:X} decreased but this time the C₁₆ and the C₁₇ were increased. Also, the C_{18:1} concentration was not affected and the C_{16:1} was augmented.

The FA ratio (saturated/unsaturated) present in *P. agglomerans* ATCC 49174 membrane (A) and RL1 (B) are shown in Figure 3. This proportion demonstrates more easily the relation between the effects of γ -irradiation and the saturation level of the FA. An increasing ratio would indicate an increase of the SFA and/or a reduction of the UFA. A reduction of the ratio would indicate the decrease of the SFA and/or an increase of the UFA. For both strains significant modifications ($P \leq 0.05$) seemed to take place at 3.5 kGy. However, no significant ($P > 0.05$) effect was observed on samples treated at 1 kGy. For the strain ATCC 49174 C₁₆, C₁₈ and total UFA ratios were significantly diminished ($P \leq 0.05$). While for the strain RL1 the C₁₆, C₁₈ and total UFA ratios increased significantly ($P \leq 0.05$).

The fractions of the muropeptides composition of *P. agglomerans* strain ATCC 49174 and strain RL1 are shown in Figure 4. In Figure 4, each fraction (1 to 10) represents a ten minutes interval during the analysis of the muropeptides using HPLC and the eleventh one is the sum of all peptides eluted between 100 and 150 minutes. According to (Glauner 1988), peaks obtained with retention times (RT) between 0 and 55 min are generally monomers, with RT between 55 and 83 min are dimers, those with RT

between 84 and 105 min are trimers, and those with RT more than 105 min are oligomers. Many significant differences ($P \leq 0.05$) were noticed at various irradiation doses for both bacterial strains. For the strain ATCC 49174 treated at 1 kGy, oligomers seemed to be higher in percentage to the expense of the smaller peptides. At 3.5 kGy, moderate changes to the overall composition were observed, but the shift to greater size peptides was still noticeable. With regard to the strain RL1 treated at 1 kGy, few changes were observed. At 3.5 kGy, a tendency in the diminution of the trimers was observed whereas every other type were increased.

Discussion

Biological membranes are essential for the cell integrity, providing a barrier between the inside and outside environments for the cell (Pedersen et al. 2006). These barriers act as support to different proteins which are involved in several different cell functions such as signal transduction, solute transport, protein targeting and trafficking, etc. (Edidin, 2003). A number of studies suggest that membranes can sense extreme environmental changes and particularly, the presence of ROS in the media. As reported by several works (Tatzer et al. 2002; Shigapova et al. 2005), the degree of fatty acyl desaturation of membrane lipids is considered to be a critical factor in membrane fluidity. This phenomenon is closely related to the membrane remodelling which is a cellular response to environmental stresses able to protect the cells from toxic ROS. The relation between fatty acyl desaturation and bacterial adaptation was reported for a number of strains exposed to heat, cold or oxidative damage (Guerzoni et al. 2001; Shigapova et al.

2005). Generally, this implies that membrane lipids play an essential role in microbial adaptation under different environmental changes.

The *P. agglomerans* bacterial strains ATCC 49174 and the strain RL1 were used to investigate the effects of γ -irradiation on the cellular membrane FA and the muropeptides of the peptidoglycan. According to the obtained results, irradiation treatments influence the composition of the bacterial wall. However, modifications of the membrane by γ -irradiation were not important when compared with those treated with antimicrobial agents such as essential oils (i.e. thymol) targeting directly on the membrane (Di Pasqua et al. 2007). It was also noticed that modifications by irradiation of membrane FA are generally dose dependant. Probably, more energy applied to the bacteria resulted in an augmentation in the number of modifications of the FA. It could be hypothesized that the increase of certain types of FA is related to an overproduction by the bacteria. For the strain RL1, the desaturation of the FA could be related to an increase or activation of an enzyme activity. According to Aguilar and de Mendoza (2006) stress can induce such activity. It is worth to note that UFA can scavenge the ROS and an augmentation in the concentration of UFA could result in favor to the radiotolerance. The change in the length of the FA could be the direct consequence of the bacterium remodeling its membrane composition. This mechanism of defense toward environmental stresses could be the bacterial response to the destructive effect of the ROS. Although the hypothesis based on the activation of a specific defense mechanism could be well supported since it is known that bacteria have the ability to modify its membrane composition to adapt itself to its environment (Zhang and Rock 2008). In the present study, results obtained were demonstrated that after irradiation, modification of UFA was

significantly increased ($p \leq 0.05$) for the RL1. In this case, the explanation could be based on the mechanism (as mentioned above) designed to ameliorate the environmental changes on the physical state of the cell membrane through membrane fatty acids desaturation. Consequently, the involvement of enzymes as desaturases seems essential in this phenomenon. Moreover, numerous reports were demonstrated that the desaturases are the key enzymes in carotenoid biosynthesis pathway (Xu et al. 2007). It is of interest to mention that the carotenoids are not involved in the DNA repair process directly, but participated in the protective mechanism of bacteria cells as ROS scavengers. The carotenoids can quench harmful ROS generated from water radiolysis to prevent oxidative damage to proteins (including DNA repair proteins), enzymes and membrane lipid peroxidation (Stahl et al. 1998). Previous works done in our laboratory with *P. agglomerans* strains ATCC 49174 and RL1 have demonstrated that γ -irradiation treatments can induce the production of carotenoids in bacteria (Dussault et al. 2008). Although, the induce production did not resulted in a greater radioresistance. Since carotenoid production rely on many enzymatic reactions, the previous finding support the fact that overall enzymatic activity was increased by ether the augmentation of the number of enzyme units or by the modification of the enzyme itself.

In comparing to the modifications of the membrane FA, the alteration of the peptidoglycan's muropeptides did not seemed to be dose dependant. For the strain ATCC 49174 treated at 1 kGy, the muropeptides had a larger size. Since linking between peptides of the murein is enzymatically regulated, the modifications made by the irradiation treatment could be related to the increasing activity of the transpeptidases, the enzyme responsible for the creation of crosslink between muropeptides. Although, at 3.5

kGy, bigger peptides, in length, could be observed as compared to the non-irradiated control. For the strain RL1, irradiation at 1 kGy seemed to inhibit the formation of the crosslinking bridges. At 3.5 kGy the increase of the peptide length was noticed as well as in the ATCC strain. The length increase was greater for the strain RL1 than the ATCC. This difference could give an advantage toward radioresistance. Stronger murein could provide a longer period before the cell loose its integrity under radiation exposure and this would allow the bacteria to repair its cell components. In conclusion, DNA is the most fatal target concerning the damages done by γ -irradiation but its effect on the bacterial membrane it noticeable and could play an important role on the cellular response and ability to survive this harsh environment.

Acknowledgment

This research was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). We also thank MDS Nordion for the radiation operations.

References

Aguilar, P.S. and de Mendoza, D. (2006) Control of fatty acid desaturation: a mechanism conserved from bacteria to humans. *Molecular microbiology* **62**, 1507-1514.

Cabiscol, E., Tamarit, J. and Ros, J. (2000) Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol* **3**, 3-8.

Caillet, S., Shareck, F. and Lacroix, M. (2005) Effect of gamma radiation and oregano essential oil on murein and ATP concentration of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of food protection* **68**, 2571-2579.

Daly, M.J., Gaidamakova, E.K., Matrosova, V.Y., Vasilenko, A., Zhai, M., Leapman, R.D., Lai, B., Ravel, B., Li, S.M., Kemner, K.M. and Fredrickson, J.K. (2007) Protein oxidation implicated as the primary determinant of bacterial radioresistance. *PLoS biology* **5**, e92.

Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D. and Mauriello, G. (2007) Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry* **55**, 4863-4870.

Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G. and Mauriello, G. (2006) Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *Journal of agricultural and food chemistry* **54**, 2745-2749.

Dussault, D., Caillet, S., Tien, C.L. and Lacroix, M. (2008) Carotenoids' influence on radiotolerance of *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen. *Letters in Applied Microbiology* **47**, 208-213.

Edidin, M. (2003) Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 414-418.

Evans, R.I., McClure, P.J., Gould, G.W. and Russell, N.J. (1998) The effect of growth temperature on the phospholipid and fatty acyl compositions of non-proteolytic *Clostridium botulinum*. *International journal of food microbiology* **40**, 159-167.

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. and Daly, M.J. (2005) How radiation kills cells: survival of *Deinococcus radiodurans* and *Shewanella oneidensis* under oxidative stress. *FEMS microbiology reviews* **29**, 361-375.

Glauner, B. (1988) Separation and quantification of muropeptides with high-performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry* **172**, 451-464.

Guerzoni, M.E., Lanciotti, R. and Cocconcelli, P.S. (2001) Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus*. *Microbiology (Reading, England)* **147**, 2255-2264.

Gupta, R., Bhadauriya, P., Chauhan, V.S. and Bisen, P.S. (2007) Impact of UV-B Radiation on Thylakoid Membrane and Fatty Acid Profile of *Spirulina platensis*. *Curr Microbiol.*

Imlay, J.A. (2003) Pathways of oxidative damage. *Annual review of microbiology* **57**, 395-418.

Lacroix, M. and Lafortune, R. (2004) Combined effects of gamma irradiation and modified atmosphere packaging on bacterial resistance in grated carrots (*Daucus carata*). *Radiation Physics and Chemistry* **71**, 77-80.

Le-Tien, C., Lafortune, R., Shareck, F. and Lacroix, M. (2006) DNA analysis of a radiotolerant bacterium *Pantoea agglomerans* by FT-IR spectroscopy. *Talanta* **71**, 1969-1975.

Oliver, J.D. (2005) The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)* **43 Spec No**, 93-100.

Pedersen, U.R., Leidy, C., Westh, P. and Peters, G.H. (2006) The effect of calcium on the properties of charged phospholipid bilayers. *Biochimica et biophysica acta* **1758**, 573-582.

Rainey, F.A., Ray, K., Ferreira, M., Gatz, B.Z., Nobre, M.F., Bagaley, D., Rash, B.A., Park, M.J., Earl, A.M., Shank, N.C., Small, A.M., Henk, M.C., Battista, J.R., Kampfer, P.

and da Costa, M.S. (2005) Extensive diversity of ionizing-radiation-resistant bacteria recovered from Sonoran Desert soil and description of nine new species of the genus *Deinococcus* obtained from a single soil sample. *Applied and environmental microbiology* **71**, 5225-5235.

Shigapova, N., Torok, Z., Balogh, G., Goloubinoff, P., Vigh, L. and Horvath, I. (2005) Membrane fluidization triggers membrane remodeling which affects the thermotolerance in *Escherichia coli*. *Biochemical and biophysical research communications* **328**, 1216-1223.

Signoretto, C., Lleo, M.M., Tafi, M.C. and Canepari, P. (2000) Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *Applied and environmental microbiology* **66**, 1953-1959.

Stahl, W., Junghans, A., de Boer, B., Driomina, E.S., Briviba, K. and Sies, H. (1998) Carotenoid mixtures protect multilamellar liposomes against oxidative damage: synergistic effects of lycopene and lutein. *FEBS letters* **427**, 305-308.

Tatzer, V., Zellnig, G., Kohlwein, S.D. and Schneider, R. (2002) Lipid-dependent subcellular relocalization of the acyl chain desaturase in yeast. *Molecular biology of the cell* **13**, 4429-4442.

Vollmer, W. and Bertsche, U. (2007) Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochimica et biophysica acta*.

Xu, Z., Tian, B., Sun, Z., Lin, J. and Hua, Y. (2007) Identification and functional analysis of a phytoene desaturase gene from the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Microbiology (Reading, England)* **153**, 1642-1652.

Zhang, Y.M. and Rock, C.O. (2008) Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nature reviews* **6**, 222-233.

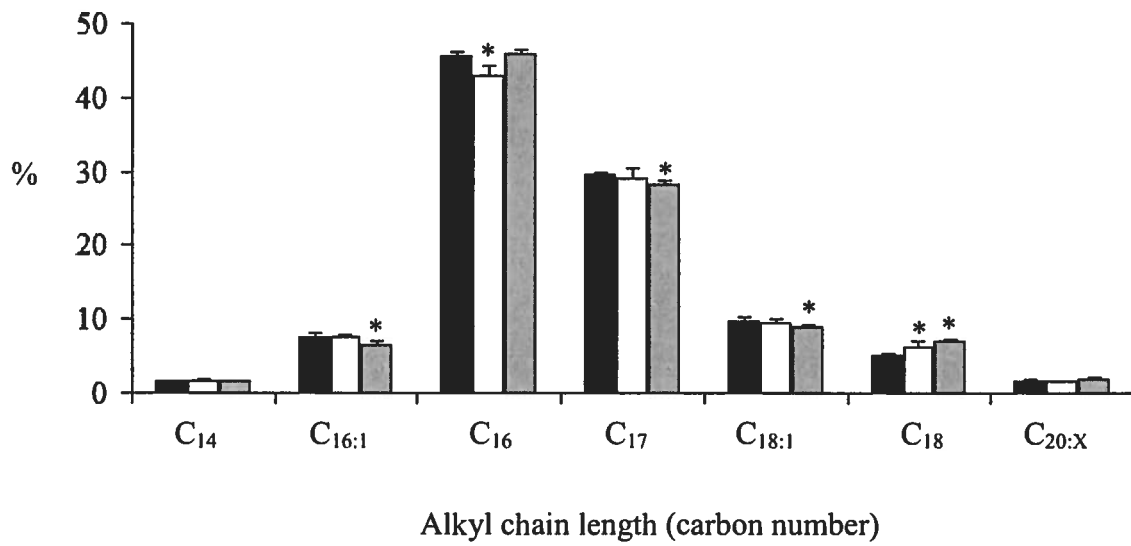


Figure 1: Fatty acids composition of the membrane of *Pant. Agglomerans* strain ATCC 49174.

(■) Control (non-irradiated)

(□) 1 kGy irradiated

(▒) 3.5 kGy irradiated

C_{20:X}, includes all variants of the 20 carbons UFA

* Significantly different ($P \leq 0.05$) as compared to the control (non-irradiated).

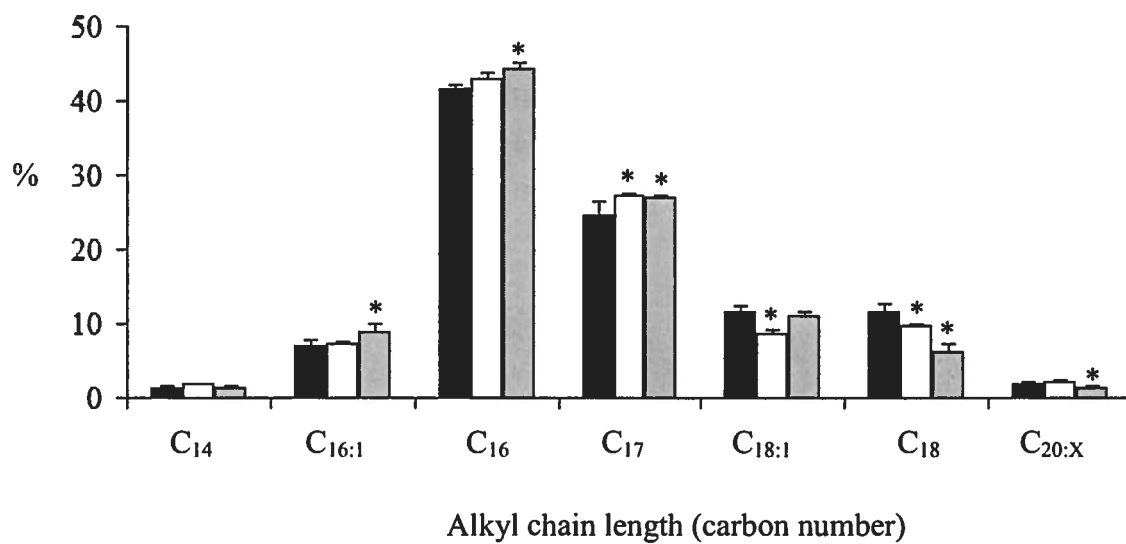


Figure 2: Fatty acid composition of the membrane of *P. agglomerans* strain RL1.

(■) Control (non-irradiated)

(□) 1 kGy

(▒) 3.5 kGy

C_{20:X}, includes all variants of the 20 carbons UFA

* Significantly different ($P \leq 0.05$) as compared to the control (non-irradiated).

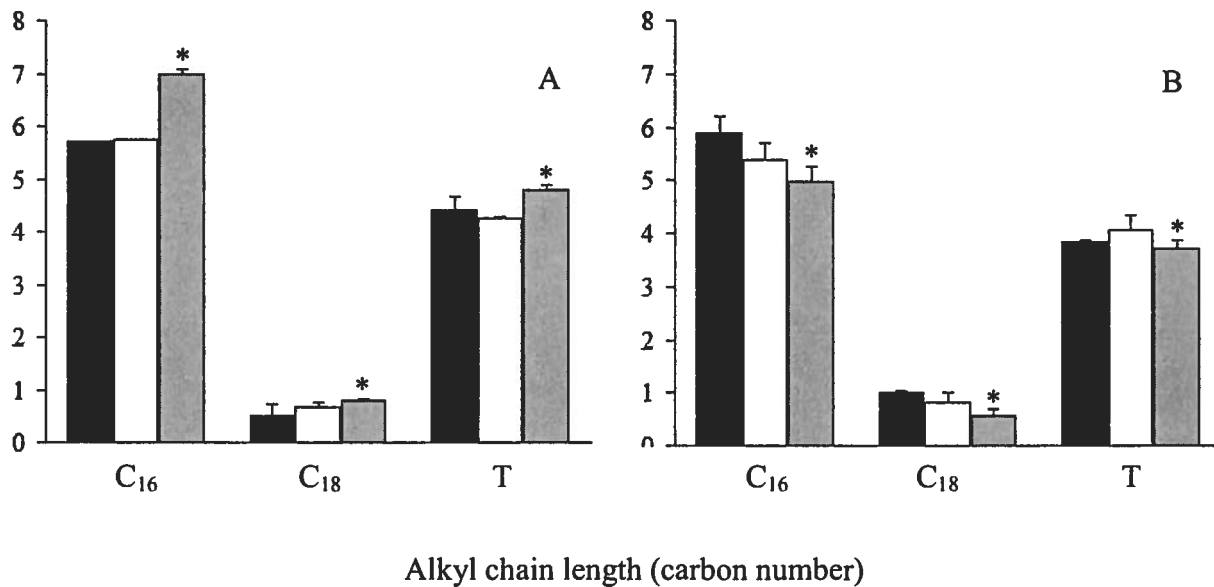


Figure 3: Fatty acids ratio (saturated/unsaturated) for strain *Pant. agglomerans* ATCC 49174 (A) and strain RL1 (B).

(■) Control (non-irradiated)

(□) 1 kGy

(▒) 3.5 kGy

T total fatty acids

* Significantly different ($P \leq 0.05$) as compared to the control (non-irradiated).

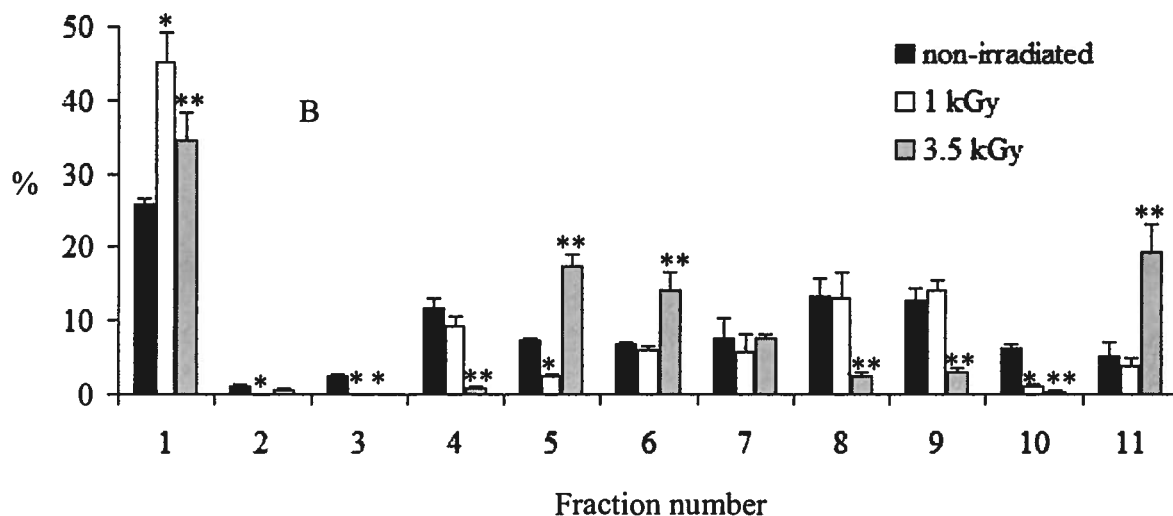
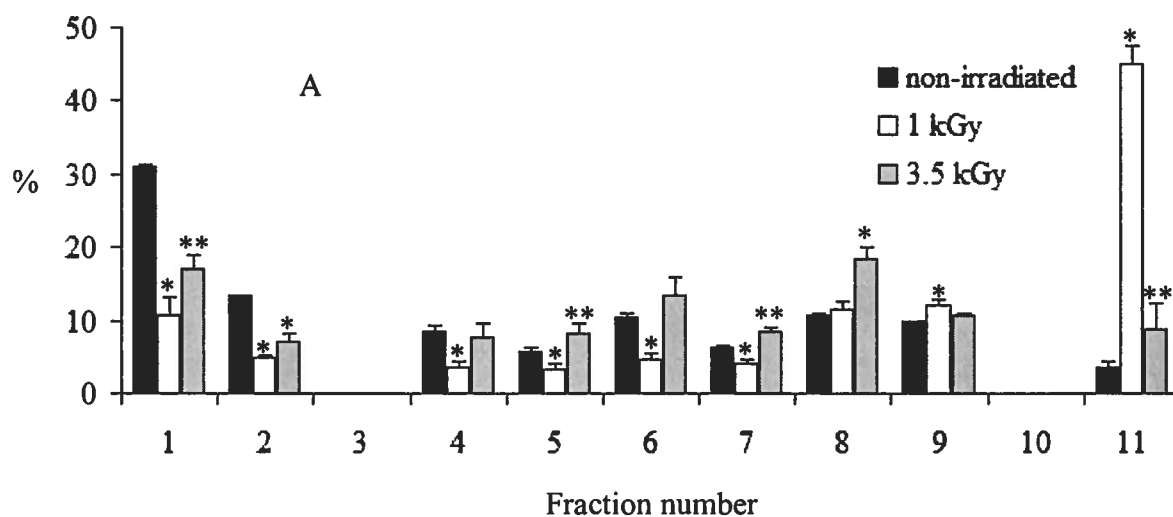


Figure 4: Effect of gamma radiation on the muropeptide composition of *Pant. agglomerans* strain ATCC 49174 (A) and strain RL1 (B).

* Significantly different ($P \leq 0.05$) as compared to the control (non-irradiated).

** Significantly different ($P \leq 0.05$) as compared to the control (non-irradiated) and irradiated at 1 kGy. The whole run has been separated in 10 fractions. The first ten fractions represent the first ten minutes intervals and the eleventh one represents the total area from a hundred minute till the end.

**Article 3: Influence of γ -irradiation on heat shock proteins of
Pantoea agglomerans, a yellow pigmented phytopathogen**

D. Dussault¹, S. Caillet¹, C. Le Tien² and M. Lacroix^{1*}

¹ Canadian Irradiation Centre and Research Laboratories in Sciences Applied to Food,
INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Quebec, Canada;

² Laboratoires Mauves inc., Selkirk, Pointe-Claire, Quebec, Canada;

Running title: *P. agglomerans* radiotolerance

Soumis le 28 août 2008 au Letters in Applied Microbiology

*Corresponding author. Professor Monique Lacroix, 531 boul. des Prairies, Laval,
Québec, Canada, H7V 1B7 Tel.:1-450-687-5010 #4489; fax: 1-450-686-5501; E-mail
address: monique.lacroix@iaf.inrs.ca

Contributions des auteurs

J'ai adapté le protocole pour l'analyse des protéines de stress, j'ai réalisé toutes les expériences et rédigé le manuscrit scientifique. Le Dr. Stephane Caillet a mis au point le protocole pour l'analyse des protéines de stress et a participé aux discussions scientifiques. Le Dr. Tien Canh Le a participé aux discussions scientifiques du projet et a révisé le manuscrit. La Prof. Monique Lacroix était la responsable scientifique et la coordinatrice du projet de recherche. De plus, la Prof. Lacroix a supervisé l'élaboration des protocoles, les discussions scientifiques entourant ce projet et elle a révisé le manuscrit.

Résumé en français

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet de l'irradiation- γ sur le contenu cytoplasmique en protéines du shock thermique de deux souches de l'*Enterobacteriaceae: Pantoea agglomerans*. Les deux souches de *P. agglomerans* ATCC 49174 et RL1 ont été utilisées pour cette étude. Des traitements d'irradiation- γ à 1 et 3.5 kGy ont été utilisés pour étudier la radiotolérance. Les protéines totales ont été extraites après l'exposition aux traitements d'irradiation et les protéines d'intérêt (GroEL, GroES and DnaK) ont été visualisées par des immunobuvardages de type Western. Il a été découvert que pour les deux souches de la bactérie, qu'il y avait une augmentation significative ($P \leq 0.05$) de la synthèse de GroEL tandis que la synthèse de DnaK était réprimée que pour la souche ATCC. De plus, le niveau basal de GroEL était plus haut chez la souche RL1 que chez la souche ATCC. En conclusion, les résultats obtenus dans cette étude ont démontré l'implication de l'irradiation- γ sur le niveau de protéines du shock thermique de la cellule bactérienne.

Abstract

Aims: The aim of this study was to evaluate the effect of γ -irradiation on the heat shock proteins content of two strains of an *Enterobacteriaceae*: *Pantoea agglomerans*. **Methods and results:** *P. agglomerans* strains ATCC 49174 and strain RL1 were used for this study. Radiation treatments (1 and 3.5 kGy) were performed to study the radiotolerance. Total proteins were extracted after irradiation treatments and proteins of interest (GroEL, GroES and DnaK) were visualized using Western blot analysis. It was found that GroEL synthesis increased significantly ($P \leq 0.05$) for both strains while the DnaK seemed to be down regulated for the ATCC strain only. Also, basal level of GroEL proteins was much higher in the strain RL1 **Conclusion:** The results obtained in this study showed clearly the implications of γ -irradiation on the heat shock proteins cellular level. **Significance and impact of the study:** This study demonstrates the effect of γ -irradiation on the modification of the bacterial hsp level.

Keywords: *Pantoea agglomerans*, irradiation, hsp, radiotolerance, VBNC

Introduction

Gamma irradiation treatment is being investigated in order to ensure the safety and to extend the shelf life of food while avoiding the effects associated with thermal processing (Manas and Pagan 2005). Work of Lacroix and Lafortune (2004) has permitted the isolation of a resistant bacterium to irradiation in a probable viable but non-culturable (VBNC) state and was identified as *Pantoea agglomerans*. This microorganism is an *Enterobacteriaceae* like *Escherichia coli* but is up to 5 times more radiotolerant (Le Tien et al. 2006). Although, the mechanism of cell protection to this stress are not well understood. Nowadays, studies on γ -irradiations seem to show that protein oxidation is the main cause to the inability to recover and repair damages observed after such a stress (Daly et al. 2007). Environmental stresses such as heat shock, cold shock, osmotic shock, starvation, amino acid analogs, antibiotics, heavy metals, ultraviolet rays, gamma rays and alcohols produce a cellular response when microorganisms are exposed to it and it is known as the heat shock response (Kvint et al. 2003). Exposure to an raising heat will begin with an increase of the membrane fluidity, proteins denaturation and degradation and will finally lead to cell death (Aguilar and de Mendoza 2006). The response to heat shock as been associated with a high production level of proteins known as heat shock proteins (hsp). Higher level of specific protein during heat shock response is due to the fact that an increase of the σ^{32} subunit of the RNA polymerase (RNAP) will enable the polymerase to attach to precise part of the DNA encoding for hsp genes (Wade et al. 2006). The hsp are molecular chaperone responsible for the proteins folding. Their activity is quite important since they will prevent non specific association, fold the proteins in the right globular shape and will

increase the time before their degradation by the cellular protease (Marchenko et al. 2006). Thus it was hypothesized that the hsp production after γ -irradiation treatment plays a significant role in the radioresistance and in the recovery of bacteria during the VBNC state.

The objective of this study was to evaluate the response of *P. agglomerans* strain ATCC 49174 (used as a non-irradiated control) and strain RL1 isolated from irradiated carrots to increasing irradiation doses in order to elucidate and characterize their adaptative response to this γ -irradiation. GroEL, GroES and DnaK expressions following γ -irradiation at different doses were studied to confirm hsp induction during exposure to the treatment.

Materials and methods

Microorganisms and growth condition. *P. agglomerans* strain ATCC 49174 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) and a strain RL1 previously isolated from irradiated carrots at 7 kGy by Lacroix and Lafortune (2004) and identified by comparing the sequence of the 16S rDNA with DNA sequences from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database using the standard nucleotide–nucleotide homology search Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) were subcultured (1.0 %, v/v) in tryptic soy broth (TSB, Difco Laboratories, Detroit, USA) at 30 °C for 24 h from the stock culture maintained at –80 °C in TSB containing glycerol (20 %, w/v). Prior to the experiment, 1 ml of culture was incubated for 24 h at 30 °C in TSB to obtain a working culture containing approximately 10^9 CFU ml⁻¹. The bacterial culture was centrifuged at 2,000 ×

g for 15 min at 4 °C, washed with NaCl (0.85 %, w/v), resuspended in 1 l of TSB and incubated for 24 h preceding the irradiation treatments. For the bacteria irradiated multiple times a portion of the irradiated cells was poured into fresh TSB and allowed to grow as described earlier before applying the next irradiation treatment. The bacteria were initially cultured without agitation unless specified for some parts of the experiment.

Irradiation. The bacterial cultures were irradiated with a mean dose of 1 kGy to create damaged cells and with a mean dose of 3.5 kGy to kill cells. A UC-15A irradiator (MDS Nordion international Inc., Kanata, Ontario, Canada) equipped with a ⁶⁰Cobalt source was used to deliver radiation at a mean rate of 16.2 kGy h⁻¹. This irradiator was certified by the National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, Md.), and the dose rate was established using a correction for decays of source. Amber Oersoex 3042D (Atomic Energy Research Establishment, Harwell, Oxfordshire, UK) was used to validate the doses distributions. The radiation treatment was carried out at the Canadian Irradiation Centre (Laval, Quebec, Canada) at room temperature (20 °C).

Extraction of proteins. Immediately after irradiation, 50 ml of each bacterial culture was quickly chilled in an ice/ethanol bath until the temperature dropped below 10 °C. Cells were harvested by centrifugation for 15 min at 2000 × g at 4 °C and the resulting pellet was washed in 25 ml NaCl (0.85 %, w/v) at the same temperature. The bacterial pellets were then resuspended in 5 ml of protease inactivation buffer (50 mmol l⁻¹ Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 mol l⁻¹ NaCl, 1 mmol l⁻¹ phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 1 mg ml⁻¹ iodoacetamide) and cell were broken using a cell disrupter (FastPREP, model FP 120, Qbiogene Inc., Carlsbad, CA, USA) containing glass beads (0.2 mm) and regulated at speed 6 for 30 s at 4°C. The suspension was centrifuged at

5000 × g for 5 min to remove the glass beads and the unbroken cells. Then, the resulting supernatant containing the proteins was harvested and stored at -20 °C.

Proteins dosage. The concentration of protein in the protein extract, was determine using a bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Pierce, Rockford, Ill, USA) according to the manufacturer's specifications. Absorbance was read at 562 nm with a DMS 100S spectrophotometer (Varian Canada Inc., Mississauga, ON, Canada). A standard curve was done using bovine serum albumin (Pierce) was used (25 – 2000 µg ml⁻¹).

SDS PAGE and western blotting. An aliquot of the suspension (1 mg of protein ml⁻¹) was diluted with sample buffer 2x (62.5 mmol l⁻¹ Tris-HCl, SDS (2 %, w/v), glycerol (31.5 %, w/v), bromophenol blue (0.01%, w/v), 7.15 mmol l⁻¹ β-mercaptoethanol) to obtain 5 µg of total protein well⁻¹ for the GroEL detection and and 10 µg of total protein well⁻¹ for the GroES and DnaK detection. Proteins contained in the bacterial cell extracts were separated by SDS-PAGE with 10 % acrylamide/bis gel (30 % T, 2.67 % C) using the Novex® Sharp™ Pre-stained (Invitrogen Canada Inc., Burlington, ON, Canada) molecular size standard. The migration of the proteins was carried out at 200 V during 45 min in a Mini-Protean® Tetra cell (Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, ON, Canada) and the coloration of the gel was done using Coomassie blue R-250. After electrophoresis, the proteins extract were transferred onto a nitrocellulose membrane Hybond™-ECL™ (Amersham Biosciences, Oakville, ON, Canada), and processed for immunoblotting in a Mini Trans-Blot® electrophoretic transfer cell (Bio-Rad) at 20 V overnight. The membrane was blocked with 3 % skim milk for 1 h at room temperature. Blots were then incubated with either GroEL rabbit polyclonal antibody

(Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) conjugated with peroxidase, DnaK mouse monoclonal antibody (Stressgen, Victoria, BC, Canada) or GroES rabbit polyclonal antibody (Stressgen) rose against corresponding proteins produced by *E. coli*. For DnaK and GroES proteins, immunocomplexes were incubated with sheep anti-mouse peroxidase and donkey anti-rabbit peroxidase (Stressgen), respectively. Immunocomplexes were then visualized with SuperSignal® West Pico chemiluminescent substrate (Pierce). The films (Konica Minolta, Mississauga, ON, Canada) are then exposed on the membrane in a darkroom and developed with a mini-med/90 X-ray film processor (AFP Imaging Corporation, Elmsford, NY). The resulting bands were analysed and quantified with a Alpha Imager™ IS-3400 (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA) using the standard curves. Results were expressed as µg of Hsp per mg of total proteins. A standard curve of 80, 40, 20, 10 and 5 ng well⁻¹ was done for GroEL, DnaK and GroES.

Statistical analysis. An analysis of variance and Duncan's multiple-range tests were employed to analyze statistically all results. Student's *t* test was utilized with the analysis of variance and paired comparisons. Differences between means were considered significant at $P \leq 0.05$. Stat-Packets Statistical Analysis software (SPSS Base 10.0, SPSS, Inc., Chicago, Ill.) was used for the analysis. All experiment was done in duplicate.

Results

P. agglomerans strain ATCC 49174 and strain RL1 were irradiated at 1 and 3.5 kGy and target stress proteins (GroEL, GroES and DnaK) were detected by western blot analysis. This experiment was carried out in parallel in order to investigate whether there

was a difference between the strain which has never been submitted under the radiation stress and the one isolated from carrots after irradiation at 7 kGy (Lacroix and Lafortune, 2004). The blots obtained from the total proteins sample, non-irradiated and irradiated (1 kGy and 3.5 kGy), of *P. agglomerans* strain ATCC 49174 and the strain RL1 are shown in Figure 1. Protein standard curve of GroEL (5-40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) is also shown in Figure 1. Quantification of each band using the standard curve for each protein (GroEL, GroES and DnaK) is shown in Table 1.

For the strain ATCC 49174 at 1 kGy the GroEL/GroES proteins were increased by 12 and 4.7 fold respectively. At 3.5 kGy the increase was much lower since the GroEL proteins concentration increased by 3.4 times and there was no significant ($P>0.05$) modification for the GroES concentration. For the DnaK protein evaluated from the strain irradiated at 1 kGy there was no significant ($P>0.05$) modification of the basal level. However, when cells were treated at 3.5 kGy a 1.75 time less proteins concentration was observed.

For the strain RL1, the GroEL protein concentration increased by 1.9 and 3 times respectively. For the GroES and DnaK proteins evaluated from strain irradiated at 1 kGy and at 3.5 kGy there was no significant ($P>0.05$) modification as compared to the protein basal level. By comparing the basal level of each protein for the two unirradiated strains of *P. agglomerans*, it was found that the strain ATCC 49174 had 8.8 times less GroEL, 4.3 times less GroES and 1.7 times more DnaK.

Discussion

The *P. agglomerans* bacterial strains ATCC 49174 and RL1 were used to investigate the effects of γ -irradiations on the hsp cellular level. According to the obtained results, irradiation treatment modified the protein synthesis in the bacterial cytoplasm. It is known that to recover from the negative effect of some environmental stresses, bacteria use greater numbers of chaperones proteins in order to rectify and correctly fold their cellular proteins (Wade et al. 2006). A study on eukaryotic cells has shown that ionizing irradiation induces hsp production, in particular Hsp70 (Calini et al. 2003). As compared to our results, hsp synthesis was also increased after exposition to γ -irradiations.

Both strains of *P. agglomerans* did not show the same response to the irradiations exposure. The level of GroEL induction in the strain RL1 was lower than the induction observed in the ATCC strain. This phenomenon could be explained by the fact that the basal level was much lower in the ATCC strain. In the strain ATCC 49174, the DnaK chaperone system was down regulated and in the strain RL1 there was no modification as compared to the non irradiated control.

The lack of DnaK induction as compared to the GroEL chaperone system could be explained by the fact that Hsp60 folding system completely traps the proteins in a closed container. The Hsp70 system only attaches to a part of the protein (Lin and Rye 2006). In the previous case, some critical parts of the proteins are still in contact with the oxidative species damaging the cell components and therefore giving no advantage toward radioresistance.

A higher concentration of hsp produced by the strain RL1 could be due to the protective effect of hsp that is necessary to survive exposition to higher irradiation doses (> 3.5 kGy). Also, it is possible that a higher basal level of hsp in the strains RL1 could be providing better means of protection when the reactive oxygen species are produced by the irradiation treatment. In conclusion, the results obtained in this study showed clearly the implication of γ -irradiation on the hsp cellular level. Although, it is not clear if the synthesis increase is a direct consequence of irradiation as a mean of protection against this stress or if it is related to the failure of cell integrity. More studies are under progress to investigate whether or not overexpressing mutant of hsp harness greater radiotolerance.

Acknowledgment

This research was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). We also thank MDS Nordion for the radiation operations.

References

Aguilar, P.S. and de Mendoza, D. (2006) Control of fatty acid desaturation: a mechanism conserved from bacteria to humans. *Molecular microbiology* **62**, 1507-1514.

Calini, V., Urani, C. and Camatini, M. (2003) Overexpression of HSP70 is induced by ionizing radiation in C3H 10T1/2 cells and protects from DNA damage. *Toxicol In Vitro* **17**, 561-566.

Daly, M.J., Gaidamakova, E.K., Matrosova, V.Y., Vasilenko, A., Zhai, M., Leapman, R.D., Lai, B., Ravel, B., Li, S.M., Kemner, K.M. and Fredrickson, J.K. (2007) Protein oxidation implicated as the primary determinant of bacterial radioresistance. *PLoS biology* **5**, e92.

Kvint, K., Nachin, L., Diez, A. and Nystrom, T. (2003) The bacterial universal stress protein: function and regulation. *Current opinion in microbiology* **6**, 140-145.

Lacroix, M. and Lafortune, R. (2004) Combined effects of gamma irradiation and modified atmosphere packaging on bacterial resistance in grated carrots (*Daucus carata*). *Radiation Physics and Chemistry* **71**, 77-80.

Le-Tien, C., Lafortune, R., Shareck, F. and Lacroix, M. (2006) DNA analysis of a radiotolerant bacterium *Pantoea agglomerans* by FT-IR spectroscopy. *Talanta* **71**, 1969-1975.

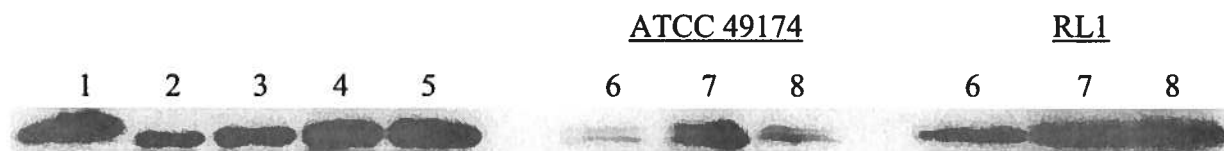
Lin, Z. and Rye, H.S. (2006) GroEL-mediated protein folding: making the impossible, possible. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **41**, 211-239.

Manas, P. and Pagan, R. (2005) Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of applied microbiology* **98**, 1387-1399.

Marchenko, N.Y., Marchenkov, V.V., Kaysheva, A.L., Kashparov, I.A., Kotova, N.V., Kaliman, P.A. and Semisotnov, G.V. (2006) Affinity Chromatography of GroEL Chaperonin Based on Denatured Proteins: Role of Electrostatic Interactions in Regulation of GroEL Affinity for Protein Substrates. *Biochemistry* **71**, 1357-1364.

Wade, J.T., Roa, D.C., Grainger, D.C., Hurd, D., Busby, S.J., Struhl, K. and Nudler, E. (2006) Extensive functional overlap between sigma factors in Escherichia coli. *Nature structural & molecular biology* **13**, 806-814.

Figure 1: Western blot analysis of GroEL, GroES and DnaK in *P. agglomerans* strains ATCC 49174 and RL1.



1, Molecular size standard; 2, GroEL 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$; 3, GroEL 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$; 4, GroEL 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$; 5, GroEL 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$; 6, non-irradiated; 7, 1 kGy; 8, 3.5 kGy

Table 1: Quantification of GroEL, GroES and DnaK in *P. agglomerans* strains ATCC 49174 and RL1.

	ATCC 49174						RL1					
	non-irradiated		1 kGy		3.5 kGy		non-irradiated		1 kGy		3.5 kGy	
GroEL	0.22	(0.14)a	2.64	(0.50)c	0.74	(0.32)b	1.94	(0.62)a	3.66	(0.84)b	5.76	(0.94)c
GroES	0.83	(0.22)a	3.86	(0.87)b	0.61	(0.24)a	3.54	(0.51)a	3.86	(0.94)a	2.95	(0.66)a
DnaK	4.78	(0.78)c	4.42	(0.67)b	2.73	(0.48)a	2.83	(0.34)a	3.97	(0.71)a	3.64	(0.59)a

The values are the means (standard deviation) of duplicate and those within a row that

bear the same letter are not significantly different ($P>0.05$).

With regard to the quantification, results are expressed as μg of hsp mg^{-1} of total protein

Chapitre IV : Discussion

Détection d'un stade de CVNC

Suite à l'isolation d'une souche de la bactérie *P. agglomerans* après plusieurs jours d'incubation sur des carottes irradiées et conservées à 4 °C, il a été émit comme hypothèse qu'un stade de CVNC était possible chez cette même bactérie. Toutefois, l'expérimentation n'a pas permis de détecter ce stade à une température de croissance de 30 °C. Cette même expérience a permis de caractériser la souche et de déterminer les doses d'irradiation ionisante permettant l'élimination de la totalité des microorganismes et du même fait la dose de sensibilité a pu être évaluée. Deux hypothèses peuvent être émises. La première consiste au fait qu'en condition de croissance optimale cette espèce bactérienne ne possède pas de stade de CVNC. Il a été démontré dans la littérature que certaines conditions particulières (manque de nutriments, température d'incubation inadéquate, forte pression osmotique, mauvaises concentrations d'oxygène ou l'exposition à la lumière blanche) sont souvent nécessaires pour obtenir ce stade cellulaire (Oliver, 2005). La deuxième hypothèse consiste au fait que les doses utilisées ne sont pas celles produisant un stade de CVNC. L'utilisation d'intervalles plus faible aurait possiblement permis d'induire ce stade. Toutefois, les doses utilisées lors de l'expérimentation étaient l'intervalle le plus petit entre deux doses produites par l'irradiateur utilisé. D'après les résultats du Tableau I, il est possible d'affirmer que la dose létale est de 3.5 kGy. De ce fait, la dose de sensibilisation est de 1 kGy car par définition, elle est environ le 1/3 de la dose létale. En comparaison avec la bactérie *Escherichia coli*, qui possède une dose létale de 1.3 kGy (résultats non démontré) *P. agglomerans* semble plus de 3 fois plus radiorésistante. De plus, les 2 souches (ATCC 491744 et celle isolée de carottes irradiées) de la bactérie *P. agglomerans* semble avoir la même radiosensibilité.

Confirmation des souches bactériennes

Suite au séquençage d'une partie du génome codant pour l'ARNr 16S il a été possible de confirmer que les deux souches appartenaient au genre *Pantoea* et à l'espèce *agglomerans*. Il est possible de confirmer le genre *Pantoea* et l'espèce *agglomerans* car pour les deux souches les pourcentages d'homologie sont supérieurs à 97%. Les résultats obtenus lors des séquençages démontrent que les deux souches de la bactérie sont d'une origine différente.

Synthèse des articles scientifiques

À la lumière des observations faites lors de mes travaux de maîtrise, il est certain que l'irradiation par des rayons γ influence grandement la cellule bactérienne. Toutefois, la réponse induite par la cellule suite à l'exposition à un tel stress semble provenir de plusieurs mécanismes cellulaires différents.

La littérature semble bien démontrer que l'altération de l'ADN bactérien est le principal responsable de la mort cellulaire (Ghosal *et al.*, 2005). Toutefois, les résultats obtenus démontrent une multitude de conséquences néfastes pour la cellule. Une modification des acides gras composant la bicouche lipidique membranaire entrainera une modification de la fluidité membranaire (Aguilar et de Mendoza, 2006). Une surproduction de pigments caroténoïdiens augmentera la résistance aux espèces réactives de l'oxygène (Sun, Lee et Song, 2004). Une augmentation des liens covalents entre les muropeptides du peptidoglycane produira une solidification de la paroi entraînant une meilleure résistance aux pressions osmotiques (van Heijenoort, 2001). Une augmentation de la synthèse de protéines chaperonnes permettant de bien replier les protéines bactériennes consentira une meilleure protection face aux stress environnementaux (Lin et Rye, 2006). Toutes ces conséquences ne jouent pas un rôle direct dans la protection ou la réparation de l'ADN mais pourrait permettre à la cellule de survivre momentanément à

l'irradiation par des rayons γ et permettre aux mécanismes de réparation de l'ADN de jouer leur rôle.

L'étude sur les mécanismes de radiorésistance a permis de cerner une problématique très importante en ce qui concerne la réponse bactérienne à un stress environnemental. Cette problématique se décrit par le fait qu'il est parfois difficile de relier directement l'implication d'un événement ponctuelle à une réponse cellulaire. Il en est tout au tant vrai pour l'exposition d'une cellule bactérienne à des rayons γ car la réponse observée peut être une conséquence des dommages causés par le traitement lui-même ou tout simplement par le fait que la cellule possède trop de mécanismes défailants et dispose d'un métabolisme dérégulé juste avant sa mort.

En ce qui concerne les perspectives à long terme, il serait intéressant de diriger les recherches futures dans une avenue plus globale afin de mieux cibler les mécanismes jouant un rôle dans la résistance bactérienne. Il serait intéressant de tenter d'identifier les protéines bactériennes influencées par les radiations γ . Une expérience impliquant une bactérie bien connue tel *Escherichia coli* et comportant un témoin non-irradié et un autre irradié à la dose sous létale pourrait servir de cible intéressante. L'extraction de leur protéomes et la visualisation sur un gel d'électrophorèse à deux dimensions permettrait de voir la réponse engendrée par le traitement. Par la suite, l'identification des protéines démontrant un profil d'expression différent du témoin proposerait des pistes solides sur la réponse bactérienne. L'utilisation d'une bactérie bien connue servirait à mieux interpréter les réponses obtenues suite à l'étude.

En conclusion, une meilleure compréhension des mécanismes de radiorésistance permettra de mieux comprendre l'impact sur les microorganismes. Ainsi en optimisant les conditions d'exposition des microorganismes, l'efficacité d'un tel traitement de décontamination permettrait d'augmenter l'efficacité alimentaire et préviendrait un grand nombre de maladies.

Bibliographie

AGUILAR, P. S. et de Mendoza, D. 2006. Control of fatty acid desaturation: a mechanism conserved from bacteria to humans. Molecular microbiology, vol. 62, no. 6, p. 1507-1514.

ALBERTS, B. 2002 Molecular biology of the cell. New York: Garland Science.

AMAECHE, B. T., Higham, S. M. et Edgar, W. M. 1998. Efficacy of sterilisation methods and their effect on enamel demineralisation. Caries research, vol. 32, no. 6, p. 441-446.

ARMSTRONG, G. A. et Hearst, J. E. 1996. Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. The FASEB Journal, vol. 10, no. 2, p. 228-237.

ASKER, D., Beppu, T. et Ueda, K. 2007. Unique diversity of carotenoid-producing bacteria isolated from Misasa, a radioactive site in Japan. Applied microbiology and biotechnology, vol. 77, no. 2, p. 383-392.

BARTELT, M. A. 2000 Diagnostic bacteriology : a study guide. Philadelphia: F.A. Davis.

BECKER-HAPAK, M., Troxtel, E., Hoerter, J. et Eisenstark, A. 1997. RpoS dependent overexpression of carotenoids from *Erwinia herbicola* in OXYR deficient *Escherichia coli*. Biochemical and biophysical research communications, vol. 239, no. 1, p. 305-309.

CAILLET, S., Millette, M., Turgis, M., Salmieri, S. et Lacroix, M. 2006. Influence of antimicrobial compounds and modified atmosphere packaging on radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes* present in ready-to-use carrots (*Daucus carota*). Journal of food protection, vol. 69, no. 1, p. 221-227.

CAILLET, S., Salmiéri, S. et Lacroix, M. 2006. Evaluation of free radical-scavenging properties of commercial grape phenol extracts by a fast colorimetric method Food Chemistry, vol. 95, no. p. 1-8.

CAILLET, S., Shareck, F. et Lacroix, M. 2005. Effect of gamma radiation and oregano essential oil on murein and ATP concentration of *Escherichia coli* O157:H7. Journal of food protection, vol. 68, no. 12, p. 2571-2579.

CARBONNEAU, M. A., Melin, A. M., Perromat, A. et Clerc, M. 1989. The action of free radicals on *Deinococcus radiodurans* carotenoids. Archives of biochemistry and biophysics, vol. 275, no. 1, p. 244-251.

CHENG, Q. 2006. Structural diversity and functional novelty of new carotenoid biosynthesis genes. Journal of industrial microbiology & biotechnology, vol. 33, no. 7, p. 552-559.

CHIASSON, F., Borsa, J. et Lacroix, M. 2005. Combined effect of carvacrol and packaging conditions on radiosensitivity of *Escherichia coli* and *Salmonella Typhi* in ground beef. Journal of food protection, vol. 68, no. 12, p. 2567-2570.

COX, M. M. et Battista, J. R. 2005. *Deinococcus radiodurans* - the consummate survivor. Nature reviews, vol. 3, no. 11, p. 882-892.

CRUZ, A. T., Cazacu, A. C. et Allen, C. H. 2007. *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human disease. Journal of clinical microbiology, vol. 45, no. 6, p. 1989-1992.

DI PASQUA, R., Hoskins, N., Betts, G. et Mauriello, G. 2006. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. Journal of agricultural and food chemistry, vol. 54, no. 7, p. 2745-2749.

DIVOL, B. et Lonvaud-Funel, A. 2005. Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. Journal of applied microbiology, vol. 99, no. 1, p. 85-93.

DU, M., Chen, J., Zhang, X., Li, A., Li, Y. et Wang, Y. 2007. Retention of Virulence in a Viable but Nonculturable *Edwardsiella tarda* Isolate. Applied and environmental microbiology, vol. 73, no. 4, p. 1349-1354.

EDWARDS, J., Baque, E. et Tang, J. 2004. Proposal to acknowledge Beijerinck as the original author of the species *Pantoea agglomerans*. Request for an opinion. International journal of systematic and evolutionary microbiology, vol. 54, no. 6, p. 2437.

EVANS, R. I., McClure, P. J., Gould, G. W. et Russell, N. J. 1998. The effect of growth temperature on the phospholipid and fatty acyl compositions of non-proteolytic *Clostridium botulinum*. International journal of food microbiology, vol. 40, no. 3, p. 159-167.

FREDRICKSON, J. K., Li, S. M., Gaidamakova, E. K., Matrosova, V. Y., Zhai, M., Sulloway, H. M., Scholten, J. C., Brown, M. G., Balkwill, D. L. et Daly, M. J. 2008. Protein oxidation: key to bacterial desiccation resistance? The ISME journal, vol. 2, no 4, p. 393-403.

FRUNDZHYAN, V. et Ugarova, N. 2007. Bioluminescent assay of total bacterial contamination of drinking water. Luminescence, vol. 22, no. 3, p. 241-244.

GENEVAUX, P., Georgopoulos, C. et Kelley, W. L. 2007. The Hsp70 chaperone machines of *Escherichia coli*: a paradigm for the repartition of chaperone functions. Molecular microbiology, vol. 66, no. 4, p. 840-857.

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. et Daly, M. J. 2005. How radiation kills cells: survival

of *Deinococcus radiodurans* and *Shewanella oneidensis* under oxidative stress. FEMS microbiology reviews, vol. 29, no. 2, p. 361-375.

GUPTA, R., Bhadauriya, P., Chauhan, V. S. et Bisen, P. S. 2007. Impact of UV-B Radiation on Thylakoid Membrane and Fatty Acid Profile of *Spirulina platensis*. Current Microbiology, vol. 56, no 2, p 156-161.

HORTON, H. R., Moran, L. A., Ochs, R. S., Rawn, J. D. et Scrimgeour, K. G. 2002 Principles of Biochemistry. Upper Saddle River: Prentice Hall.

HUNDLE, B. S., Beyer, P., Kleinig, H., Englert, G. et Hearst, J. E. 1991. Carotenoids of *Erwinia herbicola* and an *Escherichia coli* HB101 strain carrying the *Erwinia herbicola* carotenoid gene cluster. Photochemistry Photobiology, vol. 54, no. 1, p. 89-93.

IMLAY, J. A. 2003. Pathways of oxidative damage. Annual review of microbiology, vol. 57, no. p. 395-418.

INOUE, K. 2004. Carotenoid hydroxylation--P450 finally! Trends in plant science, vol. 9, no. 11, p. 515-517.

JANDA, J. M. et Abbott, S. L. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. Journal of clinical microbiology, vol. 45, no. 9, p. 2761-2764.

KHODAIYAN, F., Razavi, S. H., Emam-Djomeh, Z., Mousavi, S. M. et Hejazi, M. A. 2007. Effect of culture conditions on canthaxanthin production by *Dietzia natronolimnaea* HS-1. Journal of microbiology and biotechnology, vol. 17, no. 2, p. 195-201.

LACROIX, M. 2005 Irradiation of Foods. In *Emerging technologies for food processing*. p.353-386: Elsevier Ltd.

LACROIX, M. et Lafortune, R. 2004. Combined effects of gamma irradiation and modified atmosphere packaging on bacterial resistance in grated carrots (*Daucus carota*). Radiation Physics and Chemistry vol. 71, p. 77-80.

LE-TIEN, C., Lafortune, R., Shareck, F. et Lacroix, M. 2006. DNA analysis of a radiotolerant bacterium *Pantoea agglomerans* by FT-IR spectroscopy. Talanta, vol. 71, p. 1969-1975.

LEVANDUSKI, L. et Jaczynski, J. 2008. Increased resistance of *Escherichia coli* O157:H7 to electron beam following repetitive irradiation at sub-lethal doses. International journal of food microbiology, vol. 121, no. 3, p. 328-334.

LIN, Z. et Rye, H. S. 2006. GroEL-mediated protein folding: making the impossible, possible. Critical reviews in biochemistry and molecular biology, vol. 41, no. 4, p. 211-239.

MAHAPATRA, A. K., Muthukumarappan, K. et Julson, J. L. 2005. Applications of ozone, bacteriocins and irradiation in food processing: a review. Critical reviews in food science and nutrition, vol. 45, no. 6, p. 447-461.

MAHROUR, A., Caillet, S., Nketsa-Tabiri, J. et Lacroix, M. 2003. Microbial and sensory quality of marinated and irradiated chicken. Journal of food protection, vol. 66, no. 11, p. 2156-2159.

MANAS, P. et Pagan, R. 2005. Microbial inactivation by new technologies of food preservation. Journal of applied microbiology, vol. 98, no. 6, p. 1387-1399.

MARCHENKO, N. Y., Marchenkov, V. V., Kaysheva, A. L., Kashparov, I. A., Kotova, N. V., Kaliman, P. A. et Semisotnov, G. V. 2006. Affinity Chromatography of GroEL Chaperonin Based on Denatured Proteins: Role of Electrostatic Interactions in Regulation of GroEL Affinity for Protein Substrates. Biochemistry, vol. 71, no. 12, p. 1357-1364.

MEAD, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M. et Tauxe, R. V. 1999. Food-related illness and death in the United States. Emerging infectious diseases, vol. 5, no. 5, p. 607-625.

NARUMI, I., Satoh, K., Cui, S., Funayama, T., Kitayama, S. et Watanabe, H. 2004. PprA: a novel protein from *Deinococcus radiodurans* that stimulates DNA ligation. Molecular microbiology, vol. 54, no. 1, p. 278-285.

OHAN, M. P. et Dunn, M. G. 2003. Glucose stabilizes collagen sterilized with gamma irradiation. Journal of biomedical materials research, vol. 67, no. 4, p. 1188-1195.

OLIVER, J. D. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. Journal of microbiology (Seoul, Korea), vol. 43, p. 93-100.

PFANZAGL, B., Zenker, A., Pittenauer, E., Allmaier, G., Martinez-Torrecuadrada, J., Schmid, E. R., De Pedro, M. A. et Loffelhardt, W. 1996. Primary structure of cyanelle peptidoglycan of *Cyanophora paradoxa*: a prokaryotic cell wall as part of an organelle envelope. Journal of bacteriology, vol. 178, no. 2, p. 332-339.

PITONZO, B. J., Amy, P. S. et Rudin, M. 1999. Resuscitation of microorganisms after gamma irradiation. Radiation research, vol. 152, no. 1, p. 71-75.

PRESCOTT, L. M., Harley, J. P. et Klein, D. A. 2003 Microbiologie. Bruxelles: De Boeck.

RUPPITSCH, W., Stoger, A., Indra, A., Grif, K., Schabereiter-Gurtner, C., Hirschl, A. et Allerberger, F. 2007. Suitability of partial 16S ribosomal RNA gene sequence analysis for the identification of dangerous bacterial pathogens. Journal of applied microbiology, vol. 102, no. 3, p. 852-859.

SGHAIER, H., Narumi, I., Satoh, K., Ohba, H. et Mitomo, H. 2007. Problems with the current deinococcal hypothesis: an alternative theory. Theory in biosciences = Theorie in den Biowissenschaften, vol. 126, no. 1, p. 43-45.

STAHL, W. et Sies, H. 2003. Antioxidant activity of carotenoids. Molecular aspects of medicine, vol. 24, no. 6, p. 345-351.

SUN, N., Lee, S. et Song, K. B. 2004. Characterization of a carotenoid-hyperproducing yeast mutant isolated by low-dose gamma irradiation. International journal of food microbiology, vol. 94, no. 3, p. 263-267.

VAN GERWEN, S. J., Rombouts, F. M., van't Riet, K. et Zwietering, M. H. 1999. A data analysis of the irradiation parameter D10 for bacteria and spores under various conditions. Journal of food protection, vol. 62, no. 9, p. 1024-1032.

VAN HEIJENOORT, J. 2001. Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. Glycobiology, vol. 11, no. 3, p. 25R-36R.

WADE, J. T., Roa, D. C., Grainger, D. C., Hurd, D., Busby, S. J., Struhl, K. et Nudler, E. 2006. Extensive functional overlap between sigma factors in *Escherichia coli*. Nature structural & molecular biology, vol. 13, no. 9, p. 806-814.

WALTERMANN, M., Stoveken, T. et Steinbuchel, A. 2007. Key enzymes for biosynthesis of neutral lipid storage compounds in prokaryotes: properties, function and occurrence of wax ester synthases/acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferases. Biochimie, vol. 89, no. 2, p. 230-242.

WANG, H., Jiang, X., Mu, H., Liang, X. et Guan, H. 2007. Structure and protective effect of exopolysaccharide from *P. agglomerans* strain KFS-9 against UV radiation. Microbiological Research, vol. 162, p. 124-129.

WELMAN, A. D. et Maddox, I. S. 2003. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. Trends in biotechnology, vol. 21, no. 6, p. 269-274.