

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
CENTRE INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

**ÉTUDE DES MÉCANISMES DE RADIORÉSISTANCE ET
RADIOSENSIBILISATION BACTÉRIENNE LORS DE L'IRRADIATION
GAMMA**

Par

Karine TRUDEAU

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

Jury d'évaluation

Présidente du jury et examinatrice interne	Pr. Marie-Élise Parent INRS Centre INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Pr. Inteaz Alli Université McGill
Directrice de recherche	Pr. Monique Lacroix INRS Centre INRS-Institut Armand-Frappier
Codirecteur de recherche	Pr. François Shareck INRS Centre INRS-Institut Armand-Frappier

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement tous ceux qui m'ont aidée de près ou de loin dans ce travail. Plus particulièrement ma directrice de recherche, Pr. Monique Lacroix, pour d'abord m'avoir accueillie comme stagiaire et ensuite pour avoir cru en moi et m'avoir accepté à la maîtrise. Je tiens à remercier tous les membres du laboratoire. Je tiens à remercier Marie-Christine Groleau, le Pr. Éric Déziel, le Pr. Richard Villemur et mon codirecteur le Pr. François Shareck pour les nombreux conseils. Je tiens à remercier les employés de Nordion International Inc., pour les nombreux tours de manivelle qu'ils ont dû faire pour irradier mes échantillons. Je remercie la Fondation Armand-Frappier pour la bourse Armand-Frappier et également le CRSNG pour le soutien financier. Un merci spécial à Dominique Favreau pour son support et les innombrables conseils prodigués. Finalement, je tiens à remercier toute ma famille pour le support moral et l'encouragement constant.

RÉSUMÉ

Le but de ce projet de maîtrise est d'identifier les phénomènes qui sont responsables de la radiosensibilisation et de la radiorésistance bactérienne afin de pouvoir développer de nouvelles méthodes de conservation et assurer l'innocuité alimentaire. L'hypothèse est que le comportement des bactéries pathogènes alimentaires après irradiation est influencé par plusieurs facteurs génomiques et protéiques. Le premier objectif était d'étudier les variations d'expression de protéines de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* O157:H7 lors de l'irradiation gamma. Les résultats obtenus montrent des changements dans l'expression des protéines totales lors de l'irradiation gamma, et ce, pour des doses de sensibilisation et des doses létales. Le deuxième objectif était d'étudier l'ARN messager de sept gènes codant pour des protéines de choc thermique chez *E. coli* O157:H7 lors de l'irradiation gamma à différents temps post irradiation. En ce qui à trait à la quantification des ARN messagers de *E. coli* O157:H7 à une dose de sensibilisation, il y a une augmentation relative de l'expression de l'ARN messager codant pour les protéines de choc thermique ClpB, HtpG, GroES, GrpE et IbpB, ce qui ne correspond pas à une réponse classique à un choc thermique. À la lumière des résultats obtenus lors de ce projet de maîtrise, il serait pertinent de réaliser comme projet futur des puces à ADN pour *E. coli* O157:H7 avec une extraction d'ARN immédiatement après irradiation.

Mots clés : *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, protéines de choc thermique, électrophorèse capillaire

ABSTRACT

The aim of this project is to study the phenomena responsible for the radiosensitization and radioresistance of bacteria in order to develop new methods of conservation and to ensure food safety. The assumption is that the behaviour of pathogenic bacteria from food irradiation is influenced by several genomic and proteic factors. The first objective was to study changes in proteins of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157: H7 during gamma irradiation. The results show changes in the expression of total protein in the gamma irradiation, for sensitization and lethal doses. The second objective was to study the messenger RNA of seven genes encoding heat shock proteins in *E. coli* O157: H7 during the gamma irradiation at different times post irradiation. With regard to the quantification of messenger RNA of *E. coli* O157: H7 at a sensitization dose, there is a relative increase in the expression of messenger RNA coding for heat shock proteins ClpB, HtpG, GroES, GrpE and IbpB, which does not correspond to a classic response to heat shock. Finally, based on the results of this project, it would be appropriate to carry DNA microarrays for *E. coli* O157: H7 with an RNA extraction immediately after irradiation.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157: H7, heat shock proteins, capillary electrophoresis

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	II
RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	IV
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES TABLEAUX	VI
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SIGLES	VIII
CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE	1
1.1. INTRODUCTION	1
1.1.1. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	2
1.1.2. <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	4
1.1.3. <i>ESCHERICHIA COLI O157:H7</i>	5
1.1.4. IRRADIATION	6
1.1.5. RADIORÉSISTANCE BACTÉRIENNE	9
1.1.6. PROTÉINES DE CHOC THERMIQUE	12
1.1.7. BUT, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	15
1.2. MÉTHODOLOGIE	16
1.3. RÉSULTATS	17
1.4. CONCLUSION	19
CHAPITRE 2	
ARTICLE 1: CAPILLARY ELECTROPHORESIS SEPARATION OF PROTEIN COMPOSITION OF γ -IRRADIATED FOOD PATHOGENS <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> AND <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	20
CHAPITRE 3:	
ARTICLE 2: PROFILE OF EXPRESSED PROTEINS OF γ -IRRADIATED FOODBORNE PATHOGENS <i>ESCHERICHIA COLI O157:H7</i> ANALYSED BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS	43
CHAPITRE 4:	
ARTICLE 3: EVALUATION OF GENE EXPRESSION OF HEAT SHOCK PROTEIN IN γ -IRRADIATED FOODBORNE PATHOGENS <i>ESCHERICHIA COLI O157:H7</i> USING RT-PCR	59
RÉFÉRENCES	73

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Principales protéines de choc thermique..... 13

Tableau 1.2 : Dose d'irradiation des bactéries en phase de croissance stationnaire 16

Article 1:

Table 2.1: Profiles of protein expression by *Listeria monocytogenes* at different doses of γ -irradiation treatment 29

Table 2.2: Profiles of protein expression by *Staphylococcus aureus* at different doses of γ -irradiation treatment 34

Article 2:

Table 3.1: Profiles of protein expression by *E. coli* at different doses of γ -irradiation treatment . 49

Article 3:

Table 4.1: Primers used for q-RT-PCR..... 66

LISTE DES FIGURES

Article 1:

Figure 2.1: 3-D view of absorbance versus time and wavelength (from 190 to 400 nm) for total unirradiated proteins of (A) *L. monocytogenes* and (B) *S. aureus*. Experimental conditions: Bare-fused silica capillary, 30.2 cm (20 cm to the detection window) x 50 μm i.d.; temperature, 25°C; applied voltage, 15 kV; electrokinetic injection at 5.0 kV x 20s. Samples were diluted at 1 mg/ml with SDS sample buffer..... 27

Figure 2.2: SDS-MW Size Standards. All experimental conditions were as in Figure 2.1..... 28

Figure 2.3: Electrophoretic profiles obtained for *L. monocytogenes* with (A) non-irradiated treatment; (B) irradiated at 1.2 kGy to create cells damaged; and (C) irradiated at 3.5 kGy to kill cells..... 30

Article 3:

Figure 4.1: Responses of gene expressions of *E. coli* O157:H7 for the irradiation treatment at a sensitive dose..... 67

Figure 4.2: Amount of bacteria *E. coli* O157:H7 during RNA extraction for the control and after the irradiation treatment at a sensitive dose. 68

Figure 4.3: Responses of gene expressions of *E. coli* O157:H7 for the irradiation treatment at a sensitive dose (0.4 kGy) and lethal dose (1.3 kGy)..... 69

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SIGLES

- ^{60}Co : Cobalt 60
- ^{137}Cs : Césium 137
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- ARN : Acide ribonucléique
- ClpB : *Protein disaggregation chaperone*
- CVNC : Cellules viables, mais non cultivables
- D. radiodurans* : *Deinococcus radiodurans*
- DnaJ : *molecular chaperone DnaJ*
- DnaK : *molecular chaperone DnaK*
- E. coli*: *Escherichia coli*
- F : *forward*
- FDA : *Food and Drug Administration*
- GroEL : *molecular chaperone GroEL*
- GroES : *co-chaperonine GroES*
- GrpE : *heat shock protein GrpE*
- Gy : Gray
- HtpG: *Protein refolding molecular co-chaperone Hsp90*
- HtpX : *Heat shock protein HtpX*
- IbpB : *heat shock chaperone IbpB*
- kDa : kilo Dalton
- L. monocytogenes* : *Listeria monocytogenes*
- Mb : Méga base
- MeV : Méga électronvolt
- pH : Potentiel hydrogène

PTC : Protéines de choc thermique

q-RT-PCR : *Quantitative real-time polymerase chain reaction*

R : reverse

RpoH: *RNA polymerase factor sigma-32*

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

SHU : Syndrome hémolytique et urémique

UFC : Unité formant une colonie

USDA : *United States Departement of Agriculuture*



CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE

1.1. Introduction

Les maladies d'origine alimentaire sont un problème important de santé publique (CDC, 2009). Aux États-Unis, les maladies d'origine alimentaire provoquent environ 76 millions de cas dont 325 000 amènent une hospitalisation et 5000 entraînent un décès (Mead et al., 1999). Selon Santé Canada, il y a de 11 à 13 millions de cas de maladies d'origine alimentaire chaque année. Afin de prévenir les maladies d'origine alimentaire dues à des bactéries, l'irradiation des aliments est utilisée, car il s'agit d'un moyen qui permet d'éradiquer les pathogènes d'origine alimentaire. Souvent considérée comme la pasteurisation à froid, l'irradiation des aliments offre une perte négligeable de nutriments ou de qualités sensorielles dans les aliments et elle n'élève sensiblement pas la température de la nourriture pendant le traitement. L'irradiation des aliments utilise une source d'énergie ionisante qui traverse la nourriture pour détruire les bactéries nocives et d'autres organismes (Wood et al., 2000) sans augmentation de la température des aliments. Dans le cadre de ce projet, les pathogènes suivants ont été étudiés : *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* O157:H7. Ces pathogènes, souvent retrouvés dans les aliments, peuvent résister au traitement d'irradiation. Afin de mieux comprendre leurs mécanismes d'action, les bactéries ont été irradiées à une dose de sensibilisation et une dose létale. En état de stress, les bactéries réagissent en produisant des protéines qui leur permettent de réparer les dommages à l'ADN et à la cellule (Marles-Wright et al., 2007). Plus particulièrement, il y a une augmentation de la synthèse des protéines de choc thermique (PTC) (Kvint et al. 2003) qui feront l'objet d'une étude détaillée ainsi que des gènes codant pour des PTC.

1.1.1. *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes est un petit bacille à Gram positif non sporulé, anaérobie facultatif, catalase positive, oxydase négative et qui produit une β -hémolyse partielle sur une gélose sang. Sa température optimale de croissance se situe entre 30 et 37°C, mais la bactérie peut se multiplier à des températures allant de -0,4 à 50 °C. Elle peut croître dans une gamme de pH allant de 4,5 à 9, lorsque l'activité de l'eau est de 0,92 et en présence de hautes concentrations de NaCl, soit de 10 à 20% (Farber et al., 1991; Le Monnier et al., 2009). C'est une bactérie ubiquitaire présente dans le sol (Welshimer, 1960), l'eau et la végétation en décomposition (Welshimer, 1968; Weis et al., 1975). Cette bactérie a également été trouvée dans l'ensilage, les eaux usées, les déchets d'abattoirs, le lait de vache en santé et de vaches atteintes de mammite et dans les selles humaines et animales (Farber et al., 1991). Elle a aussi été isolée chez les bovins, ovins, caprins et volailles, mais rarement à partir d'animaux sauvages (Gray et al., 1966). Elle contamine de nombreux aliments, comme le lait, les produits laitiers, la viande crue, les produits carnés, les produits de charcuteries prêts à manger, les légumes prêts à manger et les produits de la mer (Pradhan et al., 2011; Allerberger et al., 2009; Le Monnier et al., 2009). La fréquence de contamination ainsi que le niveau de contamination varient en fonction de la catégorie d'aliments.

Environ 5 à 10% de la population canadienne peut être porteuse de *L. monocytogenes* dans les intestins, sans être atteinte par la maladie (Farber et al., 1991). Toutefois, ce microorganisme peut provoquer une toxi-infection alimentaire appelée listériose dont la contamination est essentiellement alimentaire et la période d'incubation peut varier de quelques jours à plusieurs semaines. Les hôtes les plus susceptibles sont les personnes dont le système immunitaire est modifié, altéré ou immature comme les femmes enceintes et l'enfant à naître, les nouveau-nés, les personnes âgées et les sujets immunodéprimés. La listériose chez les adultes, excepté les

femmes enceintes, se caractérise par des septicémies, méningites, méningo-encéphalites, mais peut aussi inclure des endocardites (Le Monnier et al., 2009).

Au Canada, il s'agit d'une maladie à déclaration obligatoire et le taux national de listériose signalé a augmenté au cours des dernières années, passant de 2,3 cas par million d'habitants en 2000 à 7,2 cas par million d'habitants en 2008 (Santé Canada, 2008; Clark et al., 2010). Bien que la morbidité de la listériose soit relativement faible, la mortalité peut être de l'ordre de 20 à 30 % (Santé Canada, 2010). Deux organismes fédéraux américains chargés de la supervision de la sécurité alimentaire aux États-Unis, le ministère de l'agriculture (USDA) et la « Food and Drug administration » (FDA) ont procédé à plusieurs rappels de produits alimentaires. À cet effet, durant la période allant de 2002 à 2006, 32,4% des rappels du USDA et en 2006, 15 % des rappels de la FDA étaient dus à la présence de *L. monocytogenes* (Drevets et al., 2008). Plusieurs éclosions importantes d'origine alimentaire ont été documentées en Amérique du Nord et en Europe. Selon des données épidémiologiques et de laboratoire, ces éclosions ont été attribuées à un mélange de salade de chou contaminé par du fumier non traité (Schlech et al., 1983), à du fromage à pâte molle fait de lait cru et pasteurisé (Linnan et al., 1988; Bula et al., 1995), au pâté de foie (McLauchlin et al., 1991), à la langue de porc en gelée non acidifiée (Jacquet et al., 1995) et à la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) fumée à froid (Ericsson et al., 1997; Miettinen et al., 1999). La probabilité qu'un aliment, contaminé par un faible nombre de bactéries *L. monocytogenes*, cause une maladie est considérée comme très faible. En effet, au Canada, pour certains produits comme les produits laitiers, les viandes et les poissons des concentrations inférieures ou égales à 100 UFC/g à la fin de la durée de conservation prévue sont acceptées. Cependant, pour certains produits, tels que les aliments pour nourrissons et enfants en bas âge, une politique de tolérance zéro est appliquée (Santé Canada, 2004).

1.1.2. *Staphylococcus aureus*

Les membres du genre *Staphylococcus* font partie de la famille des *Staphylococcaceae* (Kloos, 1980). Ces cocci à Gram positif mesurant entre 0,5 et 1,5 μm de diamètre se présentent sous forme d'amas irréguliers semblables à des grappes de raisin. Ils sont non mobiles, ne forment pas de spores et sont anaérobies facultatifs. Le genre *Staphylococcus* comprend 37 espèces dont *Staphylococcus aureus* qui est de loin l'espèce la plus pathogène. Le génome de *S. aureus* est constitué d'un unique chromosome de 2,8 Mb contenant approximativement 2 500 gènes (Kloos, 1980). Les staphylocoques sont largement répandus dans la nature, mais ils colonisent majoritairement la peau et les muqueuses des mammifères et des oiseaux. *S. aureus* est une espèce importante retrouvée chez les primates. Certains écovars ou biotypes peuvent cependant être retrouvés chez différents animaux domestiques ou oiseaux (Kloos, 1980; Devriese, 1984).

Tout comme *L. monocytogenes*, *S. aureus* infecte de façon permanente ou transitoire seulement de 30 à 50% de la population, mais les raisons qui expliquent cette différence ne sont pas connues (Le Loir et al., 2003). *S. aureus* cause des empoisonnements alimentaires en produisant différentes entérotoxines. Plus d'une quinzaine d'entérotoxines staphylococciques ont été identifiées, mais seulement trois sont reconnues pour causer des atteintes gastro-intestinales (Su et al., 1995; McLauchlin et al., 2000; Omoe et al., 2002). Les aliments les plus susceptibles d'être contaminés par *S. aureus* sont les plats cuisinés contenant de la viande, la volaille, les poissons et fruits de mer, les charcuteries, les pâtisseries à la crème, la mayonnaise, la crème glacée, les aliments d'origine non animale ou mixte (riz cuisiné, salades de riz, de légumes, autres salades composées), les aliments à teneur en eau réduite (poisson séché et fumé, lait en poudre, pâtes), le lait et produits laitiers (fromages frais et fromages affinés au lait pasteurisé ou au lait cru) (Le Loir et al., 2003).

Les symptômes, nausées, douleurs abdominales et surtout vomissements violents et répétés souvent accompagnés de diarrhée, apparaissent brutalement. Des complications comme la déshydratation, prostration, hypotension peuvent survenir en fonction de la dose ingérée et de la sensibilité individuelle. Le rétablissement se fait dans les 24 à 48 h et la mortalité est exceptionnelle (Le Loir et al., 2003).

1.1.3. *Escherichia coli* O157:H7

Escherichia coli entérohémorragique O157:H7 est un bacille à Gram négatif, mobile et produisant deux types de toxines (vérotoxine, toxine de *shiga*) (Lim et al., 2010). La première épidémie répertoriée causée par *E. coli* O157:H7 est survenue dans l'Oregon et le Michigan aux États-Unis en 1982. La bactérie a été isolée de personnes qui ont développé une diarrhée sanglante et de graves crampes abdominales après avoir mangé des hamburgers dans une chaîne de restaurants (Pennington, 2010). *E. coli* O157:H7 est infectieuse à faible concentration. En effet, l'ingestion d'une seule bactérie peut engendrer une infection. Elle peut être transmise de différentes façons : par transmission d'une personne à l'autre, par les aliments contaminés, par transmission par voie fécale ou orale. Une grande variété d'aliments peuvent être contaminés par *E. coli* O157:H7 : le bœuf haché ou coupé cru et non suffisamment cuit, le cidre et les jus de pommes non pasteurisés, le lait et les produits laitiers non pasteurisés, les fruits et légumes crus contaminés et non cuits et l'eau non traitée (Ferens et al., 2011). Les symptômes d'une infection à *E. coli*, couramment appelée maladie du hamburger, se manifestent en quelques heures et peuvent durer jusqu'à dix jours après l'ingestion de la bactérie. Ce pathogène alimentaire provoque des infections intestinales comme la colite hémorragique. La bactérie peut également produire une toxine de Shiga dans l'intestin. Cette

toxine peut agir sur les cellules sensibles des reins, du cerveau et d'autres organes et provoquer le syndrome hémolytique et urémique (SHU) (Ferens et al., 2011). Les symptômes du SHU sont l'anémie hémolytique, insuffisance rénale aiguë et une thrombopénie (Banatvala et al., 2001).

1.1.4. Irradiation

Il existe plusieurs méthodes permettant une bonne conservation des aliments, comme l'appertisation, l'atmosphère modifiée, la congélation et l'irradiation. Chaque méthode possède son intérêt et sa spécificité. L'irradiation a pour but d'éliminer les bactéries pathogènes et de réduire le nombre de bactéries d'altération, afin de rendre l'aliment salubre. Le traitement vise à contrôler les pathogènes microbiens tels que *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia spp*, etc. Le traitement réduit aussi le nombre des formes végétatives de *Bacillus cereus* et *Clostridium perfringens*, inactive tous les insectes, avec l'avantage de prolonger en même temps la durée de conservation de la viande refroidie et réfrigérée, retardant ainsi l'apparition d'une altération perceptible et identifiable en réduisant le niveau de micro-organismes communs, non pathogènes responsables de la détérioration de la viande. Cette technique qui a été appliquée pour le traitement des aliments la première fois au cours de la seconde guerre mondiale peut se faire avec du cobalt 60 (^{60}Co), du césium 137 (^{137}Cs), des rayons X provenant d'un appareil radiogène d'au plus cinq méga électronvolts (MeV) ou à accélérateurs d'électrons provenant d'un appareil radiogène d'au plus 5 MeV. Le rayonnement est une énergie qui se déplace dans l'espace, tout comme la lumière et la chaleur du soleil (Santé Canada, 2002).

Les rayons gamma et les rayons X, ainsi que les ondes radio, les micro-ondes, les rayons ultraviolets et le rayonnement visible, sont des rayonnements électromagnétiques se situant sur

la partie du spectre caractérisée par de courtes longueurs d'onde et de hautes énergies. Leurs effets sur les matières sont similaires et ils se différencient principalement par leur origine. Les rayons X, dont l'énergie est variable, sont émis par des machines. Les rayons gamma, dont l'énergie est spécifique, résultent de la désintégration spontanée de radio nucléides, provenant du ^{60}Co . Le ^{60}Co perd 10% de son énergie par an, sa demi-vie est de 5 ans et il se transforme en nickel après une période de 10 ans.

Seules certaines sources de rayonnement peuvent être utilisées pour l'irradiation des aliments. Il s'agit du ^{60}Co , du ^{137}Cs , des générateurs d'électrons, des rayons X ayant une énergie maximale de 5 MeV et des accélérateurs d'électrons ayant une énergie maximale de 10 MeV. Les énergies de ces sources de rayonnement sont trop faibles pour rendre radioactive la matière. La source de rayonnement la plus utilisée pour l'irradiation des aliments est le ^{60}Co qui produit des rayonnements électromagnétiques qui possèdent une énergie beaucoup plus élevée que celle de la lumière. Il est créé par bombardement neutronique de cobalt 59 dans un réacteur nucléaire, puis est placé dans une double enveloppe scellée avec du plomb pour prévenir tout risque de fuite lors de son utilisation dans l'installation d'irradiation. Le ^{137}Cs est le seul autre radio nucléotide émetteur gamma qui convient pour le traitement industriel. Il est obtenu par le retraitement des éléments combustibles épuisés et a une demi-vie de 30 ans. Le césium est un sel alors que le cobalt est un métal. Les accélérateurs d'électrons sont aussi d'autres sources de rayonnement utilisées pour irradier des aliments. Comme les électrons ont une masse, ils pénètrent moins bien dans la matière et agissent sur des petites surfaces. Les rayonnements produits par le ^{60}Co sont des rayonnements électromagnétiques n'ayant ni masse ni charge qui peuvent pénétrer dans le ciment. Ces rayonnements sont dits ionisants puisqu'ils possèdent une énergie suffisante pour arracher des électrons aux atomes et aux molécules qui sont alors transformés en particules chargées électriquement, appelées ions.

Grâce aux rayons ionisants produits par les irradiateurs, cette technologie est utilisée sur des aliments conditionnés et déjà emballés afin de diminuer le nombre de bactéries, d'améliorer la salubrité de l'aliment, d'augmenter sa durée de vie et d'éliminer les insectes qu'ils peuvent contenir. L'avantage de l'irradiation est que les rayons pénètrent directement au cœur de l'aliment, contrairement aux pesticides et aux gaz qui eux agissent en surface. Le traitement s'effectue à froid, ce qui permet de conserver la valeur nutritive et les propriétés physico-chimiques des aliments. Avec une telle méthode, l'utilisation des additifs alimentaires tels les nitrites et les nitrates peut être diminuée et même éliminée. Aux États-Unis, l'irradiation est de plus en plus utilisée et remplace peu à peu la fumigation pour le traitement des épices, des fruits et des légumes. Au Canada, l'irradiation est autorisée pour les pommes de terre depuis les années 60, les oignons, le blé, la farine, la farine de blé entier, les épices entières ou moulues et les assaisonnements déshydratés pour inhiber la germination des pommes de terre, des oignons et de l'ail, pour prévenir l'infestation d'insectes dans la farine et pour réduire la charge microbienne des épices et des assaisonnements (Santé Canada, 2002).

L'irradiation des aliments utilise une source d'énergie ionisante qui traverse la nourriture pour détruire les bactéries nocives et d'autres organismes (Wood et al., 2000) et ce, sans augmentation de la température des aliments. À ce jour, il n'est pas connu comment le rayonnement provoque la mort des bactéries, mais les dommages à l'ADN sont impliqués dans de nombreuses théories. Les rayons agissent au niveau de l'ADN des parasites et les micro-organismes en provoquant des gonflements et des fissures le long de la chaîne. Les dommages à l'ADN sont si importants que les molécules ne peuvent être réparées ce qui provoque une impossibilité de reproduction des organismes touchés et la mort (Santé Canada, 2002; Cox et al., 2005). Dans ce modèle classique de la toxicité de rayonnement, l'ADN est la molécule qui est la plus touchée par les radiations ionisantes. Toutefois, les données récentes montrent que

la survie des bactéries serait davantage reliée à la quantité de dommages causés aux protéines lors de l'irradiation qu'à la quantité de dommages à l'ADN (Daly, 2009).

1.1.5. Radiorésistance bactérienne

La radiorésistance est la tolérance aux rayonnements ionisants. Cette tolérance pourrait être un vestige des mécanismes de réparation de l'ADN qui étaient présents dans les espèces ancestrales et qui ont été conservés dans les espèces résistantes aux rayonnements ionisants qui continuent d'exiger ce phénotype. Il est aussi possible que ce phénotype soit apparu dans des espèces non apparentées par le transfert horizontal de gènes, ou par l'évolution convergente (Cox et al., 2005). *Deinococcus radiodurans*, une bactérie non sporulante (Battista, 2000) est l'espèce radiorésistante la plus étudiée (Gutman et al., 1993). Il est connu que sa résistance extrême est rendue possible par le biais de la réparation de l'ADN extraordinairement efficace (Kitayama, 1971; Moseley 1983; Grimsley et al., 1991). Par exemple, *D. radiodurans* peut réparer au moins 150 cassures doubles brins par chromosome sans létalité ou de mutagenèse dans les quelques heures suivant l'irradiation (Kitayama, 1971; Moseley, 1983) alors que la plupart des autres organismes peuvent réparer au plus deux ou trois doubles cassures (Krasin et al., 1977; Hutchinson, 1978).

Dans la discussion qui suit sur les mécanismes de réparation d'ADN, les exemples concernent les différentes espèces de *Deinococcus* qui ont une capacité extraordinaire à reconstituer leur génome. Dans le milieu des années 1960, la mort par lésion de l'ADN est devenue le paradigme dominant de la toxicité des rayonnements (Hutchinson, 1966). Les cassures double brins de

l'ADN semblent être les dégâts les plus mortels, car le destin d'une cellule irradiée dépend finalement de la préservation de son génome (Cox et al., 2005).

Une contribution passive à la radiorésistance est le nombre de copie du génome. Tout d'abord, le nombre de copie du génome améliore la résistance à des rayonnements ionisants (Burrell et al., 1971; Mortimer et al., 1991). Lorsque plusieurs génomes sont présents, il existe des exemplaires supplémentaires de loci cruciaux qui améliorent les chances de survie de la cellule irradiée. La redondance de l'information génétique peut aussi fonctionner comme une réserve qui peut être utilisée pour réparer des segments d'ADN qui sont endommagés ou dégradés au-delà de la réparation (Cox et al., 2005).

L'organisation du nucléoïde participe aussi passivement à la radiorésistance. Il est suggéré que le nucléoïde de *D. radiodurans* en phase stationnaire est disposé en anneaux très structurés (Levin-Zaidman et al., 2003) qui ne sont pas altérés par de fortes doses d'irradiation (Zimmerman et al., 2005) ce qui contribue passivement à la radiorésistance.

Une autre contribution passive à radiorésistance dans *D. radiodurans* est la régulation des réponses cellulaires aux dégâts d'irradiation, plus précisément, la cessation rapide de la réplication de l'ADN pourrait jouer un rôle (Cox et al., 2005).

La protection des extrémités d'ADN chez *D. radiodurans* est un autre mécanisme contribuant à la radiorésistance. En effet, lors de l'irradiation de *D. radiodurans*, la protéine DdrA se lie à l'extrémité 3' de l'ADN simple brin *in vitro* et protège l'ADN de la dégradation nucléolytique (Harris et al., 2004). Aussi, lorsque des coupures double brins se produisent, la protéine DdrA et peut-être d'autres protéines, se lie à l'extrémité exposée de l'ADN pour empêcher la digestion par les nucléases de l'ADN chromosomique. Ce mécanisme pourrait prévenir des dommages à l'ADN génomique comme lors de la dessiccation. La récupération des cellules après la dessiccation et peut-être après l'irradiation dans un environnement qui manque de nutriments ne permettrait pas de réparer l'ADN endommagé, car la réparation de l'ADN utilise beaucoup

d'énergie métabolique. Au fur et à mesure que les coupures de l'ADN se produisent, des nucléases pourraient dégrader l'ADN génomique. En protégeant les extrémités d'ADN cassées, les cellules pourraient conserver l'ADN génomique jusqu'à ce que les conditions deviennent favorables à la croissance cellulaire et à la réparation de l'ADN.

Le dernier élément participant à la radiorésistance présenté est la réparation des bris double brins de l'ADN par la protéine Rec-A. Le rayonnement ionisant conduit à la formation de radicaux libres hautement réactifs comme les radicaux hydroxyles et provoque une variété de dommages, comme des cassures d'ADN simple et double brin et des modifications de base. La protéine Rec-A permet la survie de *D. radiodurans* en réparant les nombreux bris à l'ADN. Par exemple, chez *D. radiodurans*, une dose de 5000 Gy introduit environ 200 bris d'ADN double brin par génome (Cox et al., 2005) et la protéine Rec-A participe à la réparation de l'ADN et ainsi la survie de la bactérie. En comparaison seulement quelques cassures d'ADN double brin peuvent tuer une cellule de *E. coli* (Krasin et al., 1977).

Tous les mécanismes présentés précédemment mettent en opposition une nouvelle théorie selon laquelle les protéines seraient le principal déterminant de la radiorésistance (Daly, 2009). Brièvement, les arguments avancés par l'équipe de recherche est que la radiorésistance bactérienne peut être corrélée à l'oxydation des protéines et que les ions manganèse protègent les protéines, mais pas l'ADN lors de l'irradiation gamma (Daly, 2009). Bien entendu, la radiorésistance pourrait provenir d'une combinaison entre la réparation des dommages fait à l'ADN et des réparations des protéines endommagées lors de l'irradiation gamma.

1.1.6. Protéines de choc thermique

De par leur habitat naturel, les bactéries sont constamment exposées à des fluctuations dans leur condition de croissance. Ainsi, les bactéries ont développé des réponses sophistiquées qui sont modulées entre autres par le remodelage des complexes protéiques, la phosphorylation, la déphosphorylation et la méthylation afin de s'adapter et survivre à différentes contraintes (Marles-Wright et al., 2007). Ces contraintes comprennent, le choc thermique, le choc au froid, le manque de nutriments, les antibiotiques, les métaux lourds, le rayonnement ultraviolet, le rayonnement gamma, les alcools, les acides (Park et al. 2000). Parmi ces stress, un des plus étudiés est le choc thermique et l'étude de la réponse au choc thermique chez *E. coli* a permis d'identifier plusieurs protéines associées avec la réponse physiologique au stress. Notamment, parmi ces protéines, les protéines de choc thermique sont les premiers chaperons moléculaires à avoir été découverts. Il y a plusieurs familles de protéines chaperons, dont les modes d'action sont très variés. Chez les procaryotes comme *E. coli*, l'expression de ces protéines est induite dans des conditions de stress comme une exposition à de hautes températures. C'est donc pour cette raison que le terme historique de protéine de choc thermique (PCT) ou plus couramment dans la littérature « Heat Shock Protein » a d'abord désigné les protéines chaperons. Leur rôle chez les eucaryotes et les procaryotes est la protection, le maintien et la régulation des fonctions des protéines auxquelles elles sont associées. Plus précisément, ces protéines jouent un rôle dans le repliement des protéines, l'assemblage, la réparation et la prévention d'agrégation, et ce, autant lors d'un stress qu'en condition sans stress. Aussi, les PTC agissent avec les protéases afin de maintenir le contrôle de la qualité des protéines cellulaires (Gottesman et al., 1997).

Les PCT sont classées en différentes familles selon leur poids moléculaire. Le tableau 1.1 décrit les principales protéines de choc thermique.

Tableau 1.1 : Principales protéines de choc thermique

Poids moléculaire approximatif	Nom de la protéine	Fonction
10 kDa	GroES	Co-facteur de GroEL
20-30 kDa	GrpE	Co-facteur de DnaK
40 kDa	DnaJ	Co-facteur de DnaK
60 kDa	GroEL	Impliqué dans le repliement des protéines
70 kDa	DnaK	Protéine de repliement et dépliage, confère la thermotolérance à la cellule lorsqu'elle est exposée à un stress thermique.
90 kDa	HtpG	Participe à l'entretien des récepteurs stéroïdiens et des facteurs de transcription
100 kDa	ClpB, ClpA, ClpX	Confère une tolérance aux températures extrêmes

Dans une étude précédente du laboratoire du professeure Monique Lacroix, il a été démontré par immunobuvardage de type Western que le traitement à différentes doses d'irradiation de *E. coli* O157 :H7 induisait l'expression des protéines de choc thermique GroEL, GroES et DnaK (Caillet et al., 2008). D'abord, les différentes doses utilisées ont été définies lors de tests préliminaires dans le laboratoire du professeur Lacroix (Caillet et al., 2006). La dose létale d'irradiation pour inactiver et tuer *E. coli* O157 :H7 est de 1,3 kGy. La dose de sensibilisation est définie comme étant le quart de la dose létale, soit 0,4 kGy, et permet de créer des dommages à

la bactérie sans causer la mort. La troisième dose, soit 1,1 kGy, est la dose qui permet aux bactéries d'entrer dans un stade de cellules viables, mais non cultivables (CVNC). Ainsi, la concentration de la protéine GroEL a augmenté de 4,52, de 5,73 et de 4,94 fois, à des doses d'irradiation de 0,4 kGy, 1,1 kGy et 1,3 kGy respectivement, comparativement au témoin sans traitement d'irradiation. Dans le cas de GroES, cette protéine a été exprimée très faiblement dans les cellules contrôles et dans les échantillons irradiés à 0,4 kGy de la bactérie *E. coli* O157:H7. Cependant, à des doses plus élevées de rayonnement (1,3 kGy), la concentration de GroES était 5 fois plus élevée que celle du contrôle. La concentration de protéine DnaK a également augmenté de manière significative de 5,92, 5,77 et 5,0 fois à des doses d'irradiation de 0,4 kGy, 1,1 kGy et 1,3 kGy respectivement, par rapport à celle du contrôle. L'étude a donc confirmé que les traitements d'irradiation ont eu un effet significatif sur le niveau d'expression des PCT.

Bien que le rôle de chacune des protéines de choc thermique soit bien connu, leur implication lors des traitements à l'irradiation gamma dans les pathogènes d'origine alimentaire n'a pas encore été démontrée. Comme il existe une grande variété de PCT, seulement quelques-unes ont été sélectionnées pour le projet de recherche soit, DnaK, GroES, GrpE, HtpG, HtpX, IbpB et ClpB. D'abord, il y a DnaK, une PTC d'un poids moléculaire approximatif de 70 kDa. Ce chaperon moléculaire aide à plier les chaînes polypeptidiques naissantes et contribue au repliement des protéines mal repliées (Goloubinoff et al., 1999; Acebron et al., 2009). Ensuite, il y a la protéine GroES, co-chaperon du chaperon GroEL. Ce co-chaperon de seulement 10 kDa se lie à une ou deux extrémités du double baril GroEL. La protéine de choc thermique GrpE est le facteur d'échange nucléotidique de l'adénine DnaK et a un poids moléculaire de 21,7 kDa. Le chaperon moléculaire HtpG est une protéine de choc thermique de 90 kDa. La PTC HtpX est une métalloprotéase. La PTC de 16 kDa, IbpB, a aussi été sélectionnée. Ce chaperon moléculaire est responsable du renouvellement des protéines et ce, avec l'aide du chaperon

IbpA. Finalement, le chaperon de 100 kDa, ClpB, est responsable de la désagrégation des protéines (Zolkiewski, 2006).

1.1.7. But, hypothèse et objectifs

Comme les changements moléculaires des bactéries pathogènes alimentaires irradiées ne sont pas connus à ce jour, le but de ce projet de maîtrise est d'étudier les phénomènes responsables de la radiosensibilisation et de la radiorésistance bactérienne afin de pouvoir ultimement développer de nouvelles méthodes de conservation et assurer l'innocuité alimentaire.

L'hypothèse de ce projet de maîtrise est que le comportement des bactéries pathogènes alimentaires après irradiation est influencé par plusieurs facteurs génomiques et protéiques dont l'expression de protéines de choc thermique.

Le premier objectif est d'étudier les variations d'expression protéique de *Listeria monocytogenes*, de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* O157:H7 lors de l'irradiation gamma à différentes doses.

Le deuxième objectif est d'étudier l'ARN messager de gènes codant pour des protéines de choc thermique chez *Escherichia coli* O157:H7 lors de l'irradiation gamma à différentes doses et à différent temps post irradiation.

1.2. Méthodologie

- Les variations d'expression protéique de *L. monocytogenes*, de *S. aureus* et *E. coli* O157:H7 lors de l'irradiation gamma ont été calculées à l'aide de l'électrophorèse capillaire.
- La quantification de l'ARN messager d' *E. coli* O157:H7 a été réalisée par q-RT-PCR et calculée selon la méthode de Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Livak et al., 2001).

Les échantillons ont été irradiés aux doses décrites dans le tableau 1.2.

Tableau 1.2 : Dose d'irradiation des bactéries en phase de croissance stationnaire

Bactérie	Dose d'irradiation (kGy)		
	Dose de sensibilisation	Dose d'entrée en CVNC	Dose létale
<i>L. monocytogenes</i>	1.20	-	3.50
<i>S. aureus</i>	1.20	2.90	3.50
<i>E. coli</i> O157 :H7	0.40	1.10	1.30

1.3. Résultats

Dans le premier article, nous avons investigué l'expression des protéines de *L. monocytogenes* et de *S. aureus* lors de l'irradiation gamma. Les résultats obtenus en électrophorèse capillaire pour ces pathogènes alimentaires montrent des changements dans l'expression des protéines totales, et ce pour les doses de sensibilisation et les doses létales. Chez *L. monocytogenes*, le niveau d'expression de trois protéines avec un poids moléculaire unique de 57,6, 64,5 et 69,7 kDa n'a pas été modifié significativement ($p \geq 0,05$) à différentes doses d'irradiation. Par ailleurs, l'expression de deux protéines (70,2 et 85,4 kDa) a été modifiée de façon significative ($p < 0,05$) et ce, à différentes doses d'irradiation.

Chez *S. aureus*, le niveau d'expression de quatre protéines uniques de 15,2 kDa, 69,2, 72,4 et 84,1 n'a pas été significativement modifié ($p \geq 0,05$) à différentes doses d'irradiation. Cependant, l'expression d'une protéine avec un poids moléculaire de 16,3 kDa, la protéine ribosomique 50S, a diminuée de façon significative ($p < 0,05$) à une dose d'irradiation de sensibilisation. L'expression d'une autre protéine avec un poids moléculaire de 17,7 kDa, le régulateur transcriptionnel CtsR, a augmenté de manière significative ($p < 0,05$) quelque soit la dose d'irradiation utilisée.

Dans le deuxième article, nous avons encore investigué le rôle des protéines totales lors de l'irradiation gamma, dans *E. coli* O157 :H7. En ce qui a trait à ce pathogène, il y a une seule protéine identifiée, la protéine B d'absorption du bactériophage N4 d'un poids moléculaire de 85,2 kDa dont le niveau d'expression n'a pas significativement changé ($p \geq 0,05$) à une dose d'irradiation de sensibilisation et à une dose létale. Cette protéine pourrait être une protéine essentielle pour la survie de *E. coli* au cours de l'irradiation gamma. Par ailleurs, sept protéines ont été identifiées soit : la rhamnulokinase, la glycérol kinase, la protéine hypothétique Z2695, la sous-unité SecD de la translocase, les sous-unités gamma et tau de l'ADN polymérase III, la

protéine Bet de transport de choline et la protéine d'assemblage de primosome, PriA avec les poids moléculaires de 54,0, 56,8, 60,7, 66,5, 71,0, 75,7 et 81,5 kDa respectivement. Le niveau d'expression de ces protéines a significativement changé ($p < 0,05$) à différentes doses d'irradiation. Cette étude a permis d'identifier des protéines qui pourraient jouer un rôle dans la survie des bactéries lors de l'irradiation gamma et il serait donc pertinent de faire d'autres études, tel que la production de clones, des gels d'électrophorèse bidimensionnels et l'identification par spectrométrie de masse de ces protéines.

Dans les deux premiers articles, il faut noter qu'autant les protéines dont l'expression a changé que celles dont l'expression n'a pas changé pourraient avoir un rôle dans la survie des bactéries lors de l'irradiation gamma. En effet, une protéine dont l'expression n'a pas été modifiée lors des traitements pourrait s'avérer essentielle à la survie de la bactérie par son expression constitutive. De plus, une diminution de l'expression d'une protéine lors du traitement à une dose létale peut montrer que la bactérie ne peut plus survivre puisque la protéine est moins exprimée alors qu'une protéine plus exprimée lors d'un traitement à une dose de sensibilisation peut indiquer que cette protéine est essentielle à la survie de la bactérie.

Finalement, dans le troisième article, nous avons quantifié les ARN messagers codant pour des protéines de choc thermique de *E. coli* O157:H7 à une dose de sensibilisation et une dose létale. Il a été observé qu'immédiatement après un traitement à l'irradiation, il y a une augmentation relative de l'expression de l'ARN messenger codant pour les protéines de stress ClpB, HtpG, GroES, GrpE et IbpB alors qu'il y a une diminution de l'expression des gènes codant pour les protéines HtpX et DnaK. Pour ce qui est des extractions d'ARN à différents temps post-irradiation, il y a une diminution de l'expression des gènes dans le temps.

1.4. Conclusion

Les résultats obtenus permettent de tirer plusieurs conclusions quant à la radio-résistance bactérienne. En ce qui a trait à l'étude des protéines chez des pathogènes alimentaires, il a été possible d'identifier des protéines qui sont exprimées chez les pathogènes et ce, autant à une dose d'irradiation nulle, de sensibilisation ou une dose létale. Afin de vérifier si les protéines identifiées jouent un rôle dans la radio-résistance bactérienne, il serait intéressant de créer des souches de bactéries ayant des mutations pour ces gènes. De plus, comme l'identification des protéines est basée uniquement sur le poids moléculaire, il faudrait confirmer l'identité de ces protéines par électrophorèse bidimensionnelle et spectrométrie de masse lors d'un projet futur. Il est d'autant plus important de faire des analyses par électrophorèse bidimensionnelle, car il y avait une limitation due à la résolution de l'électrophorèse capillaire.

En ce qui a trait aux études des gènes codant pour des protéines de choc thermique, une des conclusions que nous pouvons en tirer est que l'expression de ces gènes ne correspond pas à une réponse classique à un choc thermique. En effet, lors d'un choc thermique chez *E. coli* O157:H7, toutes les protéines de choc thermique étudiées sont immédiatement exprimées après le choc thermique (Carruthers et al., 2009). Finalement, comme les changements de l'expression des gènes surviennent majoritairement immédiatement après irradiation, lors d'un prochain projet de recherche, il serait pertinent de faire des puces à ADN avec des extractions d'ARN zéro minute post-irradiation à une dose de sensibilisation et à une dose létale.

CHAPITRE 2

ARTICLE 1: CAPILLARY ELECTROPHORESIS SEPARATION OF PROTEIN COMPOSITION OF γ -IRRADIATED FOOD PATHOGENS *LISTERIA MONOCYTOGENES* AND *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Séparation par électrophorèse capillaire des protéines des pathogènes d'origine alimentaire
Listeria monocytogenes et *Staphylococcus aureus* irradiés aux rayons gamma

Karine Trudeau¹, Khanh Dang Vu¹, François Shareck², Monique Lacroix¹

¹ INRS-Institut Armand-Frappier, Laboratoire de recherche en sciences appliquées à l'alimentation, 531 boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7

² INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7

Contribution des auteurs

Karine Trudeau a réalisé les manipulations et la rédaction de l'article.

Khanh Dang Vu a participé activement à la discussion et à la correction de l'article.

François Shareck : co-directeur de recherche, élaboration des méthodes de recherche.

Monique Lacroix : directrice de recherche, responsable scientifique et coordonatrice du projet de recherche, a participé à la planification des expériences et à la correction de l'article.

L'article a été soumis dans le journal PLoS ONE le 28 juillet 2011.

Résumé

Une méthode d'électrophorèse capillaire avec détection UV a été développée pour analyser la composition en protéines de deux pathogènes d'origine alimentaire, *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*, qui ont été traités à différentes doses d'irradiation. Les échantillons bactériens contenant 10^9 UFC/ml obtenu après deux incubations de 24 h à 37°C, ont été irradiés aux rayons gamma à des doses de 1,2 kGy, 3,5 et 2,9 kGy respectivement pour produire des cellules endommagées, pour tuer les cellules et, seulement pour *S. aureus*, pour provoquer de cellules viables, mais non cultivables. Chez *Listeria monocytogenes*, le niveau d'expression de trois protéines avec un poids moléculaire unique de 57,6, 64,5 et 69,7 kDa et n'a pas été significativement modifié ($p \geq 0,05$) aux différentes doses d'irradiation. Par ailleurs, l'expression de deux protéines (70,2 et 85,4 kDa) a été modifiée de façon significative ($p < 0,05$) et ce, aux différentes doses d'irradiation. Chez *Staphylococcus aureus*, le niveau d'expression de quatre protéines uniques de 15,2 kDa, 69,2, 72,4 et 84,1 n'a pas été significativement modifié ($p \geq 0,05$) à différentes doses d'irradiation. Cependant, l'expression d'une protéine avec un poids moléculaire de 16,3 kDa, la protéine ribosomique 50S, a diminuée de façon significative ($p < 0,05$) lors d'un traitement d'irradiation à une dose de sensibilisation. L'expression d'une autre protéine avec un poids moléculaire de 17,7 kDa, le régulateur transcriptionnel CtsR, a augmenté de manière significative quelque soit la dose d'irradiation effectuée. Des protéines qui pourraient jouer un rôle dans la survie des bactéries lors de l'irradiation gamma ont été identifiées et d'autres études sur ces protéines devront être réalisées. Une meilleure compréhension des changements moléculaires permettra d'utiliser plus efficacement le traitement par irradiation et de combiner l'irradiation à d'autres traitements adéquats comme l'emballage sous atmosphère modifiée et l'emploi d'huiles essentielles.

Abstract

A capillary electrophoresis method with UV detection was developed to analyse protein composition of two foodborne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* which were treated at different irradiation doses. Bacterial samples containing 10^9 CFU ml⁻¹, obtained after two incubations of 24 h at 37°C, were gamma irradiated at doses of 1.2, 3.5 and 2.9 kGy to respectively produce damage cells, to kill cells and, only for *S. aureus*, to provoke viable but non culturable cells (VBNC). In *Listeria monocytogenes*, the expression level of three unique proteins with molecular weight (MW) of 57.6, 64.5 and 69.7 kDa were not significantly changed at different irradiation doses of treatment. Moreover, two proteins (MW of 70.2 and 85.4 kDa) were changed significantly ($p < 0.05$) at different irradiation dose of treatment. In *Staphylococcus aureus*, the expression level of four unique proteins of 15.2, 69.2, 72.4 and 84.1 kDa was not significantly changed ($p \geq 0.05$) at different irradiation doses of treatment. However, one protein (50S ribosomal protein) with the MW of 16.3 kDa was decreased significantly ($p < 0.05$) in its expression at 1.2 kGy and the other protein (transcriptional regulator CtsR) with the MW of 17.7 kDa was increased significantly ($p < 0.05$) at all irradiated treatment compared to that of the control. We have now identified proteins that could have a role in the survival of bacteria in the gamma irradiation and we want to study further these proteins. In trying to understand the molecular changes that occur in the irradiation, we want to use more efficiently irradiation treatment and combine irradiation to other treatments such as modified atmosphere packaging or essential oil.

Keywords. Capillary electrophoresis, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, protein composition, gamma irradiation

Introduction

According to the Center for Disease Control and Prevention (CDC), food-borne illness is one of the most important health issues in the United States (CDC, 2009). Foodborne diseases cause approximately 76 million illnesses, 325000 hospitalizations, and 5000 deaths in the United States each year (Mead et al., 1999). According to the Canada public health experts, there are from 11 to 13 million cases of food-related illness each year. *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* are two predominant foodborne pathogens. *L. monocytogenes* is the causative agent of listeriosis, a severe disease with high hospitalization and case fatality rates. *L. monocytogenes* can survive and grow over a wide range of environmental conditions such as refrigeration temperatures, low pH and high salt concentration. This allows the pathogen to overcome food preservation and safety barriers, and pose a potential risk to human health (Gandhi et al., 2007). *S. aureus* is a major cause of gastroenteritis due to consumption of contaminated food and it is an accumulation of staphylococcal enterotoxins that cause staphylococcal food poisoning (Le Loir et al., 2003). In order to prevent foodborne illness caused by harmful microorganisms, food irradiation is one of the most effective processes to eliminate foodborne pathogens. Often referred as a cold pasteurization treatment, food irradiation does not cause significant loss of nutrients and sensory qualities in food. Food irradiation utilizes a source of ionizing radiation that passes through food and destroy harmful bacteria as well as other organisms without increasing food temperature (Wood et al., 2000). To date, it is still not clearly confirmed how radiation causes bacterial death, but many theories implied DNA and/or protein damage. The ionizing radiation acts on DNA of parasites and micro-organisms by causing swellings and breakings along the chain. The damage in DNA is large, making it difficult or impossible to be repaired, to be reproducible and therefore, finally causing the death of irradiated microorganisms (Cox et al., 2005). In the classical model of radiation toxicity, DNA is the molecule which is the most affected by ionizing radiation. However, recent data show that

the survival of bacteria after irradiation would be more related to the amount of damage to proteins than the quantity of damage done to DNA during irradiation (Daly, 2009).

Proteins and peptides analyses are routinely performed using reversed-phase liquid chromatography, which achieves separation based on hydrophobicity differences between peptides or proteins. Recently, however, capillary electrophoresis (CE) has increasingly been used for protein and peptide analysis (Herold et al., 1996). In capillary zone electrophoresis (CZE), the separation mechanism is based mainly on differences in charge-to-mass ratios, and because proteins and peptides are amphoteric, they are ideally suited to electrophoretic analysis (Herold et al., 1996). CE is a modern analytical method that offers the advantages of short analysis time and minimum consumption of both reagents and samples. It is well suited for the separation of proteins and has been used for this purpose for over three decades (Huck et al., 2008). The importance of CE in protein analysis increases with the growing efforts to understand more about the composition and function of proteins of living bodies, and has great potential to become one of the key tools in proteome research (Huck et al., 2008).

Thus, the aim of this study was to separate and analyze the expressed proteins synthesized by *L. monocytogenes* and *S. aureus* at different doses of γ -irradiation treatment using capillary electrophoresis (CE).

Results and discussion

Determination of wavelength for detection and quantifying the expressed proteins by *L. monocytogenes* and *S. aureus*

Due to the exceptional capabilities of CE, the observed electropherogram depends on the wavelength (WL) chosen for the detection of analysed proteins. Although the WL of 280 nm is a characteristic wavelength absorbance for proteins, the minor amount of components in the capillary requires lower WL of UV detection. Much higher sensitivity can be obtained at the WL of 200-230 nm, but at any other WL of UV, the absorbing components might also appear in the electropherogram (Kustos et al., 1998). It can be observed that there were no other peaks that could be detected after the WL of 240 nm and there was a very strong absorbance between the WL of 190 and 220 nm (Figure 2.1 A and B). Our results are also in concordance with those of Huck et al. (2008) and Dolnik (1999) that the WL between 200 and 220 nm, at which absorption is proportional to the number of peptide bonds, should be chosen for CE. Furthermore, it is known that most organic solvents have a maximum absorbance at the WL between 180 and 210 nm, thus, it is more reasonable to quantify the expressed proteins by *L. monocytogenes* and *S. aureus* at the WL of 220 nm to avoid the interferences caused by alcohol or ethers.

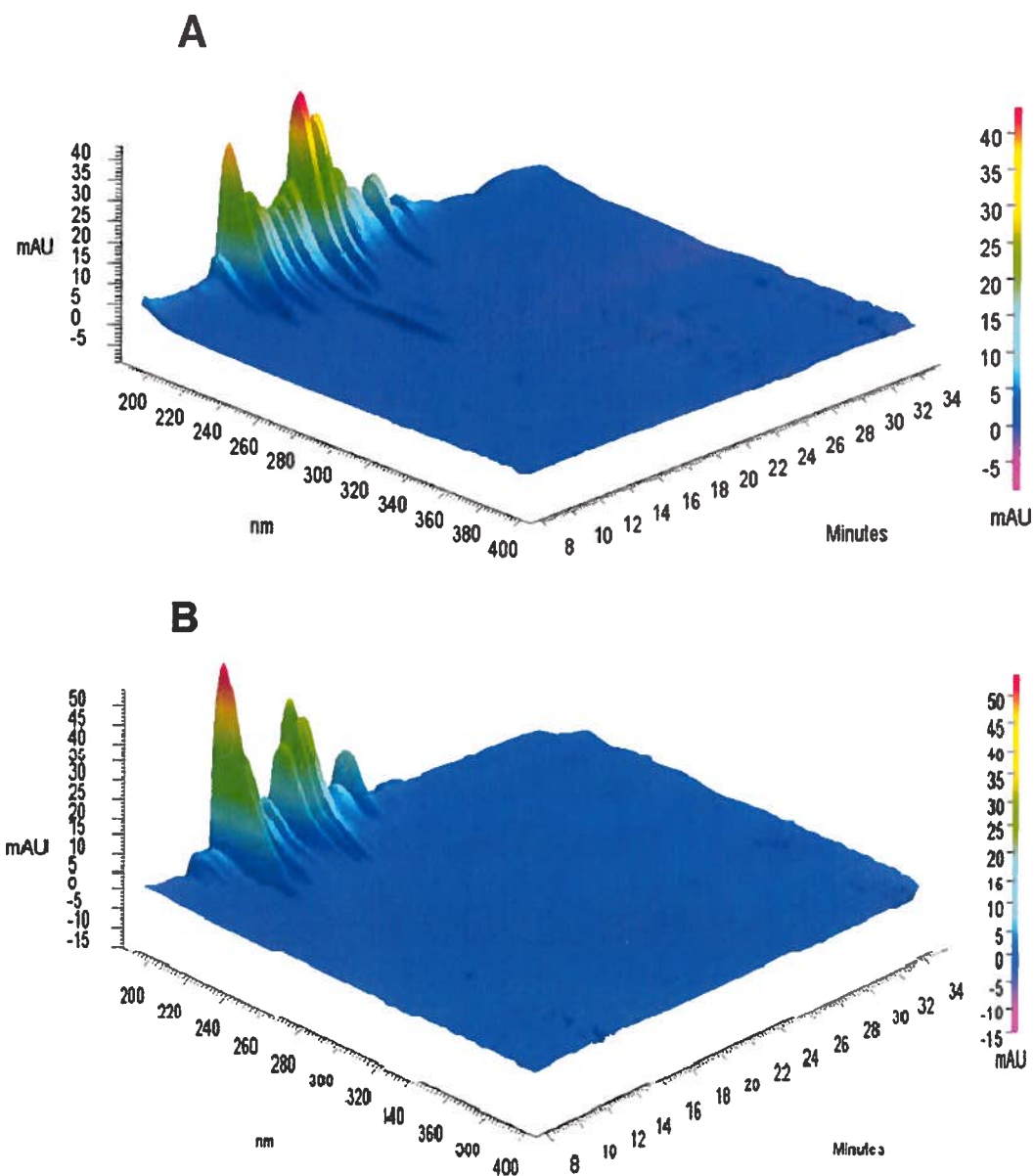


Figure 2.1: 3-D view of absorbance versus time and wavelength (from 190 to 400 nm) for total unirradiated proteins of (A) *L. monocytogenes* and (B) *S. aureus*. Experimental conditions: Bare-fused silica capillary, 30.2 cm (20 cm to the detection window) x 50 μ m i.d.; temperature, 25°C; applied voltage, 15 kV; electrokinetic injection at 5.0 kV x 20s. Samples were diluted at 1 mg/ml with SDS sample buffer.

Moreover, to determine the MW of different peaks expressed in an electropherogram, a calibration curve of electrophoretic mobility against the MW was used (Figure 2.2). This calibration curve had a coefficient of determination of 0.998.

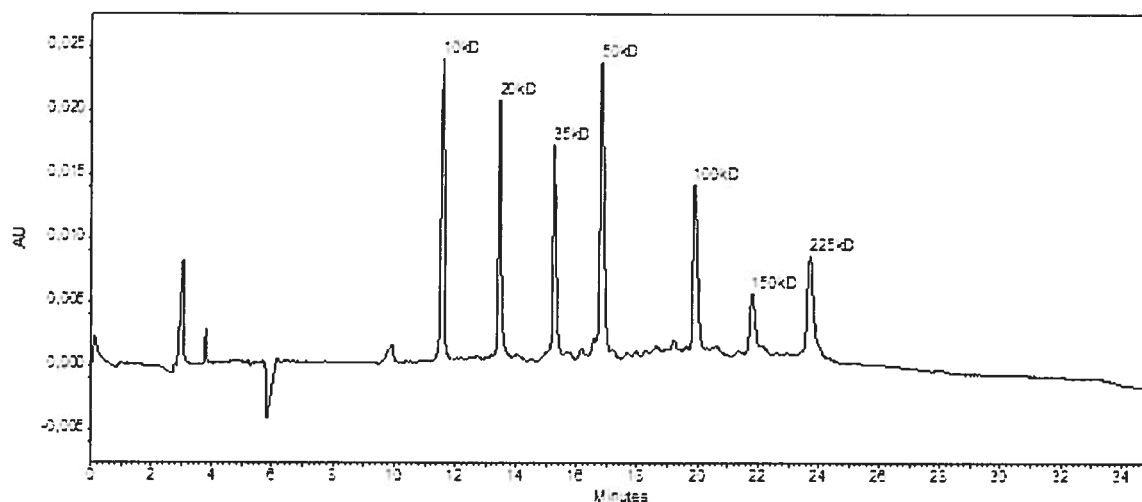


Figure 2.2: SDS-MW Size Standards. All experimental conditions were as in Figure 2.1.

Effects of γ -irradiation on the expressed proteins in *L. monocytogenes*

The CE electropherograms of expressed proteins by *L. monocytogenes* treated at different doses of γ -irradiation are presented in Figure 2.3. The profiles of protein expression by *L. monocytogenes* at different doses of γ -irradiation treatment are presented in Table 2.1. In this table, the major peaks were calculated and expressed as the equivalent MW and the peak area (%). For the non-irradiated bacterial (the control), it can be observed that there were 27 major peaks consisting of 15.7 kDa (4.58%), 17.5 kDa (0.94 %), 18.8 kDa (3.46 %), 20.3 kDa (0.43 %), 21.5 kDa (1.32 %), 22.7 kDa (3.37 %), 25.0 kDa (2.66 %), 25.8 kDa (6.33 %), 29.6 kDa (1.13 %), 33.6 kDa (14.82 %), 36.2 kDa (0.57 %), 37.4 kDa (3.47 %), 39.7 kDa (5.29 %), 42.1 kDa (10.32 %), 45.3 kDa (2.75 %), 48.2 kDa (2.51 %), 53.0 kDa (2.52 %), 56.0 kDa (3.72 %), 57.6

kDa (1.86 %), 64.5 kDa (1.54 %), 67.8 kDa (2.33 %), 70.2 kDa (0.84 %), 71.8 kDa (0.92 %) and 85.4 kDa (3.91 %) (Figure 2.3 A and Table 2.1).

Table 2.1: Profiles of protein expression by *Listeria monocytogenes* at different doses of γ -irradiation treatment

Molecular weight (kDa)	Peak number and corrected area of protein (%) ^a					
	0 kGy (Control)		1.2 kGy		3.5 kGy	
15.7	1	4.58 ± 0.30	28	4.49 ± 0.20	54	5.16 ± 0.40
17.5	2	0.94 ± 0.20	29	1.46 ± 0.40	55	1.35 ± 0.10
18.8	3	3.46 ± 0.20	30	3.56 ± 0.30	56*	4.41 ± 0.30
20.3	4	0.43 ± 0.08	31*	0.91 ± 0.06	57*	0.96 ± 0.09
21.5	5	1.32 ± 0.30	32	1.12 ± 0.20	58	1.200 ± 0.004
22.7	6	3.37 ± 0.08	33	2.67 ± 1.00	59	2.51 ± 0.20
25.0	7	2.66 ± 0.03	34*	3.27 ± 0.20	60*	4.88 ± 0.80
25.8	8	6.33 ± 0.40	35	6.52 ± 0.10	61	5.07 ± 0.80
27.7	9	1.13 ± 0.09		ND	62	1.23 ± 0.30
28.5	10	4.13 ± 0.30	36*	5.51 ± 0.50	63*	2.30 ± 0.70
29.6	11	4.42 ± 0.20	37	4.32 ± 0.80	64*	2.89 ± 0.40
33.6	12	14.82 ± 0.60	38*	15.92 ± 0.80	65*	12.45 ± 0.40
36.2	13	0.57 ± 0.10		ND	66	0.59 ± 0.05
37.4	14	3.47 ± 0.20	39	3.69 ± 0.40	67	3.28 ± 0.03
39.7	15	5.29 ± 0.10	40	5.74 ± 0.40	68	5.29 ± 0.30
42.1	16	10.32 ± 0.40	41	10.63 ± 0.50	69*	6.43 ± 0.20
45.3	17	2.75 ± 0.30	42*	7.16 ± 0.40	70*	4.08 ± 0.50
45.8	18	4.51 ± 0.50		ND	71*	1.59 ± 0.40
48.2	19	2.51 ± 0.30	43	2.62 ± 0.40	72	2.09 ± 0.20
53.0	20	2.52 ± 0.30	44*	1.90 ± 0.90	73	1.32 ± 0.09
54.1		ND	45	2.58 ± 0.50	74	1.30 ± 0.50
56.0	21	3.72 ± 0.50	46	3.09 ± 0.20	75*	2.30 ± 0.40
57.6	22	1.86 ± 0.40	47	1.37 ± 0.50	76	1.25 ± 0.30
60.2		ND	48	1.77 ± 0.30	77	1.20 ± 0.40
64.5	23	1.54 ± 0.10	49	1.53 ± 0.10	78	1.39 ± 0.30
67.9	24	2.33 ± 0.10	50	2.23 ± 0.10	79	1.91 ± 0.50
70.2	25	0.84 ± 0.08	51	0.73 ± 0.02	80*	0.47 ± 0.20
71.8	26	0.92 ± 0.20	52	0.53 ± 0.20	81	0.71 ± 0.30
85.4	27	3.91 ± 0.30	53*	4.78 ± 0.30	82	3.12 ± 0.50

^a The values of corrected area presented are the mean (standard deviation) of samples prepared in duplicate and each injected three times. 1.2 kGy, damaged cells; 2.9 kGy, VBNC state just after irradiation ; 3.5 kGy, lethal.

^{*} Corrected area differs statistically from the non-irradiated protein by Student's t test with $p < 0.05$

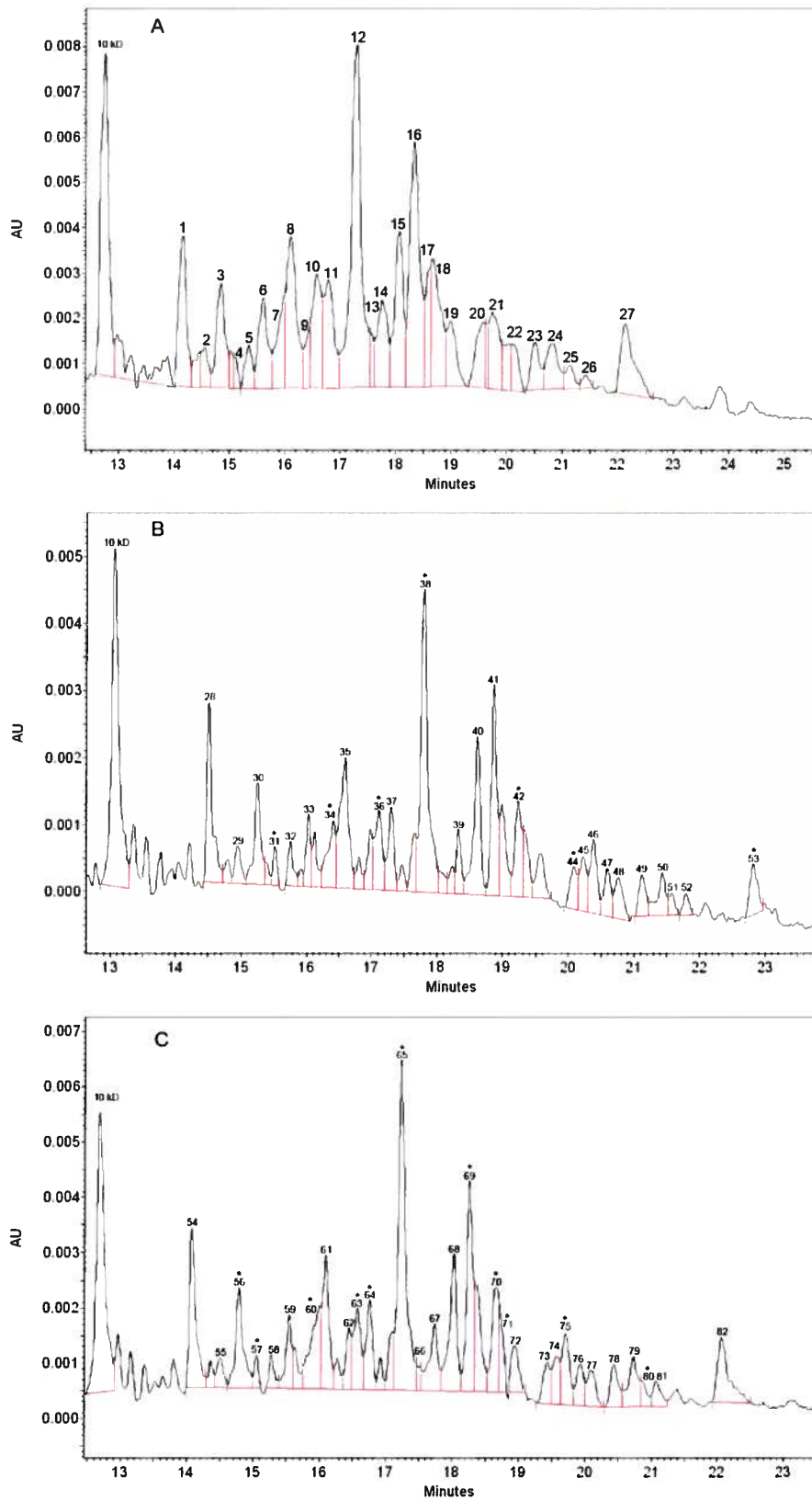


Figure 2.3: Electrophoretic profiles obtained for *L. monocytogenes* with (A) non-irradiated treatment; (B) irradiated at 1.2 kGy to create cells damaged; and (C) irradiated at 3.5 kGy to kill cells.

* corrected area differs statistically between irradiated and non-irradiated proteins by Student's t test with $p < 0.05$.

Irradiation at a sensitive dose (1.2 kGy) has caused a significantly increase ($p < 0.05$) in the peak area (%) of peaks that represent the proteins with MW of 20.3 kDa (from 0.43 % to 0.91 %), 25.0 kDa (from 2.66 % to 3.27 %), 28.5 kDa (from 4.13 % to 5.51 %), 33.6 kDa (from 14.82 % to 15.92 %), 45.3 kDa (from 2.75 % to 7.16 %) and 85.4 kDa (from 3.91 % to 4.78 %). This treatment also caused the decrease only for the peak areas (%) that represented the MW of 53.0 kDa (from 2.52 % to 1.90 %) (Figure 2.3 B and Table 2.1).

More changes were found at the irradiation of a lethal dose (3.5 kGy), mainly decrease of the peak area, than those observed at the sensitive dose. It can be found that the expressed proteins of MW of 28.5 kDa, 29.6 kDa, 33.6 kDa, 42.1 kDa, 45.3 kDa, 45.8 kDa, 56.0 kDa and 70.2 kDa were decreased. Further, there were also the increases in expressed proteins with the MW of 18.8 kDa, 20.3 kDa and 25.0 kDa (Figure 2.3 C and Table 2.1).

Although there are 3010 putative proteins encoded in *Listeria monocytogenes* 08-557 complete genome (Gilmour et al., 2010), it can be only be speculated that several expressed proteins of *L. monocytogenes* at different treatment doses by γ -irradiation based on the identity of the proteins are involved. Indeed, it is obvious that the whole proteome is not expressed at all times. Also, during the extraction, only cytosolic proteins were expected to be extracted. As the genomes of our strains of bacteria have been sequenced and are available on PubMed, *in silico* studies have allow us to find all the proteins with the molecular weight found by capillary electrophoresis. In *L. monocytogenes* (Gilmour et al., 2010) many proteins that have the approximate same MW can be expected but some MWs are represented for unique proteins and are also present in the electrophoretic profiles of our research. It can be observed that at different irradiation dose treatments, there are three unique proteins (MW of 57.6, 64.5 and 69.7 kDa) whom expression

levels were not significant changed (Table 2.1). It is presumably expected that these proteins are essential for the survival of *L. monocytogenes* during γ -irradiation treatment.

The first protein with the MW of 57.6 kDa is the hypothetical protein LM5578_2803 which was determined in the clinical strain *Listeria monocytogenes* 08-5578 (Gilmour et al., 2010). The second protein with the MW of 64.5 kDa is the 2-succinyl-6-hydroxy-2, 4-cyclohexadiene-1-carboxylic acid synthase/2-oxoglutarate decarboxylase (SHCHC) which plays a key role in menaquinone (Vitamin K2) biosynthesis. Menaquinones are constituents of bacterial cytoplasmic membranes. They play important roles in electron transport, oxidative phosphorylation, active transport, and endospore formation. Moreover, the variations in the inherent structures of menaquinones and their uneven distributions among bacteria are also considered important in bacterial taxonomy (Das et al., 1989).

The third protein with the MW of 67.9 kDa is the DNA mismatch repair (DMR). DMR is a highly conserved biological system that plays a key role in maintaining genomic stability by recognizing, repairing erroneous insertion, deletion and mis-incorporation of bases that can arise during DNA replication and recombination as well as repairing some forms of DNA damages (Iyer et al., 2006).

For some MWs that the peak areas were statistically changed, two proteins can be found (Table 2.1). This is the case of the peak number 53 (Figure 2.3 B) with the MW of 85.4 kDa. This is a hypothetical protein LM5578_2118 which was determined in the clinical strain *Listeria monocytogenes* 08-5578 (Gilmour et al., 2010). This protein has been found in other *L. monocytogenes* strain and corresponds to formate acetyltransferase. Because there is an increase of this protein at the irradiation treatment with sensitive dose, it can be hypothesised that the treated *L. monocytogenes* required more energy production to recover from damage(s).

Finally, the peak number 80 (Figure 2.3 C) with the MW of 70.2 was decreased. This MW corresponds to a hypothetical protein LM5578_1429, which is a part of the acyltransferase family proteins in other *L. monocytogenes* strains. At the lethal irradiation dose, the bacterium might require less expression level of this protein which is involved in lipid transport.

Effects of γ -irradiation on the expressed proteins in *S. aureus*

The electropherograms of CE of expressed proteins by *S. aureus* treated at different doses of γ -irradiation are presented in Figure 2.4. The profiles of protein expression by *S. aureus* at different doses of γ -irradiation treatment are presented in Table 2.2. In this table, the major peaks were calculated and expressed as the equivalent MW and the peak area (%). For the non-irradiated bacteria (the control), it can be observed that there were 26 major peaks consisting of 15.2 kDa (2.34 %), 16.3 kDa (6.2 %), 17.7 kDa (0.61 %), 18.7 kDa (1.03 %), 19.5 kDa (0.71 %), 20.3 kDa (1.30 %), 21.1 kDa (1.20 %), 23.4 kDa (4.00 %), 28.2 kDa (3.7 %), 29.4 kDa (3.56 %), 30.7 kDa (8.60 %), 33.5 kDa (11.6 %), 36.3 kDa (3.10 %), 37.8 kDa (3.30 %), 40.5 kDa (11.3 %), 48.8 kDa (4.20 %), 61.9 kDa (2.8 %), 65.2 kDa (1.63 %), 69.5 kDa (3.30 %), 72.4 kDa (6.90 %), 75.1 kDa (2.76 %) and 84.1 kDa (0.85 %) (Figure 2.4 A and Table 2.2).

Table 2.2: Profiles of protein expression by *Staphylococcus aureus* at different doses of γ -irradiation treatment

Molecular weight (kDa)	Peak number and corrected area of protein (%) ^a							
	0 kGy (Control)		1.2 kGy		2.9 kGy		3.5 kGy	
15.2	1	2.34 ± 0.05	27	2.40 ± 0.40	53	2.90 ± 0.70	ND	
16.3	2	6.20 ± 0.20	28*	5.30 ± 0.40	54	6.30 ± 0.10	86	6.80 ± 200
17.7	3	0.61 ± 0.08	29*	1.20 ± 0.30	55*	3.43 ± 0.01	87*	1.20 ± 0.20
18.7	4	1.03 ± 0.05	30	1.40 ± 0.40	56*	4.30 ± 0.50	88*	1.20 ± 0.50
19.5	5	0.71 ± 0.09	31	0.90 ± 0.10	57*	2.30 ± 0.50	89*	1.90 ± 0.30
20.3	6	1.30 ± 0.10	32	1.40 ± 0.30	58	1.31 ± 0.06	90	1.30 ± 0.30
21.1	7	1.20 ± 0.10	33	1.30 ± 0.20	59*	3.80 ± 0.70	91	1.50 ± 0.70
23.4	8	4.00 ± 0.20	34*	2.30 ± 0.10	60	3.90 ± 0.70	92	2.40 ± 2.00
28.2	10	3.70 ± 0.30	38	4.10 ± 0.50	62	3.20 ± 0.20	94	4.57 ± 0.04
29.4	11	3.56 ± 0.04	39	3.90 ± 0.50	63	3.60 ± 0.30	95	3.70 ± 0.50
30.7	12	8.60 ± 0.20	40	8.10 ± 0.30	65*	5.15 ± 0.02	96*	6.30 ± 0.90
33.4	13	11.6 ± 0.30	41	11.7 ± 0.50	67	11.9 ± 0.40	97	9.60 ± 1.00
36.3	14	3.10 ± 0.03	42	3.00 ± 0.50	68*	2.70 ± 0.10	98*	2.30 ± 0.20
37.8	15	3.30 ± 0.20	43	3.20 ± 0.50	ND		99	3.40 ± 0.50
40.5	16	11.3 ± 0.30	44	9.70 ± 0.80	69*	8.50 ± 0.60	100	9.80 ± 1.00
48.8	20	4.20 ± 0.10	46	1.10 ± 0.20	ND		102	4.60 ± 0.60
61.9	21	2.80 ± 0.20	47	2.50 ± 0.50	ND		106	2.80 ± 0.50
65.9	22	1.63 ± 0.06	48	1.50 ± 0.30	ND		107	1.40 ± 0.30
69.2	23	3.30 ± 0.20	49	2.60 ± 0.50	ND		108	2.60 ± 0.90
72.4	24	6.90 ± 0.30	50	6.60 ± 0.60	ND		109	6.30 ± 1.00
75.1	25	2.76 ± 0.05	51	1.90 ± 0.60	ND		110*	1.70 ± 0.50
84.1	26	0.85 ± 0.03	52	0.68 ± 0.03	ND		111	0.85 ± 0.01

^a The values of corrected area presented are the mean (standard deviation) of samples prepared in duplicate and each injected three times. 1.2 kGy, damaged cells; 2.9 kGy, VBNC state just after irradiation; 3.5 kGy, lethal.

* Corrected area differs statistically from the non-irradiated protein by Student's t test with $p < 0.05$

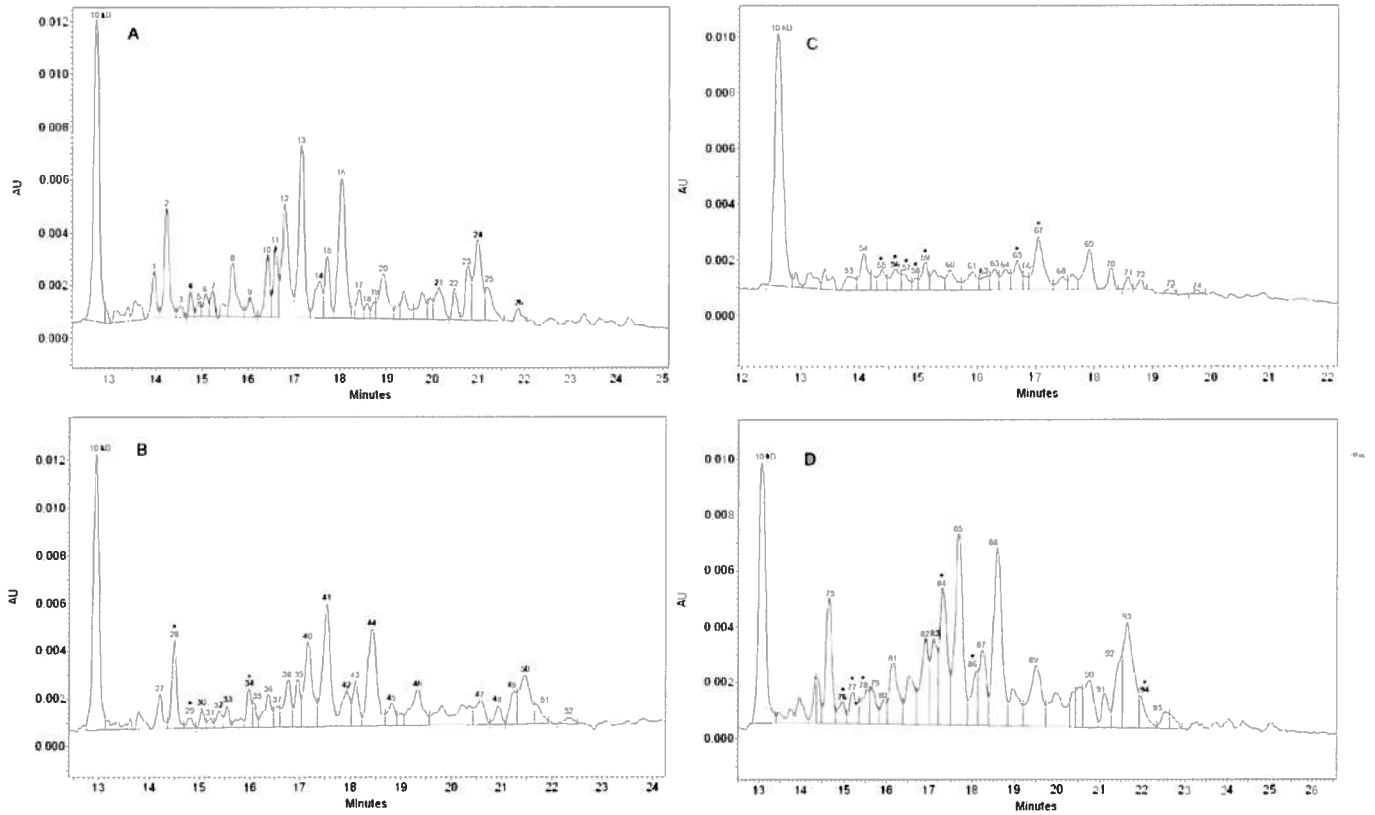


Figure 2.4: Electrophoretic profiles obtained for *S. aureus* with (A) non-irradiated treatment; (B) irradiated at 1.2 kGy to create damaged cells; (C) irradiated at 2.9 kGy to obtain viable but non cultivable state; and (D) irradiated at 3.5 kGy to kill cells.

* corrected area differs statistically between irradiated and non-irradiated proteins by Student's t test with $p < 0.05$.

Irradiation at a sensitive dose (1.2 kGy) has caused an increase significantly ($p < 0.05$) in the peak area (%) of the peak that represented for the protein with MW of 17.7 kDa (from 0.61 % to 1.2 %). This treatment also caused the decreases for the peak areas (%) that represented for the MW of 16.3 kDa (from 6.2 % to 5.3 %) and for the MW of 23.4 kDa (from 4.0 % to 2.30 %) (Figure 2.4 B and Table 2.2).

Irradiation at a VBCN dose (2.9 kGy) affected more expressed proteins as it can be observed that there were the increases of peak areas (%) with equivalent MWs of 17.7 kDa (from 0.61 % to 3.43) %, 18.7 kDa (from 1.04 % to 4.30 %), 19.5 kDa (from 0.71 % to 2.30 %), 21.1 kDa (from 1.20 % to 3.8 %). Moreover, this treatment (2.9 kGy) also caused the decreases significantly ($p < 0.05$) in the peak area (%) of the proteins with the MW of 30.7 kDa (from 8.6% to 5.15 %), 36.3 kDa (from 3.1 % to 2.7 %) and 40.5 kDa (from 11.3 % to 8.5 %) (Figure 2.4 C and Table 2.2).

Finally, for the irradiation at a lethal dose (3.5 kGy), it can be found that the expressed proteins with the MW of 17.7 kDa, 18.7 kDa and 19.5 kDa were increased less than that of expressed proteins at the VCNC dose (2.9 kGy) and these might be the very important proteins which are responsible for the survival of *S. aureus*. Furthermore, there were also the decrease in expressed proteins with the MW of 30.7, 36.3 and 75.1 kDa at this dose of treatment (3.5 kGy) suggesting that these proteins are seriously affected at high dose of γ -irradiation treatment (Figure 2.4 D and Table 2.2).

There are 2560 putative proteins identified in *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* USA300_FPR3757 (Diep et al., 2006), however, we can only speculate on the identity of several

expressed proteins of *S. aureus* when treated at different doses of irradiation. It can be observed that at different irradiation dose treatments, there are four unique proteins (MW of 15.2, 69.2, 72.4 and 84.1 kDa) which expression levels were not significantly changed (Table 2.2). These four proteins are expected as essential proteins for the survival of *S. aureus* during γ -irradiation treatment. The first protein with the MW of 15.2 kDa is the 30S ribosomal protein S12. This is a protein, component of ribosome, that plays a role in the translation of mRNA into protein (Diep et al., 2006). The second protein of MW of 69.2 kDa is the DNA primase which is responsible for synthesizing of RNA primers for the initiation of DNA replication (Diep et al., 2006). The third protein with the MW of 72.4 kDa is the DNA gyrase subunit B (Diep et al., 2006). The fourth protein with the MW of 84.1 kDa is the bifunctional preprotein translocase subunit SecD/SecE, which is a part of the preprotein secretory system and stimulates the proton motive force-driven protein translocation (Diep et al., 2006).

For some MWs that the peak areas were statistically changed, it can be found that there are two proteins. This is the case of the peak number 2 (Figure 2.4 A) and the peak number 28 (Figure 2.4 B) with the MW of 16.3 kDa which was identified as the 50S ribosomal protein L9. Because of the decrease of this protein, it can be speculated that this protein was more affected by low irradiation treatment. Moreover, as shown in Table 2.2, it can be observed that there was an augmentation of the expressed protein with the MW of 17.7 kDa and the only protein which corresponded to this MW is the transcriptional regulator CtsR (Diep et al., 2006). CtsR is a negative heat shock repressor of *clpB*, *clpC* and *clpP* (Frees et al., 2004). ClpB and ClpC are expressed proteins required for the growth of *S. aureus* at high temperature and ClpP is an essential protein for the growth of *S. aureus* under heat-shock conditions (Frees et al., 2004). In the absence of ClpC and ClpP, CtsR accumulates, so it can be speculated that during the irradiation treatment (at all the irradiation doses) these two proteins (ClpC and ClpP) were

degraded and caused the accumulation of the protein CtsR (heat shock repressor). Furthermore, it is also found that there was a decrease in peak area of the peak number 26 (supporting information S3A) when *S. aureus* was treated at the lethal dose (peak 111, supporting information S3D) which corresponds to the protein with the MW of 84.1 kDa. This protein is a unique protein (quinol oxidase, subunit I) (Diep et al., 2006). This protein is the terminal oxidase in the respiratory chain of aerobic bacteria and it catalyzes the reduction of O₂.

In conclusion, the expressed protein profiles of *Listeria monocytogenes* at different irradiation treatments were studied. There are three unique proteins (MW of 57.6, 64.5 and 69.7 kDa) which expression levels were not significant changed. These proteins could be the essential proteins for the survival of *L. monocytogenes* during γ -irradiation treatment. Moreover, it is also found that two proteins (MW of 85.4 and 70.2 kDa) of *L. monocytogenes* were statistically changed at different irradiation dose of treatment. The protein with the MW of 85.4 kDa is the enzyme formate acetyltransferase the level of which was increased at sensitive dose and the protein with the MW of 70.2 kDa (a part of the acyltransferase family proteins) was decreased at the lethal dose.

In the case of *Staphylococcus aureus*, there were four unique proteins (MW of 15.2, 69.2, 72.4 and 84.1 kDa) which expression levels were not significant changed at different irradiation dose of treatment. These four proteins could be essential proteins for the survival of *S. aureus* during γ -irradiation treatment. Moreover, one protein (50S ribosomal protein) with the MW of 16.3 kDa was decreased significantly in its expression at low dose of irradiation treatment and the other protein (transcriptional regulator CtsR) with the MW of 17.7 kDa was increased significantly at all irradiated treatment compared to that of the control.

The research further confirmed that capillary electrophoresis is a useful method to separate and analyse the expressed proteins which may be related to the resistance of food pathogen to γ -irradiation and therefore, based on the profile of expressed proteins, an advanced approach could be discovered to control food pathogens efficiently.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

Listeria monocytogenes HPB2812 (Institut National de la Recherche Scientifique - Institut Armand Frappier, Laval, PQ, Canada) and *Staphylococcus aureus* ATCC29213 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) were individually sub cultured in tryptic soy broth (TSB; Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) at 37 °C for 24 h from the stock cultures maintained at -80 °C in TBS containing 20% glycerol. One milli litre of each culture was incubated through two successive incubations of 24 h at 37 °C in TSB to obtain approximately 10^9 CFU ml⁻¹. The cultures were centrifuged at 1300 g for 15 min., washed with sterilized NaCl 0.85% (w/v) and then resuspended in TSB (500 ml) and incubated at 37 °C for 24 h. After the last incubation of 24 h, bacterial cultures were irradiated according to suitable dose. In order to obtain a viable but non culturable (VBNC) cells state after irradiation, cell cultures of *S. aureus* were then incubated at 37 °C for 5 days to permit the restoration of metabolic activity. Since no VBNC were found for *L. monocytogenes* this treatment was not applied on this bacterium.

Irradiation treatment

Bacterial cultures of *S. aureus* were irradiated with doses of 1.16 - 1.24 kGy (mean, 1.20 kGy) to create damaged cells, 2.86–2.94 kGy (mean, 2.90 kGy) to obtain cells under VBNC state and 3.46-3.54 kGy (mean, 3.50 kGy) to kill cells (Caillet et al., 2006). The bacterial cultures of *L. monocytogenes* were irradiated with doses of 1.17-1.23 kGy (mean, 1.2 kGy) to create damaged cells and 3.46-3.54 kGy (mean, 3.5 kGy) and to kill cells (Caillet et al., 2009). A UC-15A irradiator (MDS Nordion International Inc., Kanata, ON, Canada) equipped with a ⁶⁰Co source was used to deliver radiation at a dose rate of 18.27 kGy/h. This irradiator was certified by the National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, MD, USA), and the dose rate was established using a correction for decay of source. Amber Perspex 3042D (Atomic Energy Research Establishment, Harwell, Oxfordshire, UK) was used to validate the dose distribution. The radiation treatment was carried out at the Canadian Irradiation Centre (Laval, PQ, Canada) at room temperature (20 ± 1 °C).

Protein extraction

Immediately after irradiation or after the restoration of metabolic activity in VBNC state, 500 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 8670 *g* at 4 °C and the resulting pellet was washed with 10 ml of sterilized NaCl 0.85% (w/v). Bacterial pellets were then resuspended with 5 ml of lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5); 0.1 mM NaCl; 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF); 1 mg ml⁻¹ iodoacetamide] and 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 operated at speed 6 for 60 s. Then, the suspension was centrifuged at 2000 *g* for 10 min to remove the glass beads and unbroken cells. Samples were desalted by

filtration using Amicon Ultra-4 Centrifugal Units (Millipore, Billerica, MA, USA) as per instructions of the manufacturer.

Protein quantification

Concentration of proteins extracted from the bacteria was quantified using Bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA) and procedure was followed as the manufacturer's specifications. The absorbance was read at 562 nm using a DMS 100S spectrophotometer (Varian Canada Inc., Mississauga, ON, Canada). Protein concentration of samples was calculated based on standard curve of bovine serum albumin (BSA).

Capillary electrophoresis

Protein expression was analyzed using ProteomeLab SDS-Gel MW Analysis Kit and performed on the capillary electrophoresis (CE) system of ProteomeLab™ PA 800 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA). CE was used due to its many advantages: high speed, automation, low sample consumption. This "dynamic sieving" electrophoresis provides separation of macromolecules according to the molecular weight. Bare-fused silica capillary (30 cm total length, 50 µm i.d.) capillary was used. A commercially available sieving polymer, sodium lauryl sulfate (SDS) was applied for separation of proteins on the basis of their molecular weight. The run buffer of the SDS-Gel Molecular Weight Analysis kit (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA) contains a hydrophilic polymer providing a sieving range from 10000 to 225000 Da. This polymer was rinsed from the capillary by pressure between each run with the help of 0.1 M NaOH (1 min) and deionized water (2 min). Proteins pellets were resuspended in SDS sample buffer (1% SDS, 100 mM Tris-HCl pH 9.0) to obtain a final concentration of 1 mg ml⁻¹.

Electrokinetic injection (5.0 kV, 20 s) was used for each sample, the applied voltage was 15 kV (normal polarity) and the temperature of the system was stabilized at 25 °C. UV absorption was monitored with a diode array detector at 220 nm and a reference channel at 350 nm both with a bandwidth of 5 nm. A scan from 190 nm to 400 nm was also collected. An internal standard of 10 kDa was used in every experiment. For estimation of molecular weights of proteins the SDS-Gel Molecular Weight (MW) Analysis Kit (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA) was used. The use of the electrophoretic mobility (μ) instead of the relative migration time is more precise in capillary electrophoresis. Mobility is calculated as the apparent mobility (μ_{app}) minus the contribution of electroosmotic flow (μ_{eof}). Once the mobility of a reference analyte has been determined, the mobility of related analytes can be calculated with this equation:

$$\mu = L_d L_t (1/ V t - 1/V_{ref} t_{ref}) + \mu_{ref}$$

where V is the average applied voltage up to the migration time of the peak of interest, L_d is the capillary length to detector, L_t is the total capillary length, t_{ref} is the migration time of reference peak in the current run, μ_{ref} is the defined mobility for the reference peak, V_{ref} is the average applied voltage up to migration time of reference peak and t is the migration time of the peak of interest.

Statistical analysis

Student's t test was utilized and differences between means were considered significant at $p < 0.05$. Stat-Packets Statistical Analysis software (SPSS Base 18.0, SPSS Inc., Chigaco, Ill.) was used for the analysis. Each sample was prepared in duplicate and injected three times.

Acknowledgement

The authors are grateful to Nordion International Inc. for the irradiation operations. This research was supported by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada, Discovery Program. K.T. is a Fellowship recipient of the Fondation Armand- Frappier.

CHAPITRE 3:

ARTICLE 2: PROFILE OF EXPRESSED PROTEINS OF γ -IRRADIATED FOODBORNE PATHOGENS *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 ANALYSED BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Profil des protéines exprimées par le pathogène alimentaire *Escherichia coli* O157 :H7 irradié aux rayons gamma et analysé par électrophorèse capillaire.

Karine Trudeau¹, Khanh Dang Vu¹, François Shareck², Monique Lacroix¹

¹ INRS-Institut Armand-Frappier, Laboratoire de recherche en sciences appliquées à l'alimentation, 531 boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7

² INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7

Contribution des auteurs

Karine Trudeau a réalisé les manipulations et la rédaction de l'article.

Khanh Dang Vu a contribué à la rédaction de l'article et à la correction de l'article.

François Shareck : co-directeur de recherche, élaboration des stratégies de recherche.

Monique Lacroix : directrice de recherche, responsable scientifique et coordonatrice du projet de recherche, a participé à la planification des expériences et à la correction de l'article.

L'article sera soumis dans le journal PLoS ONE.

Résumé

Une méthode d'électrophorèse capillaire avec détection UV a été utilisée pour analyser la composition en protéines du pathogène alimentaire *Escherichia coli* O157: H7 EDL933 traité à différentes doses d'irradiation. Des échantillons bactériens ont été irradiés aux rayons gamma à des doses de 0,4 kGy et 1,3 kGy pour respectivement endommager les cellules et pour tuer les cellules, respectivement. Les protéines bactériennes ont été extraites et ensuite injectées dans l'électrophorèse capillaire. Le poids moléculaire et l'aire sous la courbe corrigée ont été calculés pour les pics majeurs. Il y a une seule protéine identifiée, la protéine B d'absorption du bactériophage N4 d'un poids moléculaire de 85,2 kDa, dont le niveau d'expression n'a pas significativement changé ($p \geq 0,05$) à différentes doses d'irradiation. Cette protéine pourrait être une protéine essentielle pour la survie de *E. coli* au cours de l'irradiation gamma. Par ailleurs, sept protéines ont été identifiées soit : la rhamnulokinase, la glycérol kinase, la protéine hypothétique Z2695, la sous-unité SecD de la translocase, les sous-unités gamma et tau de l'ADN polymérase III, la protéine Bet de transport de choline et la protéine d'assemblage de primosome, PriA avec les poids moléculaires respectifs de 54,0, 56,8, 60,7, 66,5, 71,0, 75,7 et 81,5 kDa. Le niveau d'expression de ces protéines a statistiquement changé ($p < 0,05$) après traitement à différentes doses d'irradiation. Les fonctions de ces protéines exprimées s'avèrent ne pas être liées aux protéines de choc thermique connues telles que DnaK, GroES et GroEL.

Abstract

A capillary electrophoresis (CE) method with UV detection was applied to analyse protein composition of foodborne pathogens *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933 which were treated at different irradiation doses. Bacterial samples were gamma irradiated at doses of 0.4 and 1.3 kGy to create damaged cells and to kill cells, respectively. The bacterial proteins were extracted and analysed using a CE system. The major peaks were calculated and expressed as the equivalent MW and the corrected peak area. There is one unique protein - bacteriophage N4 adsorption protein B (MW of 85.2 kDa) for which the expression level was not significantly changed ($p \geq 0.05$) at different doses of irradiation treatment. This protein could be an essential protein for the survival of *E. coli* during γ -irradiation treatment. Moreover, seven proteins consisting of rhamnulokinase, glycerol kinase, hypothetical protein Z2695, preprotein translocase subunit SecD, DNA polymerase III subunits gamma and tau, choline transport protein-BetT and primosome assembly protein-PriA with the respective molecular weight of 54.0, 56.8, 60.7, 66.5, 71.0, 75.7 and 81.5 kDa were determined. These proteins were statistically changed ($p < 0.05$) in the expressed level at different irradiation doses of treatment. The functions of these expressed proteins were found to not be related with known heat shock proteins (HSPs) such as DnaK, GroES, GroEL, etc. in *E. coli*.

Introduction

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 is a foodborne pathogen that causes enteric infections such as hemorrhagic colitis. The bacteria can also produce a Shiga toxin (Stx) into the intestine that acts on sensitive cells in the kidneys, brain and other organs and cause the haemolytic uremic syndrome (HUS) (Ferens et al., 2011). The symptoms of HUS are hemolytic anemia, acute renal failure and thrombocytopenia (Banatvala et al., 2001).

In order to prevent foodborne illness caused by harmful microorganisms such as *E. coli* O157:H7, food irradiation is one of the most effective processes to eliminate foodborne pathogens (Monk et al., 1995). Often referred to as a cold pasteurization treatment, food irradiation does not cause significant loss of nutrients and sensory qualities in food and utilizes a source of ionizing radiation that passes through food and destroy harmful bacteria as well as other organisms without increasing food temperature (Wood et al., 2000). To date, it is still not clearly confirmed how radiation causes bacterial death, but many theories implied DNA and/or protein damage. The ionizing radiation acts on DNA of parasites and micro-organisms by causing swellings and breakings along the chain. The damage in DNA is large, making it difficult or impossible to be repaired, to be reproducible and therefore, finally causing the death of irradiated microorganisms (Daly, 2009). In the classical model of radiation toxicity, DNA is the molecule which is the most affected by ionizing radiation. However, recent data have shown that the survival of bacteria after irradiation would be more related to the amount of damages occurred in proteins than the quantity of damage occurred in DNA during irradiation (Daly, 2009).

In a previous study, irradiation treatment of *E. coli* at different doses and analysis of expressed HSPs (GroEL, DnaK and GroES) by western blot, Caillet et al. (2008) demonstrated that expression of HSPs in *E. coli* O157:H7 was induced by irradiation.

For example, GroEL concentration was increased by 4.52, 5.73 and 4.94 times at irradiation doses of 0.4, 1.1 and 1.3 kGy, respectively, as compared to the control without treatment. DnaK was also increased significantly ($p < 0.05$) by 5.92, 5.77 and 5.0 times at irradiation doses of 0.4, 1.1 and 1.3 kGy, respectively, as compared to the control. In case of GroES, this protein was expressed at very low concentration in *E. coli* O157:H7 cells in the control and in the samples with 0.4 kGy irradiation dose. However, at the highest radiation doses (1.3 kGy), GroES concentration was 5 times more than that of the control. The study therefore confirmed that irradiation treatments had a significant effect ($p < 0.05$) on the expression level of HSPs which function as cellular protection against stresses.

It should be emphasized here that besides the changes in the expression level of HSPs in irradiated *E. coli* cells, it is still not known if there are any changes in the expression levels of other proteins when they are treated by irradiation. It is expected that the changes in expressed level (decreases or increases) of other proteins in *E. coli* after irradiation treatment at different doses may give us an idea about their functions in bacterial survival. Thus, analysis of protein profiles of expressed proteins in irradiated *E. coli* cells is necessary.

Recently, capillary electrophoresis (CE) has increasingly been used for protein and peptide analysis (Herold et al., 1996). In capillary zone electrophoresis, the separation mechanism is based mainly on differences in charge-to-mass ratios, and because proteins and peptides are

amphoteric, they are ideally suited to electrophoretic analysis (Herold et al., 1996). CE is a modern analytical method that offers the advantages of short analysis time and minimum consumption of both reagents and samples. It is well suited for the separation of proteins and has been used for this purpose for over three decades (Huck et al., 2008). The importance of CE in protein analysis increases with the growing efforts to understand more about the composition and function of proteins of living bodies, and has great potential to become one of the key tools in proteome research (Huck et al., 2008).

Thus, the objective of his study was to analyse the profiles of expressed proteins in *E. coli* at different doses of γ -irradiation treatment using capillary electrophoresis (CE). The irradiation treatments consisted of control (0 kGy), sensitive dose (0.4 kGy) and lethal dose (1.3 kGy).

Results and discussion

The profiles of protein expression by *E. coli* at different doses of γ -irradiation treatment are presented in Table 3.1. In this table, the major peaks were calculated and expressed as the equivalent MW and the corrected peak area (%). For the non-irradiated bacterial (the control), it can be observed that there were 27 major peaks consisting of 13.7 kDa (1.36%), 15.3 kDa (3.33 %), 17.2 kDa (2.15 %), 18.5 kDa (4.63 %), 19.4 kDa (1.76), 21.1 kDa (0.54 %), 22.1 kDa (1.93 %), 22.8 kDa (0.98 %), 24.7 kDa (2.15 %), 26.9 kDa (5.55 %), 30.7 kDa (2.87 %), 32.8 kDa (8.06 %), 34.5 kDa (4.70 %), 36.7 kDa (2.26 %), 40.0 kDa (10.25 %), 43.3 kDa (5.07 %), 48.6 kDa (9.28 %), 54.0 kDa (3.41 %), 56.8 kDa (1.53 %), 60.7 kDa (3.06 %), 66.5 kDa (1.71 %), 71.0 kDa (2.04 %), 75.7 kDa (7.87 %), 81.5 kDa (1.21 %), 85.2 (1.78 %) and 87.3 kDa (4.87 %).

Table 3.1: Profiles of protein expression by *E. coli* at different doses of γ -irradiation treatment

Molecular weight (kDa)	Corrected area of protein (%) ^a		
	0 kGy (Control)	0.40 kGy	1.30 kGy
13.7	1.36 ± 0.20	0.58 ± 0.20	ND
15.3	3.33 ± 0.20	2.86 ± 0.08	2.56 ± 0.40
17.2	2.15 ± 0.20	1.83 ± 0.20	1.19 ± 0.10
18.5	4.63 ± 0.20	4.38 ± 0.20	3.05 ± 0.04
19.4	1.76 ± 0.20	1.57 ± 0.10	1.76 ± 0.20
21.1	0.54 ± 0.20	0.80 ± 0.03	ND
22.1	1.93 ± 0.20	2.10 ± 0.20	1.21 ± 0.04
22.8	0.98 ± 0.20	1.03 ± 0.09	1.62 ± 0.08
24.7	2.15 ± 0.10	2.14 ± 0.30	6.19 ± 0.02
26.9	5.55 ± 0.20	4.23 ± 0.30	2.17 ± 0.01
28.6	2.17 ± 0.30	2.38 ± 0.20	1.83 ± 0.20
30.7	2.87 ± 0.20	2.32 ± 0.20	2.28 ± 0.20
32.8	8.06 ± 0.10	7.31 ± 0.10	7.58 ± 0.06
34.5	4.70 ± 0.08	4.40 ± 0.20	2.09 ± 0.08
36.7	2.26 ± 0.20	2.23 ± 0.10	2.95 ± 0.20
40.0	10.25 ± 0.20	10.26 ± 0.30	8.43 ± 0.09
43.3	5.07 ± 0.20	4.82 ± 0.50	3.86 ± 0.20
48.6	9.28 ± 0.20	9.80 ± 0.40	9.61 ± 0.30
54.0	3.41 ± 0.20	3.17 ± 0.30	2.24 ± 0.08
56.8	1.53 ± 0.10	1.45 ± 0.10	2.13 ± 0.08
60.7	3.06 ± 0.06	2.94 ± 0.10	3.84 ± 0.50
66.5	1.71 ± 0.40	2.56 ± 0.20	3.18 ± 0.30
71.0	2.04 ± 0.20	2.36 ± 0.20	2.86 ± 0.20
75.7	7.87 ± 0.20	7.53 ± 0.20	7.14 ± 0.30
81.5	1.21 ± 0.10	1.44 ± 0.20	1.82 ± 0.30
85.2	1.78 ± 0.10	1.85 ± 0.20	1.93 ± 0.30
87.3	4.87 ± 0.20	4.58 ± 0.30	3.49 ± 0.40

Values in bold differs statistically from the non-irradiated protein by Student's t test with $p < 0.05$

^a The values of corrected area presented are the mean ± SD of samples prepared in duplicate and each injected three times. 0.4 kGy, damaged cells; 1.3 kGy, lethal.

Irradiation at a sensitive dose (0.40 kGy) has caused a significantly increase ($p < 0.05$) in the peak area (%) of peaks that represent the proteins with MW of 28.6 kDa (from 2.17 % to 2.38 %) and 66.5 kDa (from 1.71 % to 2.56 %). This treatment also caused the decrease for the peak areas (%) that represented the MW of 13.7 kDa (from 1.36 % to 0.58 %), 15.3 kDa (from 3.33 % to 2.86), 26.9 kDa (from 5.55 % to 4.23%), 30.7 kDa (from 2.87 % to 2.32 %) and 34.5 kDa (from 4.70 % to 4.40 %) (Table 3.1).

More changes were found for irradiation treatment at a lethal dose (1.30 kGy), mainly decrease of the peak area, than those observed at the sensitive dose. It can be found that the expressed proteins of MW of 15.3 kDa, 17.2 kDa, 18.5 kDa, 22.1 kDa, 26.9 kDa, 30.7 kDa, 32.8 kDa, 34.5 kDa, 40.0 kDa, 43.3 kDa, 54.0 kDa, 75.7 kDa and 87.3 kDa were decreased. Further, there were also an increase in expressed proteins with the MW of 22.8 kDa, 24.7 kDa, 36.7 kDa, 56.8 kDa, 60.7 kDa, 66.5 kDa, 71.0 and 81.5 kDa (Table 3.1).

Although there are 5298 putative proteins encoded in *Escherichia coli* O157:H7 str. EDL933 complete genome (Perna et al., 2001), only several expressed proteins of *E. coli* at different treatment doses of γ -irradiation were determined based on the identity of the MW. Indeed, it is obvious that the whole proteome of *E. coli* is not expressed at all times. Moreover, during the extraction, only cytosolic proteins were expected to be extracted. In *E. coli* O157:H7 str. EDL933 many proteins with approximate same MW can be expected (Perna et al., 2001) but only some MWs are represented for unique proteins and are also present in the electrophoretic profiles of our research. It can be observed that at different irradiation dose treatments, there is only one unique protein (MW of 85.2 kDa) for which expression levels was not significantly changed ($p < 0.05$) (Table 3.1). It is speculated that this protein plays a role for the survival of *E. coli* during γ -irradiation treatment. This protein is a bacteriophage N4 adsorption protein B encoded by *nfrB*

gene (Perna et al., 2001). The product of *nfrB* gene may be required for irreversible adsorption and injection of the phage genome (Kiino et al., 1989). It is noteworthy to point out that there is no change in protein expression of this protein that participates in the infection by the bacteriophage N4, so it implies that this protein may have another yet undefined role into *E. coli* O157:H7.

For some MWs for which peak areas were statistically changed, seven proteins (MW of 54.0, 56.8, 60.7, 66.5, 71.0, 75.7 and 81.5 kDa) can be found (Table 3.1). The smallest one is a 54.0 kDa protein whose expression was decreased at the lethal dose. This protein is a rhamnulokinase, an enzyme participating in the degradation of L-rhamnose which is a ubiquitous sugar molecule (Grueninger et al., 2006). More precisely, the enzyme catalyzes the phosphorylation of L-rhamnulose then the product, L-rhamnulose-1-phosphate, is subsequently split by the aldolase into L-lactaldehyde and dihydroxyacetone phosphate. Because the expression of this protein was only decreased at the lethal dose, it could indicate that this enzyme is essential for bacterial survival after irradiation. The second protein is a glycerol kinase, a 56.8 kDa protein whose expression was increased only at the lethal dose. This enzyme is an important element in a signal transduction pathway that couples expression of genes required for glycerol metabolism to the relative availability of glucose and glycerol (Liu et al. 1994). However, this protein doesn't seem to play a key role in bacterial survival because its expression only found to be increased at the lethal dose. The third protein is a hypothetical protein Z2695 of 60.7 kDa and increased only at the lethal dose. It is an uncharacterized protein conserved in bacteria and its function is unknown (Perna et al., 2001). The 66.5 kDa protein is a preprotein translocase subunit SecD and its function is to transport large molecules (Perna et al., 2001). SecD is a part of the preprotein secretory system and when it is complexed with proteins SecF and YajC, SecDFyajC stimulates the proton motive force-driven protein translocation

(Nouwen et al., 2005). Because this protein expression was increased at the sensitive dose and the increase occurred even more at the lethal dose, it might play a role in bacterial survival. DNA polymerase III subunits gamma and tau is the 71.0 kDa protein and its expression only increased at the lethal dose. Its function is to catalyze the DNA-template-directed extension of the 3'-end of a DNA strand (Perna et al., 2001). The 75.7 kDa protein is a choline transport protein, BetT. Because its expression was only decreased at the lethal dose, it could be an important protein for the survival of the bacterium. The biggest protein, 81.5 kDa is a primosome assembly protein, PriA (Perna et al., 2001). When this protein binds forked DNA, it starts the assembly of the protein complex responsible for creating RNA primers on single stranded DNA during DNA replication (Tanaka et al., 2007). Again, this protein doesn't seem to play an essential role into bacterial survival because its expression was only increased at the lethal dose.

Thus, the results obtained in this study are the first time presented in the literature. It was found that irradiation treatment at different doses could significantly change the expression levels of seven proteins or enzymes such as rhamnolokinase, glycerol kinase, hypothetical protein Z2695, preprotein translocase subunit SecD, DNA polymerase III subunits gamma and tau, choline transport protein-BetT and primosome assembly protein-PriA. It should be emphasized here that the functions of these expressed proteins are not related to known HSPs such as DnaK, GroES, GroEL, etc. Moreover, in this study, the changes in the HSPs of *E. coli* could not be detected. It is possible that their expression levels were in low concentrations and were lower than the detection limit of CE. In future research, other methods such as 2D- electrophoresis, Western blot and knock out of each of the proteins explored in this study should be conducted to asses if these proteins might be a key to bacteria survival during irradiation.

In conclusion, the expressed protein profiles of *E. coli* at different doses of irradiation treatment were studied. There is one unique protein, the bacteriophage N4 adsorption protein B (MW of 85.2 kDa) for which the expression level was not significantly changed ($p \geq 0.05$) at different doses of irradiation treatment. This protein could be an essential protein for the survival of *E. coli* during γ -irradiation treatment. Moreover, it was also found that seven proteins (MW of 54.0, 56.8, 60.7, 66.5, 71.0, 75.7 and 81.5 kDa) of *E. coli* were statistically changed ($p < 0.05$) at different doses of irradiation treatment. These proteins are rhamnulokinase, glycerol kinase, hypothetical protein Z2695, preprotein translocase subunit SecD, DNA polymerase III subunits gamma and tau, choline transport protein-BetT and primosome assembly protein-PriA. The functions of these expressed proteins are not related to known HSPs such as DnaK, GroES, GroEL, etc. The research further confirmed that capillary electrophoresis is a useful method to separate and analyse the expressed proteins which may be related to the resistance or tolerance of food pathogen to γ -irradiation.

Materials and Methods

Bacterial strain and growth conditions

Escherichia coli O157:H7 str. EDL933 (Institut National de la Recherche Scientifique - Institut Armand Frappier, Laval, PQ, Canada) was sub cultured in tryptic soy broth (TSB; Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) at 37 °C for 24 h from the stock cultures maintained at -80 °C in TBS containing 20% glycerol. One millilitre of each culture was incubated through two successive incubations of 24 h at 37 °C in TSB to obtain approximately 10^9 CFU ml⁻¹. The cultures were centrifuged at 1300 g for 15 min., washed with sterilized NaCl 0.85% (w/v) and then resuspended in TSB (150 ml) and incubated at 37 °C for 24 h. After the last incubation of 3 h to obtain exponential growth phase, bacterial cultures were irradiated according to suitable dose.

Irradiation treatment

Bacterial cultures of *E. coli* O157:H7 were irradiated with doses of 0.36–0.44 kGy (mean, 0.40 kGy) to create damaged cells and 1.26–1.34 kGy (mean, 1.30 kGy) to kill cells (Caillet et al., 2005). A UC-15A irradiator (Nordion International Inc., Kanata, ON, Canada) equipped with a ⁶⁰Co source was used to deliver radiation at a dose rate of 18.27 kGy/h. This irradiator was certified by the National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, MD, USA), and the dose rate was established using a correction for decay of source. Amber Perspex 3042D (Atomic Energy Research Establishment, Harwell, Oxfordshire, UK) was used to validate the dose distribution. The radiation treatment was carried out at the Canadian Irradiation Centre (Laval, PQ, Canada) at room temperature (20 ± 1 °C).

Protein extraction

Immediately after irradiation or after the restoration of metabolic activity in VBNC state, 500 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 8670 *g* at 4°C and the resulting pellet was washed with 10 ml of sterilized NaCl 0.85% (wt/vol). Bacterial pellets were then resuspended with 5 ml of lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5); 0.1 mM NaCl; 0.5 mM phenylmethanesulfonyl fluoride; 1 mg/ml iodoacetamide] and 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 operated at speed 6 for 60 s. Then, the suspension was centrifuged at 2000 *g* for 10 min to remove the glass beads and unbroken cells. Samples were desalted by filtration using Amicon Ultra-4 Centrifugal Units (Millipore, Billerica, MA, USA) as per instructions of the manufacturer.

Protein quantification

Concentration of proteins extracted from the bacteria was quantified using Bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA) and procedure was followed as per the manufacturer's specifications. The absorbance was read at 562 nm using a DMS 100S spectrophotometer (Varian Canada Inc., Mississauga, ON, Canada). Protein concentration of samples was calculated based on standard curve of bovine serum albumin (BSA).

Capillary electrophoresis

Protein expression was analyzed using ProteomeLab SDS-Gel MW Analysis Kit and performed on the capillary electrophoresis (CE) system of ProteomeLab™ PA 800 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA). CE was used due to its many advantages: high speed, automation, low sample consumption. This “dynamic sieving” electrophoresis provides separation of macromolecules according to the molecular weight. Bare-fused silica capillary (30 cm total length, 50 µm i.d.) was used. A commercially available sieving polymer, sodium lauryl sulfate (SDS) was applied for separation of proteins on the basis of their molecular weight. The run buffer of the SDS-Gel Molecular Weight Analysis kit (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA) contains a hydrophilic polymer providing a sieving range from 10000 to 225000 Da. This polymer was rinsed from the capillary by pressure between each run with the help of 0.1 M NaOH (1 min) and deionized water (2 min). Proteins pellets were resuspended in the SDS sample buffer (1% SDS, 100 mM Tris-HCl pH 9.0) to obtain a final concentration of 1 mg ml⁻¹. Electrokinetic injection (5.0 kV, 20 s) was used for each sample, the applied voltage was 15 kV (normal polarity) and the temperature of the system was stabilized at 25 °C. UV absorption was monitored with a diode array detector at 220 nm and a reference channel at 350 nm both with a bandwidth of 5 nm. A scan from 190 nm to 400 nm was also collected. An internal standard of

10 kDa was used in every experiment. For estimation of molecular weights of proteins the SDS-Gel Molecular Weight (MW) Analysis Kit (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA) was used. The use of the electrophoretic mobility (μ) instead of the relative migration time is more precise in capillary electrophoresis. Mobility is calculated as the apparent mobility (μ_{app}) minus the contribution of electroosmotic flow (μ_{eof}). Once the mobility of a reference analyte has been determined, the mobility of related analytes can be calculated with this equation:

$$\mu = L_d \times L_t \left(\frac{1}{V \times t} - \frac{1}{V_{ref} \times t_{ref}} \right) + \mu_{ref}$$

where V is the average applied voltage up to the migration time of the peak of interest, L_d is the capillary length to detector, L_t is the total capillary length, t_{ref} is the migration time of reference peak in the current run, μ_{ref} is the defined mobility for the reference peak, V_{ref} is the average applied voltage up to migration time of reference peak and t is the migration time of the peak of interest.

In this study, the wavelength of 220 nm was applied for detection of protein as suggested by Huck and Bonn, (2008) and Dolnik (1999) because at this wavelength, the protein absorption is more proportional to the number of peptide bonds (Dolnik 1999; Huck and Bonn 2008). Moreover, to determine the molecular weight (MW) of different peaks expressed in an electropherogram, a calibration curve of electrophoretic mobility against the MW was used. This calibration curve had a coefficient of determination of 0.998.

Protein determination

As the genome of *E. coli* O157:H7 EDL933 (which was used in this study) has been sequenced and is available on PubMed (15), *in silico* studies were done to determine expressed proteins in *E. coli* based on the MW of detected peak in the electropherograms recorded by CE.

Statistical analysis

Student's *t* test was utilized and differences between means were considered significant at $p < 0.05$. Stat-Packets Statistical Analysis software (SPSS Base 18.0, SPSS Inc., Chigaco, Ill.) was used for the analysis of CE. Each sample was prepared in triplicate and injected three times.

Acknowledgements

The authors are grateful to Nordion International Inc. for the irradiation operations and to Pr. Éric Déziel for the participation in the elaboration of hypothesis and the use of his material. This research was supported by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada, Discovery Program. K.T. is a Fellowship recipient of the Fondation Armand- Frappier.

CHAPITRE 4

ARTICLE 3: EVALUATION OF GENE EXPRESSION OF HEAT SHOCK PROTEIN IN γ -IRRADIATED FOODBORNE PATHOGENS *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 USING RT-PCR

Évaluation de l'expression des gènes codant pour des protéines de choc thermique dans le pathogène alimentaire *Escherichia coli* O157 :H7 irradié aux rayons gamma et analysé par RT-PCR

Karine Trudeau¹, Khanh Dang Vu¹, François Shareck², Monique Lacroix¹

¹ INRS-Institut Armand-Frappier, Laboratoire de recherche en sciences appliquées à l'alimentation, 531 boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7

² INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7

Contribution des auteurs

Karine Trudeau a réalisé les manipulations et la rédaction de l'article. Elle a aussi participé à élaborer les hypothèses

Khanh Dang Vu a contribué à la rédaction de l'article et à la correction de l'article

François Shareck : co-directeur de recherche, élaboration des stratégies de recherche

Monique Lacroix : directrice de recherche, responsable scientifique et coordonatrice du projet de recherche, a participé à la planification des expériences et à la correction de l'article.

L'article sera soumis dans le journal Applied and Environmental Microbiology (AEM)

Résumé

L'expression de sept gènes (*clpB*, *dnaK*, *groES*, *grpE*, *htpG*, *htpX*, *ibpB*) codant pour des protéines de choc thermique (PTC) dans *E. coli* O157:H7 irradiée à différentes doses d'irradiation a été étudiée à différents temps post-irradiation (0-120 min) à l'aide du PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR). Les résultats montrent que l'expression des protéines de choc thermique chez *E. coli* irradiée à la dose sensibilisation de 0,4 kGy, évolue très rapidement dans le temps (0-120 min) et il s'agit d'un processus très dynamique. De plus, il y avait une diminution de l'expression génique pour tous les gènes étudiés 120 minutes post-irradiation. Les gènes *groES*, *grpE* et *ibpB* étaient plus exprimés à la dose létale (1,3 kGy) qu'à la dose sensibilisation de 0,4 kGy. Cette étude a également démontré chez *E. coli*, que l'expression de gènes codant pour les protéines de choc thermique ClpB, DnaK, GroES, GrpE, HtpG, HtpX et IbpB lors de l'irradiation gamma est très différente de l'expression de ces gènes lors d'un choc thermique.

Abstract

The expression of seven genes (*clpB*, *dnaK*, *groES*, *grpE*, *htpG*, *htpX*, *ibpB*) encoding heat shock proteins (Hsps) in *E. coli* O157:H7 irradiated at different doses was studied using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). When *E. coli* cells were irradiated at the sensitive dose of 0.4 kGy, the role of heat shock proteins was found as a very dynamic process and evolved very rapidly. Moreover, there was a decrease in gene expression for all the genes studied during post-irradiation time of 120 min. Moreover, *groES*, *grpE* and *ibpB* were more upregulated at the lethal dose (1.3 kGy) as compared to that at the sensitive dose. It is speculated that there were more damaged proteins during irradiation at the lethal dose and this dose caused more expression in heat shock proteins which contributed as damage reparation. This study also demonstrated that the expression of genes encoding Hsps in *E. coli* by irradiation treatment is different from that of heat shock treatment.

Keywords: gene expression, heat shock proteins, *E. coli*, irradiation, qRT-PCR

Introduction

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 is a foodborne pathogen that causes enteric infections such as hemorrhagic colitis. The bacteria can also produce a Shiga toxin (Stx) into the intestine that acts on sensitive cells in the kidneys, brain and other organs and cause the haemolytic uremic syndrome (HUS) (Ferens et al., 2011). The symptoms of HUS are hemolytic anemia, acute renal failure and thrombocytopenia (Banatvala et al., 2001).

In order to prevent foodborne illness caused by harmful microorganisms such as *E. coli* O157:H7, food irradiation is one of the most effective processes to eliminate foodborne pathogens (Monk et al., 1995). Often referred to as a cold pasteurization treatment, food irradiation does not cause significant loss of nutrients and sensory qualities in food and utilizes a source of ionizing radiation that passes through food and destroy harmful bacteria as well as other organisms without increasing food temperature (Wood et al., 2000).

It is known that the most primitive mechanism of cellular protection involves the expression of a polypeptide family named heat shock or stress proteins (Hsps). Some of these Hsps are present in unstressed cells and play an important role in the folding and translocation of polypeptides across membranes and therefore, they have been termed as molecular chaperones. Hsps are expressed in response to different stresses including hyperthermia, oxygen radicals, heavy metals, ethanol, and amino acid analogs (Schlesinger, 1990; De Maio, 1999; Feder et al., 1999). The genes encoding Hsps (*hsps*) are highly conserved and occur in every species in which they have been sought. Many of these genes and their products can be assigned to families on the basis of sequence homology and typical molecular weight: *hsp110*, *hsp100*, *hsp90*, *hsp70*, *hsp60*, *hsp40*, *hsp30*, *hsp10*, and small *hsp* families (Schlesinger 1990; Feder et al., 1999).

Carruthers et al. (2009) have investigated the effects of heat shock on gene expression profile (transcriptome analysis) of *E. coli* O157:H7 strain EDL933 using microarray, 111 down-regulated genes and 82 up-regulated genes were determined. Twenty-three additional genes located in O-islands were found to be differentially expressed. Moreover, some genes encoding Hsps such as *dnaK*, *dnaJ*, *groEL*, *groES*, and *grpE* were also up-regulated.

Irradiation treatment is one kind of stresses that can cause bacteria to express heat shock proteins (Hsps) or stress proteins (Caillet et al., 2008). However, it is not known if there are any difference in expression of genes encoding Hsps in *E. coli* O157:H7 strain EDL933 when treated by irradiation and by heat shock treatment. Moreover, the effect of post-irradiation time for RNA extraction on the expression of genes encoding Hsps remains unknowns. Therefore, the objective of this study was to analyse the expression of six genes encoding Hsps such as *clpB*, *dnaK*, *groES*, *grpE*, *htpG*, *htpX*, *ibpB* in *E. coli* O157:H7 strain EDL933 after irradiation treatments using quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR).

Materials and Methods

Bacterial strain and growth conditions

Escherichia coli O157:H7 str. EDL933 (Institut National de la Recherche Scientifique - Institut Armand Frappier, Laval, PQ, Canada) was sub cultured in tryptic soy broth (TSB; Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) at 37 °C for 24 h from the stock cultures maintained at -80 °C in TBS containing 20% glycerol. One millilitre of each culture was incubated through two successive incubations of 24 h at 37 °C in TSB to obtain approximately 10⁹ CFU ml⁻¹. The cultures were centrifuged at 1300 g for 15 min., washed with sterilized NaCl 0.85% (w/v) and

then resuspended in TSB (150 ml) and incubated at 37 °C for 24 h. After the last incubation of 3 h to obtain exponential growth phase, bacterial cultures were irradiated according to suitable dose. In order to obtain a viable but non culturable cells state after irradiation, cell cultures of *E. coli* O157:H7 were then incubated at 37 °C for 5 days to permit the restoration of metabolic activity. Since no VBNC was found for *E. coli* O157:H7 at exponential growth phase no protein and RNA extraction were done.

Irradiation treatment

Bacterial cultures of *E. coli* O157:H7 were irradiated with doses of 0.36–0.44 kGy (mean, 0.40 kGy) to create damaged cells and 1.26–1.34 kGy (mean, 1.30 kGy) to kill cells (Caillet et al., 2005). A UC-15A irradiator (Nordion International Inc., Kanata, ON, Canada) equipped with a ⁶⁰Co source was used to deliver radiation at a dose rate of 18.27 kGy/h. This irradiator was certified by the National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, MD, USA), and the dose rate was established using a correction for decay of source. Amber Perspex 3042D (Atomic Energy Research Establishment, Harwell, Oxfordshire, UK) was used to validate the dose distribution. The radiation treatment was carried out at the Canadian Irradiation Centre (Laval, PQ, Canada) at room temperature (20 ± 1 °C).

RNA isolation and q-RT-PCR

Immediately after irradiation treatment, 1 ml of cells were quickly added to 1 ml of RNAprotect Bacteria Reagent (Qiagen, Valencia, CA), vortexed 5 s and incubated at room temperature for 5 min. Then, we centrifuged at 5000 g for 5 min to recover the pellet. RNA was isolated from samples using the E.Z.N.A. Bacterial RNA Kit (Omega Bio-Tek Inc., Norcross, GA) following the lysis and digestion kit protocol. Each sample was treated with RNA-free DNase (Omega Bio-Tek

Inc., Norcross, GA). The quantity and purity were determined using an ND 1000 spectrophotometer (Nanodrop, Wilmington, DE). Samples were determined to be free of contaminating genomic DNA by the absence of a band on a DNA electrophoresis gel after 40 rounds of PCR. Realtime quantitative PCR was performed using the qScript One-Step SYBR green qRT-PCR kit (Quanta BioSciences, Gaithersburg, MD) with the Rotor-gene 3000 (Corbett Life Science) with 1 cycle of 50°C for 10 min, 1 cycle of 95°C for 5 min followed by 40 cycles at 95°C for 10 s and 60°C for 20 s. Modulation of gene expression from quantitative real-time PCR was analyzed using the $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ method (Livak et al., 2001) and normalized to rpho expression and the primers used are presented in table 4.1.

Table 4.1: Primers used for q-RT-PCR

Genes	Sequences	T _m (°C)
<i>clpB</i> -F	GGT GCG CGT TCT TAA TCT TTG CGA	60.2
<i>clpB</i> -R	CCT CCA CGC ATT TGT TCA ATC GCT	60.2
<i>dnak</i> -F	TGG TGG TCA GAC TCG TAT GCC AAT	60.1
<i>dnak</i> -R	ATT GCT ACA GCT TCG TCC GGG TTA	60.3
<i>groES</i> -F	TCG TCC ATT GCA TGA TCG CGT G	58.2
<i>groES</i> -R	TGC AGA GCC GGT CAG AAC GA	58.8
<i>grpE</i> -F	TGC ATA ATG CCC AGT ACG TT	59.1
<i>grpE</i> -R	GGA TAT GTC TGC GAT GGT TG	59.0
<i>htpG</i> -F	GAA GAG AAA GAC GGC GAA AC	59.1
<i>htpG</i> -R	GGT CAG CGG ATC GTT AAA AT	59.1
<i>htpX</i> -F	ACG TTT ATC CAG CGG CGG GT	58.8
<i>htpX</i> -R	GAA CCG CAA GAA GCA ACC AGC A	58.6
<i>ibpB</i> -F	TCT TTT GGC TGC TCC GGC GT	59.3
<i>ibpB</i> -R	GCA CTG CAA AAC GCC GGT GA	59.0
<i>rpoH</i> -F	TCG TCA AAG TTG CGA CCA CCA AAG	60.0
<i>rpoH</i> -R	ATC GTC GTC GGA AGA CAG GTC AAA	60.0

Statistical analysis

Student's *t* test was utilized and differences between means were considered significant at $p < 0.05$. Stat-Packets Statistical Analysis software (SPSS Base 18.0, SPSS Inc., Chigaco, Ill.). Each sample was prepared in triplicate and injected three times. ANOVA tests were performed to assess that *rpho* expression is stable and therefore can be used as an internal control gene to normalize data.

Results

Fig. 4.1 shows the heat shock protein genes response to the sensitive irradiation treatment depending on RNA extraction time post irradiation. In fig. 4.1, the scale of the y-axis means that from 0 to 1 there is a decrease of gene expression, at 1 there is no changes in gene expression and values greater than 1 means an increase in the expression.

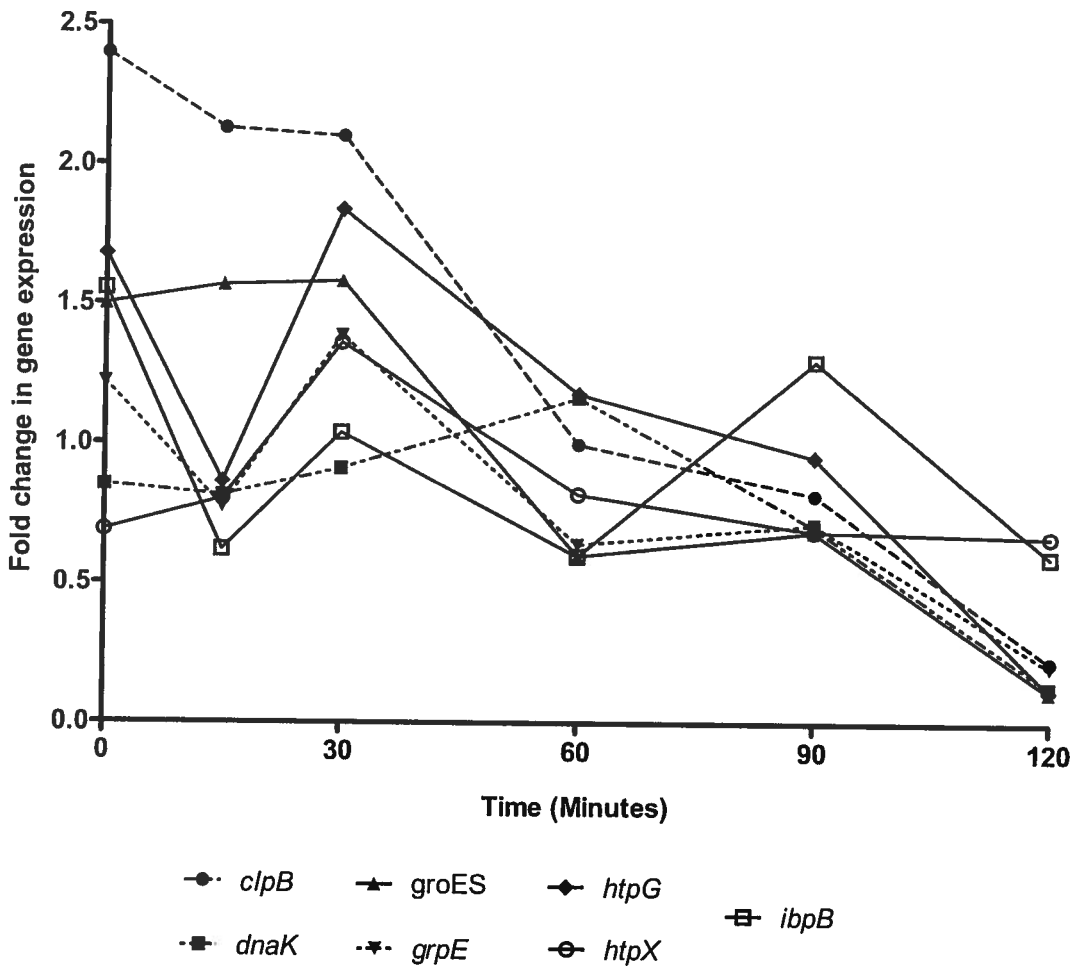


Figure 4.1: Responses of gene expressions of *E. coli* O157:H7 for the irradiation treatment at a sensitive dose.

Immediately after irradiation, *dnaK* and *htpX* genes are downregulated while *clpB*, *groES*, *grpE*, *htpG* and *ibpG* genes are upregulated. The expression of *clpB* and *groES* decreases with time. For *dnaK*, there is an upregulation after 1 hour then the expression decreases. During the initial 0-30 min, the pattern of expression is almost the same for *grpE*, *htpG* and *ibpB*. After 30 min, the expression *htpG* decreases more slowly than the expression of *grpE* and *ibpB* shows another increase of expression at 90 min. Finally, at zero min *htpX* is downregulated, at 30 min it is upregulated and after the expression decreases with time.

Fig. 4.2 shows the growth of *E. coli* with and without irradiation treatment at a sensitive dose from which RNA was collected. The irradiation treatment decreases bacteria culture of 1.5 log and after 30 min we can see an increase of 0.7 log. For the non irradiated culture, there is almost no growth during 2 hours.

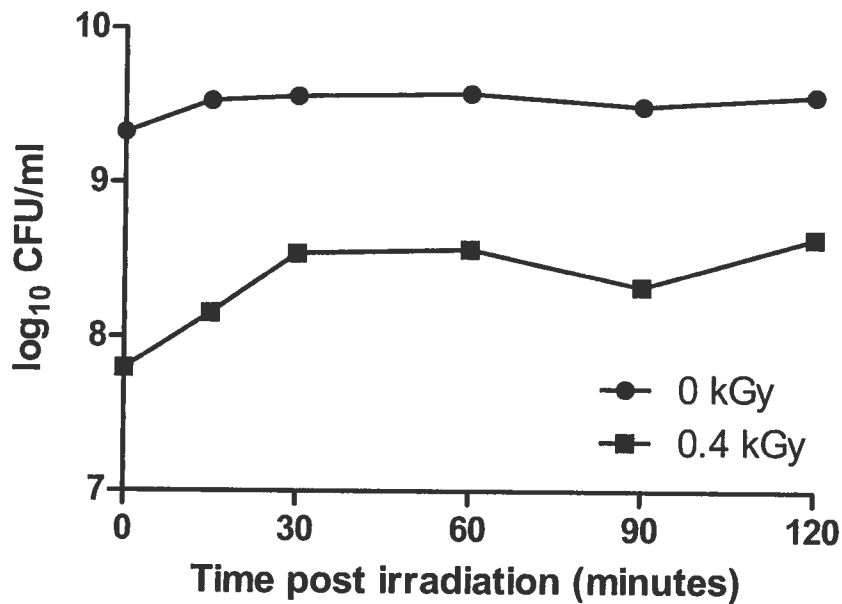


Figure 4.2: Amount of bacteria *E. coli* O157:H7 during RNA extraction for the control and after the irradiation treatment at a sensitive dose.

In fig. 4.3, the scale of the y-axis means that for negative values there is a decrease of gene expression, at 1 there is no change in gene expression and values greater than 1 mean an increase in the expression. In fig. 4.3 we can see the fold change in gene expression for *E. coli* irradiated at sensitive dose and lethal dose. The expression of *clpB*, *groES*, *grpE*, *ibpB* and *htpG* are upregulated. The expression of *htpX* and *dnaK* are downregulated. At lethal dose, *groES*, *grpE* and *ibpB* are more upregulated than at sensitive dose ($p < 0.009$, $p < 0.02$ and $p < 0.03$, respectively).

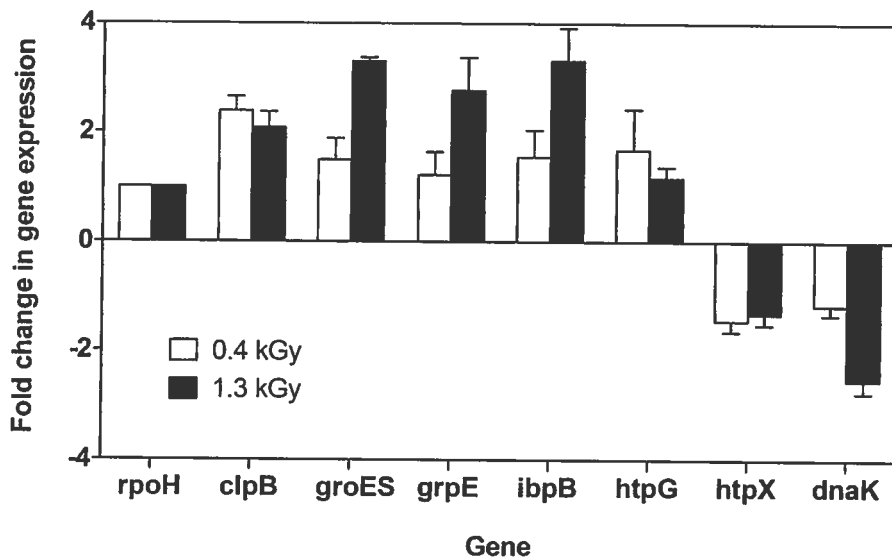


Figure 4.3: Responses of gene expressions of *E. coli* O157:H7 for the irradiation treatment at a sensitive dose (0.4 kGy) and lethal dose (1.3 kGy).

Discussion

Although the role of each heat shock protein is well known, their involvement in the gamma irradiation of foodborne pathogens has not yet been shown in the literature. In light of our experiences, we can now see the involvement of heat shock proteins. One of the first observations in fig. 4.1 is that the role of heat shock proteins is a very dynamic process and that it is evolving very rapidly. First, *clpB* gene encodes for an approximate 100 kDa protein, ClpB which is a protein disaggregation chaperone (Zolkiewski, 2006). Immediately after irradiation treatment, this gene is quickly expressed and its expression decreases over time. This protein seems to be able to quickly target unfold and misfolded proteins and to disaggregate them. This intervention of ClpB could prevent more damage into the bacteria and its role should be investigated further in order to assess if this protein is essential for the survival of the bacteria. Next, *dnaK* gene encodes for an approximate 70 kDa heat shock protein. This molecular chaperone assists in the folding of nascent polypeptide chains and refolding of misfolded proteins (Acebron et al. 2009). It can be found that *dnaK* gene was only recruited and used at one hour during post-irradiation (fig. 4.1). The third gene in fig. 4.1 is the *groES* gene coding for the co-chaperonine GroES of the chaperonine GroEL. This co-chaperonine binds to one or both ends of the GroEL double barrel in the presence of adenine nucleotides capping it and is used 30 min after irradiation. Because the GroEL/GroES system is a widely used chaperonine system, this might explain why *dnaK* gene is expressed one hour after irradiation. The next gene is *grpE*, coding for the heat shock protein GrpE. It should be noted that this gene is more expressed at 0 and 30 min because its function is the adenine nucleotide exchange factor of DnaK. The *htpG* gene is coding for a 90 kDa heat shock protein. This molecular chaperone is expressed at 0, 30 and 60 min and seems to be the most expressed molecular chaperone. Another heat shock protein expressed after irradiation is the metalloprotease HtpX encoded by

htpX. This protein is only useful after 30 min. Finally, *ibpB* is coding for the small heat shock protein *IbpB*. This molecular chaperone responsible for the protein turnover is expressed at many different moments: 0, 30 and 90 min. One explanation for the low expression of *dnaK*, *grpE*, *htpG*, *htpX* and *ibpB* at 15 min is that the protein express immediately after irradiation were misfold and ClpB degraded them. It is noteworthy to point out that there are a lot of fold change in gene expression occurring immediately after irradiation so it could be relevant to perform microarray at time 0 min post irradiation. Also, there is a decrease of gene expression over time for all the genes studied.

In addition to the ARN extraction performed at different times post irradiation we did a bacterial growth curve for the control and the bacteria irradiated at sensitive dose (see fig. 4.2). First, it shows that we have a large number of cells to realize the ARN extraction. Also, we can see that irradiation treatment at sensitive dose reduces bacteria of 1.5 log and there is an increase of 0.7 log only 30 min after irradiation treatment.

In fig. 4.3 it is worth noting that only *clpB*, *groES*, *grpE*, *ibpB* and *htpG* genes are upregulated because in a classical heat choc response in *E. coli* O157:H7 all heat choc genes are upregulated (Carruthers et al., 2009). This therefore provides evidence that irradiation induces molecular changes that are different than the heat shock. Of course, metabolic function of each gene should be investigated by doing knock out of the genes into *E. coli* O157:H7. The fact that the expression of *htpX* and *dnaK* is downregulated could mean that these genes may have another as yet undefined role into *E. coli* O157:H7. In fig. 4.3 we can also see that at lethal dose, *groES*, *grpE* and *ibpB* are more upregulated than at sensitive dose ($p < 0.009$, $p < 0.02$ and $p < 0.03$, respectively). We can hypothesize that there are more protein damage during irradiation at a lethal dose and that these heat shock proteins are more expressed and used to try to repair the damage.

In conclusion, gene expression of seven genes encoding heat shock proteins in *E. coli* O157:H7 irradiated at different doses were studied. When irradiated at sensitive dose, the role of heat shock proteins is a very dynamic process that is evolving very rapidly and it could be relevant to perform microarray at time 0 min post irradiation. Also, there is a decrease of gene expression over time for all the genes studied. We also show that irradiation induced molecular changes that are different than molecular changes during heat shock. Finally, *groES*, *grpE* and *ibpB* are more upregulated at lethal dose than at sensitive dose and we hypothesize that there are more protein damages during irradiation at a lethal dose and that these heat shock proteins are more expressed and used to try to repair the damage.

Acknowledgements

The authors are grateful to Nordion International Inc. for the irradiation operations and Pr. Éric Deziel for the help. This research was supported by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada, Discovery Program. K.T. is a Fellowship recipient of the Fondation Armand- Frappier.

Références

- Acebron, S. P., I. Martin, U. del Castillo, F. Moro and A. Muga (2009). "DnaK-mediated association of ClpB to protein aggregates. A chaperone network at the aggregate surface." FEBS Lett **583**(18): 2991-6.
- Allerberger, F. and M. Wagner (2009). "Listeriosis: a resurgent foodborne infection." Clin Microbiol Infect **16**(1): 16-23.
- Banatvala, N., P. M. Griffin, K. D. Greene, T. J. Barrett, W. F. Bibb, J. H. Green and J. G. Wells (2001). "The United States National Prospective Hemolytic Uremic Syndrome Study: microbiologic, serologic, clinical, and epidemiologic findings." J Infect Dis **183**(7): 1063-70.
- Battista, J. R. (2000). "Radiation resistance: the fragments that remain." Curr Biol **10**(5): R204-5.
- Bula, C. J., J. Bille and M. P. Glauser (1995). "An epidemic of food-borne listeriosis in western Switzerland: description of 57 cases involving adults." Clin Infect Dis **20**(1): 66-72.
- Burrell, A. D., P. Feldschreiber and C. J. Dean (1971). "DNA-membrane association and the repair of double breaks in x-irradiated *Micrococcus radiodurans*." Biochim Biophys Acta **247**(1): 38-53.
- Caillet, S. and M. Lacroix (2006). "Effect of gamma radiation and oregano essential oil on murein and ATP concentration of *Listeria monocytogenes*." J Food Prot **69**(12): 2961-9.
- Caillet, S., M. Millette, D. Dussault, F. Shareck and M. Lacroix (2008). "Effect of gamma radiation on heat shock protein expression of four foodborne pathogens." J Appl Microbiol **105**(5): 1384-91.
- Caillet, S., F. Shareck and M. Lacroix (2005). "Effect of gamma radiation and oregano essential oil on murein and ATP concentration of *Escherichia coli* O157:H7." J Food Prot **68**(12): 2571-9.
- Caillet, S., L. Ursachi, F. Shareck and M. Lacroix (2009). "Effect of gamma radiation and oregano essential oil on murein and ATP concentration of *Staphylococcus aureus*." J Food Sci **74**(9): M499-508.
- Carruthers, M. D. and C. Minion (2009). "Transcriptome analysis of *Escherichia coli* O157:H7 EDL933 during heat shock." FEMS Microbiol Lett **295**(1): 96-102.

- CDC (2009). "Surveillance for foodborne disease outbreaks - United States, 2006." MMWR Morb Mortal Wkly Rep **58**(22): 609-15.
- Clark, C. G., J. Farber, F. Pagotto, N. Ciampa, K. Dore, C. Nadon, K. Bernard and L. K. Ng (2010). "Surveillance for *Listeria monocytogenes* and listeriosis, 1995-2004." Epidemiol Infect **138**(4): 559-72.
- Cox, M. M. and J. R. Battista (2005). "*Deinococcus radiodurans* - the consummate survivor." Nat Rev Microbiol **3**(11): 882-92.
- Daly, M. J. (2009). "A new perspective on radiation resistance based on *Deinococcus radiodurans*." Nat Rev Microbiol **7**(3): 237-45.
- Das, A., J. Hugenholtz, H. Van Halbeek and L. G. Ljungdahl (1989). "Structure and function of a menaquinone involved in electron transport in membranes of *Clostridium thermoautotrophicum* and *Clostridium thermoaceticum*." J Bacteriol **171**(11): 5823-9.
- De Maio, A. (1999). "Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams." Shock **11**(1): 1-12.
- Devriese, L. A. (1984). "A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from animal species." J Appl Bacteriol **56**(2): 215-20.
- Diep, B. A., S. R. Gill, R. F. Chang, T. H. Phan, J. H. Chen, M. G. Davidson, F. Lin, J. Lin, H. A. Carleton, E. F. Mongodin, G. F. Sensabaugh and F. Perdreau-Remington (2006). "Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." Lancet **367**(9512): 731-9.
- Dolnik, V. (1999). "Recent developments in capillary zone electrophoresis of proteins." Electrophoresis **20**(15-16): 3106-15.
- Drevets, D. A. and M. S. Bronze (2008). "*Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion." FEMS Immunol Med Microbiol **53**(2): 151-65.
- Ericsson, H., A. Eklow, M. L. Danielsson-Tham, S. Loncarevic, L. O. Mentzing, I. Persson, H. Unnerstad and W. Tham (1997). "An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout." J Clin Microbiol **35**(11): 2904-7.
- Farber, J. M. and P. I. Peterkin (1991). "*Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen." Microbiol Rev **55**(3): 476-511.

- Feder, M. E. and G. E. Hofmann (1999). "Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology." Annu Rev Physiol **61**: 243-82.
- Ferens, W. A. and C. J. Hovde (2011). "*Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection." Foodborne Pathog Dis **8**(4): 465-87.
- Frees, D., A. Chastanet, S. Qazi, K. Sorensen, P. Hill, T. Msadek and H. Ingmer (2004). "Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*." Mol Microbiol **54**(5): 1445-62.
- Gandhi, M. and M. L. Chikindas (2007). "*Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive." Int J Food Microbiol **113**(1): 1-15.
- Gilmour, M. W., M. Graham, G. Van Domselaar, S. Tyler, H. Kent, K. M. Trout-Yakel, O. Larios, V. Allen, B. Lee and C. Nadon (2010). "High-throughput genome sequencing of two *Listeria monocytogenes* clinical isolates during a large foodborne outbreak." BMC Genomics **11**: 120.
- Goloubinoff, P., A. Mogk, A. P. Zvi, T. Tomoyasu and B. Bukau (1999). "Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(24): 13732-7.
- Gottesman, S., S. Wickner and M. R. Maurizi (1997). "Protein quality control: triage by chaperones and proteases." Genes Dev **11**(7): 815-23.
- Gray, M. L. and A. H. Killinger (1966). "*Listeria monocytogenes* and listeric infections." Bacteriol Rev **30**(2): 309-82.
- Grimsley, J. K., C. I. Masters, E. P. Clark and K. W. Minton (1991). "Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of DNA double-strand breakage and repair in *Deinococcus radiodurans* and a radiosensitive mutant." Int J Radiat Biol **60**(4): 613-26.
- Grueninger, D. and G. E. Schulz (2006). "Structure and reaction mechanism of L-rhamnulose kinase from *Escherichia coli*." J Mol Biol **359**(3): 787-97.
- Gutman, P. D., P. Fuchs, L. Ouyang and K. W. Minton (1993). "Identification, sequencing, and targeted mutagenesis of a DNA polymerase gene required for the extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans*." J Bacteriol **175**(11): 3581-90.
- Harris, D. R., M. Tanaka, S. V. Saveliev, E. Jolivet, A. M. Earl, M. M. Cox and J. R. Battista (2004). "Preserving genome integrity: the DdrA protein of *Deinococcus radiodurans* R1." PLoS Biol **2**(10): e304.

- Herold, M., G. A. Ross, R. Grimm and D. N. Heiger (1996). "Separation of peptides and protein digests by capillary electrophoresis." Methods Mol Biol **52**: 285-308.
- Huck, C. W. and G. K. Bonn (2008). "Analysis of proteins by capillary electrophoresis." Methods Mol Biol **384**: 507-40.
- Hutchinson, F. (1966). "The molecular basis for radiation effects on cells." Cancer Res **26**(9): 2045-52.
- Hutchinson, F. (1978). "Workshop summary: DNA strand break repair in eukaryotes." Mol Cell Biol **9**: 457-463.
- Iyer, R. R., A. Pluciennik, V. Burdett and P. L. Modrich (2006). "DNA mismatch repair: functions and mechanisms." Chem Rev **106**(2): 302-23.
- Jacquet, C., B. Catimel, R. Brosch, C. Buchrieser, P. Dehaumont, V. Goulet, A. Lepoutre, P. Veit and J. Rocourt (1995). "Investigations related to the epidemic strain involved in the French listeriosis outbreak in 1992." Appl Environ Microbiol **61**(6): 2242-6.
- Kiino, D. R. and L. B. Rothman-Denes (1989). "Genetic analysis of bacteriophage N4 adsorption." J Bacteriol **171**(9): 4595-602.
- Kitayama, S. a. M. A. (1971). "Double-strand scissions in DNA of gamma-irradiated *Micrococcus radiodurans* and their repair during postirradiation incubation." Agric. Biol. Chem. **35**: 644-652.
- Kloos, W. E. (1980). "Natural populations of the genus *Staphylococcus*." Annu Rev Microbiol **34**: 559-92.
- Krasin, F. and F. Hutchinson (1977). "Repair of DNA double-strand breaks in *Escherichia coli*, which requires recA function and the presence of a duplicate genome." J Mol Biol **116**(1): 81-98.
- Kustos, I., B. Kocsis, I. Kerepesi and F. Kilar (1998). "Protein profile characterization of bacterial lysates by capillary electrophoresis." Electrophoresis **19**(13): 2317-23.
- Kvint, K., L. Nachin, A. Diez and T. Nystrom (2003). "The bacterial universal stress protein: function and regulation." Curr Opin Microbiol **6**(2): 140-5.
- Le Loir, Y., F. Baron and M. Gautier (2003). "*Staphylococcus aureus* and food poisoning." Genet Mol Res **2**(1): 63-76.

- Le Monnier, A. and A. Leclercq (2009). "[*Listeria* and listeriosis: from farm to fork]." Pathol Biol (Paris) **57**(1): 17-22.
- Levin-Zaidman, S., J. Englander, E. Shimoni, A. K. Sharma, K. W. Minton and A. Minsky (2003). "Ringlike structure of the *Deinococcus radiodurans* genome: a key to radioresistance?" Science **299**(5604): 254-6.
- Lim, J. Y., J. Yoon and C. J. Hovde (2010). "A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157." J Microbiol Biotechnol **20**(1): 5-14.
- Linnan, M. J., L. Mascola, X. D. Lou, V. Goulet, S. May, C. Salminen, D. W. Hird, M. L. Yonekura, P. Hayes, R. Weaver and et al. (1988). "Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese." N Engl J Med **319**(13): 823-8.
- Liu, W. Z., R. Faber, M. Feese, S. J. Remington and D. W. Pettigrew (1994). "*Escherichia coli* glycerol kinase: role of a tetramer interface in regulation by fructose 1,6-bisphosphate and phosphotransferase system regulatory protein IIIglc." Biochemistry **33**(33): 10120-6.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-8.
- Marles-Wright, J. and R. J. Lewis (2007). "Stress responses of bacteria." Curr Opin Struct Biol **17**(6): 755-60.
- McLauchlin, J., S. M. Hall, S. K. Velani and R. J. Gilbert (1991). "Human listeriosis and pate: a possible association." BMJ **303**(6805): 773-5.
- McLauchlin, J., G. L. Narayanan, V. Mithani and G. O'Neill (2000). "The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction." J Food Prot **63**(4): 479-88.
- Mead, P. S., L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin and R. V. Tauxe (1999). "Food-related illness and death in the United States." Emerg Infect Dis **5**(5): 607-25.
- Miettinen, M. K., A. Siitonen, P. Heiskanen, H. Haajanen, K. J. Bjorkroth and H. J. Korkeala (1999). "Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout." J Clin Microbiol **37**(7): 2358-60.
- Monk, J. D., L. R. Beuchat and M. P. Doyle (1995). "Irradiation inactivation of food-borne microorganisms." J Food Prot **58**(2): 197-208.

- Mortimer, R. K., D. Schild, C. R. Contopoulou and J. A. Kans (1991). "Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*." Methods Enzymol **194**: 827-63.
- Moseley, B. E. B. (1983). "Photobiology and radiobiology of *Micrococcus (Deinococcus) radiodurans*." Photochem. Photobiol. Rev. **7**: 223-274.
- Nouwen, N. and A. J. Driessen (2005). "Inactivation of protein translocation by cold-sensitive mutations in the yajC-secDF operon." J Bacteriol **187**(19): 6852-5.
- Omoe, K., M. Ishikawa, Y. Shimoda, D. L. Hu, S. Ueda and K. Shinagawa (2002). "Detection of seg, seh, and sei genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates Harboring seg, seh, or sei genes." J Clin Microbiol **40**(3): 857-62.
- Park, S. H., S. J. Lee, H. Y. Chung, T. H. Kim, C. K. Cho, S. Y. Yoo and Y. S. Lee (2000). "Inducible heat-shock protein 70 is involved in the radioadaptive response." Radiat Res **153**(3): 318-26.
- Pennington, H. (2010). "*Escherichia coli* O157." Lancet **376**(9750): 1428-35.
- Perna, N. T., G. Plunkett, 3rd, V. Burland, B. Mau, J. D. Glasner, D. J. Rose, G. F. Mayhew, P. S. Evans, J. Gregor, H. A. Kirkpatrick, G. Posfai, J. Hackett, S. Klink, A. Boutin, Y. Shao, L. Miller, E. J. Grotbeck, N. W. Davis, A. Lim, E. T. Dimalanta, K. D. Potamouisis, J. Apodaca, T. S. Anantharaman, J. Lin, G. Yen, D. C. Schwartz, R. A. Welch and F. R. Blattner (2001). "Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7." Nature **409**(6819): 529-33.
- Pradhan, A. K., R. Ivanek, Y. T. Grohn, R. Bukowski and M. Wiedmann (2011) "Comparison of public health impact of *Listeria monocytogenes* product-to-product and environment-to-product contamination of deli meats at retail." J Food Prot **74**(11): 1860-8.
- Santé Canada (2002) Code canadien de pratiques recommandé pour l'irradiation des aliments, Direction générale des produits de Santé et des aliments, Agence canadienne d'inspection des aliments, 15 p.
- Santé Canada (2004) Politique sur la présence de *Listeria monocytogenes* dans les aliments prêts à manger, Direction des aliments, Direction générale des produits de santé et des aliments, 21 p.

- Santé Canada (2008) Communication personnelle. Laboratoire de recherche sur la listériose et Service de référence pour la listériose, Direction des aliments, Bureau des dangers microbiens.
- Santé Canada (2010) *Listeria* et salubrité des aliments, Ministère de la Santé, 4 p.
- Schlech, W. F., 3rd, P. M. Lavigne, R. A. Bortolussi, A. C. Allen, E. V. Haldane, A. J. Wort, A. W. Hightower, S. E. Johnson, S. H. King, E. S. Nicholls and C. V. Broome (1983). "Epidemic listeriosis--evidence for transmission by food." N Engl J Med **308**(4): 203-6.
- Schlesinger, M. J. (1990). "Heat shock proteins." J Biol Chem **265**(21): 12111-4.
- Su, Y. C. and A. C. Wong (1995). "Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H." Appl Environ Microbiol **61**(4): 1438-43.
- Tanaka, T., T. Mizukoshi, K. Sasaki, D. Kohda and H. Masai (2007). "*Escherichia coli* PriA protein, two modes of DNA binding and activation of ATP hydrolysis." J Biol Chem **282**(27): 19917-27.
- Weis, J. and H. P. Seeliger (1975). "Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature." Appl Microbiol **30**(1): 29-32.
- Welshimer, H. J. (1960). "Survival of *Listeria monocytogenes* in soil." J Bacteriol **80**: 316-20.
- Welshimer, H. J. (1968). "Isolation of *Listeria monocytogenes* from vegetation." J Bacteriol **95**(2): 300-3.
- Wood, O. B. and C. M. Bruhn (2000). "Position of the American Dietetic Association: food irradiation." J Am Diet Assoc **100**(2): 246-53.
- Zimmerman, J. M. and J. R. Battista (2005). "A ring-like nucleoid is not necessary for radioresistance in the *Deinococcaceae*." BMC Microbiol **5**: 17.
- Zolkiewski, M. (2006). "A camel passes through the eye of a needle: protein unfolding activity of Clp ATPases." Mol Microbiol **61**(5): 1094-100.