UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ A

L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAITRISE EN MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE

PAR

PAULE DION

EFFETS DE LA VARIATION DU DÉBIT DE LA DOSE D'IRRADIATION SUR LA RADIORÉSISTANCE DE BACTÉRIES PATHOGENES DANS LES ALIMENTS.

MARS 1993

A mes Parents Pour leur soutien

TABLE DES MATIERES

-

TABL	E DES	MATIER	ES	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	iii
LIST	E DES	TABLEA	UX	•	•	•	•	•	•	•	•	•	٠	•	•	•	•	•	•	•	•	vi
LIST	E DES	FIGURE	s.	٠	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	vii
LISTI	E DES	ABRÉVI.	ATIO	NS		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	ix
SOMM	AIRE	• • •	•••	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	x
INTRO	DUCT	LON .	•••	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	1
REVUI	E BIBI	LIOGRAP	HIQU	Έ	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	٠	4
1.0	IRRAI	DIATION	DES	A	LI	ME	NT	S	•	•	•	•	•	•	•	•	٠	•	•	•	•	5
	1.1	Justif	icat	io	n	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	5
	1.2	Object.	ifs	et	a	va	nt	ag	es				•	•	•	•	•	•		•	•	6
	1.3	Défini	tion		•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	٠	•	•	8
	1.4	Rayonn	emen	ts	g	am	ma		•	•	•	•	•			•	٠	•	•	•	٠	. 9
	1.5	Cobalt	60	•	•	•	•	•	•	•	•	٠	•	٠	•	•	٠	•	٠	•	•	12
2.0	MODE	D'ACTI	D NC	E	L'	IR	RA	DI	АТ	IC	N	GA	MM	IA	•	•	•	•	•	٠	•	13
	2.1	Effets	dir	ec	ts																	13
		2.1.1		Ef	fe	t	ph	ot	oé	le	ct	ri	ຕນ	e	÷				Ĵ.		Ĵ.	13
		2.1.2		Ef	fe	÷	C0	mn	to	n										÷	Ţ.,	13
		2.1.3		Mo	de	ัล	/a	ct	in	n	•	•	•				•			•	•	15
	2 2	Fffote	ind	ir		te	u	00	10		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	17
	2.2	Effete	hio	10	ai	C 3	00	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	٠	•	•	•	10
	2.5	FILECS	DIO	10	91	чu	65		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	10
3.0	DOSES	5 D'IRR	ADIA	TI	ON		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	19
4.0	DÉBIT	DE LA	DOS	Ē	D'	IR	RA	DI	АТ	10	N	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	20
	4.1	Débit e	et r	ad	ic	au	х	1i	br	es									•		•	22
	4.2	Débit e	et e	ff	et	r	el	ié	à	1	10	xy	qè	ne	2							22
	4.3	Débit	et e	ff	ic	ac	it	é	dı	1 1	sv	st	èm	е	de	r	ér	ar	at	ic	n	
		de l'AI	DN.	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	23
5.0	BACTÍ	ÉRIES PA	атно	GE	NE	s	D'	OR	IG	IN	Έ	AL	IM	EN	TA	IR	RE	•		•	•	25
	5.1	Salmone	ella	t	vp	hi	mu	ri	um													26
	5.2	Staphy	loco	cc	US	а	ur	eu	S		-		2			÷		÷.				27
	5.3	Lister	ia m	on	oc	vt	oa	en	es	-	Ĩ									-		29
	5.4	Escher	ichi	a	co	11		15	7-	H7	-	-						Ē		Ī		30
	5.5	Vibrio	nar	ah	ae	m~	10	ti	CU	s												20
	5.6	Versin	ia e	nt	or	00	-1	1+	in	a												22
	5.7	Campyle	obac	te	r	je	111	ni		-			-					-				35
		Jamp I IC	- ~ u u		-	<u>_</u>	J	-					•	-	•			-				20

6.0	RADI	ORÉSISTANCE BACTÉRIENNE
	6.1	Radiorésitance attendue
	0.2	racteurs influençant la radioresistance
		bactérienne
		6.2.1 La température
		6.2.2 La guantité d'any dans le miliou 40
		C.2.2 Da quancité d'éau dans le milled . 40
		$6.2.3 \qquad L'oxygene \dots $
		6.2.4 La phase de croissance 41
MATE	RIEL	ET METHODES
1.0	ESPE	CES ET SOUCHES BACTÉRIENNES UTILISÉES 44
	1.1	Provenance
	1 2	Conservation AA
	1.0	
	1.3	verifications de la purete 4/
	1.4	Courbe de coissance
	1.5	Conditions de croissance des cultures en
		share one of the station of the stat
		phases exponentielle et stationnaire 50
2.0	TRAI	TEMENT DES BACTÉRIES PAR IRRADIATION 52
	0 1	Defendention des Schentillens 50
	2.1	Preparation des echantilions 52
	2.2	Irradiation 53
	2.3	Evaluation de la radiorésistance (DRD)
	2.5	Evaluation at la laatorebibeance (End) 55
3.0	ÉVAL	UATION DE LA DRD DANS LA VIANDE DE POULET 56
	2 1	Souchog hactórionneg utilicóeg
	2.1	Souches bacteriennes utilisees
	3.2	Origine des lots de poulet 56
	3.3	Préparation des échantillons
	3 4	Enreuve de stérilité 58
	0 F	
	3.5	Contamination artificience du poulet 58
	3.6	Préparation des échantillons 59
	3.7	Irradiation des échantillons
	2 0	
	3.0	
DECIT	TTATC	61
RESU.	DIAIS	
1 0		
1.0	ELLE	TS DO DEBIT DE LA DOSE D'IRRADIATION SUR LA
	RADI	ORESISTANCE DE BACTERIES PATHOGENES D'ORIGINE
	ALIM	ENTAIRE
	1.1	Radiorésistance bactérienne dans l'eau
		physiologique (0,85% NaCl) en fonction
		du débit de la dose
	1 0	
	1.2	Radioresistance pacterienne dans le poulet en
		fonction du débit de la dose d'irradiation 75
2 0	דתגם	
2.0	KADI	ORESISTANCE EN FONCTION DE LA PHASE DE
	CROI	SSANCE

iv

3.0	RADIO	DRÉSI ÉRIEI	ISTA NNE	NCE	• •	EN •		FO.	NCI		N .	• 1	DE •	•	L']	ESI	PE(CE •	82	
	3.1 3.2	List Staj	teri phyl	a mo ocoo	onoi ccui	cyto s au	ogei irei	nes us	; A At	тсс сс	19 13	911 565	1 v	/s.	17 GD:	A1 13	•	•	82 82	
DISC	USSIO	. R	• •	•	•		•	•	•	• •	•		•	•		•		•	83	
1.0	ANALY PHYSI BACTI	ISE IOLOC ÉRIES	Di GIQU SÉT	ES E UDIÍ	R (0, ÉES	ADI 85%	ORÉ	SI Na(ST# Cl)	ANCI	es En	•	DAI FON	NS CTI	ON	ь.	EZ DI	AU ES	84	
	1.1 1.2	Choi Effe 1.2	ix d et d .1	es k ébit I	baci de Déb:	téri e la it	ies a do de	ose	la	 d	los	e	et	•	: rad	lio	: cau	אנ	84 85	
		1.2.	. 2] I	lib: Déb:	res it	de	la	. d	 ose	d	/ i:	rra	dia	ti	on		et	85	
	1.3	Radi	ioré	s ist	syst cano	tème ces	e de o	e r bte	ép enu	ara Ies	tio e	on n	de fo	17) nct	ADA	v.	•	le	88	
	1 4	l'es Padi	spèc	e ba	acté	érie	enne	e. fo		 tio	n	de	• •	•	ha		•	•	90	
	T • 4	croi	lssa	nce.	•	• •	•••	•	•	•••	•	·	• •	•	•	•	•	•	94	
2.0	ANALY	(SE I	DES	RADI	IORÍ	ÉSIS	STAN	ICE	s	DAN	sī	JN	ALI	ME	NΤ	•	•	•	98	
	2.1 2.2 2.3	Choi Effe Radi	x d et d loré	e l' ébit sist	ali de and	imer 2 la ces	nt e a do dar	et ose 1s	de: le	s e po	spē ule	èce •t	sk	ac [.]	téi	∶i€ •	enr •	nes	98 99 100	
3.0	ANAL	(SE)	DES	RAD	IOF	ÉSI	STA	NC	ES	A	L'	IN	TÉR	IEU	R	D'	UN	VE 7S		
	DIFFÍ	İRENI	TES.	•••	·	• •		•	•	•••	•	•	• •	•	•	•	•	•	102	
CONCI	LUSION	1.		• •	•	• •	•	٠						•	•	•	•		104	
REMER	RCIEME	ents	• •		•		•	•	•					•	•			•	107	
BIBLI	OGRAI	PHIE			•			•		•••	•			•	•	•	•	•	110	
ANNEX	Æ.	• •	• •	• •	٠	• •	•	•	•	• •	•	•	• •	•	•	•	•	•	122	

î

v

LISTE DES TABLEAUX

Ĭ,

TABLEAU	1:	Conditions de croissance des souches utilisées	45
TABLEAU	II:	Milieux utilisés en fonction de l'espèce bactérienne	46
TABLEAU	III:	Radiorésistance (DRD) en kGy, des bactéries en phase exponentielle de croissance, en fonction du débit de la dose d'irradiation en eau physiologique (0,85% NaCl)	63
TABLEAU	IV:	Radiorésistance (DRD) en kGy, des espèces bactériennes en phase stationnaire de croissance, en fonction du débit de la dose d'irradiation en eau physiologique (0,85% NaCl)	64
TABLEAU	V:	Radiorésistance (DRD) en kGy, des bactéries en phase stationnaire de croissance, en fonction du débit de la dose d'irradiation dans un homogénat de poulet.	75

vi

LISTE DES FIGURES

FIGURE	1:	Le spectre électromagnétique	10
FIGURE	2:	Radiations ionisantes	11
FIGURE	3:	Mode d'action de l'irradiation	14
FIGURE	4:	Radioactivité: réaction (naturelle ou provoquée) au niveau du noyau, rendant la cible radioactive. (émettrice de rayonnements alpha, bêta ou gamma)	16
FIGURE	5:	Effet du débit de la dose d'irradiation sur <i>Listeria</i> monocytogenes 1A1 en phase exponentielle (E) et stationnaire (S).	66
FIGURE	6:	Effet du débit de la dose d'irradiation sur <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111 en phase exponentielle (E) et stationnaire (S).	67
FIGURE	7:	Effet du débit de la dose d'irradiation sur <i>Staphylococcus aureus</i> GD13 en phase exponentielle (E) et stationnaire (S).	68
FIGURE	8:	Effet du débit de la dose d'irradiation sur <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 13565 en phase exponentielle (E) et stationnaire (S).	69
FIGURE	9:	Effet du débit de la dose d'irradiation sur <i>Escherichia coli</i> ATCC 35150 en phase exponentielle (E) et stationnaire (S).	70
FIGURE	10:	Effet du débit de la dose d'irradiation sur <i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i> ATCC 14028 en phase exponentielle (E) et stationnaire (S).	71

vii

FIGURE 11:	Effet du débit de la dose d'irradiation sur <i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 23715 en phase exponentielle (E) et stationnaire (S).	72
FIGURE 12:	Effet du débit de la dose d'irradiation sur <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802 en phase exponentielle (E) et stationnaire (S).	73
FIGURE 13:	Effet du débit de la dose d'irradiation sur <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 29428 en phase exponentielle (E) et stationnaire (S).	74
FIGURE 14:	Effet du débit de la dose d'irradiation sur <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111 en phase stationnaire dans un homogénat de poulet.	76
FIGURE 15:	Effet du débit de la dose d'irradiation sur <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 en phase stationnaire dans un homogénat de poulet.	77
FIGURE 16:	Radiorésistance de différents pathogènes alimentaires irradiés à un débit de 0,78 kGy/h en fonction de la phase de croissance exponentielle (E) ou stationnaire (S).	79
FIGURE 17:	Radiorésistance de différents pathogènes alimentaires irradiés à un débit de 2,6 kGy/h en fonction de la phase de croissance exponentielle (E) ou stationnaire (S).	80
FIGURE 18:	Radiorésistance de différents pathogènes alimentaires irradiés à un débit de 22 kGy/h en fonction de la phase de croissance exponentielle (E) ou stationnaire (S).	81

-

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- ADN : acide désoxyribonucléique
- BHI : "Brain heart infusion"
- CAST : "Council for Agricultural Science and Technology"
- CRESALA: Centre de recherches en sciences appliquées à l'alimentation
- °C : degré Celcius
- D10Ouse de radiation requise pour réduire une
population microbienne de 90 % ou
d'une unité logarithmique.
- Gy : Gray. Unité d'énergie absorbée par la matière traitée aux radiations ionisantes. 1 Gy = 1 joule absorbée par kilogramme de matière traitée (Josephson et Peterson, 1983).
- h : heure
- IAEA : "International Atomic Energy Agency"
- KGy : Kilogray
- log : logarithmes décimaux
- MeV : Mégaélectronvolt
- NFA : "National Food Agency, USA
- TSA : "Trypticase soy agar"
- TSB : "Trypticase soy broth"
- UFC : unité formatrice de colonies

SOMMAIRE

Les maladies infectieuses d'origine alimentaire augmente continuellement dans le monde et touchent autant les pays industrialisés que sous-développés.

L'irradiation est un procédé de conservation alimentaire maintenant accepté, sous certaines conditions, au Canada, au États-Unis et dans une trentaine d'autres pays. On défini habituellement l'irradiation ionisante par le type, l'énergie et la dose totale absorbée autant que par le débit de la dose. Ce mémoire porte sur l'effet de la variation du débit de la dose d'irradiation sur des espèces bactériennes pathogènes d'origine alimentaire.

Les dénombrements des bactéries survivantes, sur milieux de culture solides, ne démontraient pas de différences significatives entre les débits de doses d'irradiation 0,78 kGy/h, 2,6 kGy/h et 22 kGy/h, et ce pour les deux phases de croissance étudiées dans l'eau physiologique (0,85% NaCl). Des résultats semblables étaient obtenus lorsque l'irradiation avait lieu aux mêmes débits, dans un homogénat de poulet, sur deux espèces bactériennes différentes en phase stationnaire de croissance. Nous avons aussi observé un effet variable et peu significatif de la phase de croissance sur la radiorésistance bactérienne. La radiorésistance était

variable en fonction des genres et espèces bactériens de même qu'à l'intérieur d'un genre donné pour des espèces différentes. Nous avons également mis en évidence l'influence du milieu d'irradiation sur la radiorésistance, ainsi de façon générale plus la complexité d'un milieu d'irradiation sera grande plus on devra s'attendre à des radiorésistances élevées. De plus l'effet protecteur important d'un milieu complexe, un homogénat de poulet dans le cas présent, a été démontré.

Ainsi, selon nos résultats, la variation du débit de la dose d'irradiation, par le cobalt 60, sur des espèces bactériennes pathogènes retrouvées dans les aliments n'a aucune influence sur leur radiorésistance. Ce phénomène est observé autant en milieu simple (non protecteur) qu'en milieu complexe (protecteur).

xi

INTRODUCTION

En 1981, un comité d'experts de l'Organisation pour l'alimentation et l'agriculture (OAA), l'Agence internationale de l'énergie atomique (AIEA) et l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a conclu que les aliments irradiés à une dose KGy inférieure à 10 ne représentaient aucun danger toxicologique et ne créaient aucun problème nutritif ou microbiologique comparativement à des aliments transformés selon des procédés traditionnels (Anderson, 1989). Ces conclusions sont acceptées par la Commission du Codex Alimentarius des Nations Unies qui en 1984 les intègre à la norme générale du Codex concernant les aliments irradiés (Chuaqui-Offermanns, 1984, Codex Alimentarius Commission, 1984). Le gouvernement canadien permet maintenant l'utilisation des rayons ionisants comme procédé de préservation et de conservation des aliments. De plus, depuis septembre 1987 l'utilisation commerciale de cette technologie ne requiert plus l'application de tests toxicologiques si la dose utilisée ne dépasse pas 10 KGy (Agriculture Canada, 1988). L'approbation doit néanmoins être obtenue du Ministère de la Santé et de Bien-être social Canada pour toute nouvelle application commerciale du procédé (Mills, 1987).

Depuis de nombreuses années, des recherches sont en cours afin d'établir les doses efficaces et appropriées pour chaque type de produit alimentaire. L'étude de la radiorésistance de nombreux microorganismes a, elle aussi, donné lieu à de

2

nombreux travaux de recherche. Dans les expériences biologiques, l'irradiation ionisante est habituellement définie par le type, l'énergie et la dose totale absorbée autant que par le débit de la dose (Barburek et Sosna, 1983).

Le débit de la dose a fait l'objet d'une mention par Josephson et Peterson dans leur volume "Preservations of food by ionizing radiation" en 1983. Les auteurs y mentionnent l'importance de ce paramètre et déplorent que l'hypothèse de l'effet de la variation du débit de la dose ne puisse être vérifiée, puisque le débit d'irradiation par électrons accélérés ne peut être modifié. Si on examine la littérature portant sur l'irradiation au cobalt 60, des bactéries pathogènes isolées des aliments, on ne retrouve aucune étude portant sur les effets de la variation du débit de la dose.

Le travail présenté ici vise donc à vérifier l'hypothèse de l'effet de la variation du débit de la dose d'irradiation au cobalt 60, sur des bactéries pathogènes d'origine alimentaire. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.0 IRRADIATION DES ALIMENTS

1.1 Justification

Afin de répondre à l'augmentation sans cesse croissante de la demande alimentaire mondiale on doit avoir recours à des moyens variés et efficaces pour conserver les aliments. Parmi ces moyens, un des plus importants est la réduction des pertes alimentaires en utilisant des insecticides, des inhibiteurs de la germination ou des traitements antimicrobiens. L'emploi de ces produits chimiques comporte néanmoins des dangers pour la santé, à cause des substances chimiques proprement dites et de leurs produits métaboliques, qui peuvent interférer avec les processus biochimiques de l'organisme vivant (Micusan, 1984). En plus de pointer la part énorme des réserves alimentaires mondiales perdues chaque année par la contamination microbienne ou détériorées par l'infestation d'insectes, les rapports que l'OMS reçoit des divers pays du monde indiquent que les maladies dues aux aliments contaminés sont en augmentation et reste un des problèmes les plus répandus touchant la santé humaine. Le Dr. Todd de Santé et Bien-être Social Canada rapporte en 1988 un nombre de cas de maladies alimentaires pour les années 1978-1982 atteignant 627 200 cas pour Salmonella sp., 101 850 cas pour Staphylococcus aureus et qu'à cette époque déjà 12 950 cas occasionés par Escherichia

coli 0157-H7 et 2 800 cas pour *Listeria monocytogenes* pouvaient être recensés.

En 1980 les coûts des infections alimentaires reliés à la santé s'élevaient à 10 millions de dollars alors que les coûts reliés à l'industrie étaient difficilement quantifiables, tout en étant une cause importante de réduction de productivité économique (Kampelmacher 1981).

Seule ou associée à d'autres traitements l'irradiation des aliments contribue à éliminer ou à réduire la présence de microorganismes pathogènes, sans risques additionnels pour la santé. Ainsi ce procédé pourrait, selon l'OAA, l'AIEA et l'OMS, faire partie des solutions capables de réduire les pertes alimentaires et augmenter la durée de conservation des aliments, afin de distribuer une plus grande variété de produits, en quantité plus importante, sur une distance plus étendue (*Codex Alimentarius* Commission, 1984, CAST, 1986 et IAEA, 1989).

1.2 Objectifs et avantages

Les objectifs majeurs de l'irradiation sont d'augmenter la durée de conservation des aliments, en réduisant entre autres, le nombre de microorganismes pathogènes qui peuvent s'y trouver.

6

L' irradiation est un procédé qui augmente la période de conservation des produits, car il détruit non seulement les microbes pathogènes mais aussi ceux responsables de la putréfaction des aliments, ainsi que les insectes et les parasites nuisibles et permet en plus d'inhiber la maturation de certains fruits et légumes (CAST, 1986, Micusan, 1984 et Urbain, 1984).

On obtient ainsi un produit de qualité hygiénique supérieure qui se conserve plus longtemps à et des températures souvent plus élevées. On diminue aussi, et même parfois on élimine, des coûts de réfrigération et de congélation. L'irradiation, en abaissant la charge microbienne, permet aussi de diminuer la quantité d'agents de conservation ajoutés (dont l'usage est à la fois controversé et parfois nuisible à la santé , ex.: dibromure d'éthylène (EDB) et nitrate, deux composés reconnus potentiellement cancérigènes (Mills, 1987, IAEA, 1989). Autres avantages spécifiques à l'irradiation, la possibilité de traiter les aliments après leur emballage et le faible niveau d'énergie requis par le procédé.

1.3 Définition

L'irradiation alimentaire est un procédé de conservation à froid (pasteurisation à froid), non chimique, qui utilise l'énergie ionisante, une forme d'énergie électromagnétique. Le rayonnement électromagnétique occupe un large spectre de longueur d'onde (Figure 1). Il faut d'abord distinguer les radiations ionisantes des radiations non ionisantes. Ces dernières, telles les infrarouges et les ultraviolets, ont un pouvoir pénétrant faible. les Par contre, radiations ionisantes sont appelées ainsi parce qu'elles sont capables de convertir des atomes et des molécules en ions en enlevant ou en ajoutant des électrons. Dans cette catégorie, nous retenons trois types de rayonnements pouvant être exploités industriellement. Ce sont les électrons accélérés ou bêta, les rayons X et les rayons gamma. Les particules alpha, constituées de noyaux d'hélium, ont un pouvoir de pénétration trop limité pour être utile en irradiation alimentaire (Figure 2). Nous verrons le mode d'action de l'irradiation en détail à la section 2.0.

Les rayons gamma et les électrons accélérés sont les formes d'énergie ionisante les plus utilisées. Les électrons accélérés ont l'avantage d'être produits par un appareil, ce qui permet le contrôle de l'émission de radiations. Cependant ils sont produits sous la forme d'un faisceau unidirectionnel

et leur pouvoir de pénétration est faible. Les rayons gamma sont produits par des radioisotopes, ils ont donc les désavantages d'être produits dans toutes les directions et de facon continuelle. Cependant, ce sont des ondes éectromagnétiques de courtes longueur d'onde et d'énergie élevée ce qui leur assure un pouvoir de pénétration très grand. Leur pouvoir de pénétration est donc supérieur à celui des électrons accélérés, permettant le traitement de volume beaucoup plus gros. Ceci leur donne la préférence dans le domaine alimentaire.

1.4 Rayons gamma

Les rayons gamma sont des ondes électromagnétiques de très courte longueur d'onde $(3 \times 10^{-10} \text{ à } 3 \times 10^{-14} \text{ m})$, produites par la désintégration spontanée des noyaux atomiques de divers isotopes (CAST, 1986), ou plus précisément par la libération d'un photon, lors du retour d'un noyau excité à son niveau énergétique de base (Brynjolfsson et Wang, 1982). Les principales sources de rayons gamma sont le cobalt 60 et le césium 137, qui possèdent un niveau d'énergie suffisamment élevé, pour ioniser les atomes sans induire de radioactivité les aliments (Urbain, 1984). C'est à dire dans que l'irradiation agit seulement sur les électrons de l'atome laissant le noyau intact.

9

Figure 1: Le spectre électromagnétique

I.



Diehl 1990



.



IAEA, 1985.

1.5 Cobalt 60

Au Canada, le cobalt 60 utilisé est produit par irradiation du cobalt 59 stable dans un réacteur Candu. Le cobalt 59 sert à ralentir les réactions en chaîne dans les réacteurs nucléaires canadiens et il est converti en cobalt 60 au cours de ce processus.

Le cobalt 60 contient 33 neutrons et 27 protons. Le nombre élevé de neutrons par rapport au nombre de protons rend le noyau instable et celui-ci a tendance à se réorganiser. Le cobalt 60 émet 2 photons successifs de 1,17 MeV et 1,33 MeV. Ceci est insuffisant, pour induire de la radioactivité dans les produits traversés, puisque le seuil d'énergie où il y a possibilité d'induire de la radioactivité est de 5 MeV. Le cobalt 60 se décompose finalement en nickel 60, un isotope stable de 28 protons et 32 neutrons. Le temps de demi-vie du cobalt 60 est de 5,27 années. Bien qu'il n'y ait pas de différence entre les résultats obtenus, le cobalt 60 est préféré au césium 137 parce que sa production est moins coûteuse et qu'il est préparé à partir du cobalt 59 stable, alors que le césium provient de la fission nucléaire de l'uranium 235 c'est à dire de la séparation chimique de carburant nucléaire usé.

- 2.0 MODE D'ACTION DE L'IRRADIATION GAMMA
- 2.1 Effets directs
- 2.1.1 Effet photoélectrique

Dans l'effet photoélectrique, le photon ionisant original disparaît comme entité, toute l'énergie du photon incident est transférée à un électron orbital (Figure 3). Si l'énergie communiquée est suffisamment élevée, l'électron orbital sera éjecté et la molécule sera ionisée. Si l'énergie du photon incident est supérieure à l'énergie nécessaire pour éjecter l'électron de son orbital, l'énergie restante sera transférée à l'électron éjecté sous forme d'énergie cinétique. Celui-ci pourra à son tour entrer en collision avec d'autres électrons et ioniser d'autres atomes.

2.1.2 Effet Compton

Lorsqu' un électron incident rapide ou accéléré approche d'un électron de la couche périphérique d'un atome, il lui communique une partie de son énergie. Alors que le photon agit par collision, l'électron incident agit par répulsion électrostatique. Une partie seulement de l'énergie initiale de l'électron ou du photon gamma incident est utilisée pour l'arrachement de l' électron. L'électron ou le photon X ou gamma incident sont dérivés et ralentis.





Moinet (1983) dans Science et Vie * 795, p.80

Figure 4: Radioactivité: réaction (naturelle ou provoquée) au niveau du noyau, rendant la cible radioactive. (émettrice de rayonnements alpha, bêta ou gamma)



Moinel (1983) dans Science et Vie * 795, p.80.

figures 3 et 4 montrent l'effet photoélectrique, l'effet Compton et la différence entre la radoactivité et l'ionisation (IAEA, 1981).

2.2 Effets indirects

Lorsqu'une cellule est exposée aux rayonnements ionisants, les premières modifications biochimiques portent essentiellement sur les molécules d'eau (Ghys, 1971 cité par Micusan, 1984). Il y a formation d'eau oxygénée, d'ions tels que OH^- , H^+ , H_3O^+ , et de radicaux libres tels que OH^+ , H^+ et H₂O₂ (IAEA, 1973, Taub, 1983, NFA, 1986). Ce sont surtout les radicaux libres qui ont un rôle majeur dans les réactions subséquentes à cause de leur grande réactivité. Ceux-ci peuvent réagir entre eux ou avec d'autres molécules pour produire de nouveaux composés stables ou radicalaires; ce sont les produits de radiolyse secondaire (IAEA, 1981, Simic, 1983, Diehl, 1990).

Les produits radiolytiques générés par l'effet direct, peuvent diffuser et réagir avec les autres molécules. Il s'en suit une cascade de réactions indirectes, dans laquelle les électrons perdent leur énergie en ionisant plusieurs atomes.

2.3 Effets biologiques

Les nouvelles structures chimiques dues à l'irradiation; ions tels que OH^- , H^+ , H_3O^+ , radicaux libres tels que OH^+ , H^+ etc. et produit de radiolyse secondaire comme H2O2 (IAEA, 1973, NFA, 1986), sont très réactifs et peuvent modifier les structures essentielles d'une cellule. Plusieurs travaux, dont ceux revus par Singh and Singh en 1982 et ceux de Resnick, 1978, Marko, 1981, Gentner and Paterson, 1984, Kiefer, 1990 et Sànchez-Reyes, 1992, démontrent que la cible principale lors de l'irradiation est l'ADN et que l'espèce réactive majeure est le radical hydroxyl . L'ADN est la molécule porteuse de l'information génétique des organismes capables de se multiplier. Elle est formée de deux brins de nucléotides enroulés dans une structure hélicoïdale et réunis par des liaisons hydrogène entre les bases puriques et pyrimidiques. Environ 70% des modifications subies par la molécule d'ADN sont dues aux radicaux libres OH· provenant de la radiolyse de l'eau et 30 %, à l'ionisation directe. Ceci cause des lésions dans l'un ou dans les deux brins de la molécule. Des pontages anormaux apparaissent entre les bases puriques et pyrimidiques qui sont ordonnées le long des brins et qui constituent les "mots" du code génétique. Des boursouflures se forment suite à l'hydratation d'une ou de plusieurs bases. Ces déformations annulent la complémentarité des bases qui se font face et bloquent le mécanismes de reproduction de la molécule.

Les effets majeurs de ces modifications sont l'arrêt de la division cellulaire, la stérilité ou la mort de certains organismes, phénomènes qui sont en fonction de la dose d'irradiation absorbée (Resnick, 1978, Gentner and Paterson, 1984, Micusan, 1984, Hutchinson, 1985, Urbain 1986, Diehl, 1990).

Les dommages dûs à l'irradiation se manifestent aussi au niveau des autres composants de la cellule par exemple au niveau des acides ribonucléiques (ARN) impliqués dans la synthèse des protéines (Urbain, 1984 et Wiesner, 1981).

3.0 DOSE D'IRRADIATION

La dose d'irradiation reçue par un microorganisme s'exprime habituellement en terme de D_{10} . La D_{10} ou dose de réduction décimale (DRD), est la dose requise pour inactiver 90 % d'une population ou la réduire d'un cycle sur papier semi-logarithmique (Urbain, 1986 et IAEA, 1973). Elle s'exprime selon l'équation suivante (IAEA, 1982):

$$D_{10} =$$

log A - log B

où U = Dose Gray appliquée lors du en traitement Population bactérienne initiale A = Population B = bactérienne survivante à la dose U

La D₁₀ ou DRD indique donc, pour une souche microbienne donnée, la dose spécifique à appliquer pour réduire la population d'un facteur de 10 dans des conditions précises de culture et de traitement. Une courbe de survie des microorganismes en fonction des doses de rayonnements ionisants peut être tracée suite au dénombrement des UFC en fonction de la dose d'irradiation. La population survivante capable de se multiplier (UFC) devrait diminuer à mesure que la dose augmente, ainsi plus la pente de la courbe sera prononcée plus la souche bactérienne sera sensible à l'irradiation. Une DRD élevée est donc synonyme de résistance bactérienne accrue. Nous pourrons définir en utilisant cet indice, la dose minimale requise pour l'élimination des bactéries pathogènes, habituellement retrouvées dans les aliments. La DRD nous permettra aussi de comparer la sensibilité des souches pathogènes étudiées vis-à-vis de l'irradiation à différents débits de la dose.

4.0 DÉBIT DE LA DOSE D'IRRADIATION

Le débit de la dose d'irradiation se définit comme l'énergie absorbée par unité de temps. Puisque les coûts de l'irradiation dépendent en partie de la puissance de la source émettrice de rayons gamma utilisée, il est économiquement important de déterminer le débit minimal de la dose qui est adéquat selon les buts visés (Eichholz et Popell, 1989). De même, un débit très bas associé à un temps d'exposition trop long augmente les coûts en réduisant la productivité, d'où la nécessité de trouver une dose minimale et un débit optimal d'un point de vu économique (Wiesner, 1981). Habituellement le débit de la dose d'irradiation à partir des rayons gamma se situe autour de 10 Gy/sec. et aucun effet relié au débit de la dose n'est observé a ce niveau (IAEA, 1973, 1981, Diehl,1990).

Le débit de la dose d'irradiation appliqué aux aliments peut varier dans de très larges limites allant peut-être jusqu'à un facteur de 10^6 (Urbain, 1986, McLaughlin et coll.,1989). Selon Michael (1974), le débit de la dose absorbée peut varier de quelques uGy/sec à approximativement 10^9 Gy/sec. Bien qu'en général il semble admis que le débit de la dose n'affecte pas la D₁₀ (IAEA, 1982, Urbain, 1986 et Diehl, 1990) il existe quelques situations où le débit de la

Plusieurs chercheurs ont démontré que le débit de la dose seul pouvait affecter la survie des microorganismes irradiés. Emborg, 1972, rapporte que Christensen en 1966 avait observé, au niveau de l'effet d'inactivation, une efficacité supérieure de l'irradiation au cobalt 60, pour le matériel médical contaminé avec Streptococcus faecium souche A₂1, comparée à l'irradiation par accélérateur linéaire d'électrons à 10 MeV. Un effet débit de la dose a aussi été observé sur certaines caractéristiques biochimiques et physiques des champignons (Agaricus bisporus) entreposés à 15°C et 90 % R.H. (Beaulieu, M. et coll. 1991).

4.1 Débit et radicaux libres

A un débit de la dose élevé, (10⁴-10⁹ Gy/sec)(Diehl, 1990), les radicaux libres pourraient être formés à une concentration telle que les recombinaisons seraient favorisées au lieu des réactions avec les autres entités absorbantes. Ceci réduit la quantité d'effets indirects (Urbain, 1986 et Diehl, 1990). Ce phénomène est encore plus marqué si la concentration du soluté est basse et que sa réactivité avec les radicaux libres est diminuée ou lente (IAEA, 1981).

4.2 Débit et effet relié à l'oxygène

Durant l'irradiation, l'oxygène est retiré du milieu sous forme de peroxyde. A un débit de la dose très élevé, la concentration d'oxygène diminue considérablement et rapidement dans le milieu et il peut y avoir irradiation sous conditions anoxiques. L'effet du débit de la dose serait donc ici un effet relié à l'oxygène et à sa capacité de diffuser suffisamment dans le milieu pendant l'irradiation (IAEA, 1973, IAEA, 1981 et Diehl, 1990). Une augmentation de la résistance de *Sitophilus granaricus* aux rayons ionisants sous des conditions de déplétion en oxygène a déjà été rapporté (Cornwell et Bull, 1966).

4.3 Débit et efficacité du système de réparation de l'ADN.

Un autre effet relié au débit de la dose peut être observé chez les organismes vivants qui ont une habileté significative à réparer les dommages causés à leur ADN. A un débit de la dose très bas, le système de réparation de l'ADN pourrait arriver à maintenir l'intégrité du génome pendant l'irradiation (IAEA, 1981). Frankenberg-Schwager et coll. ont remarqué en 1981 que l'irradiation de cellules eucaryotes à un débit de la dose faible mène à un taux de survivants plus élevé qu'à débit de la dose élevé, pour une même dose. Ceci s'expliquerait par la réparation des dommages critiques induits par l'irradiation au cours du processus d'irradiation lui même (Lajtha et Oliver, 1961, cité par Frankenberg-Schwager, 1981).

Frankenberg-Schwager et coll. ont aussi étudié en 1980, les effets du débit de la dose sur l'induction des bris des chaînes d'ADN dans les cellules eucaryotes et ont montré que le nombre de bris diminue, lorsque le débit de la dose est de 0,33 KGy/hre comparativement à 78 kGy/hre. En 1976, Sara C. Pavon-Flores utilise des débits de 0,9, 1,2, 2,25 et 5 kGy/h et étudie la variation de la dose sur des champignons (*Fusarium Aerobasidium, Petronella* et *Alternaria*), ne citons que les résultats observés chez *Aerobasidium* pour une dose de 18 kGy administrée a différents débits de la dose. Aucun effet n'a été observé à 0,9 kGy/h, des altérations dans le cytoplasme ont été observées à 1,2 et 2,25 kGy/h et finalement à 5 kGy/h le développement a été complètement inhibé. La conclusion finale de l'auteur est donc, à partir de ces observations, que la dose létale pour les champignons irradiés est de 18 kGy à un débit de la dose de 5 kGy/h.

Des expériences faites par Tanaka et coll. en 1988 démontrent que le pouvoir mutagène des rayons gamma, ainsi que la survie des conidies de *Cochliobolus heterostrophus* ne dépend pas de la dose totale, mais plutôt du débit de la dose. Furuno-Fukushi et Matsudaira (1989), parviennent à la même conclusion en remarquant une diminution de la mortalité tout en observant une augmentation du taux de mutations chez les leucocytes de souris (L5178Y), en fonction d' une diminution du débit pour une dose équivalente.

Josephson et Peterson, dans "Preservations of food by ionizing radiation" en 1983, mentionnent l'importance de ce paramètre, surtout à faible débit de la dose, et déplorent que l'hypothèse de l'effet de la variation du débit de la dose ne

24

puisse être vérifiée faute d'altérations possibles du débit de l'irradiation par rayons gamma.

La variation du débit de la dose d'irradiation aux rayons gamma provenant du cobalt 60 est possible à l'Institut Armand-Frappier grâce à la disponibilité de plusieurs sources. Notre étude vise donc à vérifier l'hypothèse de l'effet de la variation du débit de la dose d'irradiation sur la survie de bactéries pathogènes d'origine alimentaire. La bibliographie scientifique ne rapporte aucun travail traitant de ce sujet.

5.0 BACTÉRIES PATHOGENES D'ORIGINE ALIMENTAIRE

Par maladies alimentaires nous entendons infections et intoxications alimentaires. Les infections sont dûes aux bactéries elles-mêmes alors que les intoxications sont causées par des toxines sécrétées par les bactéries. L'incidence de ces maladies est en augmentation à travers le monde et concerne autant les pays en voie de développement qu'industrialisés. C'est le problème de santé le plus répandu dans le monde contemporain et c'est une cause importante de réduction de la prospérité économique (Sudhakar et infections par coll.,1988). Les des salmonelles, les intoxication par Staphylococcus aureus et les infections par les vibrios, notamment le choléra, ont une importance bien reconnue. Cependant, d'autres bactéries pathogènes non

négligeables ont émergées au cours des dernières décennies, pour n'en citer que quelques unes, Listeria monocytogenes, Escherichia coli 0157-H7, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica et Campylobacter jejuni en font parties (Kampelmacher, 1981).

5.1 Salmonella typhimurium

Salmonella typhimurium responsable est de la salmonellose, maladie d'origine alimentaire dont l'incidence est en augmentation par exemple aux Etats-Unis et représente un problème de santé mondiale considérable. La salmonellose se manifeste de façon typique sous la forme d'une gastroentérite qui débute 6-24 heures après l'ingestion des aliments contaminés par le microorganisme. Les symptômes majeurs de la maladie incluent nausée, douleur à l'estomac, vomissement, diarrhée, frissons, fièvre et sueurs. Les symptômes persistent normalement deux à six jours, mais dans des cas exeptionnels jusqu'à plusieurs semaines (Singh et col. 1992).

Le centre des maladies infectieuses des E.-U. rapporte 38 886, 36 061, 56 750 et 52 028 isolats d'espèces Salmonella associées à des maladies humaines pour les années 1983, 1984, 1985 et 1986 respectivement (Thayer et coll.,1991). Le poulet est le vecteur majeur de la salmonellose bien que plusieurs
autres aliments puissent supporter la croissance de la bactérie, par exemple les oeufs (Matic et coll.,1990).

Salmonella typhimurium est un bâtonnet Gram négatif, aérophile. Tous les membres du genre sont potentiellement pathogènes pour l'homme et les autres animaux vertébrés.

5.2 Staphylococcus aureus

Aux État-Unis, Staphylococcus aureus a constamment été un des trois plus importants microorganismes responsables d'intoxications alimentaires (Wilson et coll.,1991). Cependant, l'incidence en fonction des pays varie selon les régions géographiques et les habitudes alimentaires. Par exemple, aux États-Unis entre 1983 et 1987, 47 (7,8%) des 600 cas d'empoisonnements alimentaires rapportés étaient dûs à Staphylococcus aureus (Bean et coll., 1990), alors qu'en Angleterre et aux pays de Galles, 1,9 % des 2815 cas rapportés (54/2815) étaient dûs à cette même espèce bactérienne par (Tranter, 1990). L'intoxication est causée des entérotoxines thermostables A à E. Toutes les souches de S.aureus sont potentiellement pathogènes. Cependant, les souches à coagulase positive sont celles qui généralement sont reconnues comme pathogènes, bien qu'il existe quelques souches à coagulase négative qui le soient (AIFST, CSIRO, 1976).

S. aureus est un microorganisme Gram positif, non mobile, aérophile ou microaérophile et à catalase positive. Les cellules sont sphériques et généralement arrangées en grappes ou amas, bien que l'on retrouve aussi des cellules en paires ou isolées. Sa croissance est rapide et aisée sur plusieurs types de milieux. Sa température optimale de croissance est de 37°C ou légèrement inférieure à 37°C (Kloos et Schleifer, 1981, Jawetz et coll., 1987). La bibliographie consultée fait mention de 30-37°C (AIFST, CSIRO, 1976) et 35-37°C (Hauduroy et coll., 1953). Une grande variété d'aliments peuvent être impliqués dans les cas d'intoxications causées par Staphylococcus aureus. Il existe cependant des exceptions comme les aliments dont le pH est acide (pH < 5) et ceux dont le contenu en eau (Aw) est inférieur à 0,86 (Tranter, 1990). Le prérequis pour une intoxication est la présence d'une souche bactérienne produisant une entérotoxine et sa capacité à croître et à se multiplier dans l'aliment (Slabyj et coll., 1965). Les symptômes d'une intoxication par Staphylococcus aureus peuvent se manifester très rapidement, soit 30 minutes à 8 heures suivant la consommation de l'aliment contaminé par la toxine. Cependant les symtômes apparaissent généralement à l'intérieur de 2 à 4 heures. (Bergdoll, 1979) Les plus communs sont la diarrhée et les vomissements mais on retrouve aussi d'autres symptômes incluant la nausée, les frissons, la sudation, les pulsations cardiaques faibles et une température corporelle sous la normale (Gourama et coll. 1991).

Į.

28

5.3 Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes est l'un des nouveaux ennemis en microbiologie alimentaire. On estime à 2800 cas/année, en moyenne, entre les années 1978-1982, le nombre de maladies reliées à l'alimentation due à Listeria monocytogenes (Todd, 1988). Sa grande distribution dans la nature et son association avec le bétail rendent sa présence occasionnelle sur les viandes crues presque inévitable. La contamination par cette bactérie des mets prêts-à-manger à base de viande pose un problème important pour la santé publique. Ceci parce que ce microorganisme peut croître à la température de réfrigération et résiste à une pasteurisation minimale. C'est un organisme transitoire de la microflore intestinale excrété par 1 à 10 % des humains en santé (Hashisaka et coll., 1989 et Farber, 1991).

Listeria monocytogenes est retrouvé dans les produits laitiers, la viande et le poisson (Huhtanen et coll., 1989). Toutes les souches sont pathogènes par définition bien que certaines le soient plus que d'autres (Jonhson et coll. 1990). Il est maintenant reconnu que la listeriolysine 0, une protéine hémolysine de 60 kilodalton et la protéine p60 sont deux facteurs de virulence majeurs chez Listeria monocytogenes (Farber, 1991).

L. monocytogenes est un coccobacille asporogène, de coloration Gram positive, aérophile et mobile lorsque cultivé entre 20 et 25 °C. Sa température optimale de croissance se situe entre 30 et 37 °C mais il peut croître entre 1 et 45 °C. La population humaine à risque comprend les femmes enceintes, les nouveaux-nés et les patients immunodéficients. Une listeriose se présente généralement chez ces patients sous forme de septicémie, de méningites ou d'avortement dans le cas de la femme enceinte (Hashisaka et coll., 1989 et Farber, 1991). Le taux de mortalité, lorsque les cas sont diagnostiqués, est de 20% à 35%, mais ce taux est biaisé et il est probable que chez les individus en santé, c'est-à-dire la population qui n'est pas à risque élevé, des infections par Listeria monocytogenes apparaissent et disparaissent sans être diagnostiquées comme des listérioses.

5.4 Escherichia coli 0157-H7

Escherichia coli, sérogroupe 0157-H7, est impliqué dans plusieurs cas de colite hémorragique et du syndrome urémique hémolytique à tous les ans. Par exemple, en 1982, 26 cas ont été rapportés parmi les clients d'un restaurant en Oregon, 21 cas parmi les clients d'un restaurant au Michigan et 31 cas parmi les résidents d'une maison pour gens du troisième âge en Ontario. En 1984, 43 cas dont 4 morts ont été rapportés dans

30

une clinique du Nebraska alors qu'en 1985, au moins 53 cas, dont 19 morts, étaient déclarés dans une clinique de l'Ontario (Foster, 1986). Ces cas sont documentés et ont été reliés épidémiologiquement, pour la plupart, à la consommation de boeuf haché insuffisamment cuit. De plus, de nombreux cas individuels, dûs à Escherichia coli 0157-H7, ont aussi été rapportés aux autorités médicales depuis 1982 (Foster, 1986). Le poulet peut aussi être considéré comme un réservoir de Escherichia coli 0157-H7, en effet la bactérie peut être excrétée dans les feces pendant plusieurs mois (Doyle et Schoeni, 1987). Récemment des vaches laitières ont été identifées comme réservoir de cette espèce bactérienne, l'organisme a été isolé en deux occasions de feces de jeunes animaux provenant de troupeaux associés à des cas de syndrome urémique hémolytique chez des enfants suivant la consommation de lait cru (Doyle et Schoeni, 1987).

ţ

Il s'agit d'un bâtonnet Gram négatif, non mobile, aérophile et dont la croissance est optimale à 37°C. Le microorganisme produit une toxine spécifique, qui cause une hémorragie dans le colon d'animaux expérimentaux et, présumément, chez l'humain (Foster, 1986). Une cuisson adéquate des aliments détruit généralement la bactérie. Les symptômes associés à la colite hémorragique sont généralement des crampes abdominales sévères suivies de diarrhées aqueuse qui contiennent par la suite du sang. La durée peut s'étaler

31

sur 2 à 9 jours. Les vomissements sont communs mais la fièvre est rare. La diarrhée est parfois suivie du syndrome urémique hémolytique, une maladie sérieuse du tractus urinaire caractérisée par un disfonctionnement des reins et présence d'urée dans le sang (Foster, 1986).

5.5 Vibrio parahaemolyticus

Vibrio parahaemolyticus fut isolé de fruits de mer pour la première fois en 1970 par Baross et Liston. Il est largement répandu dans les eaux côtières à travers le monde et **i**1 entre autre, être directement isolé de peut, l'environnement australien. Sa pathogénicité est reliée à la consommation de poisson cru ou insuffisamment cuit, au Japon il est responsable de 70 % des empoisonnements alimentaires durant l'été et son incidence est reliée à la consommation de sushi (AIFST, CSIRO, 1976).

Il s'agit d'un microorganisme Gram négatif, asporogène, mobile, ayant la forme d'un bâtonnet simple, rigide, recourbé ou linéaire portant un flagelle polaire simple. Il est aérophile (anaérobique facultatif), entéropathogène, halophile; sa croissance est abondante dans l'eau peptonée avec de 2% à 4 % de chlorure de sodium. Elle est optimale à pH 7.5 à 8.5. Le temps de génération est de 12 min. à 37 °C dans les conditions idéales et de 30 min. à 20 °C. Bien qu'il puisse croître entre 5° et 43 °C sa température optimale de croisance est de 37 °C (Matches et Liston, 1971, AIFST, CSIRO, 1976, Direction générale de la protection de la santé (DGPS), 1986, Jawetz et coll., 1987 et Sudhakar et coll., 1988).

Les symptômes apparaissent habituellement 12 heures après l'ingestion de l'aliment infecté, mais la période d'incubation peut varier entre 2 et 48 heures. Les douleurs abdominales sont le symptôme principal, souvent accompagné de diarrhée, nausée et vomissement et parfois de fièvre et frissons. Les Vibrio sont habituellement excrétés à l'intérieur de 2-3 jours mais parfois jusqu'à 12 jours. Le patient récupère normalement entre deux à cinq jours, mais la mort peut survenir chez les patients affaiblis ou âgés (Direction générale de la protection de la santé (DGPS), 1986).

5.6 Yersinia enterocolitica

Yersinia enterocolitica cause une infection appelée yersiniose. La forme la plus commune est la gastroentérite mais on retrouve des symptômes plus sérieux incluant la lymphadénite mésentérique, l'iléite terminale, la polyarthrite, l'érythème noduleux, la septicémie et la méningite (Silliker, 1986). Le décès suite à une gastroentérite est rare et de façon générale la récupération complète a lieu en 1 à 2 jours. L'OMS, en 1981, considérait

Yersinia enterocolitica comme une cause majeure d'infections entériques d'origine alimentaire. Les vecteurs les plus courants sont l'eau, le lait, le boeuf, le poulet, les légumes aussi bien que les produits marins. De plus la relation entre le porc et la yersiniose humaine est bien établie (Hanna et coll., 1977, Ibrahim et Mac Rae, 1991).

Il s'agit d'un bacille Gram négatif de 1,0 à 3,5 μ m de largeur. Incubées à 25 °C, les cellules végétatives de cultures jeunes sont de formes ovoïdes à allongées acquérant plus tard la morphologie caractéristique de bâtonnet. La plage de températures de croissance est comprise entre -2° et 40 °C. La croissance optimale s'effectue entre 18° et 30°C pour de nombreuses souches. La capacité de Yersinia enterocolitica à croître à des températures de réfrigération en fait un problème majeur pour l'industrie alimentaire (El-Zawahry et Rowley, 1979). Bien que considérée comme une bactérie pathogène émergente, le nombre de cas d'épidémie due à Yersinia enterocolitica reste faible. Malgré sa grande distribution dans la nature, il semble qu'un grand nombre de souches rencontrées soient non pathogènes. Le profil, suivi par les épidémies bien documentées, montre que la cause principale est la contamination après le traitement ou pendant la préparation des aliments (Silliker, 1986).

5.7 Campylobacter jejuni

Campylobacter jejuni est un contaminant commun; une grande variété d'aliments a été identifiée comme vecteur possible de la bactérie; le lait, le poulet, le boeuf et le porc pour nommer les principaux (Foster, 1986). Le réservoir de Campylobacter jejuni inclus des animaux comme le porc, les vaches, le mouton et le poulet. Présentement l'incidence de Campylobacter jejuni sur les carcasses d'animaux est en voie de dépasser celle des salmonelles (Lambert et Maxcy, 1984). Le nombre d'infections aux Etats-Unis impliquant Campylobacter est du même ordre que celles causées par Salmonella et excéderaient même le nombre de cas de shigellose (Foster, 1986).

Campylobacter jejuni est une petite bactérie (0,2 à 0,8 μ m de largeur et 1,5 à 5 μ m de longueur) Gram négative généralement arrondie, en forme de S ou spiralée. Les cellules incubées plus de 48 heures renferment des cellules coccicoïdes en proportion dont le nombre augmente directe avec l'augmentation de la période d'incubation. C'est une bactérie microaérophile, l'athmosphère optimale est de 3 à 6% d'02 et 2 à 10 % de CO₂. La température optimale de croissance est de 43°C quoique Campylobacter jejuni pousse bien entre 36° et 37°C (Jawetz et coll., 1987).

Campylobacter jejuni cause surtout des infections entériques mais peut occasionnellement provoquer des invasions systémiques. Le symptôme majeur de la maladie chez l'homme est la diarrhée. On remarque aussi les manifestations cliniques suivantes: douleur abdominale aiguë, maux de tête, malaises et fièvre. Habituellement les symptômes se résorbent en cinq à huit jours, mais se prolongent occasionnellement (Jawetz et coll., 1987).

6.0 RADIORÉSISTANCE BACTÉRIENNE

6.1 Radiorésitance attendue

De manière générale, plus un organisme est complexe plus l'irradiation. Les microorganismes **i**] est sensible à unicellulaires sont ainsi plus résistants que les mammifères (Thornley, 1963 et IAEA, 1982) et les virus résistent mieux que bactéries (Mills, 1987). Les bactéries sous les forme végétatives sont moins tolérantes que les bactéries sous forme sporulées; les levures et moisissures présentes une sensibilité variable face aux rayonnements ionisants. Cependant les levures sont en général plus résistantes que les moisissures. Certaines levures atteignent même une radiorésistance aussi élevée que les bactéries les plus tolérantes (CAST, 1986, Farkas, 1989). Il est à noter que la

radiosensibilité, pour différentes souches à l'intérieur d'un même genre, peut varier d'un facteur de 4 ou plus (Wiesner, 1981).

Chez les bactéries, on retrouve beaucoup de pathogènes alimentaires dans le groupe à coloration Gram négative, celles-ci sont reconnues plus sensibles à l'irradiation que les bactéries à coloration Gram positive (Thornley, 1963, Maxcy, 1983 et Lambert et Maxcy, 1984). Les entérobactéries, fréquemment impliquées dans les intoxications alimentaires, ainsi que les genres bactériens Pseudomonas et Achromobacter, responsables de la putréfaction de la viande, possèdent une très faible résistance à l'irradiation. Entre autres les bactéries de l'espèce Streptococcus faecalis sont plus résistantes que celles des genres Staphylococcus et Salmonella ainsi que celles du groupe des coliformes, respectivement nommées des plus résistantes au plus sensibles (Erdman et coll., 1961). Nous retrouvons parmi les cellules végétatives les plus résistantes, les genres Deinococcus et Streptococcus, Moraxella et Acinetobacter (Thornley, 1963 et Maxcy, 1983). Ces bactéries sont capables de réparer même plusieurs bris dans le double brin de leur molécule d'ADN

(Farkas, 1989). Parmi les différentes espèces nommées précédemment, *Deinococcus* est la plus résistante à ce jour. Par chance, elle n'est pas pathogène (Farkas, 1989). 6.2. Facteurs influençant la radiorésistance bactérienne.

Les variations de radiorésistance entre différents genres de microorganismes ou même entre certaines espèces du même genre et souches de la même espèce, seraient principalement dues à l'efficacité de leur système enzymatique de réparation de l'ADN (Grecz et coll., 1983). De tels mécanismes incluent photoréactivation, l'excision, la la réparation postréplicationnelle, la correction d'épreuve "mismatch repair", le mécanisme de réparation "SOS", qui implique l'activation de la protéase RecA', et la réparation de bris des brins de l'ADN (Wiesner, 1981, Darnell et coll., 1988 et Sànchez-Reyes, 1992). De façon générale, la réparation des dommages de l'ADN suit le patron suivant; incision par des endonucléases dans la région endommagée, excision de cette région par des exonucléases, resynthèse d'ADN par des ADN polymérases et réparations finales par des ligases pour l'obtention d'un brin d'ADN complètement réparé. Les enzymes de réparation appartiennent ADN impliquées donc aux glycosylases, endonucléases, ligases, photolyase et transméthylase pour 06 méthylguanosine, etc. (Lindahl, 1982, Darnell et coll., 1988, Moseley, 1989). Prenons le cas particulier du genre Deinococcus radiodurans, la radiorésistance élevée est principalement due à un mécanisme rapide et efficace de réparation de l'ADN qui permet la réparation d'un nombre élevé

de dommages sur un, ou même les deux brins de l'ADN (Brooks et coll., 1981, Maxcy, 1983, Moseley, 1984).

D'autres facteurs affectent cependant la radiorésistance des microorganismes dans un aliment, le contenu aqueux du cytoplasme et de l'aliment, la dimension de l'ADN cible, la dose d'irradiation, le genre et le nombre des espèces et souches bactériennes présentes, leur phase de développement, la composition organique et l'état physique du milieu, la température, le pH, l'activité de l'eau et la présence d'oxygène (El-Zawahry et Rowley, 1979, IAEA, 1981, Wiesner, 1981, Brynjolfsson et Wang, 1982, Maxcy, 1981, Josephson, et Peterson, 1983 et NFA, 1986).

Voici un aperçu des principaux facteurs qui influençent la radiorésistance bactérienne qui ont fait l'objet d'études antérieures.

6.2.1 La température.

Une température très basse demande une dose d'irradiation plus considérable pour l'obtention d'un effet équivalent (Maxcy et Ma., 1981). La radiorésistance élevée des bactéries irradiées à des températures de congélation est due à la réduction de l'eau libre dans le milieu, situation qui favorise une réduction des radicaux libres formés à partir de la radiolyse de l'eau. De plus il y a diminution de la diffusion de ces derniers, amenant un ralentissement de l'effet nocif sur les microorganismes présents. La congélation offre donc aux microorganismes une protection contre les attaques radiochimiques de l'irradiation (Maxcy, 1983 et Josephson et Peterson, 1983).

6.2.2 La quantité d'eau dans le milieu

Į

En général, la radiorésistance d'une bactérie à une dose donnée diminue avec la quantité d'eau dans le milieu ambiant. Parce qu'une plus grande quantité de produits de radiolyse sera formée à partir de l'eau et que le pouvoir protecteur de la solution sera faible en raison de l'absence de matières organiques. Ainsi une souche bactérienne aura une radiorésistance de plus en plus élevée selon qu'elle se trouve en suspension dans un tampon, dans un bouillon de culture liquide ou dans un aliment. Certaines protéines qui possèdent des groupements SH, comme la cystéine, agissent aussi comme accepteurs de radicaux libres (Thornley, 1963 et Charbonneau, 1984). Les aliments jouent donc un rôle protecteur dont il faut tenir compte, afin de bien déterminer quels seront les différentes doses ou différents débits de dose à appliquer, pour éliminer ou réduire les espèces microbiennes présentes.

6.2.3 L'oxygène

L'oxygène est un autre facteur qui, lorsqu'il est présent, diminue la résistance des microorganismes irradiés. Les microorganismes irradiés en présence d'azote ou en anaérobiose sont plus résistants à l'irradiation. Ce phénomène est du à la formation des radicaux libres et du peroxyde d'hydrogène en présence d'oxygène (Brynjolfsson et Wang, 1982). En présence d'oxygène la DRD peut être diminuée d'un facteur allant de 2,5 à 4,5 (Wiesner, 1981).

6.2.4 La phase de croissance

La phase de croissance des cellules a fréquemment une influence substantielle sur la valeur de la DRD. (Wiesner, 1981). Règle générale, les organismes en voie de division sont particulièrement sensibles et plusieurs chercheurs constatent que les bactéries deviennent nettement plus résistantes lorsque leur multiplication est ralentie ou arrêtée. Cette situation a été effectivement constaté dans le cas de bactéries lactiques (Dupuy et Tremeau, 1962). Ainsi lorsque les enzymes qui prennent part à la réplication de l'ADN aussi bien qu'à sa réparation sont plus en demande ou bien utilisés dans le processus de réplication, ils ne sont pas accessibles pour le processus de réparation. Donc la radiorésistance varie systématiquement durant les différentes phases de la

croissance d'une culture. Ce phénomène a été prouvé expérimentalement avec des organismes en culture synchronisée (Wiesner, 1981). Cependant d'autres chercheurs ayant étudié *Escherichia coli* en phase stationnaire et exponentielle n'ont rapporté aucune différence dans les DRD lors de ces deux phases (Stapleton, 1955). On rapporte cependant une constance plus grande dans les résultats, donc une meilleure reproductibilité chez les cellules récoltées en phase stationnaire (Dupuy et Tremeau, 1962).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.0 ESPECES ET SOUCHES BACTÉRIENNES UTILISÉES

1.1 Provenance

La presque totalité des espèces bactériennes utilisées dans ce travail de recherche provenaient de l'" American Type Culture Collection" (Rockville, Maryland, USA). Soient Escherichia coli 0157-H7 ATCC 35150, Listeria monocytogenes sérotype 1 ATCC 19111, Staphylococcus aureus ATCC 13565, Salmonella typhimurium ATCC 14028, Yersinia enterocolitica ATCC 23715, Vibrio parahaemolyticus ATCC 17802 et Campylobacter jejuni ATCC 29428. La souche de Listeria monocytogenes 1A1 utilisée a été isolée de la crevette congelée, et gracieusement fournie par le Dr. Susan McCarthy de la " Food and Drug Administration", (FDA), États-Unis tandis que la souche de Stahpylococcus aureus GD13 provenait de la collection du CRESALA.

1.2 Conservation

Les souches des diverses espèces bactériennes ont d'abord été cultivées en milieu liquide dans le but d'obtenir des cultures de 24 h en condition optimale de croissance. Le tableau I résume les conditions de croissance pour chacune des souches utilisées. Tableau I: Conditions de croissance des espèces et souches

Souches	Températu Milie liquides	re (^o C±1) ux solides	Athmosphère	Agita- tion (rpm)
Listeria monocytogenes	30	37	aérobie	180
Staphylococcus aureus	37	37	aérobie	180
Escherichia coli 0157-H7	37	37	aérobie	180
Salmonella typhimurium	35	37	aérobie	180
Yersinia enterocolitica	25	37	aérobie	0*
Vibrio parahaemolyticus	37	37	aérobie	180
Campylobacter jejuni	42	42	microaéro- bie	0*

bactériennes utilisées.

* Incubateurs ne permettant pas l'agitation des cultures.

Les cultures bactériennes étaient ensuite diluées 1:1 dans un tube de plastique "Falcon" de 5 ml, 12 x 77 mm, avec une solution stérile de glycérol à 40 % afin d'obtenir 2 ml de culture diluée à 20 % dans la solution cryoprotectrice de glycérol (El-Kest and Marth 1992). Les cultures de départ étaient conservées dans un congélateur à -80 °C et servaient d'inoculum pour les cultures mères.

Le tableau II regroupe les milieux de culture utilisés en fonction des espèces bactériennes.

Tableau	II:	Milieux	de	culture	utilisés	en	fonction	de
		l'espèce	e ba	actérien	ne.			

Souches	Milieux liquides	Milieux de dénombrements	
Listeria monocytogenes	TSBYE 0,6% *	PCA	
Staphylococcus aureus	BHI **	PCA	
Esherichia coli 0157-H7	BHI	PCA	
Salmonella typhimurium	BHI	PCA	
Yersinia enterocolitica	TSB	PCA	
Vibrio parahaemolyticus	TSB + 3% NaCl	PCA + 3% NaCl	
Campylobacter jejuni	Bouillon Brucella	TSA + 5% sang de mouton	

act 0,6%, Becton " Brain Heart Infusion", de Becton Dickinson, USA. roth y 'Y

**

1.3 Vérifications de la pureté

Avant l'utilisation, la pureté de chacune des cultures bactériennes conservées au froid a été vérifiée par ensemencements sur milieu riche et sur milieu sélectif et/ou différentiel, qui seront décrits plus loin. Une coloration de Gram était aussi effectuée à partir de la culture en milieu liquide et à partir d'une colonie isolée sur milieu solide riche.

souches de Listeria monocytogenes (LM) étaient Les striées sur milieux solides "Plate Count Agar", PCA, (DIFCO, Detroit, USA) et sur "Oxford Agar" (OA) (Unipath Ltd.). Pour les souches de Staphylococcus aureus (SA), nous utilisions les milieux solides PCA et "Baird Parker Agar", BPA. Escherichia coli (EC) était étalée sur les milieux PCA et sur "Eosine Methyl Blue", EMB, alors que nous employions le PCA, le "Brilliant Green", BG, et le "Brilliant Green Sulphite Agar", BGSA pour Salmonella typhimurium (ST). Vibrio parahaemolyticus (VP) et Yersinia enterocolitica (YE) étaient respectivement repiquées sur milieux PCA + 3 % NaCl et sur PCA + 0,5 % NaCl. Pour Campylobacter jejuni (CJ), nous avons utilisé le milieu "Tryptic Soy Agar" + 5% sang de mouton (Quelab, Montréal # 1993) et le milieu sélectif TSA Blaser (Quelab, Montréal # 1515). Les conditions d'incubation des cultures en milieux liquides et solides se retrouvent au tableau I.

Pour effectuer la coloration de Gram, le matériel et la méthode décrite par la compagnie DIFCO ont été employés.

1.4 Courbe de coissance

Afin de déterminer les phases de croissances exponentielle et stationnaire de chaque espèces bactériennes, la courbe de croissance de chacune a été établie, à l'exeption de certaines souches. Soit Listeria monocytogenes 1A1 et ATCC 19111, pour lesquelles cette étape avait déjà été effectuée dans le cadre d'une recherche antérieure (Brandao Areal, 1992). Dans le cas de Campylobacter jejuni, seules les conditions de culture en phase stationnaire ont été déterminées.

Des erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml de culture liquide étaient incubés dans un agitateur rotatif (G24 Environnemental incubator shaker, New Brunswick Scientific Co. Inc., N.J. États-Unis). Les cultures sans agitation et en aérobies ainsi que les boîtes de Petri étaient incubées dans une étuve (Napco model 320, Portland, Etats-Unis) aux conditions de températures citées au tableau I. Pour la souche microaérophile l'incubation se fait dans un incubateur à CO_2 (Queue System) à 42 °C contenant le mélange de gaz suivant, 5 O_2 , 10 CO^2 et 85 N_2 (Linde Union Carbide, Toronto, Canada). Une culture-mère obtenue à partir des cultures lyophilisées ou congelées était conservée à 4 °C. L'inoculum, prélevé de celle-ci, contenait environ 10⁹ UFC/ml et servait à inoculer un bouillon nutritif (voir tableau II) de manière à obtenir environ 10⁵ UFC/ml. L'eau peptonée 0,1% a servi de diluant.

Les bouillons nutritifs étaient pré-incubés 24 heures afin d'en vérifier la stérilité et éviter ainsi la contamination. La croissance des cultures bactériennes était ensuite suivie par lecture de la densité optique (D.O.) à 400 nm dans le cas de *Staphylococcus aureus* et à 450 nm dans le cas des autres bactéries, ceci en fonction de l'absorbance maximale définie selon le spectre du spectrophotomètre. Les lectures ont été prises à 0,1, 1,5 , 2, 2,5 , 3, 3,5 , 5, 5,5 , 6, 6,5 , 7, 8 et 24 heures. Le témoin négatif étant le bouillon nutritif stérile approprié.

Pour chaque lecture de D.O. des échantillons de cultures étaient dilués entre 10^{-1} et et 10^{-12} selon le cas, dans une solution d'eau peptonée 0,1 %. On ensemençait ensuite les géloses, choisies selon le tableau II, en étalant sur chacune d'elle, à l'aide d'un rateau de verre, 0,1 ml de chaque dilution. L'incubation des boîtes de Petri étaient ensuite réalisée selon les conditions décrites au tableau I durant 24 à 48 heures (52 heures dans le cas de *Campylobacter jejuni*).

Lorsque les colonies étaient devenues visibles, elles étaient comptées à l'aide du "Quebec Colony Counter" (Darkfield Quebec Colony Counter, modèle 3321, American Optical, Buffalo, USA). Le temps d'incubation était toujours le même pour une espèce donnée. Il a été déterminé en fonction de l'assurance que toutes les colonies étaient devenues visibles. Pour se faire, les géloses étaient réincubées après le dénombrements et vérifiées après 24 heures d'incubation supplémentaires. Le dénombrement des colonies sur chacune des géloses, contenant entre 30 et 300 colonies, a permis d'établir une courbe standard du logarithme des UFC/ml en fonction de la densité optique et en fonction du temps. Ces courbes ont permis d'établir les conditions d'inoculation et de croissance nécessaires pour obtenir des cultures en phase exponentielle et stationnaire, contenant environ 10⁸ à 10⁹ UFC/ml. Ces cultures ont été utilisées pour étudier l'impact du débit de la dose d'irradiation sur la radiorésistance bactérienne.

1.5 Conditions de croissance des cultures en phases exponentielle et stationnaire.

Les cultures mères, conservées à 4°C, ont été utilisées comme inoculum de départ. Dans le cas de *Staphylococcus aureus* GD13, une pré-culture était préparée en inoculant aseptiquement 10 ml de bouillon BHI avec le contenu d'une anse d'un fil à boucle en platine. Cette pré-culture était incubée

50

à 37 °C durant 24 hre, afin d'obtenir une population d'environ 10⁹ UFC/ml. Par la suite 1 ml de cette pré-culture servait d'inoculum pour ensemencer 99 ml de milieu liquide BHI afin d'obtenir une population bactérienne se rapprochant de 10⁵ UFC/ml dans un volume de 100 ml. L'eau peptonée 0,1 % était utilisée comme diluant.

La suspension bactérienne était par la suite incubée à 37°C pour une période de 18 heures afin d'obtenir une culture en phase stationnaire. Cette procédure était répétée simultanément à trois reprises afin d'obtenir 3 populations de densité microbienne équivalente, permettant de déterminer, en triplicata, dans des conditions expérimentales similaires, la DRD du microorganisme étudié.

Pour obtenir une culture en triplicata de *Staphylococcus aureus* GD13, en phase exponentielle, nous avons procédé de façon similaire en utilisant pour ensemencer 99 ml de milieu liquide BHI, un inoculum de 1% qui provenait directement de la pré-culture en tube non diluée. La période d'incubation était réduite à environ 3 heures ou jusqu'à l'obtention d'une densité optique de 1,0 à 400 nm, ce qui correspond à une population d'environ 10⁹ UFC/ml.

De façon générale la même procédure était utilisée afin d'obtenir des cultures en phase exponentielle et stationnaire pour chacune des souches bactériennes étudiées. Cependant l'étape de la pré-culture en tube a été omise, pour les cultures bactériennes étudiées autres que celles de *Staphylococcus aureus*, puisqu'elle n'était pas essentielle à l'obtention de cultures en conditions optimales et ne faisait qu'allonger la procédure. La culture-mère conservée à 4°C a donc servi d'inoculum de départ.

2.0 TRAITEMENT DES BACTÉRIES PAR IRRADIATION

2.1 Préparation des échantillons

Les cultures en phases exponentielle et stationnaire étaient maintenues sur la glace (0° à 4° C) avant et durant les irrradiations afin d'éviter la croissance des bactéries. Les cultures étaient diluées, à une concentration approximative de 10^{8} UFC/ml, dans une solution d'eau physiologique (NaCl 0,85%) réfrigérée. Dans le cas de *Vibrio parahaemolyticus*, un microorganisme halophile, l'eau salée (3% NaCl) était employée.

La solution d'eau physiologique (NaCl 0,85%) utilisée minimise l'effet protecteur du milieu et permet de mettre en évidence l'action du rayonnement ionisant sur les microorganismes. Cette solution, par sa composition élémentaire, ne favorise pas la formation de produits de

radiolyse complexes qui sont susceptibles d'élever la radiosensibilité des organismes. Elle n'offre pas non plus de substances "boucliers", capables d'absorber une partie des effets du rayonnement. De plus cette solution ne permet pas la croissance des microorganismes étudiés pendant l'irradiation (qui peut durer plus de deux heures aux doses les plus élevées, lorsque le débit est faible), fait important afin d'éviter de fausser les résultats au niveau du dénombrement des cellules ayant survécues à l'irradiation.

2.2 Irradiation

Les tubes en plastiques de 15 ml, 120 x 17 mm, (Sarstedt, USA) contenant les cultures bactériennes étaient exposés aux rayons gamma dans trois types d'irradiateurs afin d'obtenir trois débits de la dose différents. Les trois irradiateurs ont été construit par Nordion International Inc., Kanata, Canada. Il s'agissait de deux "Gammacell" 220, situées au Centre d'irradiation du Canada (CIC) à Laval, et à l'institut Laval, et Armand-Frappier, aussi à d'un "Underwater Calibrator" UC-15, situé au CIC. Les débits centraux de dose moyens pour chaque irradiateur au cours de l'étude étaient de 0,78 kGy/h et de 2,6 kGy/h pour les deux "Gammacell" 220 et de 22 kGy/h pour l'"Underwater Calibrator" UC-15. La dosimétrie était réalisée par la compagnie Nordion International Inc. et était basée sur des mesures à 22°C obtenues de dosimètres

53

Fricke (Nordion International inc., Kanata, Canada). Les lectures étaient effectuées à une longueur d'onde de 302 nm. On retrouve en annexe la représentation schématique des irradiateurs utilisés.

Les doses reçues par un même tube étant cumulatives, tous les tubes étaient d'abord placés dans la chambre d'irradiation au temps zéro, puis retirés à mesure que le temps d'exposition requis pour atteindre la dose totale désirée était atteint. A chaque descente et remontée de la chambre d'irradiation, une dose transitoire était en plus reçue par l'échantillon. Cette dose transitoire ne doit jamais excéder 5% de la dose totale désirée afin d'obtenir une précision optimale. La dose totale de transition des échantillons les plus irradiés n'a jamais dépassée 5% de la dose désirée. A cette fin certaines irradiation ont été effectuées dose par dose, en triplicata, afin d'assurer une plus grande précision.

Afin d'obtenir au moins trois points sur la courbe de survie, chaque culture bactérienne a reçu un minimum de six doses, si on considère que le témoin non irradié correspondait à la dose 0, dans un intervalle qui tient compte de la radiorésistance de chaque souche. Les doses appliquées à chaque souches, dans les deux phases de croissance et pour chacun des trois débits de doses, sont indiquées sur les figures 5 à 13. Chaque expérience d'irradiation a eu lieu en triplicata et fût répétée plusieurs fois au besoin.

2.3 Évaluation de la radiorésistance (DRD)

Les suspensions bactériennes irradiées étaient maintenues à 0 ^oC sur la glace et des dilutions décimales étaient réalisées dans les plus brefs délais dans des tubes contenant 9 ml (ou des bouteilles contenant 99 ml) d'eau peptonée 0,1 %. Vibrio parahaemolyticus étant un microorganisme halophile, l'eau peptonée 0,1 % + NaCl 3% était employée pour les dilutions. Des dilutions décimales de la suspension bactérienne témoin (non-irradiée) étaient aussi préparées. Un volume de 0,1 ml des dilutions appropriées était inoculé en duplicata sur des milieux gélosés, on retrouve au tableau II les milieux de récupération utilisés. Ces boîtes de Petri étaient incubées selon les conditions présentées au tableau I. Le dénombrement de la population capable de se multiplier (UFC/ml) était déterminé de la même manière que lors de l'établissement des courbes de croissance. Ce qui nous a permis de déterminer la DRD selon la formule retrouvée à la section 3 de la revue bibliographique. Les DRD ont été calculées par régression linéaire avec Lotus 1-2-3 version 2.2 (Lotus Development Corporation, 1985, USA) à partir d'au moins trois résultats. Les analyses de covariance permettant la comparaison des radiorésistances entre elles ont été

accomplies à l'aide du logiciel statistique SPSS Mannova (SPSS Inc., Chicago, USA).

3.0 ÉVALUATION DE LA DRD DANS LA VIANDE DE POULET

3.1 Souches bactériennes utilisées

L'effet de la variation du débit de la dose d'irradiation a été étudié avec deux bactéries, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 et *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. Il s'agit de deux bactéries pathogènes pouvant se retrouver dans la viande de poulet.

3.2 Origine des lots de poulet

Des poitrines de poulet désossées (1 kg) ont été achetées à deux reprises dans des supermarchés appartenant à des chaînes alimentaires différentes. Chaque achat a permis de préparer un lot de poulet qui était utilisé pour étudier la DRD d'une des deux souches bactériennes.

La taille des poitrines de poulet désossées et l'absence d'os dans ce produit motivait le choix de cette viande en particulier, ceci facilitant l'homogénisation et permettant de reproduire les échantillons à partir d'un même lot du produit commercial. De plus, la popularité du poulet et sa fréquente association à des cas de maladies alimentaires apportaient d'autres arguments en faveur de ce choix. Enfin le poulet désossé indique un niveau de manipulation plus élevé que le poulet non-désossé donc, un potentiel de contamination plus élevé.

Le poulet présentait aussi l'avantage d'une stérélisation facile, par irradiation gamma, avec peu ou pas d'altération des propriétés chimiques et physiques (Shamsuzzaman, K. et coll. 1992).

Après l'achat, le poulet demeurait entreposé à -10 °C, permettant de le conserver congelé jusqu'à la préparation des échantillons.

3.3 Préparation des échantillons

Le poulet était d'abord décongelé sous l'eau froide le matin de la préparation des échantillons, puis pesé et homogénéisé dans un mélangeur électrique (Osterizer 10 de Sunbeam, USA) avec de l'eau peptonée 0,1% stérile, dans une proportion de 100 g de poulet pour 100 ml d'eau peptonée stérile. L'homogénat était ensuite réparti en échantillons de 40 ml dans des tubes de plastique de 50 ml stériles (Falcon 2098 Blue max, Becton Dickinson, USA). L'irradiation gamma, dans l'"Underwater Calibrator UC-15", avec une dose de 30 kGy, stérilisait les échantillons conservés par la suite à 4°C jusqu'à leur utilisation.

3.4 Épreuve de stérilité

Immédiatement après le traitement de stérilisation un échantillon servait de contrôle pour vérifier la stérilité du poulet. Une dilution 1:100, effectuée à partir du poulet dans une solution d'eau peptonée stérile, servait d'inoculum pour ensemencer, à une concentration de 1%, les milieux liquides. Cette épreuve de stérilité était faite sur milieux BHI, TSB et Brucella incubés à des températures de 30°C, 37°C et 42°C en aérobie et en microaérobie. Examinés à intervalle de 24 heures tout au long des expériences d'irradiation, impliquant le lot duquel l'échantillon était originaire, les bouillons ainsi inoculés permettaient de s'assurer de la stérilité du poulet avant la contamination artificielle.

3.5 Contamination artificielle du poulet

Chaque expérience utilisait trois échantillons de poulet afin de réaliser les expériences en triplicata. Chaque échantillon de 40 ml était contaminé artificiellement avec 0,4 ml d'une culture bactérienne en phase stationnaire (18 hres) de manière a obtenir des échantillons de poulet contaminé avec environ 10⁸ UFC/ml.

3.6 Préparation des échantillons

L'homogénat de poulet contaminé artificiellement était ensuite réparti aseptiquement dans des tubes de plastique stériles de 15 ml (Falcon, Becton Dickinson, USA) à raison de 5 ml /tube. Les tubes étaient conservés sur la glace jusqu'à l'irradiation.

3.7 Irradiation des échantillons

Trois irradiateurs, afin d'obtenir trois débits de dose différents (voir section 2.2 du matériel et méthodes), permettaient d'exposer aux rayons gamma les tubes contenant l'homogénat de poulet contaminé artificiellement. De la glace concassée gardait les tubes près de 0°C avant, pendant et après l'irradiation afin d'éviter la croissance bactérienne pendant le traitement, évitant ainsi de fausser les résultats au moment du dénombrement des cellules survivantes. Les échantillons reçurent 6 doses entre 0 (contrôle non irradié) et 2,5 kGy à intervalle de 0,5 kGy de façon à obtenir au moins 5 points pour établir la courbe de survie bactérienne. Chaque expérience en triplicata a été répétée trois fois afin de permettre une analyse statistique des résultats. Ceci dans le but de tenir compte des variations plus grandes dans les résultats des comptages, dûes aux manipulations moins précises dans l'aliment comparées à celles dans l'eau physiologique

(0,85% NaCl). L'imprécision dans l'aliment provient de sa texture moins compatibles avec les instruments de mesures, par exemple les pipettes.

3.8 Évaluation de la DRD

Après l'irradiation, les échantillons restaient sur la glace et les dilutions décimales appropriées étaient effectuées avec de l'eau peptonée stérile dans les plus brefs délais. La DRD a été calculée comme indiqué à la section 2.3, (page 54) et le milieu PCA servait de milieu de dénombrements des UFC (aussi appellé milieu de récupération). 1

<u>RÉSULTATS</u>

.

- 1.0 EFFET DU DÉBIT DE LA DOSE D'IRRADIATION SUR LA RADIORÉSISTANCE DE BACTÉRIES PATHOGENES D'ORIGINE ALIMENTAIRE
- 1.1 Radiorésistance bactérienne dans l'eau physiologique (0,85% NaCl) en fonction du débit de la dose.

En premier lieu nous avons établi la radiorésistance de neuf souches bactériennes, représentant sept espèces différentes, dans une solution physiologique (NaCl 0,85%) et ce à trois débits de dose d'irradiation différents. Le tableau III présente les radiorésistances obtenues pour les bactéries irradiées en phase exponentielle de croissance.

Le tableau IV regroupe les radiorésistances obtenues pour les bactéries irradiées dans l'eau physiologique (0,85% NaCl), en phase stationnaire de croissance, aux mêmes débits que précédemment.

La radiorésistance bactérienne varie en fonction des espèces étudiées comme le montre les tableaux III et IV. Ainsi les bactéries les plus radiosensibles appartiennent aux genres *Vibrio, Yersinia* et *Escherichia*, toutes des bâtonnets de coloration Gram négative, avec des DRD moyennes allant de 0,03 kGy à 0,06 kGy. *Campylobacter* (DRD 0,08 kGy) vient
immédiatement après et répond aux mêmes critères de morphologie et de coloration.

Tableau III: Radiorésistance (DRD) en kGy, des bactéries en phase exponentielle de croissance, en fonction du débit de la dose d'irradiation en eau physiologique (0,85% NaCl).

Espèces bactériennes		Débit (kGy/h)			
		0,78	2,6	22	
Listeria monocytogenes	1A1	0,22ª	0,22ª	0,20 ^a	
	19111	0,18 ^{ab}	0,16 ^b	0,16 ^{ab}	
Staphylococcus aureus	GD13	0,09 ^b	0,09 ^b	0,09 ^b	
	13565	0,12 ^a	0,12 ^a	0,12 ^a	
Escherichia coli 0157:H7		0,05 ^c	0,05 ^c	0,05 ^c	
Salmonella typhimurium		0,18 ^d	0,20 ^d	0,20 ^d	
Yersinia enterocolitica		0,05 ^e	0,05 ^e	0,05 ^e	
Vibrio parahaemolyticus		0,04 ^f	0,03 ^f	0,03 ^f	
Campylobacter jejuni		-	-	-	

- = Non effectué

19.16

Les valeurs sur la même rangée comportant des lettres non identiques sont significativement différentes, p < 0,05.

Les valeurs sur la même colonne, exclusivement pour Listeria monocytogenes et Staphylococcus aureus, cas par cas, comportant des lettres non identiques sont significativement différentes à (p < 0,05) où a > b.

Tableau IV: Radiorésistance (DRD) en kGy, des bactéries en phase stationnaire de croissance, en fonction du débit de la dose d'irradiation en eau physiologique (0,85% NaCl)

-

Espèces bactériennes		Débit (kGy/h)			
		0,78	2,6	22	
Listeria monocytogenes	1A1	0,27 ^a	0,25 ^a	0,23 ^a	
	19111	0,24 ^a	0,23 ^a	0,23 ^a	
Staphylococcus aureus	GD13	0,11 ^b	0,13 ^b	0,12 ^b	
	13565	0,11 ^b	0,12 ^b	0,12 ^b	
Escherichia coli 0157:H7		0,06 ^c	0,06 ^c	0,06 ^c	
Salmonella typhimurium		0,14 ^d	0,16 ^d	0,14 ^d	
Yersinia enterocolitica		0,05 ^e	0,04 ^e	0,05 ^e	
Vibrio parahaemolyticus		0,03 ^f	0,04 ^f	0,03 ^f	
Campylobacter jejuni		0,08 ⁹	0,08 ^g	0,08 ^g	

Les valeurs sur la même rangée comportant des lettres non identiques sont significativement différentes, p < 0,05.

Les valeurs sur la même colonne, exclusivement pour Listeria monocytogenes et Staphylococcus aureus, cas par cas, comportant des lettres non identiques sont significativement différentes à (p < 0,05) où a > b.

64

On retrouve parmi les bactéries ayant une radiosensibilité moyenne un coque de coloration Gram positive du genre *Staphylococcus*, avec une DRD qui varie entre 0,09 et 0,13 kGy.

Parmi les bactéries étudiées ici, ce sont les genres Salmonella et Listeria, deux bâtonnets respectivement de coloration Gram négative et positive, qui sont les plus radiorésistants avec des DRD variant entre 0,14 et 0,20 kGy pour Salmonella et entre 0,16 et 0,27 pour Listeria.

Les figures 5 à 13 présentent les courbes de survie des différentes bactéries étudiées, soit le logarithme des UFC /ml. dénombrées en fonction de chaque dose appliquée. Ces courbes de survie mettent en évidence l'effet du débit de la dose d'irradiation sur la radiorésistance bactérienne. Les radiorésistances rapportées aux tableaux III et IV ont été calculées à partir de l'inverse de la pente de ces courbes de survie comme mentionné à la section 2.3 de la méthodologie.

Pour les 9 souches étudiées aucun effet relié au débit de la dose d'irradiation n'a été observé en relation avec la radiorésistance (DRD) lors de l'irradiation des bactéries dans l'eau physiologique (0,85% NaCl).







Figure 6: Effet du débit de dose d'irradiation sur *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 en phases exponentielle (E) et stationnaire (S).



Figure 7: Effet du débit de dose d'irradiation sur Staphylococcus aureus GD13 en phases exponentielle (E) et stationnaire (S).







Figure 9: Effet du débit de dose d'irradiation sur *Escherichia coli* ATCC 35150 en phases exponentielle (E) et stationnaire (S).



Figure 10: Effet du débit de dose d'irradiation sur *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 en phases exponentielle (E) et stationnaire (S).







Figure 12: Effet du débit de dose d'irradiation sur Vibrio parahaemolyticus ATCC 17802 en phases exponentielle (E) et stationnaire (S).



Figure 13: Effet du débit de dose d'irradiation sur *Campylobacter jejuni* ATCC 29428 en phase stationnaire (S).

1

1

1.2 Radiorésistance bactérienne dans le poulet en fonction du débit de la dose d'irradiation.

L'aliment, ici la viande de poulet, joue un rôle protecteur face à l'irradiation des souches bactériennes. Ainsi on retrouve des radiorésistances plus élevées pour une même espèce lorsque celle-ci est irradiée dans l'homogénat de poulet (tableau V) comparativement à la radiorésistance obtenue lorsque la même souche est irradiée dans l'eau physiologique (0,85% NaCl)(tableau IV).

Tableau V: Radiorésistance (DRD) en kGy, des bactéries en phase stationnaire de croissance en fonction du débit de la dose d'irradiation dans un homogénat de poulet.

Espèces bactériennes	Débit (kGy/h)		
	0,78	2,6	22
Listeria monocytogenes ATCC 19111	0,38 ^a	0,38 ^a	0,36 ^a
Salmonella typhimurium ATCC 14028	0,33 ^b	0,33 ^b	0,31 ^b

Les valeurs sur la même rangée comportant des lettres non identiques sont significativement différentes, p < 0,05.

Les radiorésistances qui apparaissent au tableau V ont été calculées selon les courbes de survie comme expliqué précédemment. Aucun effet relié au débit de la dose d'irradiation n'a été observé comme le montre le tableau V. Les figures 14 et 15 permettent de mieux visualiser la relation entre les UFC/ml et la dose en fonction des débits. L'analyse statistique des covariances par SPSS Mannova (SPSS





ţ



t



inc., Chicago, États-Unis) a démontré que les DRD obtenues étaient toutes semblables (p > 0,05) entre elles, pour une souche donnée, dans une phase donnée, en fonction des débits.

2.0 RADIORÉSISTANCE EN FONCTION DE LA PHASE DE CROISSANCE

La radiorésistance des bactéries en phase de croissance est variable selon les conditions d'irradiation et la souche irradiée. Ainsi pour Listeria monocytogenes ATCC 19111 et Staphylococcus aureus GD13 la phase de croissance influence la radiorésistance des bactéries de façon significative (p < 0,05). Les figures 16,17 et 18 permettent de visualiser les radiorésistances des bactéries en fonction de la phase de croissance pour chacun des débits étudiés. On remarque dans ATCC Listeria monocytogenes les cas de 19111 et Staphylococcus aureus GD13 que la DRD est toujours plus élevée la phase stationnaire. A l'inverse, Salmonella pour typhimurium ATCC 14028 irradiée à un débit de la dose de 0,78 kGy/h montre une DRD significativement supérieure (p < 0,05) lorsqu'irradiée en phase exponentielle (figure 16). Cependant la phase de croissance n'influence pas de façon significative la radiorésistance (DRD) pour les débits de dose 2,6 et 22 kGy/h chez Salmonella typhimurium ATCC 14028. Cette dernière observation s'applique aux autres bactéries étudiées et ce pour les trois débits de doses (figures 16, 17 et 18).

FIGURE16: Radiorésistance de différents pathogènes alimentaires irradiés à un débit de 0,78 kGy/h. en fonction de la phase de croissance exponentielle (E) ou stationnaire (5).



- LM1: Listeria monocytogenes 1A1
- LM2: Listeria monocytogenes ATCC 19111
- SA1: Staphylococcus aureus GD13
- SA2: Staphylococcus aureus ATCC 13565
- EC: Escherichia coli ATCC 35150
- YE: Yersinia enterocolitica ATCC 23715
- ST: Salmonella typhimurium ATCC 14028
- VP: Vibrio parahaemolyticus ATCC 17802

FIGURE17: Radiorésistance de différents pathogènes alimentaires irradiés à un débit de 2,6 kGy/h. en fonction de la phase de croissance exponentielle (E) ou stationnaire (S).



- LM1: Listeria monocytogenes 1A1
- LM2: Listeria monocytogenes ATCC 19111
- SA1: Staphylococcus aureus GD13
- SA2: Staphylococcus aureus ATCC 13565
- EC: Escherichia coli ATCC 35150
- YE: Yersinia enterocolitica ATCC 23715
- ST: Salmonella typhimurium ATCC 14028
- VP: Vibrio parahaemolyticus ATCC 17802

FIGURE18: Radiorésistance de différents pathogènes alimentaires irradiés à un débit de 22,0 kGy/h. en fonction de la phase de croissance exponentielle (E) ou stationnaire (S).



- LM1: Listeria monocytogenes 1A1
- LM2: Listeria monocytogenes ATCC 19111
- SA1: Staphylococcus aureus GD13
- SA2: Staphylococcus aureus ATCC 13565
- EC: Escherichia coli ATCC 35150
- YE: Yersinia enterocolitica ATCC 23715
- ST: Salmonella typhimurium ATCC 14028
- VP: Vibrio parahaemolyticus ATCC 17802

3.0 RADIORÉSISTANCE EN FONCTION DE L'ESPECE BACTÉRIENNE

3.1 Listeria monocytogenes ATCC 19111 vs. 1A1

On remarque aux tableaux III et IV que la radiorésistance varie en fonction de l'espèce bactérienne et qu'elle peut même varier à l'intérieur d'une même espèce pour deux souches différentes. Ainsi chez *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 irradié à débit moyen (2,6 kGy/h) en phase exponentielle de croissance (tableau III) on obtient une DRD de 0,16 kGy comparativement à une DRD de 0,22 kGy pour *Listeria moncytogenes* 1A1 irradié dans les mêmes conditions. Cette différence significative (p < 0,05) ne se retrouve cependant pas aux autres conditions de croissance et d'irradiation pour *Listeria monocytogenes*.

3.2 Staphylococcus aureus ATCC 13565 vs. GD13

Dans le cas de *Staphylococcus aureus*, aucune différence significative n'est observée entre les DRD des deux souches en phase stationnaire de croissance. Cependant, les deux souches irradiées en phase exponentielle de croissance montrent des différences significatives (p<0,05) dans leurs radiorésistances. Ainsi *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 a une DRD de 0,12 kGy comparativement à 0,09 kGy pour *Staphylococcus aureus* GD13 et ce pour les trois débits de dose. DISCUSSION

ŧ

1.0 ANALYSE DES RADIORÉSISTANCES DANS L'EAU PHYSIOLOGIQUE (0,85% NaCl) EN FONCTION DES BACTÉRIES ÉTUDIÉES

1.1 Choix des bactéries.

La radiorésistance de neuf souches bactériennes, représentant sept espèces différentes, a été déterminée à trois débits de dose différents. Les expériences ont été effectuées pour les phases de croissance exponentielle et stationnaire dans milieu protecteur, l'eau un non physiologique (0,85% NaCl). Les genres bactériens étudiés ont été choisis afin de couvrir un large spectre d'espèces pathogènes qui se retrouvent dans les infections alimentaires. Ainsi on retrouve parmi les bactéries étudiées des cocci à coloration Gram positive (Staphylococcus aureus), des bâtonnets à coloration Gram négative (Escherichia coli 0157-H7, Salmonella typhimurium, Yersinia enterocolitica) et positive (Listeria monocytogenes), une espèce halophile (Vibrio parahaemolyticus) ainsi qu'une espèce microaérophile (Campylobacter jejuni). De plus, dans le cas de Staphylococcus aureus et Listeria monocytogenes, deux souches ont été choisies pour chaque espèce afin d'avoir un aperçu de l'influence de la souche sur la radiorésistance à l'intérieur d'une même espèce.

1.2 Effet débit de la dose.

Aucun effet relié au débit de la dose d'irradiation n'a pu être mis en évidence au cours de cette étude comme on le voit aux figures 5 à 15 ainsi qu'aux tableaux III, IV et V. Nous avons procédé à l'analyse statistique des doses de réduction décimale (DRD) en fonction du débit de la dose d'irradiation par analyse des covariances avec SPSS Mannova. Les DRD de chaque espèce bactérienne sont donc semblables entre elles pour les trois débits de doses étudiés dans chacune des phases de croissance exponentielle et stationnaire. Le facteur p étant supérieur ou égal à 0,05.

1.2.1 Débit de la dose et radicaux libres

Ces résultats sont en accord avec la majorité des hypothèses déjà émises, mais non vérifiées, au sujet d'un potentiel effet débit de la dose chez les bactéries (IAEA, 1973, 1981, 1982, Urbain 1986 et Diehl, 1990). Ainsi l'hypothèse de la recombinaison des radicaux libres entre-eux à un débit de la dose élevé, occasionnant une diminution des intéractions des radicaux libres avec les autres entités absorbantes et diminuant par le fait même la quantité d'effets indirects, mentionnée par Urbain en 1986 et Diehl en 1990, est théoriquement valable mais les débits utilisés ici ne sont sans doutes pas assez élevés et ne représentent pas un spectre de débits assez large pour le mettre en évidence ou le prouver d'une manière définitive.

Pour réussir à mettre un tel effet en évidence, il serait nécessaire de comparer les DRD reliées à l'utilisation d'électrons accélérés avec celles reliées aux débits obtenus du cobalt 60. Cependant une telle étude serait difficilement réalisable pour plusieurs raisons dont le coût et la disponiblité de l'équipement, le CIC et l'institut Armandpossédant pas d'accélérateur d'électron. Frappier ne L'élimination des pathogènes dans les aliments, même si on se réfère à des bactéries comme Salmonella typhimurium ou Listeria monocytogenes, chez qui on retrouve les DRD les plus élevée de notre étude, nécessite des doses d'irradiation relativement faibles. Ceci implique des temps d'exposition très courts lorsque le débit est élevé. Il est aussi important de pouvoir administrer plusieurs doses de façon précise et dans un intervalle assez rapproché pour permettre le calcul de la DRD, ce qui implique un nombre de bactéries survivantes assez élevé pour être statistiquement valable lors du dénombrements des UFC. L'utilisation d'un débit très élevé devient problématique et même impossible lorsqu'une dose transitoire est impliquée comme dans le cas des irradiateurs au cobalt 60 et Césium 137. Rappelons que la dose transitoire se définit comme la dose absorbée par les échantillons pendant la descente et la remontée entre la position de chargement et

la source. La dose transitoire devient trop importante par rapport à la dose administrée lorsqu'elle est supérieure à 5 % de celle-ci. Cette situation limite donc le champs des doses disponibles de façon pratique.

Nous avons rencontré type de problème ce avec l'"Underwater Calibrator" (UC-15) lorsque nous avons irradié des bactéries très sensibles comme Yersinia enterocolitica et Vibrio parahaemolyticus. Si on tient compte de la dose transitoire, la dose minimale applicable de façon précise dans un appareil comme l'UC-15, qui a un débit de la dose central moyen de 22 kGy/h, est de 0,2 kGy. Des bactéries comme celles mentionnées ci-dessus ont des DRD de l'ordre de 0,05 kGy. Ceci limite la dose maximale applicable à 0,4 kGy pour espérer avoir un nombre de survivants (UFC/ml) statistiquement valable lors du comptage, si on prend au départ une culture de 10⁸-10¹⁰ UFC/ml. On voit donc que le spectre de doses applicables entre 0,2 kGy et 0,4 kGy est très restreint. Ce qui explique le nombre inférieur de doses administrées, donc de points sur la courbe, à 22 kGy/h comparativement à 2,6 et 0,78 kGy/h pour les bactéries radiosensibles comme Yersinia enterocolitica (figure 11) et Vibrio parahaemolyticus (figure 12).

1.2.2 Débit de la dose d'irradiation et système de réparation de l'ADN.

L'hypothèse de l'effet débit de la dose associé à l'efficacité du système de réparation de l'ADN n'a pu être mise en évidence ici malgré les différentes espèces choisies ainsi que l'étude du débit de la dose dans deux phases de croissance différentes. Ceci peut être attribuable en partie au choix des souches qui aurait pu inclure une souche hautement radiorésistante. Cependant une telle souche, *Deinococcus* par exemple, n'a pas été incluse dans l'étude puisqu'aucune d'entre elles n'est pathogène pour l'homme et n'est retrouvée communément dans les aliments (Oyaizu et coll., 1987).

D'autre part cette hypothèse, chez les microorganismes, comme le mentionnent Frankenberg-Schwager et coll. en 1981, serait valable surtout à débit de la dose très faible. Les débits de doses employés ici sont sans doute trop élevés et leur spectre trop limité pour mettre en évidence un tel effet du débit de la dose chez des cellules procaryotes, plus radiorésistantes que les cellules eucaryotes. Ainsi tous les auteurs qui rapportent des effets associés a des débits de dose très faibles ont procédé à l'étude de ce phénomène chez des cellules eucaryotes. Cornwell et Bull (1966) ont étudié la survie des insectes et des larves d'insectes, Pavon-Flores (1976) a étudié la croissance et la survie de champignons, Frankenberg-Schwager et coll. (1981) ont étudié l'induction de bris dans la molécule d'ADN de cellules de levure. De nombreux auteurs rapportent aussi des effets reliés au débit de la dose d'irradiation mais chez des cellules leucémiques de souris ainsi que chez des cellules tumorales humaines. Les cellules eucaryotes étant beaucoup plus sensibles, les doses employées sont beaucoup plus petites et généralement les sources utilisées ont des débits très faibles. Ce type de débits ne pourrait jamais être utilisé dans l'industrie alimentaire en raison des longs temps d'exposition qu'il commande et de la perte de productivité qui en découlerait. A vrai dire, même le débit de la dose central moyen de la "Gamma Cell 220" de l'Institut Armand-Frappier, avec 0,78 kGy/h, est trop faible pour traiter des aliments.

Aucunes différences significatives n'ayant été décelées par l'analyse statistique des résultats nous utiliserons la moyenne des trois DRD obtenues, pour les trois débits étudiés, comme étant la DRD moyenne associée à une souche donnée. Ceci afin d'alléger le texte de la discussion des radiorésistances obtenues en fonction des espèces bactériennes. 1.3 Radiorésistances obtenues en fonction de l'espèce bactérienne.

Les tableaux III et IV présentent les radiorésistances obtenues en fonction des espèces bactériennes. Nos résultats à ce niveau se comparent à ceux retrouvés dans la littérature. Ainsi de façon générale, les bactéries à coloration Gram négative sont plus sensibles que celles à coloration Gram positive. Par conséquent des doses plus faibles sont requises pour éliminer les bactéries entériques comme *Escherichia coli* et *Campylobacter jejuni* que celles utilisées pour éliminer *Listeria monocytogenes*.

Bien qu'il soit possible d'interpréter nos résultats, comme nous venons de le faire, en fonction des critères généraux admis au niveau de la radiorésistance bactérienne (Erdman et coll., 1961, Thornley, 1963, Dyer et coll., 1966) peu d'informations sont disponibles au niveau des radiorésistances chez des genres bactériens comme Yersinia enterocolitica, Vibrio parahaemolyticus et Campylobacter jejuni. Ces derniers font parti de ce qu'il est convenu d'appeller les nouveaux ennemis en microbiologie alimentaire. Ainsi pour Yersinia enterocolitica El-Zawahry et Rowley rapportent, en 1979, des doses de réduction décimales (DRD) allant de 0,10 à 0,12 kGy dans un bouillon riche (TSB) et de 0,20 kGy dans le boeuf haché à 25 ^oC. Dans le cas de

Campylobacter jejuni, Lambert et Maxcy rapportent en 1984 une DRD de 0,27 kGy lorsque la bactérie est irradiée dans un bouillon riche (BHI). Aucune donnée n'est disponible au niveau de la radiorésistance de ces bactéries lorsqu'elles sont irradiées dans un milieu non protecteur. Cependant, il est admis dans la littérature que les DRD en milieu non protecteur devraient être plus faibles que celles obtenues suite à l'irradiation dans un milieu pouvant apporter une protection puisqu'aucune substance n'est présente faisant office telles d'accepteur de radicaux libres. De substances protectrices incluent par exemple les acides aminés, les protéines, les produits contenant des groupements SH comme la cystéine, etc. De plus, le fait qu'il s'agisse de bactéries entériques, des bâtonnets Gram négatifs tout comme Escherichia coli, nous permet de penser que leurs radiorésistances seront plus faibles que celles rapportées et approchant celle d'Eschericia coli. Nos résultats suivent effectivement ce shéma avec des DRD moyennes de 0,05 kGy et de 0,08 kGy pour Yersinia enterocolitica et Campylobacter jejuni respectivement en comparaison à 0,06 kGy pour Escherichia coli.

Dans le même ordre d'idée, on s'attend à une radiorésistance semblable pour Vibrio parahaemolyticus. Matches et Liston ont obtenu, en 1971, une réduction de logs à partir d'une culture initiale de 107 4 à 7 organismes/ml et ce en irradiant la culture dans un milieu composé d'eau salée et peptonée avec une dose entre 0,2 et 0,3 kGy. Ceci équivaut à une DRD d'environ 0,05 kGy. Nos résultats, bien qu'ils soient légèrement inférieurs, avec une DRD moyenne de 0,03 kGy, sont conformes à ceux rapportés ici.

Dans le cas de *Staphylococcus aureus* GD 13 et ATCC 13565 nous obtenons des radiorésistances plus faibles que celles généralement rapportées dans la littérature soit 0,09-0,13 kGy comparativement à 0,2 kGy par Slabyj et coll., 1965 et 0,4 kGy par Lefebvre, 1990. Des études antérieures ont cependant démontré que la radiorésistance peut varier à l'intérieur d'une espèce donnée en fonction de la souche. Ainsi Thibault en 1987 a obtenu des DRD allant de 0,13 à 1,12 kGy pour plusieurs souches de *Staphylococcus aureus* irradiées en phase stationnaire dans l'eau physiologique (0,85% NaCl) à un débit de 1,9 kGy/h.

Selon Matic et coll. 1990, la DRD de Salmonella typhimurium peut varier de 0,3 à 1 kGy dépendemment de la souche et des conditions environnementales. Shamsuzzaman et coll. 1989, ont étudié deux souches de Salmonella typhimurium, ATCC 13311 et K1-2B, résistantes à l'acide nalidixique et rapportent une DRD près de 0,20 kGy pour les deux souches irradiées dans une solution de tampon phosphate. Suite à ces résultats, les DRD moyennes de 0,15 à 0,20 kGy obtenues lors de notre étude pour Salmonella typhimurium ATCC 14028 sont conformes ou légèrement inférieures à celles rapportées dans la littérature. Ceci peut s'expliquer par l'utilisation de l'eau physiologique (0,85% NaCl) au lieu d'une solution de tampon phosphate ainsi que par des conditions d'irradiation différentes de celles utilisées par les autres auteurs cités.

Nous avons obtenu des DRD moyennes de 0,21 kGy et de 0,25 kGy pour Listeria monocytogenes 1A1 en phases exponentielle et stationnaire de croissance respectivement et de 0,17 kGy et 0,23 kGy pour la souche ATCC 19111 dans les même conditions de traitement et de croissance. Encore une fois aucune donnée n'est disponible pour les DRD susceptibles d'être obtenues dans un milieu non protecteur, comme l'eau physiologique (0,85% NaCl). Nous pouvons cependant nous baser sur les résultats obtenus en bouillon de culture en supposant que nos résultats devraient être inférieurs à ceux ci. Ainsi Brandao Areal (résultats non publiés) a obtenu des DRD allant de 0,19 à 0,27 kGy et de 0,29 à 0,35 kGy pour Listeria monocytogenes 1A1, et de 0,29 à 0,31 kGy et de 0,30 à 0,38 kGy pour la souche ATCC 19111 en phases exponentielle et stationnaire de croissance respectivement dans les deux cas. Huhtanen et coll., 1989, ont obtenu une DRD moyenne de 0,35 kGy après irradiation de plusieurs souches de Listeria monocytogenes en bouillon. Nos DRD pour les mêmes souches sont inférieures à celles obtenues par Brandao Areal mais contrairement à celuici nous obtenons des DRD légèrement supérieures dans le cas de

la souche 1A1 comparativement à la souche ATCC 19111. Nous discuterons en détail dans une autre section, de la radiorésistance au sein d'une même espèce pour des souches différentes. Nos DRD sont aussi inférieures à celles obtenus par Huhtanen et coll., 1989.

De façon générale les DRD obtenues lors de notre étude sont généralement inférieures ou semblables à celles retrouvées dans la bibliographie. Ceci est possiblement dû à l'emploi de l'eau physiologique (0,85% NaCl) comme milieu d'irradiation. De plus, les conditions d'irradiation, Aw, températures, etc. varient beaucoup selon les auteurs. Un autre facteur qui rend la comparaison des résultats difficile réside dans l'emploi de différents milieux de récupération selon les auteurs.

1.4 Radiorésistance en fonction de la phase de croissance.

qu'un aliment contaminé puisse contenir Bien des bactéries dans toutes les phases physiologiques de développement, nous avons choisis de limiter notre étude aux phases de croissance exponentielle et stationnaire qui sont les phases majeures du développement bactérien. Cependant nous tenons à faire remarquer qu' une étude visant à déterminer la dose d'irradiation à appliquer pour éliminer une espèce bactérienne donnée dans un aliment spécifique, devrait tenir

compte de la phase la plus résistante. Toutes les espèces bactériennes de notre étude ont donc été irradiées en phases exponentielle et stationnaire de croissance à l'exception de *Campylobacter jejuni*. Cette exception est due au fait qu'une étude de la radiorésistance de cette bactérie en fonction de la phase de croissance a déjà été effectuée par Lambert et Maxcy en 1984 dans des conditions d'irradiation semblables aux nôtres. La conclusion des auteurs est que l'âge de la culture de *Campylobacter jejuni* n'a aucun effet significatif sur la radiorésistance.

L'analyse statistique des résultats par analyse des covariances sur SPSS Mannova indique que l'influence de la phase de croissance, exponentielle ou stationnaire, sur la radiorésistance (DRD) des divers microorganismes étudiés est variable. Aucune différence significative (p > 0,05) n'a été observée entre les DRD obtenues en phases exponentielle et stationnaire pour *Listeria monocytogenes* 1A1 (figure 5), *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 (figure 8), *Escherichia coli* 0157-H7 (figure 9), *Yersinia enterocolitica* (figure 11) et *Vibrio parahaemolyticus* (figure 12). Ceci aux trois débits de la dose étudiés. On observe la même chose pour *Salmonella typhimurium* (figure 10) à l'exeption de la DRD obtenue à 0,78 kGy/h en phase exponentielle qui est significativement supérieure (p < 0,05) à celle en phase stationnaire. *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 (figure 6) et *Staphylococcus aureus*

95

GD13 (figure 7) montrent une différence significative au niveau de leur DRD respective en fonction de la phase de croissance. Dans ces deux cas la DRD en phase stationnaire est supérieure à celle obtenue en phase exponentielle et ceci s'applique pour les trois débits étudiés. Les figures 16, 17 et 18 permettent d'ailleurs de visualiser ces résultats pour chaque débit de la dose.

La variabilité des résultats correspond à ce qui est retrouvé dans la bibliographie. Ainsi les auteurs ne s'entendent pas à savoir si la phase de croissance a oui ou non une influence significative sur la radiorésistance bactérienne et si oui devrait-on s'attendre à une augmentation ou une diminution de la DRD? Un bref survol de la bibliographie met en évidence les deux possibilités. Lambert et Maxcy dans leur revu bibliographique en 1984, s'entendent pour dire que généralement une culture en phase exponentielle de croissance est plus sensible au stress qu'une culture en phase stationnaire. Cependant l'effet de l'âge de la culture a été démontré comme étant variable par ces mêmes auteurs dépendemment de l'organisme en cause et des conditions de culture. Dupuy et Tremeau (1962) indiquent que de nombreuses études ont décrit l'influence des conditions de milieu sur la sensibilité aux radiations ionisantes d'Escherichia coli. Ces études ont démontré que les conditions de croissance aussi bien que les conditions dans lesquelles se font les

irradiations agissent assez fortement sur cette sensibilité. Dans le cas de *Pediococcus cerevisiae* les auteurs ont remarqué une augmentation de la DRD lorsque la croissance était diminuée ou arrêtée alors que les DRD étaient les même en phases stationnaire ou exponentielle pour *Escherichia coli* K12S. Dans le cas de *Escherichia coli* B/r la DRD variait selon le cycle de croissance pour atteindre un maximum en phase exponentielle avant de décroître à la fin de cette même phase. Les auteurs ont donc obtenu des comportements différents à l'intérieur d'une même espèce en fonction des souches comme c'est le cas dans notre étude pour *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*.

Bien qu'il semble certain maintenant que l'âge de la cuture ait un effet variable sur la radiorésistance selon l'espèce bactérienne étudiée, les conditions de croissance et d'irradiation; les DRD les plus élevées et aisément reproductibles d'un à essai un autre se retrouvent généralement chez les cellules où la croissance est ralentie ou arrêtée. Ainsi ce sont ces cellules qu'il faudrait utiliser pour comparer entre elles les DRD des diverses souches de préférence aux cellules provenant de la phase exponentielle.

Nous avons démontré lors de notre travail de recherche que, de façon générale, la phase de croissance n'avait aucune influence significative sur la DRD. Lorqu'une différence

97

significative a été observée, la DRD de la phase stationnaire était supérieure à celle de la phase exponentielle à une seule exeption près, *Salmonella typhimurium* irradiée à 0,78 kGy/h. C'est pourquoi nous avons choisi dans la deuxième partie de notre travail, qui consistait à irradier certaines bactéries dans un aliment, d'utiliser des bactéries en phase stationnaire de croissance.

2.0 ANALYSE DES RADIORÉSISTANCE DANS UN ALIMENT

2.1 Choix de l'aliment et des espèces bactériennes

Nous avons choisi d'étudier l'effet débit de la dose d'irradiation dans la viande de poulet parce que sa consommation est élevée en Amérique du Nord. De plus, la permission d'irradier la volaille vient d'être octroyer aux États-Unis (Federal Register, 1990) et pourrait l'être bientôt au Canada. Listeria monocytogenes et Salmonella typhimurium ont été choisies pour cette étude en raison de leur pathogénécité et de leur fréquente implication dans les épisodes d'infections alimentaires. De plus ces espèces bactériennes sont fréquemment retrouvées dans la viande de poulet. Une étude récente provenant du Royaume-Uni indique que 60% des poulets crus (réfrigérés ou congelés) étudiés étaient contaminés par Listeria monocytogenes (Pini et Gilbert, 1988). Corry et Lewis (1991) ont obtenus des
résultats similaires avec 56% des volailles contaminées par Listeria monocytogenes. L'incidence des Salmonelles dans le poulet et la dinde préparés est de 50-60 % selon Curtis (1984). De plus Shamsuzzaman et coll. memtionnent dans une étude publiée en 1989, la présence de Salmonella typhimurium dans le poulet désossé mécaniquement et plus particulièrement dans les poitrines de poulet désossées, même en l'absence de peau. Cette étude souligne aussi l'usage du poulet désossé mécaniquement comme modèle puisque c'est un produit commercial et qu'il a déjà été impliqué dans la transmission de Salmonelles, entre autres.

2.2 Effet débit de la dose

Aucun effet débit de la dose n'a été mis en évidence lors de l'irradiation de *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 et *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 à trois débits de dose différents dans un homogénat de poulet. Les radiorésistances obtenues sont indiquées au tableau V et les figures 14 et 15 permettent de visualiser les courbes de survie. L'analyse statistique des résultats par analyse des covariances avec SPSS Mannova indique que le facteur p obtenu pour chaque cas est toujours supérieur à 0,05. Ceci n'est pas surprenant puisqu'aucun effet débit de la dose n'avait été observé dans le cas des mêmes espèces bactériennes irradiées dans l'eau physiologique (0,85% NaCl). L'homogénat de poulet n'occasionne aucune différence au niveau de l'effet débit de la dose bien qu'il augmente la radiorésistance bactérienne par son effet protecteur vis-à-vis des radicaux libres.

2.3 Radiorésistances dans le poulet

Listeria monocytogenes ATCC 1911 a une DRD de 0,38 kGy aux débits 0,78 et 2,6 kGy/h et de 0,36 kGy à 22 kGy/h. Statistiquement il n'y a aucune différence significative entre ces valeurs comme nous l'avons déjà mentionné à la section précédente. Nous considérerons donc une DRD moyenne de 0,37 kGy dans l'homogénat de poulet comparativement à 0,23 kGy dans l'eau physiologique (0,85% NaCl). La DRD moyenne obtenue dans l'homogénat de poulet est conforme à celle obtenue par Huhtanen et coll. en 1989. Ceux-ci ont obtenu une DRD moyenne de 0,35 kGy pour sept souches de Listeria monocytogenes différentes, irradiées dans le poulet. Cependant elle est inférieure à celles obtenues par Patterson (1989) dans la viande de poulet. Dans ce cas les DRD varient entre 0,42 kGy et 0,55 kGy selon le milieu de récupération utilisé et la souche. Nous avons utilisé lors de notre étude un milieu de récupération d'usage général soit le "Plate Count Agar" (PCA), ceci peut expliquer l'obtention de DRD plus faibles puisqu'il a été démontré que le milieu de récupération influence la DRD (Patterson, 1989 et Warburton et coll., 1992).

Selon nos résutats, la DRD moyenne de Salmonella typhimurium ATCC 14028 est de 0,32 kGy dans l'homogénat de poulet comparativement à 0,15 kGy dans l'eau physiologique (0,85% NaCl). Shamsuzzan et coll. (1989) ont étudié la radiorésistance de deux souches de Salmonella typhimurium irradiées sur des cuisses de poulet, soit Nal^r ATCC 13311 et K1-2B. Ils ont obtenu une DRD moyenne de 0,53 kGy pour la souche Nal^r et 0,32 kGy pour K1-2B. Il y a donc une variation au niveau de la DRD pour une même espèce selon la souche. Thayer et Boyd (1991) ont obtenu une DRD de 0,47 kGy en irradiant la souche Salmonella typhimurium ATCC 14028, soit la même que nous, dans un homogénat de poulet à 20 °C. Ils ont cependant utilisé le milieu TSA comme milieu de récupération et la technique de la dilution en gélose pour les dilutions. Une autre différence susceptible d'influencer les résultats est la quantité d'eau supérieure présente dans l'homogénat permettant une plus grande formation de radicaux libres, la quantité d'eau et un milieu de récupération différent peuvent expliquer en partie la DRD plus faible que nous avons obtenue.

Nos résultats démontrent clairement l'effet protecteur d'un milieu complexe tel un homogénat de poulet comparé à un milieu simple comme l'eau physiologique (0,85% NaCl). Les DRD observées dans le milieu complexe sont près de deux fois plus élevées que celles observées dans l'eau physiologique (0,85% NaCl). La viande de poulet constitue un milieu où la quantité d'eau est réduite et un milieu beaucoup plus riche en matière organique que l'eau physiologique (0,85% NaCl). La quantité de radicaux libres formés dans l'homogénat de poulet est donc plus faible et ces derniers sont susceptibles d'être acceptés par les protéines et les polysaccharides présents dans la viande.

3.0 ANALYSE DES RADIORÉSISTANCES À L'INTÉRIEUR D'UNE MEME ESPECE BACTÉRIENNE POUR DES SOUCHES DIFFÉRENTES.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la radiorésistance varie souvent à l'intérieur d'une même espèce des souches différentes. Ainsi dans AVEC le cas de Staphylococcus aureus aucune différence significative n'est observée entre les DRD de la souche GD13 et ATCC 13565 irradiée en phase stationnaire alors que les DRD de la souche ATCC 13565 irradiée en phase exponentielle sont plus élevées que celles de la souches GD13. De façon générale aucune différence significative n'est observée entre les DRD des souches de Listeria monocytogenes étudiées à l'exception des DRD obtenues en phase exponentielle de croissance à 2,6 kGy/h. Après un bref survol de la bibliographie on remarque que, bien plusieurs chercheurs rapportent des variations que à l'intérieur d'espèces pour des souches différentes, aucun n'est en mesure d'apporter une explication à ce phénomène qui semble des plus variable selon les auteurs et les conditions

d'irradiation. Notre étude s'étant limitée à deux souches seulement à l'intérieur de deux espèces et de deux genres il ne s'agit que d'un bref aperçu du phénomène qui pourrait être approfondi au cours d'études subséquentes plus appronfondies. CONCLUSION

÷.

A partir de nos résultats nous pouvons conclure que la variation du débit de la dose d'irradiation, par le cobalt 60, sur des bactéries pathogènes d'origine alimentaire n'a aucune influence, du moins dans l'intervalle étudié (0,78 kGy/h à 22 kGy/h) sur leur radiorésistance et ceci autant en milieu simple (non protecteur) qu'en milieu comlexe (protecteur). L'absence d'effet relié au débit de la dose est rassurant au niveau de l'irradiation alimentaire puisque il en facilite l'usage industriel, et peut être ainsi vu comme un aspect positif supplémentaire de cette technique de conservation.

La radiorésistance des bactéries pathogènes d'origine alimentaire varie en fonction de la phase de croissance. Cependant il semble admis, comme nous l'avons remarqué, que la phase stationnaire de croissance permet une meilleure reproductibilité des résultats. Le milieu d'irradiation influence la radiorésistance bactérienne en modifiant la disponiblité des radicaux libres produits. Plus le milieu est complexe plus la quantité de substances pouvant faire office de "bouclier" est grande et plus la radiorésistance devrait être élevée. Des études plus approfondies seraient nécessaires au niveau de chacune des espèces bactériennes afin de déterminer dans quelle phase de croissance et dans quel milieu la radiorésistance est la plus élevée afin de déterminer la adéquate d'irradiation pour l'élimination dose de ces bactéries. La radiorésistance la plus élevée, parmi les

105

espèces bactériennes étudiées lors de ce travail, se retrouve chez *Listeria monocytogenes*. Il pourrait être utile d'utiliser le comportement de cette bactérie face à l'irradiation comme modèle, afin de déderminer la dose d'irradiation à administrer, pour tout produit susceptible d'être contaminé par cette bactérie plutôt que d'entreprendre des études sur tous les genres ayant une radiorésistance inférieure. REMERCIEMENTS

τ.

Je tiens à remercier sincèrement mon directeur de mémoire, Monsieur Raymond Charbonneau, professeur au CRESALA, pour son support technique et financier, ses précieux conseils ainsi que pour la confiance qu'il m'a accordée.

Mes remerciements vont aussi à Marie Racine, sans qui mon projet aurait été beaucoup plus long et pénible, pour son assistance technique, sa grande patience et son sourire à toute épreuve!

Merci aussi à Marie Désy, pour l'analyse statistique des résultats et à toute l'équipe de Nordion International inc., notamment Daniel Lévesque, Jeannot Proulx et Robert Lalonde, pour leur assistance technique au niveau des irradiateurs, leur disponibilité et leur patience.

Je tiens de plus à remercier toutes les personnes dont le nom suit, en espérant n'en avoir oublié aucune:

Henrique Brandao Areal, pour tous ses conseils, Francine Dinelle, Lucie Dumont, Danielle Groulx, Benoit Latreille, Sylvain Milot pour leur support moral, Le Thi Hong Nhung et Chantal Thibault dont l'orthographe est meilleure que la mienne! Je tiens aussi à remercier le Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec pour leur soutien financier.

En terminant j'aimerais remerçier l'Institut Armand-Frappier pour la bourse d'étude accordée. BIBLIOGRAPHIE

1

Agriculture Canada. 1988. Objectif salubrité. Bulletin sur les toxi-infections alimentaires. <u>7</u>: 1-4 Direction générale de la production et de l'inspection des aliments.

AIFST, CSIRO. 1976. Food-Borne Microorganisms of Public Health Significance, Special course for the food industry <u>6</u> (I et II) Chapitre 11-14-15.

Anderson, Joan. 1989. Food irradiation; An Alternative Food Processing Technology. Agriculture Canada. Food development division.

Barburek, I. et Sosna, M. 1983. The modifying effect or the frequency of pulses of ionizing radiation on its efficiency in biological experiments. Biol. Plant. <u>25</u> (2): 134-138.

Baross, J. and Liston, J. 1970. Occurrence of Vibrio parahaemolyticus and related haemolytic vibrios in marine environnements of Washington State. Appl. Microbiol. <u>20</u>:179-186.

Bean, N.H., Griffin, P.M., Goulding, J.S., Ivey, C.B. 1990. Foodborne disease outbreaks, 5-year summary, 1983-1987. MMWR, 39: 15-37.

Beaulieu, M., Lacroix, M., Charbonneau, R., Gagnon, M. 1991. Gamma irradiation dose rate effect on biochemical microbiological and physical quality of mushrooms. (Agaricus bisporus) stored at 15°C and 90% R.H. Presentation to FAO and IAEA, division of nuclear techniques in food and agriculture, at the first research co-ordination meeting (RCM) on irradiation with other processes for improving food quality. Strasbourg, France.

Bergdoll, M.S. 1979. Staphylococcal intoxications. In " Foodborne Infections and Intoxications", 2 nd. ed. H.Reimann and F.L. Bryan, p443. Academic Press, New York.

Brandao Areal H. 1992. Communication personnelle.

Brooks, B.W., and Murray, R.G.E. 1981. Nomenclature for "Micrococcus radiodurans" and other radiation-resistant cocci: Deinococcaceae fam. nov. and Deinococcus gen. nov., including five species. Int. J. Syst. Bacteriol. <u>31</u>: 353-360.

Brynjolfsson, A. et C.P. Wang. 1982. "Atomic structures" in Preservation of food by ionizing radiation. Josephson E. S. and Peterson M.S.Eds. CRC Press Inc. Florida. Vol 1 chap.4: 80-108.

CAST. 1986. Ionizing Energy in food processing and pest control:I. Wholesomeness of food treated with ionizing energy. Report No. 109.

Charbonneau, R. 1984. Les effets de l'irradiation sur les microorganismes. Conférence sur l'irradiation et ses applications. Institut Armand-Frappier, Laval, Québec:53-70.

Chuaqui-Offermanns, N. 1984. Packaging materials for use in irradiation. Food engineering Vol.4.

Codex Alimentarius Commission. 1984. Codex Alimentarius Volume XV. Codex general standards for irradiated foods and recommended international code of practice for the operation of radiation facilities used for the treatment of foods. Joint FAO\WHO Food Standards Program. CAC.XV-Ed.1. Food and Agriculture Organization of the United Nations, WHO, Rome.

Cornwell, P.B. and Bull, J.O. 1966. A comparison of the susceptibility of the grain weevil Sitophilus granaricus (L) to accelerated electrons and cobalt 60 gamma radiation. in <u>Entomology of radiation disinfestation of grain</u> Cornwell, P. B. Ed., Pergamon Press. pp.173-175.

Corry, J.E.L. and Lewis, J.S. 1991. Survey of the incidence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in experimentally irradiated and in matche unirradiated raw chickens. Int. J. food Microbiol. 12: 257-262.

Curtis L. 1984. Economic study of salmonella poisoning and control measures in Canada. Agriculture Canada Working Paper 11/84.

Darnell, J., Lodish, H. et Baltimore, D. 1988. <u>La cellule,</u> <u>biologie moléculaire.</u>, Décarie Editeur Inc. Ville Mont-Royal, Québec et Editions Vigot, Paris. pp. 517-565.

٩.

Diehl, J. F. 1990. <u>Safety of irradiated foods.</u> Marcel Dekker Inc., NY and Basel, p. 10, 44, 50, 54, 99, 200.

DIFCO manual. 1984. Dehydrated culture media and reagents for microbiology. Tenth Edition. Difco Laboratories. Detroit, Michigan, 1155p.

DGPS. 1986. a. Procédures de laboratoire. Isolement de Vibrio parahaemolyticus dans les poissons marins et les coquillages. Ottawa. Vol. 4. 26 p.

DGPS. 1986. b. Procédures de laboratoire. Isolement de Yersinia enterocolitica et de Yersinia pseudotuberculosis dans les aliments. Ottawa. Vol.4. 26 p.

Doyle, P.M. and Schoeni, J.L. 1987. Isolation of *Escherichia coli* 0157:H7 from retail fresh meats and poultry. Appl. Environ. Microbiol. <u>53</u> (10): 2394-2396.

Dupuy, P. et Tremeau, O. 1962. Influence des conditions de culture sur la résistance aux radiations de quelques "Lactobacillus". CNRS. XII L'emploi des radioisotopes en sciences nutritionelles et des rayonnement ionisants en technologie alimentaire. Strasbourg 1-6. Vol. 10. pp. 427-437.

Dyer, K.J. Anderson, A.W. and Dutiyabodhi, P. 1966. Radiation survival of pathogens in complex media. Appl. Microbiol. **14**: 92-97.

Eichholz, G.G. and Popell, S.W. 1989. Dose rate effects in the control of iron bacteria by irradiation. Appl. Radiat. Isot. <u>40</u> (4): 337-339.

El-Kest, S.E., and Marth, E.H. 1992. Freezing of Listeria monocytogenes and other microorganisms: A review. J. Food Prot. <u>55</u> (8): 639-648.

El-Zawahry Y.A. and Rowley, D.B. 1979. Radiation resistance and injury of Yersinia enterocolitica. App. Env. Microbiol. 37 (1): 50-54.

Emborg, Claus. 1972. The influence of preparation technique, humidity and irradiation conditions on radiation inactivation of *Streptococcus faecium* strain A2I. Acta. Path. Microbiol. Scand. Section B. <u>80</u>: 367-372.

Erdman, I.E., Thatcher, F.S., MacQueen, K.F. 1961. Studies on the irradiation of microorganisms in relation to food preservation. I. The comparative sensitivities of specific bacteria of public health significance. Can.J. Microbiol. (7): 199-205.

Farber, J.M. 1991. Listeria monocytogenes. J. Assoc. Off. Anal. Chem. <u>74</u> (4): 701-704.

Farkas, J. 1989. Microbiological safety or irradiated foods. Int. J. food Microbiol. (9): 1-15.

Federal Register, 1990. Irradiation in the production and handling of food. Fed. Reg. (55): 18538-18544.

Foster, E.M. 1986. New bacteria in the news. A special symposium. *Campylobacter jejuni, Escherichia coli*. Food technol. <u>40</u> (8): 20-21.

Frankenberg-Schwager, M., Frankenberg, D., Blocher, D. and Adamczyk. 1980. Repair of DNA double-strand breaks in irradiated yeast cells under nongrowth conditions. Radiat. Res. <u>82</u>: 498-510.

Frankenberg-Schwager, M., Frankenberg, D., Bloecher, D. and Adamczyk, C. 1981. Radiat. Res. <u>87</u> (3): 710-717.

Furuno-Fukushi, I. and Matsudaira, H. 1989. Mutation induction by different dose rates of gamma rays in radiationsensitive mutants of mouse leukemia cells. Radiat. Res. <u>120</u>: 370-374 **Gentner, N.E. and Paterson, M.C.** 1984. Damage and repair fron ionizing radiation. In <u>Repairable lesions in microorganisms</u>. Cap. 2p. 57-84. Ed. by Hurst, A. and Nasim, A. Academic Press. London.

1

Gourama, H., Tsai, W.Y.J., and Bullerman, L.B. 1991. Growth and production of enterotoxin A and D by *Staphylococcus aureus* in salad bar ingredients and clam chowder. J. of Food Prot. <u>54</u> (11):844-847.

Grecz, N. , D.B. Rowley et A. Matsuyama. 1983. "The action of radiation on bacteria and viruses" dans <u>Preservation of</u> <u>food by ionizing radiation</u>. Josephson E. S. and Peterson M.S. Eds. CRC Press Inc. Florida vol. 2, Chap.: 4: 167-218.

Hanna, M.O., Stewart, J.C., Zink, D.L., Carpenter, Z.L. and Vanderzant, C. 1977. Development of Yersinia enterocolitica on raw and cooked beef and pork at different temperatures. J. Food Sci. <u>42</u>: 1180.

Hauduroy, P., Ehringer, Guillot, G., Magrou, Prévot, A.R., Rosset et Urbain. 1953. <u>Dictionnaire des bactéries pathogènes.</u> Masson and Cie.

Hashisaka, A.E., Weagant, S.D., and Dong, F.M. 1989. Survival of *Listeria monocytogenes* in mozzarella cheese and ice cream exposed to gamma irradiation. A research note. J. Food Prot. 52 (7): 490-492.

Huhtanen, C. N., Jenkins, R. K., and Thayer, D. W. 1989. Gamma radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. <u>52</u>: 610-613.

Hutchinson, F. 1985. Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation. Progress in nucleic acid research and molecular biology. <u>32</u>: 115-54.

Ibrahim, A., and Mac Rae, I.C. 1991. Isolation of Yersinia enterocolitica and related species from red meat and milk. J. of Food Science <u>56</u> (6): 1524-1526.

IAEA. 1973. Manual on radiation strerilization of medical and biological materials. Technical Reports Series no. 149. Vienna 13-147.

τ.

IAEA. 1981. Combination Processes in Food Irradiation. Proceedings of a symposium, Columbo 24-28 november 1980, jointly organized by IAEA and FAO, Vienna:367-372.

IAEA. 1982. Training manual on food irradiation technology and techniques. Technical Reports Series no. 114, Vienna: 31-109.

IAEA. 1989. Food Irradiation Newsletter. Joint FAO\IAEA Division of nuclear techniques in food and agriculture. Vienna, 13 (2).

Jawetz, E., Melnick, J.L., and Adelberg, E.A. 1987. <u>A Lange</u> <u>Medical Book</u>, Review of medical microbiology. 17 th. Ed. Chapitre 16 et 21.

Jonhson, L.J., Doyle, M.P., Cassens, R.G. 1990. Listeria monocytogenes and other Listeria spp. in meat and meat products, A review. J. Food Prot. <u>53</u> (1) 81-91.

Josephson, E.S. and Peterson, M.S. 1983. <u>Preservation of food</u> by ionizing radiation. Vol. 1. CRC Press. Boca Raton. Florida. 378 p.

Kampelmacher, E.H. 1981. Prospects of eliminating pathogens by the process of food irradiation. IAEA. Combination Processes in Food Irradiation. Proceedings of a symposium, Columbo 24-28 november 1980, jointly organized by IAEA and FAO, Vienna: 265-289.

Kiefer, J. 1990. Biological radiation effects.Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.

Kloos, W.E. and Schleifer, K.H. 1981. The Genus Staphylococcus in <u>The Procaryotes</u>, Vol. II. Mortimer P.Stau Ed. Lambert, J. D., and Maxcy, R.B. 1984. Effect of gamma radiation on *Campylobacter jejuni*. J. Food Sci. <u>49</u> (3): 665-667.

2

Lefebvre, N. 1990. Essais d'amélioration de la salubrité et de la période de conservation du boeuf haché à l'aide de rayonnements ionisants. Mémoire de maîtrise. Institut Armand-Frappier. Université du Québec. 154 p.

Lindahl, T. 1982. DNA repair enzymes. Ann. Rev. Biochem. <u>51</u>: 61-87.

Liston, J., Chan, J.G. and Baross, J.A. 1967. Marine microbiology. In "1966 Research in Fisheries", University of Washington.

Marko, A.M. 1981. Biological effects of ionizing radiation, Atomic Energy of Canada Limited AECL-7164.

Matches, J.R. and Liston, J. 1971. A Research Note, Radiation destruction of Vibrio parahaemolyticus. J. Food Sci. <u>36</u>: 339-340.

Matic.S, Mihokovic,V., Katusin-Razem,B. and Razem,D. 1990. The eradication of *Salmonella* in egg powder by gamma irradiation. J. of Food Prot. <u>53</u> (2): 111-114.

Maxcy, R. B. 1983. Significance of residual organisms in foods after substerilizing doses of gamma radiation: a review. J. Food Safety <u>5</u> (4): 203-211.

Maxcy, R.B. and K.MA. 1981. Factors influencing radiation resistance of vegetative bacteria and spores associated with radappertization of meat. J. Food Sci. <u>46</u>: 612-616.

McLaughlin, W.L., Boyd, A.W., Chadwick, K.H., Mc.Donald, J.C. and Miller, A. 1989. Dosimetry for radiation processing. Ed. Taylor and Francis. pp. 185-199.

Michael, B.D. 1974. Problems of dosimetry at high dose rate. In <u>Sterilization by ionizing radiation.</u> Vol. 1. Edited by E.R.L. Gaughtan and A.J. Goudie (Mtl. Multi-science) p. 270. Micusan, V.V. 1984. Les effets de l'irradiation sur les microorganismes, Conférence sur l'irradiation et ses applications, Institut Armand-Frappier, Laval, Québec: 41-52.

Mills, Susan. 1987. Le point sur l'irradiation des aliments, document d'étude, Conseil des sciences du Canada. Ottawa. 61p.

Moseley, B.E.B. 1984. Radiation damage and its repair in nonsporulating bacteria. In: M.H.E. Andrew and A.D. Russel (Eds.), <u>The revival of Injured Microbes</u>, Academic Press, London, pp. 147-174.

Moseley, B.E.B. 1989. Ionizing radiation : Action and repair. In. <u>Mechanisms of action of food preservation procedures</u>. Edited by G.W. Gould, Elsevier Applied Science. London & NY. Chap. 3. p. 43-70.

NFA. 1986. Irradiation of Food. The translation of a report by a danish working group, 9,18, 115-120,138-145.

OMS 1981. World Health Organization, Technical Report, 1981. <u>Wholesomeness of irradiated foods</u>. Report of joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee, WHO Technical Report, 659.

Oyaizu,H., Stackebrandt, E., Schleifer, K.E., Ludwig, W., Pohla, H., Ito, H., Hirata, A., Oyaizu, Y. and Komagata, K. 1987. A radiation resistant rod-shaped bacterium, *Deinobacter grandis* gen.nov., sp. nov., with peptidoglycan containing ornithine. Int. J. of Syst. Bacteriol. <u>37</u> (1): 62-67.

Patterson, M. 1989. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to irradiation on poultry meat in phosphate-buffered saline. Letters in Appl. Microbiol. <u>8</u>: 181-184.

Pavon-Flores, C.S. 1976. Gamma radiation as fungicide and its effects on paper. Bulletin of AIG, 16.1, 15-44.

Pini, P.N. and Gilbert, R.J. 1988. The occurence in the U.K. of *Listeria* species in raw chikens and soft cheeses. Int. J. Food Microbiol. <u>6</u>: 317-326.

Resnick, M.A. 1978. Similar responses to ionizing radiation of fungal and vertebrate cells and the importance of DNA double-strand breaks. J. Theor. Biol. <u>71</u>: 339-346.

Sànchez-Reyes, A. 1992. A simple model of radiation action in cells based on a repair saturation mechanism. Radiat. Res. **130**: 139-147.

Shamsuzzaman, K., Goodwin, M., George, I. and Singh, H. 1989. Radiation survival of two nalidixic acid resistant strains of Salmonella typhimurium in various media. Radiat. Phys. Chem. 34 (6): 985-989. Int. J. Radiat. Appl. Instrum., Part C.

Shamsuzzaman, K., Chuaqui-Offermanns, N., Lucht, L., Mc Dougall, T., and Borsa, J. 1992. Microbial and other characteristics of chicken breast meat following electron-beam and sous-vide treatments. J. Food Prot. <u>55</u> (7): 528-533.

Silliker, J.H. 1986. New bacteria in the news. A special symposium. *Campylobacter jejuni*. Food technol. <u>40</u> (8): 22.

Simic, M. G. 1983. Radiation chemistry of water -soluble food components in <u>Preservation of food by ionizing radiation</u>. E.S. Josephson et M.S. Peterson éds., Vol. II. CRC Press, Boca Raton, Florida, chapitre 1.

Singh, A. and Singh, H. 1982. Time-scale and nature of radiation-biological damage: approaches to radiation protection and post-irradiation therapy. Prog. Biophys. Molec. Biol., <u>32</u>: 69-107.

Singh, H., Charbonneau, R., Thibault, C. et Gagnon, M. 1992. Control of Salmonella and other pathogenic and spoilage microorganisms in poultry by gamma and electron irradiation: A review. Radiation Application Research Branch. Whiteshell Nuclear Research Establishment, Pinawa, Manitoba, ROE 1L0.

Slabyj,B.M., Dollar, A.M., Liston, J. 1965. Post-irradiation survival of *Staphylococcus aureus* in sea foods. J. Food Sci. <u>30</u>: 344-350.

Stapleton, G.E. 1955. Variations in the sensitivity of *Escherichia coli* to ionizing radiations during the growth cycle. J. Bacteriol. <u>70</u> (4): 357-362.

Sudhakar, P., Nageswara R., Ramesh, R., Bhat, V. and Gupta, C.P. 1988. The economic impact of a foodborne disease outbreak due to *Staphylococcus aureus*. J. Food Prot. <u>51</u> (11): 898-900.

Tanaka, C.H., Kubo, Y and Tsuda, M. 1988. Comparison of mutagens in *Cochliobolus heterostrophus* mutagenesis. Ann. Phytophatol. Soc. Jpn. <u>54</u> (3): 503-509.

Taub, I. A. 1983. Reaction mechanisms, irradiation parameters, and product formation in <u>Preservation of food by ionizing</u> <u>radiation</u>. E.S Josephson et M.S. Peterson, ed., Vol. II CRC Press, Boca Raton, Florida, chapitre 3.

Thayer, D.W., Songprasertchai, S. and Boyd, G. 1991. Effects of heat and ionizing radiation on *Salmonella typhimurium* in mechanically deboned chicken meat. J. Food Prot. <u>54</u> (9): 718-724.

Thayer, D.W. and Boyd, G. 1991. Effect of ionizing radiation dose, temperature, and atmosphere on the survival of *Salmonella typhimurium* in sterile, mechanically deboned chicken meat. Poultry Science <u>70</u> (2): 381-388.

Thibault, Chantal. 1987. Etude des effets des rayonnements gamma sur la flore bactérienne et la conservation des filets de morue (*Gadus morhua*). Mémoire de maîtrise. Institut Armand-Frappier. Université du Québec. 111p.

Thornley, M.J. 1963. Radiation resistance among bacteria. J. Appl. Bact. <u>26</u> (3): 334-345.

Todd, C.D.E. 1988. Preliminary estimates of costs of foodborne disease in Canada and costs to reduce salmonellosis. J. Food. Prot. <u>52</u> (7): 503-511.

Tranter, S. H. 1990. Foodborne illness; Foodborne staphylococcal illness. The Lancet. <u>27</u>: 1044-1046.

Urbain, W. 1986. Food irradiation. Academic Press. Inc. N-Y, États-Unis, <u>33</u>: 99-103.

Urbain, W. 1984. Irradiated foods: A giant step beyond Appert. Nutrition Today. <u>19</u> (4): 2-7.

Warburton, D.W., Farber, J.M., Powell,C., Tiwari, N.P., Read, S., Plante,P., Babiuk, T., Laffey,P., Kauri, T., Mayers,P., Champagne, M.J., Hunt, T., Lacasse, P., Viet, K., Smando, R. and Coates, F. 1992. Comparison of methods for optimum detection of stressed and low levels of *Listeria* monocytogenes. Food Microbiol., <u>9</u>: 127-145.

Wiesner, L. 1981. Repair capacity for DNA defects and inactivation of microorganisms during treatments with radiation and other agents. IAEA. Combination Processes in Food Irradiation. Proceedings of a symposium, Columbo 24-28 november 1980, jointly organized by IAEA and FAO, Vienna: 265-289.

Wilson, I.G., Cooper, E.J. and Gilmour, A. 1991. Detection of enterotoxigenic Staphylococcus aureus in dried skimmed milk: Use of polymerase chain reaction for amplification and detection of staphylococcal enterotoxin genes entB and ent C1 and the thermonuclease gene nuc. Appl. Environ. Microbiol. <u>57</u> (6):1793-1798. ANNEXES

1