

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand-Frappier – Microbiologie et Biotechnologie

***UTILISATION DE L'IRRADIATION GAMMA SEULE OU EN
COMBINAISON AVEC D'AUTRES TRAITEMENTS COMME
MOYEN DE CONSERVATION DES CAROTTES PRÊTES À
MANGER***

Par
Roxane Lafortune

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

Jury d'évaluation

Examineur interne	Réjean Beudet, Microbiologie et Biotechnologie
Examineur externe	Pierre Simard, Université Laval à Québec
Directrice de recherche	Monique Lacroix, Microbiologie et Biotechnologie
Codirecteur de recherche	François Shareck, Microbiologie et Biotechnologie

À ma famille...

«Et je veux vivre comme un fou, comme un défoncé, je veux manger de la vie comme de la vache enragée. Et je veux dévorer du temps, dévorer du temps comme un avaleur de sable, planté debout, gueule ouverte, sous le trou du grand sablier de l'éternité.»

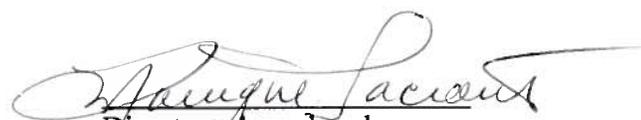
- Stéphane Bourguignon

RÉSUMÉ

La carotte figure parmi les légumes les plus consommés en Amérique du Nord. Afin de combler la demande grandissante des consommateurs concernant l'accessibilité à des produits frais prêts à manger, ce légume a été minimalement transformé. La carotte est maintenant retrouvée sous forme de bâtonnets, de rondelles, ajoutées en salades de légumes mélangés, râpée et miniature pelée. Or, ce type d'aliments est consommé cru et sans traitement à la chaleur. La consommation de ces denrées comporte donc des risques sans oublier les nombreuses sources possibles de contamination auxquelles elles sont exposées de leur production à leur utilisation. Actuellement, aucune étape dans la transformation et la conservation des légumes prêts à l'emploi n'assure une élimination convenable des micro-organismes. L'objectif premier de ce projet a d'abord été de démontrer que l'irradiation gamma, utilisée seule ou en combinaison avec d'autres moyens de conservation, demeure une technologie efficace pour assurer l'innocuité des carottes prêtes à manger. Ainsi, l'irradiation a été couplée avec des méthodes couramment rencontrées dans l'industrie alimentaire telles que la réfrigération et l'atmosphère modifiée en plus d'un procédé peu connu comme l'utilisation d'un enrobage comestible sur les carottes prêtes à manger. Les résultats ont révélé que l'application de faibles doses d'irradiation, combinées aux autres méthodes, permet de prolonger la durée de conservation des carottes prêtes à l'emploi, tout en maintenant leurs propriétés physico-chimiques. L'irradiation ou de tous autres moyens de conservation des aliments, est autant assujettie au phénomène de résistance microbienne. En effet, au cours de l'évolution, certains micro-organismes se sont adaptés à leur environnement, développant ainsi des résistances naturelles, leur permettant d'échapper aux effets néfastes de ces technologies. Durant le présent travail, une bactérie a affiché une radiorésistance élevée par rapport aux doses d'irradiation employées. Ce micro-organisme, identifié comme étant *Pantoea agglomerans* et faisant partie de la microflore épiphytique des carottes, a survécu à plus de 4.5 kGy lorsqu'il était irradié dans un bouillon nutritif. Les études entreprises afin de cerner davantage cette radiorésistance supposent que la synthèse de protéines n'est pas nécessaire à la bactérie pour résister à l'irradiation. Puisque l'ADN demeure la principale cible des radiations ionisantes issues du traitement de l'irradiation,

une analyse par FT-IR des dommages causés à l'ADN de cette bactérie par irradiation a été réalisée. Les données recueillies soutiennent que le micro-organisme est apte à réparer les dommages occasionnés par de faibles doses d'irradiation (doses sous-létales). Ces dommages ont été identifiés comme étant un bris des appariements établis entre les bases complémentaires de l'ADN. Enfin, l'ensemble de ce travail témoigne du besoin de recherches approfondies sur l'emploi de l'irradiation comme moyen de conservation des aliments afin de rentabiliser son utilisation, par sa combinaison avec d'autres procédés, et d'assurer les consommateurs sur les répercussions à long terme de ses effets sur les micro-organismes et les aliments.


Étudiant


Directeur de recherche

REMERCIEMENTS

Maintenant que mon séjour à l'INRS-Institut Armand-Frappier s'achève, j'aimerais prendre le temps de remercier tous ceux et celles qui ont su m'apporter leur aide et me supporter tant de manière scientifique que personnelle. Vous avez tous participé en quelque sorte à l'accomplissement et à la réussite de ce projet.

Tout d'abord, je remercie la Fondation Armand-Frappier de même que ma directrice de recherche, Monique Lacroix, pour les bourses d'études qu'elles m'ont octroyées. Merci Madame Lacroix de m'avoir accueillie dans votre laboratoire et de m'avoir fait confiance pour ce projet de recherche. Une petite pensée spéciale pour Blaise Ouattara: merci pour tous les conseils judicieux que tu m'as prodigués lors de la rédaction des protocoles expérimentaux et pendant mon travail de laboratoire, sans oublier ta disponibilité et ta patience. Je tiens à remercier également toute l'équipe du laboratoire: Anne-Sophie Guenier, Canh Le Tien, Francine Chiasson, Mathieu Millette, Mylène Thériault, Patrick Denoncourt, Simon Bourgois, Stéphane Caillet et Stéphane Salmiéri pour l'agréable climat de travail, vos sourires et les nombreuses bonnes bouffes prises en votre compagnie. Je garderai un très bon souvenir de vous tous. Sans oublier tous les stagiaires, Audrey, Dorothée, Erwan, Michel, Nadège et Sébastien, qui ont participé à ce projet.

Je ne peux passer sous silence le support exemplaire de mon codirecteur de recherche François Shareck. Merci François d'avoir pris le temps de m'écouter et de me conseiller tout au long de mon travail de laboratoire et aussi pendant ma rédaction. Je n'oublierai jamais tes nombreuses anecdotes et maximes qui me faisaient sourire. Par ta rigueur scientifique, tu as toujours su répondre à mes interrogations faisant ainsi avancer mes recherches. Merci de m'avoir enseigné les principes de la protéomique et de la biologie moléculaire.

Mes années passées à l'Institut n'auraient pas été aussi remarquables si je n'avais pas côtoyé les membres de l'AGEIAF. Merci à vous les filles, Anne-Sophie, Annie et Jacinthe pour les fous rires, les copieux Dairy Queen et les péripéties de toutes sortes !!! Votre amitié m'est très précieuse. Il me faut aussi remercier tous les gens que j'ai rencontrés au sein de la FEUQ et à travers la vie sociale de l'Institut qui ont embelli mon séjour par la création d'une ambiance fortement enrichissante et stimulante.

Enfin, ce mémoire n'aurait pas vu le jour sans les encouragements continuels et le soutien moral de mes parents Gilles et Maryse. Merci et encore merci d'être toujours là pour m'épauler et m'assister dans les moments les plus difficiles. Je ne vous serai jamais assez reconnaissante pour tous les sacrifices que vous avez faits pour moi. Ces remerciements sont autant adressés à mes soeurs, Mylène et Rachel, que j'adore et qui ont su me changer les idées quand j'en éprouvais le besoin.

TABLE DES MATIÈRES

CITATION.....	ii
RÉSUMÉ.....	iii
REMERCIEMENTS.....	v
TABLE DES MATIÈRES.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xv
INTRODUCTION.....	1
1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
1.1 LÉGUMES PRÊTS À MANGER MINIMALEMENT TRANSFORMÉS.....	5
1.1.1 Généralités.....	5
1.1.2 Facteurs extrinsèques et intrinsèques influençant leur détérioration.....	7
1.1.3 Les risques associés à la consommation.....	8
1.1.4 Nature et origine des populations microbiennes.....	10
1.1.4.1 Microflore d'altération.....	13
1.1.4.2 Pathogènes.....	14
1.2 LA CAROTTE.....	20
1.2.1 Consommation de carottes.....	20
1.2.2 Aspect économique.....	21
1.2.3 Problèmes de conservation.....	23
1.2.4 Propriétés sensorielles et composition biochimique.....	27
1.3 PROCÉDÉS DE CONSERVATION.....	31
1.3.1 Températures de réfrigération.....	32
1.3.2 Atmosphère modifiée.....	35
1.3.3 Enrobage comestible.....	39
1.3.4 Irradiation des aliments.....	44
1.3.4.1 Généralités et importance industrielle.....	44
1.3.4.2 Sources de rayonnements ionisants.....	46
1.3.4.3 Mode d'action des rayonnements ionisants.....	48
1.3.4.4 Conditions qui influencent l'efficacité d'un traitement d'irradiation.....	57
1.3.4.5 Effet de l'irradiation sur les propriétés sensorielles des légumes prêts à manger.....	58
1.3.4.6 Réglementations en matière d'irradiation.....	59
1.4 PROBLÉMATIQUE.....	61
1.4.1 Hypothèse.....	61

1.4.2 Objectifs.....	61
1.4.3 Moyens pour atteindre les objectifs.....	62
2. APPROCHE EXPÉRIMENTALE.....	65
2.1 LISTE DES PRODUITS CHIMIQUES UTILISÉS.....	66
2.2 SOUCHES BACTÉRIENNES.....	68
2.3 EFFET DE L'IRRADIATION SUR LA BACTÉRIE <i>E. COLI</i> ENSEMENCÉE DANS DES CAROTTES RÂPÉES.....	68
2.3.1 Préparation et transformation des carottes.....	68
2.3.2 Stérilisation des carottes râpées par irradiation.....	69
2.3.3 Contamination artificielle des carottes râpées.....	69
2.3.4 Traitement d'irradiation.....	70
2.3.5 Analyses microbiologiques.....	70
2.4 EFFET DE L'IRRADIATION COUPLÉE À L'ATMOSPHÈRE MODIFIÉE SUR LA BACTÉRIE <i>E. COLI</i> ENSEMENCÉE DANS DES CAROTTES RÂPÉES.....	71
2.4.1 Préparation et stérilisation des carottes.....	71
2.4.2 Contamination artificielle des carottes râpées.....	71
2.4.3 Traitement d'irradiation et analyses microbiologiques.....	72
2.4.4 Détermination de la D_{10}	72
2.5 EFFET DE L'IRRADIATION COMBINÉE À UN ENROBAGE ANTIMICROBIEN ET UNE ATMOSPHÈRE MODIFIÉE SUR DES CAROTTES MINIATURES.....	73
2.5.1 Préparation de l'enrobage stérile.....	73
2.5.2 Traitement des solutions.....	73
2.5.3 Sources des carottes miniatures.....	74
2.5.4 Application de l'enrobage.....	74
2.5.5 Traitement d'irradiation et emballage.....	74
2.5.6 Détermination de la D_{10}	75
2.5.7 Analyses microbiologiques.....	76
2.5.8 Analyses colorimétriques.....	76
2.5.9 Analyses de la texture.....	77
2.6 ANALYSES STATISTIQUES.....	79
2.7 IDENTIFICATIONS BACTÉRIENNES.....	80
2.8 ISOLEMENT DE LA BACTÉRIE <i>P. AGGLOMERANS</i> DANS DES CAROTTES RÂPÉES IRRADIÉES.....	81
2.9 CARACTÉRISATION DE LA BACTÉRIE <i>P. AGGLOMERANS</i> PAR SÉQUENÇAGE DE L'ARNr 16S.....	82
2.9.1 Extraction de l'ADN chromosomique.....	82
2.9.2 Détermination de la concentration d'ADN.....	82
2.9.3 Amplification élective <i>in vitro</i>	83
2.9.4 Purification de l'extrait d'ADN.....	84
2.9.5 Électrophorèse sur gel d'agarose.....	84
2.9.6 Séquençage et analyse des séquences.....	85
2.10 ÉVALUATION DE LA D_{10} DES BACTÉRIES <i>E. COLI</i> ET <i>P. AGGLOMERANS</i> IRRADIÉES DANS UN BOUILLON NUTRITIF.....	86
2.11 ADAPTATION DE <i>P. AGGLOMERANS</i> À L'IRRADIATION.....	86
2.12 ANALYSE DU PROTÉOME DE <i>P. AGGLOMERANS</i> IRRADIÉ.....	87
2.12.1 Conditions de culture.....	87

2.12.2 Préparation des échantillons protéiques.....	88
2.12.3 Dosage des protéines.....	89
2.12.4 Électrophorèse en deux dimensions.....	89
2.12.4.1 Incorporation des protéines par réhydratation des languettes.....	89
2.12.4.2 La première dimension: la focalisation isoélectrique.....	90
2.12.4.3 Équilibration des languettes.....	90
2.12.4.4 La deuxième dimension: l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS.....	91
2.12.5 Coloration au nitrate d'argent.....	91
2.12.6 Analyse des gels 2-D.....	92
2.13 ANALYSE PAR FT-IR DES DOMMAGES CAUSÉS À L'ADN DE <i>P. AGGLOMERANS</i> PAR IRRADIATION.....	93
2.13.1 Irradiation de la culture.....	93
2.13.2 Extraction de l'ADN chromosomique.....	93
2.13.3 Estimation de la pureté des extraits d'ADN.....	94
2.13.4 Fabrication des pastilles pour analyses au FT-IR.....	94
2.13.5 Analyses par FT-IR.....	95
2.13.6 Électrophorèse sur gel d'agarose.....	95
3. RÉSULTATS.....	97
3.1. APPLICATION DE L'IRRADIATION SEULE OU EN COMBINAISON AVEC D'AUTRES TRAITEMENTS.....	98
3.1.1 Effet de l'irradiation sur la bactérie <i>E. coli</i> ensemencée dans des carottes râpées.....	98
3.1.2 Effet de l'irradiation combinée à une atmosphère modifiée sur la bactérie <i>E. coli</i> ensemencée dans des carottes râpées.....	100
3.1.3 Effet d'un traitement d'irradiation combiné à un enrobage antimicrobien et à une atmosphère modifiée sur des carottes miniatures.....	106
3.2 IDENTIFICATIONS BACTÉRIENNES.....	119
3.2.1 Analyse biochimique.....	119
3.2.2 Isolement de la bactérie <i>P. agglomerans</i> dans des carottes râpées irradiées à 5 kGy.....	122
3.2.3 Analyse génétique.....	124
3.3. RADIORÉSISTANCE.....	127
3.3.1 Détermination de la D ₁₀ : courbes de survie de <i>P. agglomerans</i> et <i>E. coli</i>	127
3.3.2 Adaptation de <i>P. agglomerans</i> à l'irradiation.....	131
3.3.3 Analyse du protéome de <i>P. agglomerans</i>	133
3.3.4 Analyse par FT-IR des dommages causés à l'ADN de <i>P. agglomerans</i> par irradiation.....	137
3.3.4.1 Analyse d'ADN extraits de bactéries non irradiées.....	137
3.3.4.2 Analyse d'ADN extraits de bactéries irradiées.....	138
4. DISCUSSION.....	144
4.1. APPLICATION DE L'IRRADIATION SEULE OU EN COMBINAISON AVEC D'AUTRES TRAITEMENTS.....	145
4.1.1 Effet de l'irradiation sur la bactérie <i>E. coli</i> ensemencée dans des carottes râpées.....	145

4.1.2 Effet de l'irradiation combinée à une atmosphère modifiée sur la bactérie <i>E. coli</i> ensemencée dans des carottes râpées.....	149
4.1.3 Effet d'un traitement d'irradiation combiné à un enrobage antimicrobien et à une atmosphère modifiée sur de carottes miniatures.....	154
4.2 RADIORÉSISTANCE.....	161
4.2.1 Détermination de la D_{10} : courbes de survie de <i>P. agglomerans</i> et <i>E. coli</i>	161
4.2.2 Adaptation de <i>P. agglomerans</i> à l'irradiation.....	163
4.2.3 Analyse du protéome de <i>P. agglomerans</i>	164
4.2.4 Analyse par FT-IR des dommages causés à l'ADN de <i>P. agglomerans</i> par irradiation.....	166
4.2.4.1 Modifications à faibles doses.....	166
4.2.4.2 Modifications à fortes doses.....	169
5. CONCLUSION.....	172
BIBLIOGRAPHIE.....	176

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1: Diagramme de la production de légumes minimalement transformés	6
Figure 2: Appariement des bases d'ADN complémentaires démontrant les liaisons hydrogène entre chacune	51
Figure 3: Lésions radio-induites de l'ADN	52
Figure 4: Graphique obtenu lors d'un test de fermeté sur les carottes miniatures	78
Figure 5: Effet de l'irradiation appliquée sous air ou sous MAP sur les populations d' <i>E. coli</i> ensemencées dans des carottes râpées conservées à 4°C	103
Figure 6: Sensibilité à l'irradiation de la bactérie <i>E. coli</i> ensemencée dans des carottes râpées emballées sous air ou sous MAP	105
Figure 7: Effet de l'irradiation sur les populations bactériennes mésophiles totales de carottes miniatures non enrobées et enrobées, emballées sous air ou sous MAP pour une période de 21 jours d'entreposage à 4°C	112
Figure 8: Sensibilité à l'irradiation des populations bactériennes mésophiles totales présentes sur des carottes miniatures non enrobées et enrobées, conservées sous air ou sous MAP	114
Figure 9: Suivi de la coloration blanchâtre de carottes non enrobées et enrobées, traitées avec trois doses d'irradiation, emballées sous air ou sous MAP, puis conservées à 4°C	115
Figure 10: Suivi de la fermeté de carottes non enrobées et enrobées, traitées avec trois doses d'irradiation, emballées sous air ou sous MAP, puis conservées à 4°C	117
Figure 11: Dénombrement de la bactérie <i>P. agglomerans</i> obtenu après 7 jours d'entreposage à 10°C des carottes provenant de huit marques différentes	123
Figure 12: Produits d'amplification par PCR du gène de l'ARNr 16 S de l'isolat bactérien <i>P. agglomerans</i>	125
Figure 13: Sensibilité à l'irradiation des bactéries <i>E. coli</i> et <i>P. agglomerans</i> irradiées dans le bouillon nutritif TSB	129
Figure 14: Taux de survie de la bactérie <i>P. agglomerans</i> pour chacun des groupes de traitements	132

- Figure 15: Gels 2-D de pH 4 à 7 (18 cm) des protéines cytoplasmiques de la bactérie *P. agglomerans* non irradiée et irradiée (jour 0, 3, 5 et 7) 135
- Figure 16: Gels 2-D de pH 3 à 10 (18 cm) des protéines cytoplasmiques de la bactérie *P. agglomerans* non irradiée et irradiée à 3, 5, et 8 kGy 136
- Figure 17: Spectres infrarouges, obtenus à partir d'échantillons d'ADN extraits et purifiés de la bactérie *P. agglomerans* non irradiée et irradiée à différentes doses, pour la région 4000-600 cm^{-1} 140
- Figure 18: Spectres infrarouges, région spectrale de 1800-600 cm^{-1} , pour les différents échantillons d'ADN de *P. agglomerans* 141
- Figure 19: Observation de la dégradation d'extraits d'ADN purifiés, issus de la bactérie *P. agglomerans* non irradiée et irradiée à différentes doses, par électrophorèse sur gel d'agarose 0.7% 143

LISTE DES TABLEAUX

		Page
Tableau I:	Sources de contamination microbienne des légumes avant, pendant et après leur transformation	9
Tableau II:	Propriétés des micro-organismes et des légumes affectant le processus de détérioration	11
Tableau III:	Spécifications des critères microbiologiques pour les légumes minimalement transformés prêts à manger	12
Tableau IV:	Exemples d'occurrence de pathogènes dans des légumes frais intacts et prêts à manger	18
Tableau V:	Exemples d'épisodes de toxi-infections liées à la consommation de légumes crus	19
Tableau VI:	Différents types de matériaux et d'ingrédients entrant dans la composition d'enrobages comestibles pour les légumes minimalement transformés	43
Tableau VII:	Description des groupes de traitements de carottes miniatures	75
Tableau VIII:	Description des tests pour identification	80
Tableau IX:	Séquences des amorces	83
Tableau X:	Description des groupes de traitements	87
Tableau XI:	Effet de l'irradiation sur la croissance de la bactérie <i>E. coli</i> ensemencée dans des carottes râpées conservées à 10°C	99
Tableau XII:	Effet d'un traitement d'irradiation combiné à une atmosphère modifiée sur des populations d' <i>E. coli</i> ensemencées dans des carottes râpées entreposées pendant 50 jours à 4°C	104
Tableau XIII:	Effet d'un traitement d'irradiation couplé à un emballage sous MAP sur les populations bactériennes mésophiles totales de carottes miniatures non enrobées et enrobées, puis entreposées à 4°C pendant 21 jours	113
Tableau XIV:	Effet d'un traitement d'irradiation couplé à un emballage, sous MAP ou sous air, sur le blanchiment de carottes miniatures non enrobées et enrobées, puis entreposées à 4°C pendant 21 jours	116

Tableau XV:	Effet d'un traitement d'irradiation couplé à un emballage, sous MAP ou sous air, sur la texture de carottes miniatures non enrobées et enrobées, entreposées à 4°C pendant 21 jours	118
Tableau XVI:	Résultats des tests conventionnels d'identification effectués sur les bactéries inconnues produisant des colonies jaunes	121
Tableau XVII:	Origine des échantillons de carottes analysées et valeurs des dénombrements de <i>P. agglomerans</i> après 7 jours d'entreposage des carottes à 10°C	123
Tableau XVIII:	Liste de micro-organismes possédant une séquence similaire, de leur gène ARNr 16S, aux séquences obtenues, à l'aide des amorces pA et pH, du même gène provenant de l'isolat bactérien <i>P. agglomerans</i>	126
Tableau XIX:	Sensibilité à l'irradiation de la bactérie <i>E. coli</i> irradiée dans le bouillon nutritif TSB	130
Tableau XX:	Sensibilité à l'irradiation de la bactérie <i>P. agglomerans</i> irradiée dans le bouillon nutritif TSB	130
Tableau XXI:	Caractéristiques des fréquences de vibration de groupements fonctionnels observés par FT-IR pour l'ADN extrait et purifié de la bactérie <i>P. agglomerans</i> non irradiée	142

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	adénine
μA	microampère (s)
ACIA	Agence canadienne d'inspection des aliments
ADN	acide déoxyribonucléique
AIEA (IAEA)	Agence internationale de l'énergie atomique
ANOVA	analysis of variance
aq	aqueux
ARNr	acide ribonucléique ribosomal
ARS	agricultural research service
ATCC	American type culture collection
A_w	activité de l'eau libre
C	cytosine
$^{\circ}\text{C}$	degré Celsius
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl) dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonate
CIC	Centre d'Irradiation du Canada
CIELAB	Commission internationale de l'éclairage ($L^*a^*b^*$)
cm	centimètre (s)
Cm	chloramphénicol
CMC	carboxyméthylcellulose
CUMAIRA	Comité sur l'uniformisation des méthodes d'analyses et l'interprétation des résultats analytiques
CVNC	cellule viable non cultivable
2-D	deux dimensions
DCTS	cye terminator cycle sequencing
DO	densité optique
D_{10} (DRD)	dose de réduction décimale
DTT	dithiothréitol
e^-	électrons
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique

ER	équivalents de rétinol
FDA	Food and drug administration
FT-IR	spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
<i>g</i>	force de la pesanteur
<i>g</i>	gramme (s)
G	guanine
µg	microgramme (s)
HACCP	système des points de contrôle critiques pour l'analyse des risques
ICGFI	Groupe consultatif international sur l'irradiation des denrées alimentaires
ICMSF	international commission on microbiological specifications for foods
IEF	focalisation électrique
INRS	Institut national de la recherche scientifique
IPG	immobilized pH gradients
kg	kilogramme (s)
kGy/h	kilograys/heure
LB	loading buffer
m	mètre (s)
M	molaire
mA	milliampère (s)
MAP	modified atmosphere packaging
MAPAQ	Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec
µl	microlitre (s)
ml	millilitre (s)
mM	millimolaire (s)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	nanogramme (s)
nm	nanomètre (s)
NZMP	New Zealand Milk Products
OAA	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
OMS (WHO)	Organisation mondiale de la santé
pb	paire (s) de base (s)

PCA	plate count agar
PCR	polymerase chain reaction
pI	point isoélectrique
p/p	poids/poids
ppm	parties par million
p/v	poids/volume
s	seconde (s)
SDS	sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodécyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
spp	sous-espèce
T	thymine
TBE	Tris-Borate-EDTA
TCA	acide trichloroacétique
TE	Tris-EDTA
Tris	tris(hydroxyméthyl) aminométhane
TSA	agar de soja tryptique
TSB	bouillon de soja tryptique
UATR	universal attenuated total reflectance
UFC/g	unité formatrice de colonies/gramme (s)
USDA	United States department of agriculture
V	volt (s)
Vh	volt-heures
v/v	volume/volume
W	watt (s)
WI	whiteness index
WPI	whey protein isolate

INTRODUCTION

Au cours des années 1980, un rapide développement des restaurants minutes a entraîné une tendance favorable auprès des consommateurs pour les aliments prêts à manger. Parmi ces derniers, les légumes minimalement transformés affichaient une popularité considérable due à leur faible contenu en agents chimiques de conservation, leur utilité pratique comme légumes pour salades et l'accès pour les consommateurs à une large variété de légumes importés tout au long de l'année. Tous ces facteurs ont donc contribué à favoriser la consommation de légumes prêts à l'emploi. Bien que ce secteur ait été créé dans un premier temps pour approvisionner les restaurants et les chaînes hôtelières, il dessert maintenant les fournisseurs des marchés d'alimentation et représente une division prospère de l'industrie alimentaire.

Récemment, la fréquence des gastro-entérites reliées à la consommation de légumes prêts à manger a augmenté entraînant des coûts importants. Cette constatation serait en partie attribuable à l'augmentation de la consommation de ce type de denrées. Notamment, en réponse aux recommandations des autorités de la santé, plusieurs Canadiens ont changé leur diète alimentaire dans le but de prévenir les maladies cardiovasculaires et le cancer. De plus, les marchés ont démontré des hausses importantes d'importations de légumes frais exposant ainsi les consommateurs, au pauvre système sanitaire de certains pays.

Puisque le développement actuel est en pleine expansion, cette situation engendre des ajustements au niveau de la transformation, la conservation et la distribution des légumes prêts à manger. Par exemple, l'utilisation de l'atmosphère modifiée permet de prolonger la durée de conservation de ces aliments tout en maintenant leur fraîcheur. Toutefois, cette technologie présente le risque de favoriser la prolifération des pathogènes, sans laisser paraître de signe de détérioration de l'aliment au consommateur. En outre, certaines étapes de la transformation, comme l'épluchage des carottes, permettent de soutirer des effets autant positifs que négatifs. D'une part, cette étape entraîne la diminution de la charge microbienne de ces légumes, mais d'autre part,

l'action physique de l'éplucheur cause une déshydratation des couches externes de la carotte. Conséquemment, le légume perd sa couleur orange attrayante et devient plus vulnérable aux micro-organismes. Actuellement, aucune étape dans la transformation et la conservation des légumes prêts à l'emploi n'assure une élimination convenable des micro-organismes.

Depuis plusieurs années, le groupe de recherche du professeure Monique Lacroix de l'Institut Armand-Frappier s'intéresse en autres à l'effet germicide qu'offre la technologie de l'irradiation gamma sur différents types d'aliments. Ce procédé peut être employé seul ou en combinaison avec d'autres traitements pour obtenir un effet synergique. Ainsi, une bonne compréhension des effets de l'irradiation sur les propriétés physico-chimiques et organoleptiques des légumes prêts à manger et de sa combinaison avec d'autres moyens de conservation contribuerait à rentabiliser cette technologie pour l'industrie alimentaire mais procurerait également des connaissances fondamentales sur le phénomène de résistance des micro-organismes face à ce procédé.

Le démarrage d'une telle étude implique le choix des légumes à irradier, préalablement contaminés avec une certaine quantité de micro-organismes, afin de visualiser l'effet de l'irradiation sur ces derniers. L'objectif premier de ce projet a donc été de démontrer les effets de l'irradiation gamma, utilisée seule ou en combinaison avec d'autres moyens de conservation, sur l'innocuité des carottes prêtes à manger. Pour ce faire, la bactérie *E. coli* a servi de modèle alors que la réfrigération, l'atmosphère modifiée et l'enrobage comestible ont été couplés avec le traitement d'irradiation.

Lors de ces expérimentations, une bactérie de la flore endogène de la carotte, identifiée comme étant *Pantoea agglomerans*, a démontré une résistance élevée aux traitements d'irradiation utilisés. Alors dans un deuxième temps, plusieurs analyses ont été entreprises dans le but de comprendre les moyens employés par ce micro-organisme pour résister à de fortes doses d'irradiation. Notamment, des expériences portant sur la sensibilité de *P. agglomerans* à différentes doses d'irradiation, l'analyse de son protéome

à la suite d'un traitement d'irradiation et la détermination par FT-IR des dommages causés à son ADN par les rayons gamma ont été réalisées.

1. Revue bibliographique

1.1 LÉGUMES PRÊTS À MANGER MINIMALEMENT TRANSFORMÉS

1.1.1 Généralités

Les légumes prêts à manger minimalement transformés sont des légumes crus qui ont été pelés, tranchés, hachés ou coupés finement avant d'être emballés pour la vente. Leur consommation ne nécessite aucune préparation proprement dite, à l'exception de l'ajout de vinaigrette ou de croûtons par l'utilisateur. Ce groupe d'aliments inclut en outre la laitue et le chou râpés, les salades de légumes mélangés, le brocoli haché et les carottes miniatures pelées. Les légumes frais qui ne sont que parés, les pommes de terre ou autres légumes tranchés qui sont destinés à la cuisson, tels que les frites, sont écartés de cette catégorie. Une représentation graphique générale des différentes étapes de la production de légumes prêts à manger est illustrée à la figure 1.

La production de légumes fraîchement coupés a débuté il y a plus de 35 ans aux États-Unis et elle était destinée principalement pour l'approvisionnement des hôtels et des chaînes de restauration rapide. Au Canada, le développement accéléré des restaurants minutes a également conduit à l'augmentation de la consommation d'aliments prêts à manger tels que les légumes minimalement transformés vers le début des années 1980. Ce type de produits alimentaires a connu un essor dans le milieu des années 1990 pour le marché de la vente au détail en Europe. En France notamment, la production a augmenté, passant de 400 tonnes en 1985 à 35000 tonnes en 1989 (Nguyen-the et Carlin, 1994).

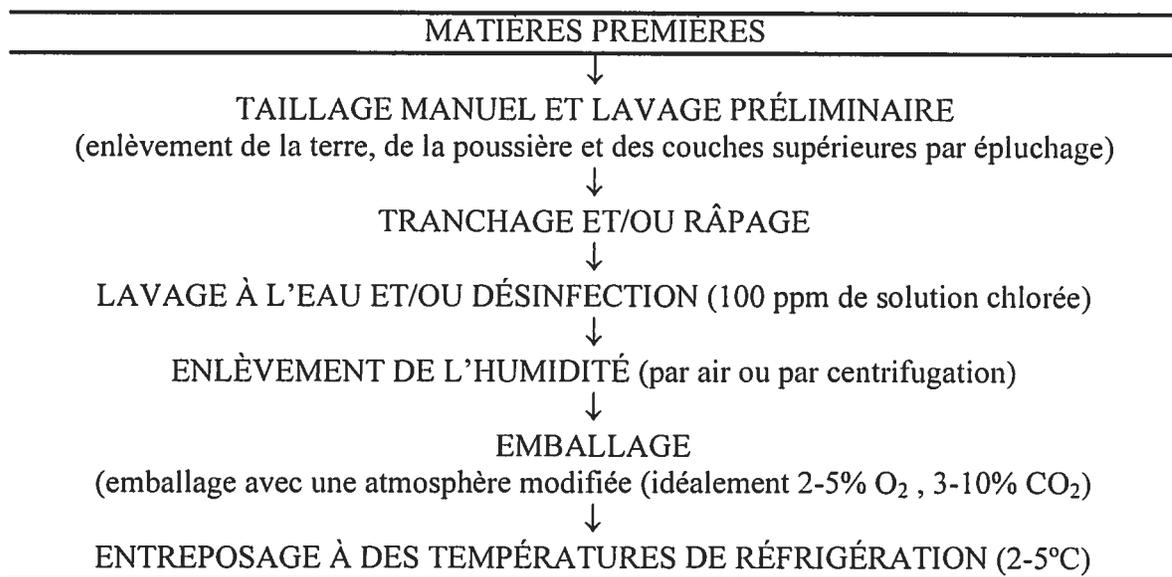


Figure 1. Diagramme de la production de légumes minimalement transformés.
(Francis, Thomas et O'Beirne, 1999)

1.1.2 Facteurs extrinsèques et intrinsèques influençant leur détérioration

Les particularités des légumes minimalement transformés sont:

- 1) la présence de surfaces ouvertes ou de tissus endommagés suite à la transformation;
- 2) la transformation minimale qui ne peut assurer la stérilité ou la stabilité microbienne du produit;
- 3) le métabolisme actif des tissus végétaux;
- 4) le confinement du produit.

Tous ces éléments contribuent en quelque sorte à la prolifération des cellules microbiennes présentes dans ce genre d'aliments. De plus, les légumes fraîchement coupés demeurent un produit périssable puisqu'ils offrent des conditions propices à la croissance de micro-organismes telles que leur contenu élevé en éléments nutritifs, leur pH s'approchant de la neutralité (entre 5,5 et 6,5; Lacasse, 1995) et l'eau disponible à leur surface (A_w à la surface des légumes frais est de 0.99; Lund, 1971). Ce type d'aliments supportent donc autant la croissance de mycètes que de bactéries. Contrairement à d'autres denrées alimentaires, les légumes frais sont des organes végétaux vivants dont la maturation continue après la récolte. L'activité des enzymes est maintenue, même après la mort des cellules végétales. Par conséquent, les légumes ramollissent de façon progressive tout au long de leur mûrissement et leurs mécanismes de défense antimicrobiens diminuent. Les tissus davantage fragiles, les téguments plus minces et la baisse de la concentration de composés inhibiteurs rendent donc les légumes vulnérables à l'attaque des micro-organismes. Enfin, les conditions physiologiques du légume (son état de sénescence) ont une influence considérable sur le développement des cellules microbiennes présentes à sa surface.

1.1.3 Les risques associés à la consommation

Les dangers rattachés à la consommation de légumes prêts à l'emploi sont liés essentiellement à la contamination microbienne. Les risques chimiques et physiques tels que la présence de produits chimiques agricoles ou de métaux sont tout de même à considérer. D'ailleurs, le ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec (MAPAQ) effectuait récemment deux rappels d'aliments suite à une contamination chimique. Les légumes incriminés étaient la salade romaine du Québec renfermant des résidus de pesticide (2001) et des poivrons rouges en provenance du Mexique et vendus au Québec, contaminés avec du naphthalène (2002).

Puisque les légumes sont exposés à un large éventail de conditions pendant leur production, leur récolte, leur transformation et leur distribution, le risque qu'ils soient contaminés avec un pathogène demeure élevé. Ce fait est autant plus véridique en considérant que les légumes prêts à manger sont consommés crus et sans traitement à la chaleur. Les sources de contamination possibles sont illustrées dans le tableau I. L'occurrence des cas de contamination de légumes par des pathogènes, suite à des pratiques agricoles boiteuses telles que l'utilisation d'eau polluée pour l'irrigation ou une mauvaise gestion de fertilisants naturels, demeure élevée. D'ailleurs, l'eau tout comme le sol semblent être à l'origine de la plupart des contaminations microbiennes des légumes suite à l'isolement de bactéries pathogènes de ces éléments (Geldreich et Bordner, 1971). Puisque l'eau est une ressource hautement utilisée dans l'industrie de la transformation des légumes, sa qualité influence grandement la salubrité des légumes. Parfois, les producteurs de ce type de produits vont employer une source d'eau à proximité des lieux de production sans se soucier de la qualité de cette eau. Ainsi, l'eau en provenance de rivières, ruisseaux, étangs et lacs peut renfermer la présence de micro-organismes pathogènes et d'indicateurs de contamination fécale tels qu'*E. coli*, ayant pour conséquence d'augmenter la charge microbiologique des végétaux. Manifestement, la surface de la pelure des légumes, parfois rugueuse et réticulée, se prête bien à l'accumulation de particules contaminatrices. Si l'enveloppe extérieure du légume est

contaminée, la portion comestible à l'intérieur de ce dernier peut devenir contaminée lors de la transformation.

Au Canada, l'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA) a élaboré un code d'usage relatif aux légumes prêts à manger minimalement transformés. Ce dernier se veut un guide de fabrication destiné à promouvoir la salubrité des légumes prêts à manger. Bien que tous les moyens possibles des mesures préventives ne soient pas exposés, les fabricants sont encouragés à suivre les recommandations générales contenues dans ce code pour adapter des pratiques sanitaires à leurs activités particulières.

Tableau I. Sources de contamination microbienne des légumes avant, pendant et après leur transformation.

Eau utilisée pour l'irrigation et la fumigation
Air (poussière)
Manipulation humaine
Récipients contaminés
Fertilisants naturels (fumier, matières organiques, déchets d'abattage, boues d'épuration)
Animaux sauvages et domestiques
Lavages après récolte et pendant la transformation
Équipement de transformation (éplucheurs, couteaux)
Température inadéquate lors du transport, de l'entreposage et de la vente au détail
Emballage inapproprié
Contamination croisée

Adapté de Madden, 1992

1.1.4 Nature et origine des populations microbiennes

L'occurrence et la progression de la détérioration des légumes minimalement transformés dépendent à la fois de plusieurs propriétés du ou des micro-organismes et du légume concernés (tableau II). D'ailleurs, plusieurs autres facteurs peuvent justifier la domination d'une population microbienne contenue dans les légumes minimalement transformés. Notamment, l'influence de la microflore originale sur les légumes dans les champs, le temps alloué à la distribution du produit en plus de la température pendant cette période et les conditions d'emballage et d'entreposage sont à considérer. Néanmoins, les micro-organismes présents dans les légumes prêts à l'emploi sont ceux qui proviennent de la microflore épiphytique des légumes entiers; soient les cellules microbiennes normalement retrouvées sur les plantes dans les champs lors de la production.

Dans plusieurs cas, le nombre total de populations microbiennes, à la fin de l'entreposage des légumes prêts à manger, n'est pas relié à la qualité de ces produits. La détérioration de ces aliments est habituellement concomitante avec la croissance de micro-organismes, mais ceci ne signifie pas que toutes les altérations sont d'origine microbienne. Essentiellement, le rôle de certaines populations microbiennes dans le processus de dégradation des légumes prêts à manger est difficile à définir parfaitement.

Au Québec, un groupe de travail a été formé en mai 1989 dans le but d'uniformiser les techniques analytiques utilisées dans les laboratoires de microbiologie alimentaire du MAPAQ pour évaluer les critères microbiologiques d'interprétation de résultats analytiques pour les aliments prélevés au niveau de la consommation. Le comité sur l'uniformisation des méthodes d'analyses et l'interprétation des résultats analytiques (CUMAIRA) a élaboré un document de critères microbiologiques pour les analyses alimentaires dont les normes administratives proposées pour les légumes prêts à manger minimalement transformés sont illustrées à travers le tableau III.

Tableau II. Propriétés des micro-organismes et des légumes affectant le processus de détérioration.

Micro-organisme	Légume
1. Habileté à croître et à utiliser les nutriments sur le légume	1. Voies d'entrée pour micro-organismes sur les tissus végétaux (stomates, lenticelles ou blessures)
2. Taux de croissance	2. Susceptibilité du tissu végétal à la dégradation (conditions de culture, état de sénescence)
3. Production d'enzymes pouvant attaquer les tissus végétaux (enzymes pectinolytiques)	3. Production de substances antimicrobiennes (composés phénoliques)
4. Production de toxines létales pour les cellules végétales	4. Réponse de cicatrisation des blessures

Source: Lund, 1971

Tableau III. Spécifications des critères microbiologiques¹ pour les légumes minimalement transformés prêts à manger.

Micro-organismes	n ²	c ³	m ⁴	M ⁵
Numération aérobie mésophile totale				
Légumes crus 4 ^e gamme	5	3	5.0 x 10 ⁶	5.0 x 10 ⁷
Salades légumes tous genres (exclusivement)	5	3	5.0 x 10 ⁶	1.0 x 10 ⁸
<i>Escherichia coli</i>	5	2	20	1.0 x 10 ²
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	2	1.0 x 10 ²	1.0 x 10 ³
<i>Salmonella</i>	5	0	absence ⁶	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	5	0	absence	-
<i>Bacillus cereus</i>	5	2	1.0 x 10 ³	1.0 x 10 ⁴
<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	absence	-

Adapté de CUMAIRA-MAPAQ, 1995.

¹ critères exprimés en UFC/g à l'exception de *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica* et *Listeria monocytogenes* exprimés par 25 grammes

² n: nombre d'échantillons analysés

³ c: nombre maximal d'échantillons pouvant présenter des valeurs se situant entre m et M

⁴ m: échantillon acceptable si le résultat est égal ou inférieur à cette valeur

⁵ M: seuil limite d'acceptabilité, aucun échantillon ne doit dépasser cette valeur

⁶ absence: sous la limite de détection de la méthode utilisée

1.1.4.1 Microflore d'altération

Les bactéries mésophiles sont les principales composantes de la microflore des légumes prêts à manger. Parmi ces dernières, 80 à 90% sont des bâtonnets à Gram négatif appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Enterobacter* et *Erwinia* (Nguyen-the et Carlin, 1994). Par ailleurs, les espèces *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia herbicola* et *Enterobacter agglomerans* sont les principaux constituants de la microflore épiphytique de la plupart des légumes retrouvés dans les champs et par le fait même, des légumes prêts à l'emploi. En 1989, le genre *Pantoea* a été créé par Gavini *et al.* regroupant l'espèce *Pantoea agglomerans* (synonyme: *Enterobacter agglomerans*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia milletiae*). De ce fait, *Pantoea* et *Pseudomonas* demeurent les deux principaux genres caractérisant la microflore mésophile des légumes. Les souches pectinolytiques de *Pseudomonas fluorescens* sont reconnues comme les agents responsables de la pourriture molle bactérienne des légumes feuillus caractérisée par une pourriture aqueuse malodorante. En effet, ces souches digèrent la pectine, un glucide complexe responsable de la fermeté des tissus végétaux, à l'aide d'enzymes. Néanmoins, la présence de *Pseudomonas* sur les légumes ne dépend pas d'une contamination externe puisque cet organisme est endémique. Par opposition à *Erwinia*, identifié comme la cause majeure de la pourriture molle des légumes, mais qui est isolé des légumes minimalement transformés seulement de façon sporadique. D'ailleurs, les micro-organismes appartenant à ce genre sont rarement présents en grand nombre dans l'environnement (Perombelon et Kelman, 1980). Une inspection efficace des légumes avant transformation par l'enlèvement des parties gâtées et déperies assure une faible présence de ces phytopathogènes.

Quant aux autres micro-organismes d'altération détectés dans les légumes prêts à l'emploi, les bactéries lactiques occupent le deuxième rang en terme d'importance. Bien que des bactéries lactiques homofermentaires soient isolées, l'espèce *Leuconostoc mesenteroides* prédomine. Cette dernière est d'ailleurs fréquemment isolée des plantes et les souches pectinolytiques peuvent causer des dommages importants aux légumes. Enfin, une plus petite proportion consiste en la présence de coliformes, de levures

(*Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Pichia*, *Torulaspora*) et de moisissures (*Sclerotinia*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Phoma*, *Rhizopus*). Ce dernier groupe de mycètes est rarement isolé de légumes fraîchement coupés. Finalement, en dépit du large nombre d'espèces prélevées d'échantillons de légumes prêts à l'emploi, les micro-organismes qui prédominent sont *P. fluorescens*, quelques espèces de la famille des Entérobactéries et *L. mesenteroides* (Nguyen-the et Carlin, 1994).

La transformation des légumes prêts à manger ne change pas de manière significative la composition de la flore mésophile qui est similaire dans les produits finaux et ceux non transformés (Nguyen-the et Carlin, 1994). Cependant, les actions apposées pendant son déroulement peuvent augmenter la contamination par les pathogènes. En ce qui a trait aux interactions entre les pathogènes et la microflore épiphytique, ces dernières sont peu étudiées pour les produits végétaux tels que les légumes prêts à manger en comparaison avec les denrées de viandes et de produits laitiers. Néanmoins, puisque *P. fluorescens* demeure la principale espèce représentative de la microflore épiphytique et qu'elle participe activement à la dénaturation des tissus végétaux, son rôle dans le relâchement de nutriments potentiels pour la croissance des micro-organismes pathogènes nécessite davantage d'investigations.

1.1.4.2 Pathogènes

Lorsque les légumes entrent dans la chaîne de transformation, leur charge microbienne est élevée et la possibilité que ceux-ci soient contaminés par un pathogène demeure une réalité. Les pathogènes associés aux légumes fraîchement coupés sont notamment *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Clostridium botulinum* et *Escherichia coli*. Cependant, la survie d'un pathogène présent dans un aliment dépend de la nature du micro-organisme impliqué en plus des conditions dans lesquelles l'aliment est conservé après sa transformation et pendant son transport à un point de vente jusqu'à sa consommation. Bien que plusieurs études rapportent la présence de pathogènes détectés dans des légumes frais (tableau IV), les toxi-infections reliées à la consommation de ce type d'aliments entiers ou transformés demeurent peu nombreuses comparées à

celles impliquant la consommation de viande ou de produits laitiers (tableau V). Notamment, de la salmonelle a été retrouvée dans du chou-fleur, de la fenouil et de la laitue (Tamminga, Beumer et Kampelmacher, 1978; Ercolani, 1976) alors que la bactérie *E. coli* a été détectée dans des légumes en salade (Brocklehurst, Zaman-Wong et Lund, 1987). Le faible nombre d'épisodes d'intoxication alimentaire attribuables aux légumes prêts à manger serait causé par les artefacts inhérents dans le processus de déclaration (Madden, 1992). En effet, ces produits alimentaires sont rarement suspectés d'être le véhicule responsable de toxi-infections. Néanmoins, les cas de gastro-entérites impliquant les légumes fraîchement coupés ont augmenté au cours des dernières années suite à l'essor que connaît ce secteur de l'industrie alimentaire. Parmi les pathogènes ayant été reconnus comme agents responsables de toxi-infections alimentaires en relation avec la consommation de légumes prêts à manger, on reconnaît:

1) *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes est une bactérie à Gram positif en forme de bâtonnet et mobile. Ce pathogène affecte principalement les femmes enceintes et leur fœtus, les enfants en bas âge, les personnes âgées et les gens immunosupprimés causant des septicémies, des méningites, des avortements ou la naissance d'un enfant mort-né. La mortalité touche 30% des gens ayant une listériose (Lacasse, 1995). La particularité de ce micro-organisme est son habileté à croître à des températures de réfrigération. À cause de son métabolisme d'anaérobie facultatif, *L. monocytogenes* est capable de survivre dans des conditions pauvres en oxygène retrouvées dans des emballages de légumes prêts à l'emploi sous atmosphère modifiée.

Cette bactérie est retrouvée de façon ubiquitaire dans l'environnement et particulièrement au niveau du sol. Plusieurs animaux en sont des porteurs sains. Puisque sa présence est aussi largement associée avec la végétation (herbes sauvages et céréales) ce microbe a été isolé de plusieurs légumes intacts et prêts à l'emploi (tableau IV). Ainsi, les plantes et leurs parties utilisées pour la consommation jouent un rôle dans la dissémination du pathogène de son habitat naturel jusqu'au marché de l'alimentation (Beuchat, 1996). Récemment, le MAPAQ (2001) a effectué un rappel d'aliments

signalant la présence de la bactérie *L. monocytogenes* dans de la salade du chef ensachée et prête à manger provenant du Québec.

2) *Salmonella* spp.

Ce bâtonnet mobile et à Gram négatif fait partie de la famille des Entérobactéries. Le genre *Salmonella* est composé de plus de 2700 sérotypes qui sont tous potentiellement dangereux (Beuchat, 1996). Les espèces pathogènes sont en autres *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. montevideo* et *S. heidelberg*. Ces dernières causent des symptômes associés à une gastro-entérite tels que la diarrhée, des nausées, des crampes abdominales, des vomissements et de la fièvre. Ce type de bactéries est mésophile, dont l'intervalle de température optimale de croissance se situe entre 35 et 43°C. La croissance de la plupart des salmonelles est inhibée à une température sous 7°C (Francis, Thomas et O'Beirne, 1999). Les animaux et les oiseaux demeurent des réservoirs naturels de ces micro-organismes. Les salmonelles sont abondantes dans le matériel fécal et peuvent ainsi contaminer le sol et les récoltes de légumes. Ces bactéries peuvent survivre pendant des mois une fois introduite dans l'environnement. Des salmonelles ont été isolées de plusieurs légumes intacts tels que du chou-fleur, des germes de luzerne, de la fenouil et de la laitue (tableau IV).

3) *Clostridium botulinum*

Le genre *Clostridium* est caractérisé par des bâtonnets à Gram positif, anaérobies et sporulés. La bactérie *Clostridium botulinum* est retrouvée en sous-divisions basées sur la spécificité sérologique de la neurotoxine produite en plus des différences physiologiques entre les souches (protéolytiques ou non). Le botulisme chez l'humain est normalement attribué au type A, B, E et parfois au type F (Prescott, Harley et Klein, 1995). Le micro-organisme affecte essentiellement le système nerveux. Les principaux symptômes demeurent des problèmes de vision, des nausées, des crampes abdominales, de l'asphyxie et la paralysie générale. La contamination des légumes avec les spores de *C. botulinum* présentes dans le sol n'est pas rare (Beuchat, 1996) (tableau IV). Cependant, la menace réelle envers la santé des consommateurs est présente seulement si le produit alimentaire

est manipulé de façon à permettre la germination de ces spores et la croissance des cellules végétatives pour la production de toxine. Notamment, le risque demeure très élevé avec les légumes prêts à l'emploi conservés dans un emballage dont les conditions à l'intérieur sont très pauvres en oxygène.

4) *Escherichia coli*

Escherichia coli est l'espèce typique de la famille des Entérobactéries. Ce bâtonnet à Gram négatif est retrouvé normalement dans la flore intestinale des mammifères. La plupart des souches sont non pathogènes et servent donc surtout d'indicateurs de contamination fécale dans les aliments et l'eau de consommation. Toutefois, plusieurs études ont démontré qu'il existe une corrélation entre l'occurrence de salmonelles sur les légumes et la présence d'*E. coli* comme indicateur de contamination fécale (Ercolani, 1976; Geldreich et Bordner, 1971; Tamminga, Beumer et Kampelmacher, 1978). Parmi les souches pathogènes, la bactérie *E. coli* entérotoxigène est la principale cause de la diarrhée du voyageur (*tourista*). Cette maladie est rare dans les pays industrialisés en comparaison avec ceux en développement dont les installations sanitaires sont souvent déficientes. D'ailleurs, les légumes crus contaminés par ce micro-organisme semblent être la cause commune de cette maladie (Beuchat, 1996). La souche entérohémorragique *E. coli* O157:H7 est une autre souche très connue, responsable notamment de la maladie du hamburger, et qui peut causer des gastro-entérites saignantes avec des complications majeures si elle n'est pas traitée. Ces malaises font suite à la production de toxines, par le micro-organisme, dans les intestins de l'individu ayant consommé l'aliment contaminé. Bien que les informations sur le taux de contamination des légumes prêts à l'emploi avec cette bactérie soient limitées, la contamination et la survie de cette dernière dans les sources d'eau naturelles démontrent un risque potentiel d'infection si les légumes crus sont lavés avec de l'eau contaminée (Francis, Thomas et O'Beirne, 1999). De plus, *E. coli* O157:H7 est capable de croître à 8°C; soit une température à laquelle des légumes prêts à manger peuvent être exposés pendant plusieurs heures lors de la distribution ou dans des buffets de restaurateurs (Weeratna et Doyle, 1991). Le tableau IV illustre quelques exemples de légumes pouvant supporter la croissance de la bactérie *E. coli*.

Tableau IV. Exemples d'occurrence de pathogènes dans des légumes frais intacts et prêts à manger.

Légume	Pathogène	Prévalence	Pays	Référence
Légumes intacts				
Ail	<i>C. botulinum</i>	4.4%	États-Unis	Solomon et Kautter, 1988
Brocoli	<i>Aeromonas</i>	5/16 (31.3%)	États-Unis	Callister et Agger, 1987
Carottes	<i>Staphylococcus</i>	14.3%	Liban	Abdelnoor, Batsoun et Roumani, 1983
Céleri	<i>E. coli</i> O157:H7	6/34 (17.6%)	Mexique	Zepeda-Lopez <i>et al.</i> , 1995
Chou	<i>E. coli</i> O157:H7	1/4 (25%)	Mexique	Zepeda-Lopez <i>et al.</i> , 1995
Chou-fleur	<i>Salmonella</i>	1/13 (7.7%)	Pays-Bas	Tammingra, Beumer et Kampelmacher, 1978
Fenouil	<i>Salmonella</i>	4/89 (71.9%)	Italie	Ercolani, 1976
Germes de luzerne	<i>Salmonella</i>	N.S.	Canada	MAPAQ, 2001
Laitue	<i>Salmonella</i>	82/120 (68.3%)	Italie	Ercolani, 1976
Oignon	<i>C. botulinum</i>	6.7%	États-Unis	Solomon et Kautter, 1986
Radis	<i>L. monocytogenes</i>	25/68 (36.8%)	États-Unis	Heisick <i>et al.</i> , 1989
Semences germées	<i>Staphylococcus</i>	13/54 (24%)	Canada	Prokopowich et Blank, 1991
Légumes prêts à manger				
Chou haché	<i>C. botulinum</i>	13.6%	États-Unis	Solomon <i>et al.</i> , 1990
Chou haché et carottes en salade	<i>L. monocytogenes</i>	2/92 (2.2%)	Canada	Schlech <i>et al.</i> , 1983
Concombre tranché	<i>L. monocytogenes</i>	4/5 (80%)	Malaisie	Arumugaswamy, Ali et Hamid, 1994
Légumes en salade	<i>E. coli</i>	25%	Angleterre	Brocklehurst, Zaman-Wong et Lund, 1987
Légumes préparés	<i>L. monocytogenes</i>	1/26 (3.8%)	Royaume-Uni	MacGowan <i>et al.</i> , 1994
Légumes prêts à l'emploi	<i>Aeromonas hydrophila</i>	N. S.	Italie	Marchetti, Casadei et Guerzoni, 1992
Salade	<i>Aeromonas</i> spp.	21.6%	Angleterre	Fricke et Tompsett, 1989
Salade	<i>E. coli</i>	2-6%	États-Unis	Fowler et Foster, 1976
Salade	<i>Staphylococcus aureus</i>	3-14%	États-Unis	Fowler et Foster, 1976
Salade	<i>Staphylococcus aureus</i>	N. S.	États-Unis	Houang, Bodnaruk et Ahmet, 1991

Adapté de Beuchat, 1996; Nguyen-the et Carlin, 1994.

N.S. = Non spécifié

Tableau V. Exemples d'épisodes de toxi-infections liées à la consommation de légumes crus.

Micro-organisme	Produit suspecté	Pays	Référence
<i>C. botulinum</i>	Chou haché	États-Unis	Solomon <i>et al.</i> , 1990
<i>E. coli</i> O157:H7	Alfalfa	États-Unis	Como-Sabetti <i>et al.</i> , 1997
<i>E. coli</i> O157:H7	Salade de légumes crus	Mexique	Nguyen-the et Carlin, 1994
<i>L. monocytogenes</i>	Alfalfa	Canada	Farber <i>et al.</i> , 1990
	Champignons salés	Suède	Nguyen-the et Carlin, 1994
	Chou haché et carottes en salade	Canada	Schlech <i>et al.</i> , 1983
	Légumes crus en salade	États-Unis	Ho <i>et al.</i> , 1986
<i>Salmonella</i>	Fèves germées	Royaume-Uni	O'Mahony <i>et al.</i> , 1990
<i>Salmonella</i>	Tomates	États-Unis	Hedberg, MacDonald et Olsterholm, 1994

Adapté de Francis, Thomas et O'Beirne, 1999; Nguyen-the et Carlin, 1994.

1.2 LA CAROTTE

La carotte est une plante potagère bisannuelle à racine pivotante de la famille des ombellifères. C'est la racine comestible de cette plante qui définit le légume. La carotte prête à manger minimalement transformée est retrouvée sur le marché sous la forme de bâtonnets, tranchée en rondelles, râpée, en salades de légumes mélangés et en carottes miniatures pelées.

Ce légume est composé majoritairement d'eau (89%), de glucides (3.5 - 10%) et de fibres (2.4%). Les lipides et les protéines ne constituent qu'une proportion de < 1% (Santé Canada, 1999). Les sucres retrouvés dans la carotte augmentent lors de la maturation du légume. Par ailleurs, la qualité de la carotte est grandement liée à son contenu en sucres contribuant à son goût particulier. L'apport minéral de ce légume demeure important avec le potassium qui domine, comme dans la plupart des végétaux, en plus des teneurs considérables en calcium et en fer. La caractéristique essentielle de la carotte est sa très grande richesse en vitamine A (β -carotène). Avec une quantité de 50 grammes de carottes, l'apport nutritionnel quotidien recommandé, qui est de 1000 ER (équivalents de rétinol), est couvert à 50% (Santé Canada, 1999). Cette vitamine est notamment essentielle au maintien du système immunitaire. Une autre vertu de la carotte est son action favorable sur le taux de cholestérol sanguin. Cet effet bénéfique est dû aux fibres (pectine et cellulose) qui, en plus de régulariser le transit intestinal et paradoxalement d'être un bon agent contre la diarrhée, peuvent séquestrer les sels biliaires et les acides gras.

1.2.1 Consommation de carottes

1) Canada

Le Canada demeure le pays affichant l'un des taux les plus élevés de consommation par habitant de légumes frais au monde. Seulement en 2001, Statistique Canada estimait ce taux à 69 kg de légumes frais (excluant les pommes de terre). Les

tomates, la laitue, les carottes et le maïs figurent parmi les légumes les plus populaires auprès des consommateurs, respectivement. Au niveau du taux de consommation de carottes fraîches par habitant, ce dernier s'élevait à 7.77 kg en l'an 2000, accusant une légère baisse par rapport au taux déterminé en 1999 qui était évalué à 7.90 kg (Statistique Canada, 2000).

2) États-Unis

En 2001, le taux de consommation de légumes frais (excluant les pommes de terre) par habitant des États-Unis était de 78.5 kg, correspondant à une différence de plus de 13.8% par rapport au Canada (United States Department of Agriculture; USDA, 2002). La laitue, les tomates, le maïs et les carottes, tout comme le Canada, sont les légumes les plus consommés. Cependant, la consommation de carottes fraîches est moindre aux États-Unis avec un taux de 4.8 kg par habitant. Avec l'introduction des carottes fraîchement coupées sur le marché, les Américains ont connu un taux record de consommation de carottes fraîches en 1997 qui était de 6.5 kg (USDA, 1999).

1.2.2 Aspect économique

1) Canada

En l'an 2000, les revenus tirés de la production légumière s'élevaient à 1.34 milliard de dollars, représentant 32% des recettes monétaires agricoles en horticulture (Agriculture et Agroalimentaire Canada, 2002). Ces revenus exhibent une hausse de 10.7% de plus qu'en 1999, pouvant être expliquée par la croissance observée particulièrement dans le secteur des légumes frais coupés. Les données pour le Canada pour la division des légumes minimalement transformés ne sont pas disponibles, mais la progression de la production de ce secteur semble accuser un léger retard par rapport à celle des États-Unis. Toutefois, les producteurs de carottes du Canada semblent s'adapter aux exigences du marché en valorisant les légumes déclassés par la voie du prêt à l'emploi, malgré qu'au Québec, il n'y ait qu'une seule entreprise de production de carottes qui pèle, coupe et emballe les carottes miniatures. Un espoir toutefois est fondé

sur un nouvel établissement de préparation de légumes fraîchement coupés, construit à Laval en 1999, et ayant pour but de desservir les marchés de la Nouvelle-Angleterre, des Maritimes, de l'Ontario et du Québec. En terme de production de carottes fraîches, le Canada en a produit 182 018 tonnes pour l'année 2000, représentant 21% de la production totale de légumes frais (Agriculture et Agroalimentaire Canada, 2002). Le Québec occupe une place importante dans la production de carottes fraîches. Seulement en 1999, cette province a produit 44% des carottes du Canada (Sauriol, 2001).

Le Canada est un importateur net de légumes frais. En 2000, ce pays a importé 1.3 million de tonnes de légumes frais d'une valeur de 1.26 milliard de dollars. Les importations de carottes fraîches ont triplé entre 1994 et 2000, passant de 29 à 79 millions de dollars, soit de 61 200 tonnes à 103 900 tonnes (Sauriol, 2001). Pour cette même année, 83% des importations canadiennes de légumes frais provenaient des États-Unis, suivi du Mexique avec 9%. Quant aux exportations, celles-ci correspondaient à 346 283 tonnes, valant 521 millions de dollars (Agriculture et Agroalimentaire Canada, 2002). Environ 40% de la production de carottes est exportée aux États-Unis (Sauriol, 2001).

2) États-Unis

Aux États-Unis, l'industrie des légumes frais demeure tout aussi importante, ayant rapporté 7.8 milliards de dollars en 2000, correspondant à une quantité de 19.3 millions de tonnes et à une augmentation de 3.3% par rapport à l'an dernier (Agriculture et Agroalimentaire Canada, 2002). Cependant, la production américaine totale de légumes frais a diminué. Durant cette même année, la production de carottes fraîches a été estimée à 4 milliards de dollars, pour une quantité de 1.55 million de tonnes, soit environ 8% de la production totale de légumes frais (USDA, 2002). En ce qui concerne le secteur des légumes minimalement transformés pour ce pays, Agriculture et Agroalimentaire Canada (2002) estime que ce marché constitue environ 8% de la totalité des légumes écoulés dans les magasins d'alimentation de détail et de 20% de ceux vendus par les restaurateurs. Il est prévu qu'au cours des cinq prochaines années, les ventes au détail de ce type de légumes atteindront 19 milliards de dollars aux États-Unis, comparativement à

5 milliards en 1994 et que ce segment représentera 25% des ventes de légumes frais d'ici l'année 2003.

Les États-Unis demeure le principal partenaire commercial du Canada. En effet, ce pays représente la destination de plus de 97% de nos exportations et la source de 84% de nos importations. La valeur des importations américaines de légumes frais et de melons en 2000 est estimée à 2.3 milliards de dollars, correspondant à 2.5 millions de tonnes. Quant aux exportations, ces dernières sont en hausse de 3% par rapport à l'année précédente avec 1.1 milliard de dollars pour 1 million de tonnes de légumes frais exportés (Agriculture et Agroalimentaire Canada, 2002).

1.2.3 Problèmes de conservation

1) Altérations de l'aspect physique

Un problème fréquemment rencontré lors de la conservation des carottes minimalement transformées est un changement important au niveau de leur apparence causé par la déshydratation. Les actions physiques appliquées lors de leur transformation telles que l'épluchage ou le récurage, le tranchage et le déchiquetage causent l'enlèvement des couches protectrices (épiderme) des carottes les rendant susceptibles au dessèchement et flétrissement. La déshydratation des débris en surface suite à cette transformation altère l'apparence du produit par le développement d'une couche blanchâtre à la surface des carottes fraîchement coupées. Les consommateurs associent ce changement à une perte de fraîcheur du produit puisque l'intensité de la couleur orange diminue. Au niveau physiologique, l'élimination de cette protection entraîne une augmentation du taux de respiration de la carotte en plus de stimuler la production d'éthylène.

La coloration blanchâtre en surface des carottes est le résultat à la fois d'une réponse physique et physiologique à la cicatrisation des blessures du légume suite à sa transformation. Une déshydratation des couches extérieures de la surface de la carotte

constitue la réponse physique (Cisneros-Zevallos, Saltveit et Krochta, 1995). Cette réaction est toutefois réversible puisqu'une hydratation du légume par son trempage dans l'eau rétablit la couleur orange originale. La réaction physiologique du végétal est la formation de lignine à sa surface (Bolin et Huxsoll, 1991; Howard et Griffin, 1993). La lignine est une composante de la paroi des cellules végétales en plus de la cellulose, l'hémicellulose et d'autres polysaccharides. Cette molécule hydrophobe est le constituant principal du bois. Lors de la lignification, les membranes des cellules de la carotte s'imprègnent de lignine donnant au légume une texture d'aspect rigide et inextensible. Cette dernière solution à la cicatrisation est une réaction stimulée par des enzymes dont une peroxydase en est l'enzyme clé (Bell, 1981). Bien que les effets résultant de la lignification soient irréversibles, l'inactivation des enzymes responsables de ce phénomène pourrait retarder le développement de la coloration blanchâtre.

Plusieurs facteurs peuvent influencer la formation du blanchiment tels que la température (Buick et Damoglou, 1987), le degré de sévérité des blessures (Bolin et Huxsoll, 1991), l'humidité relative (Avena-Bustillos *et al.*, 1993) et le type de coupe obtenue lors de l'étape du tranchage pendant la transformation (Tatsumi, Watada et Ling, 1993; Tatsumi, Watada et Wergin, 1991). Notamment, la température a un effet sur le taux de sénescence du légume prêt à manger et par conséquent, influence la réaction physiologique conduisant au développement de la coloration blanchâtre. Cette même réponse physiologique en regard à la cicatrisation du légume peut être amplifiée par exemple suite à un épluchage plus prononcé des carottes lors de leur transformation. Également, la quantité initiale d'eau présente à la surface des carottes minimalement transformées agit considérablement sur la réponse physique qui est la déshydratation des carottes. Cette quantité varie en fonction de l'humidité relative à laquelle les légumes sont exposés lors de leur distribution. Ainsi, une faible humidité relative entraîne une perte considérable d'eau en surface. Finalement, le genre de lame employée pendant la transformation, lors des étapes de tranchage notamment, peut influencer sur la perte de qualité des carottes. En fait, l'utilisation d'une lame semblable à celle d'un couteau culinaire tend à cisailer, séparer et compresser les cellules végétales en comparaison avec

un instrument de coupe muni d'une lame de type rasoir. Ainsi, la déshydratation d'un nombre étendu de ces cellules est la cause de l'apparition blanchâtre en surface.

2) Altérations microbiologiques

Les actions physiques exercées pendant la transformation des carottes prêtes à l'emploi exposent les tissus internes aux micro-organismes et aux enzymes endogènes potentiellement très altérantes. De plus, le bris des cellules végétales conduit à la libération d'éléments nutritifs pouvant favoriser la prolifération de microbes. Essentiellement, la dégradation des carottes fraîchement coupées entraîne une perte de fermeté associée à la formation d'odeurs désagréables, une importante exsudation, une surface visqueuse générée par la présence de bactéries et une perte de saveur. Les bactéries responsables de ces altérations sont relatées par plusieurs études recensées dans la littérature, malgré la possibilité que ces phénomènes généraux de dégradation ne soient pas d'origine microbienne. Puisque la carotte est un légume produit dans le sol, les micro-organismes détectés dans l'aliment transformé sont issus de cet environnement, en plus du risque d'y retrouver des pathogènes tels qu'*E. coli*, *Salmonella* spp. et *Listeria monocytogenes* suite à l'utilisation d'eau polluée, de fertilisants naturels ou la présence d'excréments d'animaux. À ce jour néanmoins, aucune étude n'a rapporté un cas de toxoinfection reliée à la consommation de carottes prêtes à l'emploi. Enfin, les micro-organismes suspectés d'être la cause de dégradation des carottes prêtes à l'emploi sont les a) bactéries mésophiles pectinolytiques, b) les bactéries lactiques ainsi que c) les levures et les moisissures.

a) Bactéries mésophiles

Les carottes fraîchement coupées renferment habituellement des populations de bactéries mésophiles variant de 10^6 - 10^9 UFC/g (Nguyen-the et Carlin, 1994). Tel que mentionné précédemment, ces bactéries représentent la flore épiphytique retrouvée dans les champs comprenant principalement les espèces *P. fluorescens*, *E. herbicola* et *E. agglomerans*. Malgré le fait que plusieurs études rapportent la détection de souches pectinolytiques de l'espèce *P. fluorescens*, leur implication dans l'altération de ce type de

produits demeure faible. Par ailleurs, l'influence des bactéries mésophiles dans la détérioration des carottes prêtes à l'emploi est vague puisque dans la plupart des cas, le nombre total de populations bactériennes détectées à la fin de la période d'entreposage n'est pas en relation avec la qualité de l'échantillon. Ainsi, les comptes totaux de la flore mésophile sont similaires dans les échantillons de carottes minimalement transformées détériorés et ceux ayant bonne apparence (Carlin *et al.*, 1989). Enfin, l'espèce *Erwinia carotovora* est reconnue comme un important phytopathogène de la carotte, responsable de la pourriture molle bactérienne, et qui se développe au cours de l'entreposage. Cette bactérie n'est pas endémique dans le sol et sa présence est observée en relation de plante-hôte (phytopathogène). Cependant, la détection de cette espèce dans les carottes fraîchement coupées n'est pas fréquente puisque les parties malades du légume sont triées et enlevées avant sa transformation.

b) Bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont particulièrement impliquées dans la détérioration des carottes minimalement transformées (Carlin *et al.*, 1989; Zagory, 1999). L'altération de ce type de légume est régulièrement associée avec des populations bactériennes élevées de *Leuconostoc mesenteroides* plutôt que des populations nombreuses de bactéries mésophiles. Ce sont les souches pectinolytiques de *Leuconostoc* qui sont responsables d'affecter l'aspect organoleptique de la carotte (Juven, Lindner et Weisslowicz, 1985). Bien que dans plusieurs cas, la dégradation des légumes prêts à manger ne peut être associée directement à un micro-organisme en particulier, les carottes sont davantage susceptibles d'être altérées par une fermentation lactique (Nguyen-the et Carlin, 1994). Ainsi, ces légumes prêts à l'emploi libèrent des sucres et des acides organiques propices au développement des bactéries lactiques et ces conditions font surir les carottes suite à la fermentation lactique.

c) Levures et moisissures

Les carottes entières sont très sensibles à des altérations fongiques par des moisissures pathogènes lors de l'entreposage. L'espèce *Botrytis cinerea* est un mycélium gris dont la croissance est favorisée par une température et une humidité élevées. *Sclerotinia sclerotiorum* est responsable de la pourriture brune liquéfiante faisant gonfler le légume d'eau et amenant par conséquent une perte de texture. Cette dernière moisissure de type pectinolytique a été isolée de carottes prêtes à l'emploi en plus du genre *Mucor*. Les levures les plus fréquemment identifiées dans des carottes minimalement transformées sont *Candida lambica* et *Candida sake* en plus de la présence de levures pectinolytiques telles que *Trichosporon* spp. (Babic *et al.*, 1992). Le rôle des mycètes dans la détérioration des légumes prêts à manger est toutefois encore peu étudié.

1.2.4 Propriétés sensorielles et composition biochimique

1) Goût

La carotte possède un goût complexe. Un seul composé ne peut être en mesure de reproduire la saveur distinctive de ce légume. Plusieurs facteurs peuvent influencer le goût de la carotte comme la variation du niveau des sucres lors de la maturation, les phosphates, les composés nitrogénés et les composés phénoliques. Néanmoins, la saveur typique de la carotte est issue davantage de la présence de composés volatils tels que les terpènes et sesquiterpènes (Alasalvar *et al.*, 2001) et d'un taux élevé de sucres (Howard *et al.*, 1995). Mis à part l'influence des composés chimiques, la variation génétique a un fort impact sur l'arôme final du légume. D'ailleurs, ce facteur domine sur l'effet du sol et du climat (Simon, Peterson et Lindsay, 1982).

2) Couleur

La couleur orangée de la carotte que les gens consomment aujourd'hui n'a fait son apparition qu'au XIX^e siècle. À cette époque, les marchands de légumes insistaient auprès des agronomes français pour que ces derniers établissent une nouvelle image davantage attrayante de la carotte sur les étalages. Ainsi, d'une couleur beige se rapprochant du panais, la carotte est devenue jaune orangé. Les carottes minimalement transformées retrouvées sur le marché sont obtenues à partir d'une variété de carottes de cette couleur. Toutefois, d'autres variétés de carottes existent telles que la carotte marron, la carotte jaune et la carotte blanche.

La carotte est un aliment riche en bêta-carotène. Ce dernier figure parmi les 400 caroténoïdes existant dans la nature. Il demeure le plus abondant et le mieux connu de tous. Les caroténoïdes sont des pigments jaunes ou rouges que l'on retrouve dans de nombreux végétaux leur attribuant leur couleur caractéristique. Le pigment jaune orange contenu dans la carotte a été isolé et désigné sous le nom de carotène en 1831 par Wackenroder (Roche Vitamines, 2001). La teneur en bêta-carotène de la carotte peut varier selon le génotype, la saison, la durée de l'entreposage et le degré de maturité (Alasalvar *et al.*, 2001).

3) Texture

Chaque cellule végétale composant une plante est entourée d'une paroi cellulaire très résistante. Cette dernière est formée de cellulose et d'hémicellulose. Chacune des parois des cellules végétales est fermement cimentée les unes aux autres donnant à la plante un niveau considérable de support et de structure. Quand une cellule végétale se divise, une cloison composée majoritairement de pectine est construite par les deux nouvelles cellules. Les pectines sont des polysaccharides susceptibles d'être dégradés par l'enzyme pectine- α -polygalacturonosidase. Le ramollissement des fruits et légumes lors de leur maturation est d'ailleurs provoqué par cette enzyme. Certaines bactéries possèdent cette même enzyme et sont impliquées dans l'altération microbiologique des légumes comme la carotte. Ce sont les micro-organismes de type pectinolytiques.

Toutefois, d'autres enzymes (méthyle estérases) ont pour substrat les pectines et sont reliées au processus du ramollissement, mais le mécanisme distinct reste à préciser.

Finalement, après la croissance des cellules végétales, certaines d'entre elles édifient une paroi cellulaire secondaire plus rigide. Cette dernière est composée de cellulose qui est consolidée avec de la lignine. Ce matériel de renforcement est un polysaccharide notamment impliqué dans la cicatrisation des blessures des tissus végétaux.

4) Vitamine A

La carotte demeure une des principales sources naturelles de vitamine A (β -carotène). Cette vitamine liposoluble, appelée aussi rétinol, se présente sous deux formes: le rétinol et les caroténoïdes. La première forme se retrouve exclusivement chez les animaux. Le caroténoïde nommé bêta-carotène est un précurseur de la vitamine A puisqu'il ne développe son activité vitaminique A qu'après avoir été transformé en rétinol dans l'organisme. La quantité de ce caroténoïde qui se transforme en vitamine A est fonction des réserves de cette vitamine dans le corps. Le bêta-carotène est une des vitamines les plus stables parmi celles retrouvées dans les légumes (Roche Vitamines, 2001).

Une des vertus du bêta-carotène demeure ses propriétés antioxydantes qui permettent le piégeage des radicaux libres (Roche Vitamines, 2001). Ces derniers sont des molécules énergiques fortement réactives qui se forment au cours de réactions biochimiques normales telles que les réponses inflammatoires ou par l'intermédiaire de sources exogènes comme la fumée de cigarette. Ces molécules peuvent causer des dommages aux membranes cellulaires et au matériel génétique des cellules et par conséquent, ces changements peuvent entraîner le cancer. Bien que les études voulant démontrer une corrélation entre l'apport de bêta-carotène et l'incidence de cette maladie ne soient pas achevées, les données suggèrent fortement que cet antioxydant jouerait un rôle dans la protection contre le cancer, particulièrement celui des poumons (Longnecker *et al.*, 1997; Speizer *et al.*, 1999).

Une autre fonction remplie par le bêta-carotène est la neutralisation d'une molécule aussi très réactive; l'oxygène singulet. Lorsque la peau est exposée aux rayons ultraviolets, cette molécule peut se former dans cette composante du corps et induire des modifications précancéreuses au niveau des cellules. De plus, l'oxygène singulet a la propriété de déclencher des réactions en chaîne de radicaux libres.

5) Substances antimicrobiennes

Plusieurs composés, trouvés naturellement dans les légumes ou formés en réponse à un stress physique ou chimique, possèdent une activité antimicrobienne. Dans la carotte, les composés naturels préexistants (terpènes) ou induits (composés phénoliques, polyacétylènes) jouent un rôle majeur dans la défense des tissus du végétal contre les infections et blessures (Garrod, Lea et Lewis, 1979; Garrod, Lewis et Coxon, 1978; Sarkar et Phan, 1979). Le terpinéol (terpène), le falcarindiol (acétylène), le *cis*-heptadéca-1, 9diène-4' 6-diyne-3, 8-diol (polyacétylène) et l'acide chlorogénique (composé phénolique) en sont des exemples. Notamment, la phytoalexine nommée 6-méthoxymelléine ou isocoumarine (composé phénolique) inhibe la croissance de plusieurs mycètes et bactéries. Cette substance exerce son activité antimicrobienne en interagissant avec la membrane des micro-organismes et atteint par conséquent les fonctions reliées à cette structure (Kurosaki et Nishi, 1983). Les phytoalexines sont des composés antimicrobiens de faible poids moléculaire qui sont synthétisés par les tissus vivants des plantes en réponse à une infection microbienne ou à des conditions de stress. D'autres composés phénoliques extraits de carottes prêtes à manger ont démontré un effet antimicrobien contre plusieurs micro-organismes retrouvés dans les aliments (Babic *et al.*, 1994). C'est le cas en autres des esters hydroxycinnamiques, de l'acide *p*-hydroxybenzoïque et des esters *p*-hydroxybenzoïques. Toutefois, l'attention des recherches est davantage tournée vers l'effet «anti-*Listeria*» que renferme les constituants chimiques de la carotte (Nguyen-the et Lund, 1991, 1992).

1.3 PROCÉDÉS DE CONSERVATION

Anciennement, les efforts des gens étaient centrés sur la prolongation de la durée de conservation des denrées alimentaires après leur récolte afin d'avoir assez de provisions au cours de l'année. À cette époque, la diversité des moyens de conservation des aliments était très limitée. En effet, jusqu'au début du XIX^e siècle, seulement l'action protectrice du sel, du vinaigre et du sucre, le séchage et le fumage de certains produits (poissons, viandes) ainsi que la fermentation que subissaient quelques denrées (lait, jus de raisin) étaient connus (Lacasse, 1995). Conséquemment, cette situation engendrait une sorte de dépendance de la race humaine envers les saisons et les bonnes ou mauvaises récoltes locales amenant parfois des cas de carences vitaminiques. Aujourd'hui, la modernisation a entraîné la création d'une multitude de procédés de conservation visant à retarder ou à empêcher la détérioration des denrées alimentaires, tout en préservant leurs propriétés nutritionnelles et organoleptiques.

Les légumes prêts à manger renferment une multitude d'éléments nutritifs propices à la prolifération de micro-organismes. En ce qui a trait aux carottes minimalement transformées, ces dernières sont vendues dans un intervalle de 7 à 8 jours après leur transformation, mais des carottes de moindre qualité peuvent avoir une durée de vie de seulement 4 à 5 jours (Carlin *et al.*, 1989). En effet, ce temps de conservation peut être raccourci par la détérioration du produit suite à la croissance et à l'activité microbiennes. Des précautions particulières doivent être apposées afin que ces denrées fraîches ne s'altèrent rapidement. La réfrigération et l'atmosphère modifiée figurent parmi les moyens de conservation les plus connus pour assurer l'innocuité de ce type de denrées, alors que les enrobages comestibles et l'irradiation gamma prennent de plus en plus d'expansion sur le marché. Néanmoins, l'emploi de telles mesures de conservation ne permet pas de négliger le respect des règles d'hygiène.

La combinaison simultanée de moyens de conservation pour assurer l'innocuité des denrées alimentaires est pratique courante aujourd'hui. Le mode d'action de ces traitements peut être additif ou même synergique. En fait, chaque traitement contribue à stabiliser la charge microbienne du produit alimentaire par l'effet de différents paramètres

comme le pH, l'activité de l'eau libre, les températures et la flore compétitrice. Cet effet «barrière» de chacun permet de conserver les propriétés nutritives de l'aliment sans l'utilisation abusive d'un seul procédé. Ce concept a été introduit vers la fin des années 1970 (Leistner, 1978). De l'effet «barrière» est dérivée la technologie «barrière» dont le but premier est l'économie d'énergie. Enfin, par cette notion de «barrière» microbiologique (Leistner, 1992), l'irradiation des légumes fraîchement coupés peut être couplée avec d'autres traitements tels qu'une température de réfrigération, une atmosphère modifiée et un enrobage antimicrobien afin d'obtenir un effet d'inhibition synergique. Ces combinaisons permettent l'emploi de doses d'irradiation moins élevées sans affecter la qualité du produit.

1.3.1 Températures de réfrigération

Au cours des 50 dernières années, l'utilisation généralisée de la réfrigération en alimentation a engendré un progrès considérable, spécifiquement au niveau de la salubrité des aliments. La réfrigération consiste au maintien d'aliments à des températures situées légèrement au-dessus du point de congélation. De façon générale, les températures de réfrigérateurs domestiques sont comprises entre 4 et 7°C alors que celles des entrepôts frigorifiques ou de certains réfrigérateurs retrouvés en industrie alimentaire sont voisines de 0°C. Dans l'industrie de conditionnement des légumes prêts à manger, la température est de loin le facteur qui affecte le plus l'activité et la croissance des micro-organismes. En effet, l'optimisation de la conservation par le froid de ces aliments se réalise par le maintien ininterrompu de la chaîne du froid. Ainsi, du légume entier conservé en entrepôt jusqu'à sa transformation, les véhicules de transport de même que les entrepôts doivent être munis de systèmes de réfrigération efficaces. Au Canada, le code d'usage relatif aux légumes prêts à manger minimalement transformés (ACIA, 2000) exige le respect d'une température de réfrigération de 4°C pour ces installations. Parmi les légumes fraîchement coupés, certains ne sont pas sensibles au froid tels que les carottes et la laitue. Ces produits peuvent donc être conservés à des températures se rapprochant du point de congélation sans possibilité de blessures subies par le gel. Enfin, le respect des conditions de réfrigération demeure important, car 40% des cas de toxi-infections alimentaires pour

plusieurs genres d'aliments sont reliés à une température inadéquate d'entreposage (Banwart, 1989).

L'avantage principal de la conservation des légumes prêts à l'emploi par le froid est l'obtention d'un bas niveau d'activité des enzymes microbiennes et alimentaires. Par conséquent, les températures de réfrigération entraînent le ralentissement ou l'arrêt de la croissance des micro-organismes en plus du retardement de la détérioration de l'aliment. La vitesse d'autres réactions chimiques non enzymatiques telles que l'oxydation sont aussi retardées par le froid. Toutefois, cette méthode de conservation ne permet pas d'assainir les aliments de leurs populations microbiennes puisque la plupart des micro-organismes tolèrent bien le froid et peuvent reprendre leurs activités après l'exposition de l'aliment à des températures favorables. De plus, puisque les enzymes alimentaires ne sont pas dénaturées, la durée de conservation des légumes fraîchement coupés ou autres produits alimentaires réfrigérés est limitée. Les températures de réfrigération ne permettent donc pas la stabilisation parfaite ni permanente des aliments soumis au froid. En fait, l'arrêt complet de croissance de micro-organismes dans un aliment est assuré seulement par des températures de congélation ($\leq -18^{\circ}\text{C}$) (Lacasse, 1995). Dans le cas des produits de légumes fraîchement coupés, deux facteurs doivent être considérés afin d'expliquer l'effet de la température et son action directe sur le taux de croissance des micro-organismes:

- 1) la température d'entreposage détermine le taux de respiration du produit et par conséquent les changements d'atmosphères gazeuses à l'intérieur de l'emballage;

- 2) l'influence de la température sur le taux de sénescence du légume transformé qui modifie l'environnement des micro-organismes.

La réfrigération demeure l'une des principales méthodes pour prévenir des cas de toxi-infections alimentaires puisque la plupart des germes susceptibles d'y être impliqués exigent une température supérieure à 7 ou 10°C pour se développer (Lacasse, 1995). En effet, les thermophiles et un nombre considérable de mésophiles (dont la plupart des

pathogènes) ne peuvent plus se multiplier au réfrigérateur tandis que les psychrotrophes et les quelques mésophiles tolérants (*Enterobacter cloacae*, *Hafnia alvei*, *Yersinia enterocolitica*) poursuivent leur croissance, bien qu'à un rythme moins important qu'à la température de la pièce. Des genres bactériens, fréquemment isolés de légumes fraîchement coupés tels qu'*Enterobacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas* et *Lactobacillus* ont encore une activité importante à des températures inférieures à 7°C (Lacasse, 1995). Ces bactéries peuvent alors poursuivre l'altération des aliments même si ceux-ci sont conservés à des températures de réfrigération. D'ailleurs, l'entreposage au froid des légumes prêts à l'emploi a un effet sélectif important sur la flore d'altération, permettant l'évolution rapide et la domination des organismes psychrotrophes. Des pathogènes comme *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium botulinum* type E et *Listeria monocytogenes* ont aussi une capacité de croître à des températures de réfrigération. Puisque leur croissance est plus lente que celles des bactéries psychrotrophes non pathogènes, l'inhibition compétitive et les modifications organoleptiques générées par ces dernières aident à prévenir les cas de toxi-infections alimentaires. Cependant, si cette flore compétitive est inhibée par un autre traitement quelconque, le danger de maladies alimentaires est davantage présent. La réfrigération ne peut donc être considérée comme une méthode de conservation absolue des légumes prêts à l'emploi. Un changement brusque de température suite au bris de la chaîne du froid peut notamment entraîner une condensation de la vapeur d'eau à la surface des légumes favorisant ainsi la croissance des micro-organismes. L'utilisation parallèle de la réfrigération avec d'autres traitements, comme l'irradiation, peut augmenter la durée de conservation des légumes fraîchement coupés (Boisseau, Jungas et Libert, 1991; Farkas *et al.*, 1997).

1.3.2 Atmosphère modifiée

La technologie de l'atmosphère modifiée captive l'industrie alimentaire depuis près d'un siècle. La première application commerciale a eu lieu vers les années 1930 dans le but de conserver la viande d'agneau et de bœuf par l'ajout de gaz carbonique dans les cales réfrigérées des navires d'exportateurs australiens (Lacasse, 1995). De nos jours, les efforts des chercheurs sont concentrés sur la mise au point d'emballages plastiques davantage étanches aux gaz utilisés.

L'atmosphère modifiée est une méthode de conservation des denrées dans un environnement autre que l'air. Ces conditions peuvent être établies tout simplement par la respiration de l'aliment emballé (atmosphère modifiée passive) ou par l'expulsion de l'air à l'intérieur de l'emballage et son remplacement par une combinaison gazeuse favorable au produit alimentaire à préserver. Cette dernière application, qualifiée d'atmosphère modifiée active, inclut notamment les emballages sous-vide. Aucun contrôle ultérieur n'est effectué sur la composition de l'environnement gazeux à l'intérieur de ces emballages d'atmosphère modifiée active contrairement aux atmosphères modifiées contrôlées dont l'aliment est continuellement exposé au mélange de gaz. C'est le cas par exemple des entrepôts où les fruits et légumes bénéficient d'un environnement où l'air ambiant est enrichi en gaz carbonique (1-10%) et appauvri en oxygène (2-5%). L'azote est le gaz de complément (85-97%). Les œufs en coquille, les carcasses de viandes et de volailles sont également conservés sous atmosphère contrôlée (Lacasse, 1995).

Le principal avantage de l'atmosphère modifiée est de prolonger la durée de conservation des aliments en retardant l'altération de ces derniers. Conséquemment, une réduction des pertes économiques est observée. Cependant, une différente formulation gazeuse doit être établie pour chaque produit alimentaire à conditionner. Par ailleurs, l'utilisation de l'atmosphère modifiée n'est pas un substitut à de bonnes pratiques d'hygiène ni un moyen de remplacer le maintien strict des températures de réfrigération.

La combinaison d'une atmosphère modifiée avec la réfrigération des aliments permet notamment l'allongement de leur état de fraîcheur allant de 50 à 400% (Hotchkiss, 1988).

Les trois principaux gaz utilisés commercialement sont l'oxygène (O_2), le dioxyde de carbone (CO_2) et l'azote (N_2). Généralement, l'oxygène stimule la croissance des micro-organismes aérobies et par conséquent, une réduction de sa proportion dans le mélange gazeux affecte la croissance de ces cellules microbiennes. À l'opposé, la présence d'oxygène inhibe les bactéries anaérobies. De façon générale, ce gaz ne semble pas prolonger la durée de conservation des aliments (Hotchkiss, 1988). L'azote est employé comme un gaz neutre en remplacement de l'oxygène afin de prévenir l'affaissement de l'emballage qui se produit fréquemment lors de l'utilisation d'une atmosphère modifiée élevée en gaz carbonique (Farber, 1991). Par ailleurs, le remplacement de l'oxygène par de l'azote à l'intérieur des emballages permet le retardement de la rancidité, causée par l'oxydation des gras de l'aliment, et l'inhibition de la croissance des micro-organismes aérobies. Enfin, l'effet inhibiteur d'une atmosphère modifiée sur la microflore d'altération des aliments est principalement associé à un haut niveau de gaz carbonique (> 4%) (Lacasse, 1995). Ce gaz est notamment soluble dans l'eau et les lipides. Il est reconnu pour son activité bactériostatique contre plusieurs micro-organismes (Daniels, Krishnamurt et Rizvi, 1985; Dixon et Kell, 1989). Bien que le mode d'action spécifique de ce gaz ne soit pas clairement établi, les effets possibles du dioxyde de carbone sont:

- 1) l'altération des fonctions normales des membranes;
- 2) le blocage de l'activité de certaines enzymes;
- 3) la réduction du pH intracellulaire;
- 4) le déclenchement de changements au niveau des propriétés physico-chimiques des protéines.

Plusieurs facteurs peuvent influencer ces effets tels que la pression partielle du dioxyde de carbone, sa concentration, le volume disponible à l'intérieur de l'emballage, la température, l'acidité, l'activité de l'eau, la nature des micro-organismes et leur état de croissance de même que la composition de l'aliment. Parmi tous ces éléments, la température est de loin le facteur ayant le plus d'impact. En effet, cette dernière régit la solubilité du gaz carbonique qui diminue particulièrement lorsque la température augmente. Ainsi, une température d'entreposage inadéquate du produit alimentaire conservé sous une atmosphère modifiée éliminera l'effet bénéfique du gaz.

La conservation des aliments par atmosphère modifiée donne lieu à une série de modifications au niveau de la flore microbienne des aliments. Généralement, la phase de latence des moisissures et des bactéries à Gram négatif psychrotrophes aérobies (*Pseudomonas*) se prolonge et leur taux de croissance ralentit. Cet état favorise d'autres cellules microbiennes compétitrices telles que les bactéries lactiques et les levures fermentaires. Les bactéries lactiques freinent à leur tour la croissance des anaérobies facultatives comme les Entérobactéries. Cette flore normale d'altération, que sont les bactéries lactiques, agit comme indicateur de l'état de fraîcheur du produit alimentaire et permet de réprimer les pathogènes.

L'atmosphère modifiée couplée à la réfrigération est une combinaison de méthodes fréquemment utilisée pour améliorer la stabilité microbiologique des légumes prêts à l'emploi (Huxsoll et Bolin, 1989; Myers, 1989). Ce type de produits alimentaires diffère des autres aliments puisque les cellules des végétaux continuent de respirer même après leur récolte. La respiration des cellules végétales exige alors que les légumes soient exposés à un environnement comprenant de l'oxygène, car les conditions adverses vont entraîner des fermentations causant la production de mauvaises odeurs et saveurs. Les bénéfices de l'utilisation de l'atmosphère modifiée pour les légumes minimalement transformés sont le retardement de la sénescence (rétention des pigments), la diminution du taux de respiration et de la fermeté des tissus végétaux (diminution de la lignification). Typiquement, une atmosphère modifiée composée de 5 à 10% de gaz carbonique et de 2 à 5% d'oxygène est utilisée pour conserver les légumes fraîchement coupés (Kader, Zagory

et Kerbel, 1989). Puisque les légumes respirent activement, une atmosphère modifiée contenant un niveau élevé de dioxyde de carbone et un bas niveau d'oxygène se crée à l'intérieur de l'emballage. De façon idéale, les légumes doivent être conditionnés dans des emballages perméables à l'oxygène. D'ailleurs, la perméabilité du conditionnement employé influence grandement la réponse physiologique du légume à l'atmosphère modifiée. Notamment, les carottes fraîchement coupées se conservent préférablement dans des emballages possédant une haute perméabilité à l'oxygène (Carlin *et al.*, 1990). Récemment, l'emploi d'une atmosphère modifiée composée d'un taux élevé d'oxygène et de gaz carbonique a été proposée pour la conservation de légumes prêts à manger (Allende *et al.*, 2002; Amanatidou *et al.*, 2000; Heimdal *et al.*, 1995). Par ailleurs, les effets de concentrations élevées de ces gaz ont été étudiés *in vitro* et *in vivo* sur des micro-organismes isolés de légumes prêts à manger (Amanatidou, Smid et Gorris, 1999; Jacxsens *et al.*, 2001).

Les légumes fraîchement coupés conservés sous atmosphère modifiée nécessitent une température de réfrigération adéquate. Or, un problème considérable lié à l'innocuité des aliments conservés sous atmosphère modifiée est la prolongation de la durée de vie des denrées réfrigérées. Les conditions d'anaérobiose, obtenues par la respiration du produit, et les températures froides employées peuvent conduire à une diminution de la flore compétitrice. Par conséquent, cette situation favorise la croissance de certains micro-organismes pathogènes psychrotrophes et aérobies facultatifs tels que *Listeria monocytogenes* et *Clostridium botulinum*. Puisque l'atmosphère modifiée prolonge la conservation des aliments, le risque de consommer des aliments contaminés par des pathogènes est réel, si l'aliment n'affiche aucun signe de dégradation suite aux changements provoqués par la flore d'altération. Le couplage d'un traitement d'irradiation et d'une atmosphère modifiée pour la conservation des légumes minimalement transformés permet de remédier à ce problème (Fan et Sokorai, 2002; Fan *et al.*, 2003; Hagenmaier et Baker, 1998).

1.3.3 Enrobage comestible

L'utilisation d'enrobages comestibles semble être un nouveau concept, mais existe depuis très longtemps. Au 12^e et 13^e siècle en Chine, une cire était appliquée sur des citrons afin de retarder leur déshydratation. Jusqu'au 16^e siècle, la viande était enrobée de gras dans le but de prévenir son rétrécissement. L'emploi de sucrose sur des noix pour empêcher leur oxydation et leur rancissement avait lieu au 19^e siècle. Jusqu'à ce jour, l'enrobage comestible le plus connu, employé depuis 1930, est l'utilisation d'une émulsion, faite à partir de cire et d'huile, vaporisée sur les fruits pour l'amélioration de leur brillance, leur couleur, leur texture et le retardement de la perte d'eau (Debeaufort, Quezada-Gallo et Voilley, 1998). Au cours des 40 dernières années, des chercheurs ont persisté à mettre au point de nouvelles formulations d'enrobages afin de préserver les propriétés organoleptiques et nutritives des produits alimentaires. Ce type d'emballages demeure intéressant en comparaison avec les films de plastique, car l'enrobage est constitué d'ingrédients naturels et par conséquent est non polluant et protège l'environnement.

Les qualités requises d'un enrobage comestible dépendent principalement des altérations de l'aliment. D'une part, l'enrobage peut avoir des fonctions sélectives quant aux transferts de masse. Cette forme d'emballage par exemple peut fournir une barrière efficace du transfert de la vapeur d'eau afin de retarder la déshydratation de produits frais tels que les viandes ainsi que les fruits et légumes. Les enrobages comestibles assurent aussi le contrôle des échanges gazeux, particulièrement l'oxygène, permettant de contrôler la maturation des végétaux ou de réduire l'oxydation des aliments. La perte de composés aromatiques pendant l'entreposage des denrées alimentaires peut être évitée par l'enrobage de ces dernières. D'autre part, les enrobages comestibles peuvent avoir des propriétés actives. En effet, ces emballages peuvent permettre l'encapsulation ou être le véhicule d'additifs alimentaires (antimicrobiens, pigments, antioxydants, vitamines) en plus d'améliorer la résistance mécanique de l'aliment (couleur, brillance, transparence, rugosité).

L'enrobage comestible idéal pour les légumes fraîchement coupés doit créer une barrière contre la perte de composés volatils et de la vapeur d'eau en plus de restreindre les échanges de gaz carbonique et d'oxygène. Cette barrière crée ainsi une atmosphère modifiée relativement élevée en dioxyde de carbone et réduite en oxygène (Baldwin, Nisperos-Carriedo et Baker, 1995). Cette atmosphère modifiée permet alors une diminution du taux de respiration des végétaux en plus de la production d'éthylène sans toutefois créer des conditions d'anaérobiose pouvant entraîner de mauvaises saveurs et la stimulation de micro-organismes anaérobies. Un exemple concret demeure l'application d'enrobages sur des carottes minimalement transformées pour retarder le développement de la coloration blanchâtre à leur surface (Howard et Dewi, 1995, 1996; Cisneros-Zevallos, Saltveit, Krochta, 1997; Li et Barth, 1998). L'emballage comestible permet à la fois de contrôler la déshydratation et la lignification; deux éléments responsables de ce défaut physique. De plus, l'enrobage retarde la sénescence du légume et empêche la perte de composés volatils suite à la transformation de la carotte permettant de préserver sa saveur originale. La valeur nutritive des carottes enrobées est aussi conservée par la préservation de nutriments tels que le β -carotène.

Les conditions idéales d'un enrobage sont difficiles à obtenir dans la réalité puisque plusieurs facteurs comme la température et l'humidité relative peuvent affecter les propriétés de l'enrobage. En effet, les attributs de l'enrobage pour la barrière contre les gaz dépendent de l'humidité relative à laquelle le produit enrobé est exposé. À une humidité relative élevée, un enrobage très hydrophile peut incorporer de l'eau causant l'augmentation de la perméabilité de l'enrobage aux gaz. Par ailleurs, puisque la surface des légumes prêts à manger affiche une humidité relative élevée (où les tissus ont été coupés), les caractéristiques de l'enrobage, quant à sa perméabilité, sont difficiles à prévoir. De plus, la température d'entreposage de l'aliment enrobé peut avoir une influence notable sur l'atmosphère modifiée établie entre la surface du légume et l'enrobage. Une augmentation de température peut élever le taux de respiration du légume apportant des changements défavorables (état d'anaérobiose) aux conditions de l'atmosphère modifiée.

Les formulations des enrobages comestibles sont élaborées à partir de quatre types de matériel: des lipides, des résines, des polysaccharides et des protéines. Le tableau VI illustre, pour différents types de matériaux, des exemples d'ingrédients employés dans le cas de formulations désignées pour les légumes minimalement transformés (particulièrement les carottes fraîchement coupées). Les résines (bois, écailles de poisson, résine coumarone-indène) sont rarement utilisées. Bien qu'elles soient davantage perméables à la vapeur d'eau que les lipides, les résines et les lipides peuvent créer des conditions d'anaérobiose suite à des hausses de la température d'entreposage du produit enrobé. La principale cause de ces conditions est leur faible perméabilité aux gaz. Par ailleurs, ces ingrédients n'adhèrent pas parfaitement aux surfaces hydrophiles comme celles des légumes fraîchement coupés. En ce qui a trait aux polysaccharides, leur emploi dans des formulations d'enrobage doit tenir compte de leur nature hydrophile qui font de ces emballages de pauvres barrières à l'humidité (Kester et Fennema, 1988). Quant aux enrobages fabriqués avec des protéines, ces derniers ne résistent pas à la diffusion de la vapeur d'eau dans la plupart des cas (Gennadios et Weller, 1990).

Les enrobages destinés aux légumes prêts à manger peuvent aussi servir de véhicules d'ingrédients ayant une fonction spécifique. Par exemple, des agents de conservation (acide benzoïque, benzoate de sodium, acide sorbique, sorbate de potassium, acide propionique) peuvent être additionnés à la formulation afin de retarder la croissance de levures, moisissures et bactéries à la surface des légumes pendant leur entreposage et distribution. D'autres ingrédients tels que des antioxydants, des pigments, des assaisonnements peuvent améliorer la stabilité et la qualité de l'aliment. Enfin, des éléments nutritifs peuvent être ajoutés à l'enrobage fournissant aux produits alimentaires des nutriments qui se retrouvent normalement en faibles quantités (Chen, 1995; Elliott, 1999; Mei *et al.*, 2002).

L'utilisation d'un emballage approprié aux légumes prêts à manger est nécessaire dans l'ultime étape de leur conservation. L'application d'un enrobage pour ce type de denrées alimentaires demeure une option intéressante pour le prolongement de leur qualité. Toutefois, l'enrobage ne peut être le seul moyen employé pour obtenir cette durabilité. L'irradiation gamma peut ainsi être couplée à un enrobage afin de préserver toute la fraîcheur des légumes minimalement transformés, sans oublier le maintien d'une température de réfrigération adéquate. De telles combinaisons de traitements ont d'ailleurs faites l'objet d'études pour des produits périssables comme le sont les légumes prêts à manger (Ouattara *et al.*, 2002; Ouattara, Sabato et Lacroix, 2001; Vachon *et al.*, 2003). Ces travaux ont notamment montré qu'il était possible de conserver la couleur et la fraîcheur du bœuf et d'augmenter le temps de conservation des crevettes. De plus, l'utilisation de l'irradiation et d'un enrobage appliqué sur des fraises ont permis l'obtention d'effets synergiques.

Tableau VI. Différents types de matériaux et d'ingrédients entrant dans la composition d'enrobages comestibles pour les légumes minimalement transformés.

Matériaux	Ingrédients	Propriétés	Références (formulations)
Lipides	▪ Cire d'abeille	Barrière efficace contre l'humidité	Avena-Bustillos et Krochta, 1993
	▪ Monoglycérides acétylés		
	▪ Acide stéarique		Avena-Bustillos <i>et al.</i> , 1993
	▪ Acide laurique		
	▪ Esters d'acides gras et sucrose		
Polysaccharides	▪ Cellulose	Barrière efficace contre les gaz	Howard et Dewi, 1995
	▪ Pectine		Howard et Dewi, 1996
	▪ Amidon	Bonne adhérence à la surface du produit	Cisneros-Zevallos, Saltveit et Krochta, 1997
	▪ Alginate		
	▪ Chitosane		
Protéines	▪ Caséine	Bonne adhérence aux surfaces hydrophiles	Avena-Bustillos, Cisneros-Zevallos et Krochta, 1993
	▪ Gélatine		
	▪ Soya		Avena-Bustillos <i>et al.</i> , 1993
	▪ Zéine		
	▪ Albumine		

1.3.4 Irradiation des aliments

1.3.4.1 Généralités et importance industrielle

L'intérêt envers l'irradiation des aliments a débuté au 19^e siècle. À cette époque, la découverte des rayons X par Roentgen en 1895, la radioactivité naturelle par Becquerel en 1896, sans oublier les recherches de Marie et Paul Curie sur l'uranium, annonçaient la venue d'une ère scientifique moderne. Les effets de ces radiations ionisantes sur des plantes, des animaux et des composés organiques ont été dès lors le sujet de recherches minutieuses. Le premier brevet permettant l'utilisation de l'irradiation pour conserver les aliments a été accordé en 1921 aux États-Unis (Robins, 1991). Ce dernier décrivait l'utilisation des rayons X pour la destruction de *Trichinella spiralis* dans la viande. Les autres recherches qui ont suivi ont été freinées par le coût et la disponibilité de ces radiations. De plus, les sources de ces radiations pendant cette période étaient encombrantes et peu adaptées pour une exploitation possible par l'industrie alimentaire. Le développement de la théorie atomique, ayant conduit à la production de sources d'irradiation contrôlées, a permis de relancer l'intérêt envers l'irradiation des aliments. Aux États-Unis, ceci a été initié en 1953 avec le programme «Utilisation de l'énergie atomique pour la paix». À ce jour, l'irradiation de plus de 40 denrées alimentaires est maintenant permise dans 40 pays (Molins, Motarjemi et Käferstein, 2001). Actuellement, 32 pays exploitent ce procédé à des fins commerciales pour un ou plusieurs aliments. Par ailleurs, l'application d'une approche basée sur les principes d'HACCP (système des points de contrôle critiques pour l'analyse des risques) par les autorités de la santé publique a démontré le besoin d'un traitement efficace dans la production d'aliments frais tels que les légumes prêts à manger. L'irradiation pourrait être considérée comme un point de contrôle critique pour assurer la stabilité microbiologique des produits minimalement transformés (Molins, Motarjemi et Käferstein, 2001).

L'irradiation des aliments est un procédé physique qui consiste à exposer des denrées alimentaires à l'action directe d'un rayonnement ionisant, soit une forme d'énergie électromagnétique. Cette technologie offre plusieurs avantages face à d'autres méthodes de conservation des aliments utilisées pour assurer leur innocuité. Notamment, le traitement est effectué à froid ne causant pas d'augmentation significative de la température des denrées traitées. Cette procédure permet donc une meilleure conservation de la valeur nutritive des aliments. D'ailleurs, l'irradiation offre la possibilité aux industries de traiter directement des produits congelés. De plus, l'absence de résidus chimiques est assurée puisque cette technique de conservation demeure une méthode physique et non chimique. En plus de détruire les micro-organismes, les insectes et les parasites présents dans les aliments, l'irradiation permet le retardement de la maturation de certains fruits et légumes en plus d'inhiber la germination de certains légumes tels que la carotte et la pomme de terre. Finalement, l'application du traitement à des produits préemballés évite les contaminations éventuelles pouvant survenir après le traitement. Bien que l'irradiation détruise la plupart des micro-organismes, ce procédé ne stérilise pas nécessairement les aliments. Les consommateurs doivent toujours s'assurer de réfrigérer, manipuler et cuire suffisamment les aliments afin de détruire les micro-organismes potentiellement dangereux qui peuvent être encore présents.

L'irradiation des aliments n'est pas une panacée pour tous les problèmes de conservation. Cette technologie a des limites qui sont liées à son emploi comme moyen de conservation des denrées alimentaires. Les doses normalement utilisées pour le traitement des denrées alimentaires n'assurent pas l'inactivation des enzymes responsables de la lente détérioration des aliments pendant leur entreposage. La combinaison d'un traitement en parallèle avec l'irradiation peut aider à stabiliser ces enzymes (Lacasse, 1995). Également, des modifications organoleptiques et nutritionnelles peuvent survenir si les doses limites d'irradiation ne sont pas respectées. Certains produits comme les légumes verts et les aliments contenant des acides gras insaturés sont plus sensibles à l'irradiation. Une modification de la couleur et de l'odeur peuvent affecter l'apparence du produit. Conséquemment, les consommateurs associeront ces changements à un produit de qualité inférieure. Toutefois, ces effets

secondaires peuvent être évités ou réduits notamment par la réduction des doses d'irradiation et l'utilisation d'une atmosphère modifiée. Cependant, le lait et les produits riches en lipides insaturés demeurent trop sensibles aux changements organoleptiques occasionnés par les rayons ionisants et l'irradiation de ces denrées comme moyen de conservation est peu envisageable.

Le traitement d'aliments par irradiation ne rend pas ces derniers radioactifs, car l'énergie produite pendant le processus n'est pas suffisante pour affecter le contenu en neutrons dans le noyau. Les rayons ionisants agissent donc seulement sur les électrons des atomes composant les aliments laissant leur noyau intact (Urbain, 1984).

1.3.4.2 Sources de rayonnements ionisants

1) Rayons gamma

Les rayons gamma sont des ondes électromagnétiques de très haute énergie résultant de la désintégration spontanée d'isotopes radioactifs. Ils sont produits dans toutes les directions et de façon continue. Ces radiations de très courtes longueurs d'ondes (3×10^{-10} à 3×10^{-14} m) possèdent une capacité remarquablement élevée de pénétration à travers l'aliment (Robins, 1991). Les principales sources de rayons gamma sont le cobalt 60 (^{60}Co) et le césium 137 (^{137}Cs). Ce dernier provient de la fission nucléaire de l'uranium 235 (la séparation chimique de carburant nucléaire usé) et a une période radioactive de 30 ans (Groupe consultatif international sur l'irradiation des denrées alimentaires; ICGFI, 1992a). Pour obtenir le cobalt 60, un neutron est ajouté au cobalt 59 par bombardement neutronique dans un réacteur nucléaire. Ainsi, en désirant retrouver son état stable, le cobalt 60 émet des rayons gamma. Ce radionucléide a une demi-vie de 5,3 ans et est de loin le rayonnement le plus utilisé pour l'irradiation des aliments à cause de son pouvoir pénétrant élevé et de sa production peu coûteuse.

2) Rayons X

Les rayons X sont des rayonnements électromagnétiques de courtes longueurs d'ondes (3×10^{-8} à 3×10^{-12} m), tout comme les rayons gamma (Robins, 1991). Les caractéristiques de ces deux radiations et leurs effets sur la matière sont comparables, bien que les rayons gamma soient d'énergie spécifique alors que les rayons X sont d'énergie variable. La principale différence réside dans leur origine. Les rayons X sont produits en bombardant une cible métallique avec un faisceau d'électrons accélérés (ICGFI, 1992a). Ce flux d'électrons est émis par un fil de tungstène porté à incandescence dans un tube de verre sous vide. Par la création d'une différence de potentiel entre la cathode (le fil métallique chargé négativement) et l'anode (la pièce de métal avec une charge positive), un champ électrique intense est produit entraînant le faisceau d'électrons de la cathode sur l'anode. Le rendement en rayons X est très faible, car 95% de l'impact des électrons sur la pièce métallique est transformé en chaleur et le reste en rayons X. De ce fait, les rayons X sont peu utilisés pour l'irradiation des aliments, malgré leur pouvoir de pénétration.

3) Électrons accélérés

Des faisceaux d'électrons de haute énergie sont obtenus dans des dispositifs permettant d'accélérer les électrons et par conséquent, de contrôler l'émission de radiations (ICGFI, 1992a). Ces appareils utilisent des champs électriques ou magnétiques pour produire des électrons accélérés. Puisque les électrons sont produits sous la forme d'un faisceau unidirectionnel et que leur pouvoir de pénétration dans les aliments est très faible, ils sont peu employés pour l'irradiation des aliments. De plus, la taille et la géométrie des générateurs d'électrons représentent des inconvénients pour leur emploi au niveau industriel (Robins, 1991).

1.3.4.3 Mode d'action des rayonnements ionisants

Sous l'effet des rayonnements ionisants, certains atomes des aliments s'ionisent. En effet, ces rayonnements sont dits ionisants puisqu'ils possèdent une énergie suffisante pour arracher des électrons aux atomes et aux molécules (électriquement neutres) qui sont alors transformés en particules chargées électriquement appelées ions. L'ionisation est une réaction en chaîne, car les électrons éjectés continuent d'entrer en collision avec d'autres atomes. Ce processus se termine quand l'énergie des particules ionisantes atteint un bas niveau.

La radiolyse est le phénomène de la décomposition de molécules par l'action de rayonnements ionisants. L'eau est une composante majeure de la plupart des aliments. Lorsque les produits alimentaires contenant de l'eau sont irradiés, les électrons de la molécule d'eau sont arrachés par les radiations ionisantes produisant des bris de liens chimiques et la formation d'espèces radicalaires et ioniques ($\text{OH}\bullet$, $\text{H}\bullet$, e^-_{aq} , H^+). Les radicaux libres sont des molécules ou atomes ayant un électron non apparié. Ils sont hyperactifs à cause de cet électron qui a tendance à vouloir se combiner avec les molécules voisines pour combler ce lien brisé. Dans ce sens, les radicaux libres diffèrent des ions parce que ces molécules amorcent des réactions pour devenir neutres tandis que les ions isolés vont simplement s'agréger avec des charges opposées environnantes pour atteindre ce stade (Robins, 1991). Les radicaux libres issus de la radiolyse de l'eau ($\text{OH}\bullet$ et $\text{H}\bullet$) peuvent interagir avec d'autres composantes dans les aliments irradiés tels que les lipides, les protéines et les hydrates de carbone. Par exemple, les radicaux libres peuvent initier des réactions en cascade comme la peroxydation lipidique entraînant l'altération des membranes des micro-organismes ou un goût rance dans les aliments riches en gras. De plus, les radicaux libres ont une forte affinité pour l'oxygène, étant aussi considéré comme un radical libre à cause de ses deux électrons libres. Ceci entraîne alors des réactions d'oxydation.

1) Effets sur les micro-organismes

L'effet antimicrobien des radiations ionisantes est attribué aux dommages causés principalement à l'ADN (Monk, Beuchat et Doyle, 1995). Ces modifications entraînent ainsi le blocage des divisions cellulaires et l'arrêt de la synthèse des protéines codées par les gènes touchés. Ces effets peuvent être produits par une interaction directe du rayon ionisant avec la molécule d'ADN par exemple ou par l'intermédiaire de l'eau présente dans le milieu où se retrouve la molécule. Ce sont les effets directs et indirects du rayonnement ionisant. Toutefois, l'interaction indirecte des espèces radicalaires issues de la radiolyse de l'eau prédomine sur les effets directs.

L'ADN est un polymère constitué d'un groupement phosphate relié à un sucre, le 2-désoxyribose, lui-même relié à une base azotée par une liaison *N*-glycosidique. Des liaisons phosphodiester en 3' et 5' des 2-désoxyriboses relient ensuite les nucléotides entre eux. L'ADN comprend quatre bases principales. L'adénine (A) et la guanine (G) constituent les bases puriques et la thymine (T) et la cytosine (C) représentent les bases pyrimidiques. L'assemblage des nucléotides (A, T, G ou C) en une succession conduit à la formation d'un brin orienté 5'-3'. Ce dernier est associé de façon complémentaire à un deuxième brin d'ADN antiparallèle par l'intermédiaire de liaisons hydrogène entre les bases (figure 2). Les bases complémentaires sont respectivement la guanine et la cytosine (reliées par trois liaisons hydrogène) de même que l'adénine et la thymine (reliées par deux liaisons hydrogène). Les produits de la radiolyse de l'eau peuvent réagir avec les bases ou avec le sucre (2-désoxyribose) de la molécule d'ADN. Le résultat de ces réactions peut conduire à la formation de quatre types de lésions illustrées à la figure 3:

- 1) coupures simple ou double brin;
- 2) modifications des bases;
- 3) formation de sites abasiques;
- 4) pontages entre ADN et protéines.

La membrane cellulaire demeure également une autre cible des rayonnements ionisants. En effet, puisqu'elle est constituée d'un double feuillet phospholipidique, les radicaux générés lors de la radiolyse de l'eau, particulièrement les radicaux hydroxyle, sont susceptibles de réagir avec les chaînes d'acides gras insaturés au niveau des doubles liaisons (Pouget, 2000). De plus, la détérioration de la membrane peut être causée par l'oxydation des lipoprotéines.

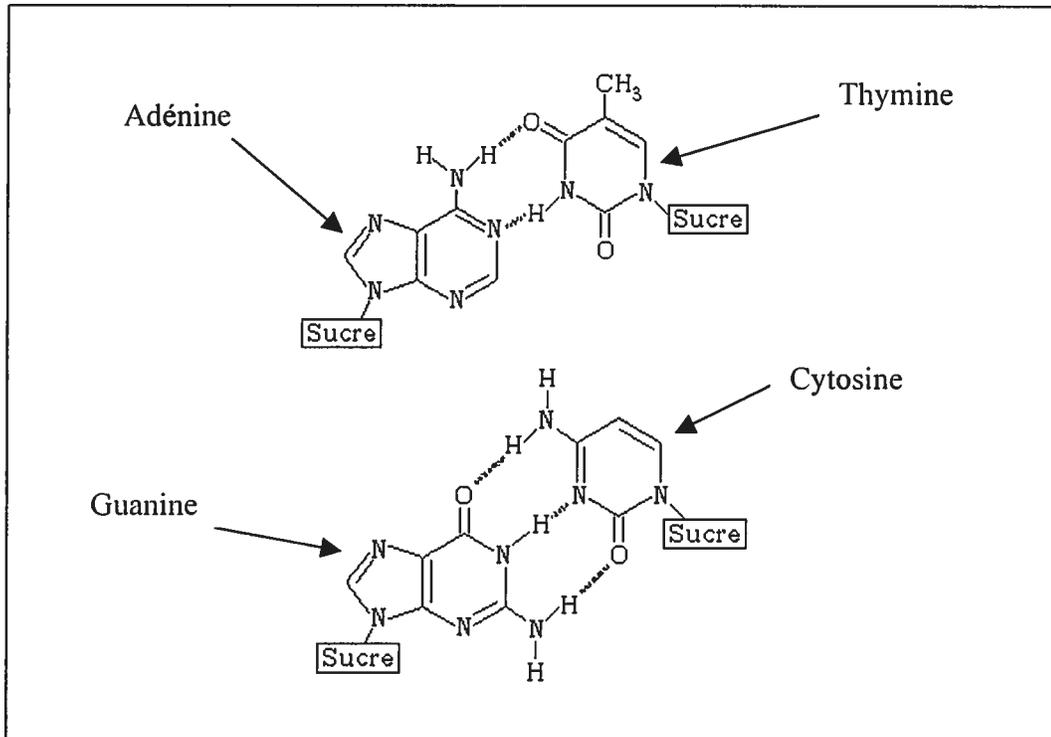


Figure 2. Appariement des bases d'ADN complémentaires démontrant les liaisons hydrogène entre chacune (Prescott, Harley et Klein, 1995).

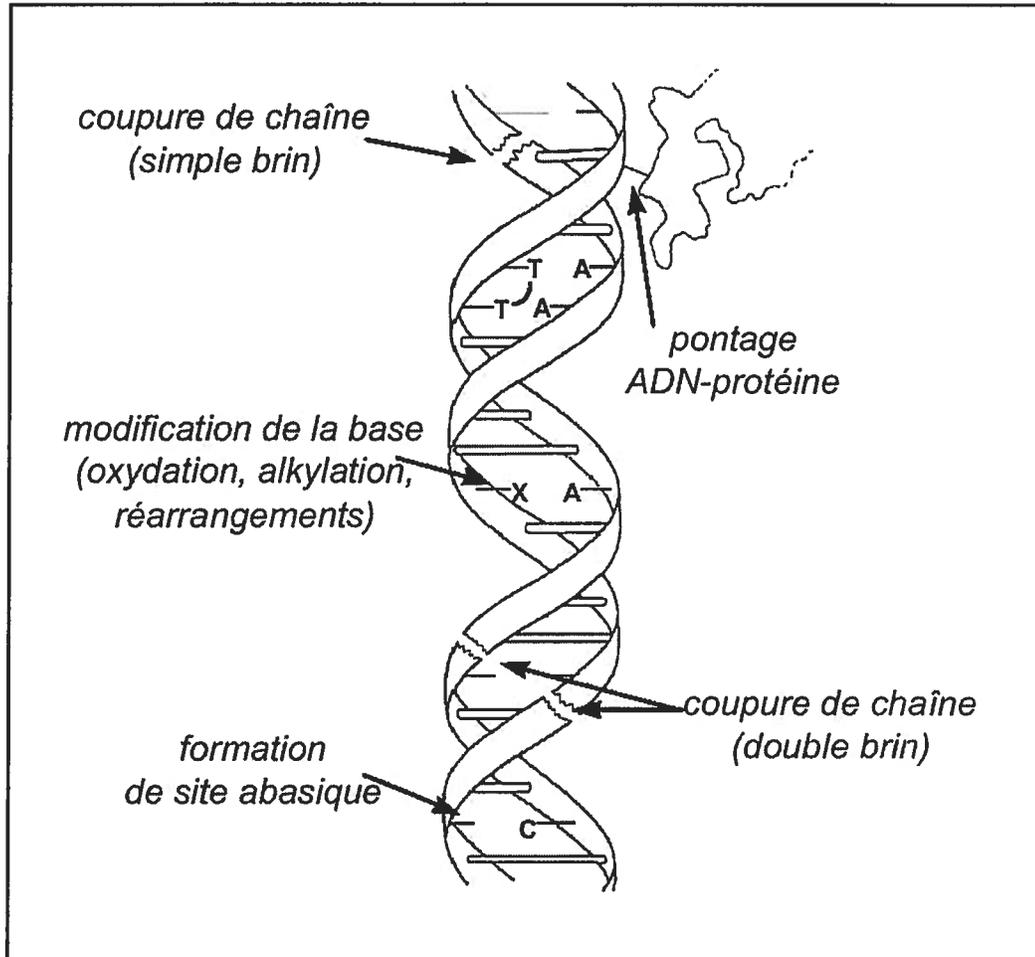


Figure 3. Lésions radio-induites de l'ADN (Pouget, 2000)

Habituellement, le nombre de micro-organismes survivant à ces dommages est déterminé par la proportion de cellules capables de croître et de former des colonies sur un milieu nutritif solide. Récemment, une méthode a été élaborée pour qualifier plus précisément les dommages induits dans les cellules microbiennes exposées à des rayons ionisants ou à des traitements chimiques. Cette nouvelle approche s'effectue par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR; Fourier transform infrared spectroscopy) et permet d'investiguer le comportement de micro-organismes présents dans tout genre d'environnement. Cette technique est une spectroscopie en réflexion ou en transmission à des longueurs d'ondes de l'ordre de 4000 à 600 cm^{-1} . Ainsi, une abondance d'informations, autant qualitatives que quantitatives, peut être obtenue sur les mouvements vibratoires et rotatoires des structures moléculaires des atomes composant un échantillon pur ou un mélange. Ces informations sont contenues dans des spectres infrarouges représentant la composition chimique totale de l'échantillon dont certaines bandes spectrales sont assignées à des groupements fonctionnels distincts. Cette méthode a d'ailleurs été utilisée pour expliquer davantage la radiorésistance exemplaire de l'espèce *Deinococcus radiodurans* (Melin, Perromat et Déléris, 2001). Par ailleurs, la méthode de FT-IR est utilisée pour l'identification de bactéries à différents niveaux (genre, espèce et séro groupe) (Helm *et al.*, 1991; Horbach, Naumann et Fehrenbach, 1988; Naumann *et al.*, 1988). En comparaison avec d'autres techniques d'identification comme le SDS-PAGE (électrophorèse sur gel de polyacrylamide à une dimension) ou l'hybridation ADN-ADN, la spectroscopie FT-IR permet d'obtenir des données plus rapidement sans l'implication d'étapes de purification ou de lyse cellulaire.

Un autre type de recherche centrée sur l'analyse de la réponse au stress de l'irradiation est l'étude du protéome du micro-organisme. En fait, le protéome est le complément protéique exprimé par le génome d'une cellule microbienne par exemple ou d'un tissu (Wasinger *et al.*, 1995). Contrairement au génome, de nature statique et qui définit le code génétique d'un organisme donné, le protéome reflète la réponse dynamique de la cellule face aux conditions multiples auxquelles elle est exposée. Ainsi, l'analyse du protéome d'un micro-organisme irradié permet d'identifier des protéines présentes ou induites suite au stress en plus de déterminer leur rôle dans la survie de la

cellule en regard de la réparation des cibles vitales atteintes telles que l'ADN. La séparation des protéines est réalisée par électrophorèse en deux dimensions. La bactérie *Deinococcus radiodurans* est d'ailleurs un modèle très représentatif des recherches effectuées en analyse protéomique d'organismes stressés par irradiation (Hansen, 1980; Tanaka *et al.*, 1996).

La résistance d'un micro-organisme face à des rayons ionisants dépend à la fois de:

- 1) la nature et la quantité de dommages directs et indirects aux cibles vitales (ADN);
- 2) le nombre, la nature et la durée des espèces radicalaires créées suite au traitement d'irradiation;
- 3) l'habileté du micro-organisme à tolérer ou à réparer avec précision les dommages causés par les radiations ionisantes et/ou les espèces radicalaires.

Des variations peuvent survenir entre différents genres de micro-organismes, entre certaines espèces du même genre et entre souches de la même espèce. Par ailleurs, la sensibilité des micro-organismes aux radiations ionisantes varie considérablement entre les différents groupes (Farkas, 1989). En fait, plus un organisme est évolué, plus il est sensible aux radiations. Par exemple, les doses nécessaires à la destruction des bactéries sont plus élevées que celles requises pour tuer des insectes. De façon générale, les bactéries à Gram négatif, incluant celles communément impliquées dans l'altération des aliments, sont plus sensibles à l'irradiation que les bactéries à Gram positif. Les bactéries lactiques sont particulièrement résistantes. Ainsi, l'irradiation offre la possibilité d'éliminer les pathogènes par l'application de doses relativement faibles. De plus, puisque la flore d'altération des aliments est souvent dominée par des bactéries à Gram négatif, le traitement des denrées avec des doses peu élevées (1 à 3 kGy) permet une réduction considérable de la charge microbienne de ces dernières (en particulier les psychrotrophes) et par conséquent, un prolongement de la durée de conservation. Parmi les groupes de micro-organismes les plus résistants, les spores bactériennes et les virus sont les plus difficiles à détruire par irradiation. Exceptionnellement, la bactérie non

pathogène *Deinococcus radiodurans* est capable de résister à des doses extrêmement élevées (21 à 50 kGy) (Lacasse, 1995).

Ces différences sont principalement dues à l'efficacité du système de réparation de l'ADN de chaque micro-organisme. Par exemple, la radiorésistance très élevée de l'espèce *Deinococcus radiodurans* peut être expliquée par son mécanisme rapide et efficace de réparation de l'ADN lui permettant de réparer un nombre multiple de dommages présents sur un ou même les deux brins de l'ADN (Moseley, 1984). De plus, la multiplicité du génome de cette bactérie lui permet de réaliser des recombinaisons entre chromosomes pour réparer l'ADN sans perte de viabilité ou l'apparition de mutations (Hansen, 1978).

D'autres facteurs peuvent influencer la radiorésistance des micro-organismes présents dans l'aliment tels que la dose d'irradiation et la charge microbienne de l'aliment. La courbe représentant la destruction d'un micro-organisme par un traitement d'irradiation résulte en une régression linéaire. L'inverse de la pente de cette courbe de survie permet d'obtenir la D_{10} ou la dose de réduction décimale (DRD) représentant la dose requise pour inactiver 90% d'une population microbienne ou réduire cette dernière d'un log dans des conditions précises de culture et de traitement (Urbain, 1986). Une DRD élevée signifie une radiorésistance accrue.

Plus la dose d'irradiation employée pour le traitement est élevée, plus elle est efficace pour détruire les micro-organismes présents dans l'aliment. Dans le cas des légumes prêts à manger, un traitement de type radurisation est utilisé. Par l'emploi de faibles doses, de l'ordre de 0.7 à 2.5 kGy, la charge microbienne du produit est réduite. Ce traitement est comparable à une pasteurisation. Les autres termes rencontrés en industrie alimentaire sont la radappertisation et la radicidation. Le premier terme fait référence à un traitement d'irradiation à fortes doses (30 à 40 kGy), souvent assimilé à une appertisation, permettant d'inactiver tous les micro-organismes d'altération des aliments, comprenant les spores bactériennes. À l'opposé, la radicidation est le résultat

de l'utilisation de doses d'irradiation moyennes (2.5 à 10 kGy) visant la destruction des germes pathogènes non sporulés.

L'efficacité d'un traitement d'irradiation dépend de la quantité de micro-organismes dans l'aliment. De plus, des aliments renfermant des toxines bactériennes ne peuvent être irradiés. L'élimination des virus est également difficile à réaliser et des combinaisons de traitements, par exemple la chaleur, peuvent s'avérer nécessaire, puisque les virus sont résistants à l'irradiation (Lacasse, 1995). L'irradiation de même que tous les autres moyens de conservation ne peuvent inverser le processus de dégradation ou rendre présentable une denrée avariée. Aucun traitement employé pour assurer l'innocuité des aliments ne peut être substitué à de bonnes pratiques d'hygiène.

2) Hydrates de carbone

Le terme hydrate de carbone inclut notamment l'amidon, la cellulose, des sucres et autres matériaux de structure tels que les pectines. En terme chimique, les hydrates de carbone représentent une agrégation de plusieurs unités de saccharides et ils sont considérés comme des bio-polymères. L'unité principale demeure le glucose. Les légumes prêts à manger contiennent des quantités considérables d'hydrates de carbone. L'irradiation de ces hydrates de carbone cause le bris des liens extérieurs des éthers et peut conduire à la production de produits de radiolyse tels que le glucose, l'acide formique et l'acide malique (Siddhuraju, Makkar et Becker, 2002). Deux mécanismes peuvent contribuer à ce processus:

- a) l'action directe des rayons ionisants sur les liens de l'oxygène conduit à la formation d'un radical $-O\cdot$ et la liaison $-O-C-$ du glucose voisin est décomposée produisant un ion positif à partir de l'atome de carbone et un radical glycosyle;
- b) l'altération des unités de saccharides dans la chaîne du polymère par une déshydratation et une rupture β amenant la formation de groupements déoxycarbonyle ou déoxyacide dans la chaîne.

1.3.4.4 Conditions qui influencent l'efficacité d'un traitement d'irradiation

1) La température

La température est un facteur qui influence considérablement la survie des cellules microbiennes pendant un traitement d'irradiation. De façon générale, les micro-organismes contenus dans un aliment sont plus résistants à l'irradiation si ce dernier est irradié congelé plutôt qu'à la température de la pièce (Monk, Beuchat et Doyle, 1995). Ce fait peut être expliqué par une réduction de l'eau libre dans le milieu favorisant une baisse des radicaux libres formés à partir de la radiolyse de l'eau. De plus, la diffusion des espèces radicalaires est diminuée dans l'aliment congelé permettant un effet moins nocif de ces dernières sur les micro-organismes. La congélation offre donc un effet protecteur aux cellules bactériennes retrouvées dans les aliments congelés.

2) La composition des gaz atmosphériques

La nature de l'atmosphère en contact avec les cellules microbiennes peut influencer l'effet germicide de l'irradiation. Les micro-organismes irradiés en présence d'azote ou en condition d'anaérobiose sont plus résistants au traitement, car ces derniers ne peuvent être affectés par les radicaux libres et le peroxyde d'hydrogène formés à partir de l'oxygène (Monk, Beuchat et Doyle, 1995). Certains micro-organismes comme *Deinococcus radiodurans* possèdent des systèmes de protection contre ces espèces réactives formées à partir de l'oxygène. Ces défenses enzymatiques incluent notamment la dismutase superoxyde, la peroxydase et la catalase (Wang et Schellhorn, 1995).

3) La composition du produit alimentaire

La radiorésistance d'un micro-organisme varie selon la nature du produit irradié. Par exemple, les D_{10} de bactéries irradiées dans un aliment sont plus élevées que celles observées dans un bouillon de culture. Ce fait peut être expliqué d'une part, par la présence de nutriments qui protègent les bactéries au cours du traitement et d'autre part, par le faible pouvoir protecteur du bouillon de culture en raison de l'absence de matière

organique. La forte présence d'eau qui engendre la production de radicaux libres peut aussi expliquer cette observation. La richesse en protéines ou en polysaccharides augmente particulièrement la résistance des cellules microbiennes contenues dans un aliment traité par irradiation. Notamment, certaines protéines qui possèdent des groupements sulfhydryle (SH), comme la cystéine, agissent comme accepteurs de radicaux libres (Thornley, 1963). En outre, l'action protectrice antioxydante de molécules présentes dans les produits alimentaires telles que la vitamine C, le β -carotène et la vitamine E est également à considérer. D'ailleurs, l'espèce *Deinococcus radiodurans* possède une quantité considérable de vitamines A et E qui contribuent à sa résistance élevée aux rayons ionisants (Melin *et al.*, 1998). Parallèlement, des spéculations à propos du rôle des caroténoïdes ou autres pigments contenus dans la membrane de micro-organismes comme agent protecteur contre l'irradiation ont conduit à des résultats contradictoires (Anderson et Hansen, 1985).

1.3.4.5 Effet de l'irradiation sur les propriétés sensorielles des légumes prêts à manger

L'application d'une dose d'irradiation égale ou inférieure à 1 kGy permet l'inhibition de la germination des légumes, le ralentissement de leur mûrissement et l'élimination de l'infestation par des insectes. Avec un intervalle de doses entre 1 et 3 kGy, l'élimination des moisissures est possible. La plupart des légumes tolèrent un traitement d'irradiation à une dose minimale de 0.25 kGy sans subir de changements quant à leur qualité. Généralement, une dose de 2.25 kGy représente la dose optimale que les légumes peuvent tolérer sans affecter leurs aspects organoleptiques (Lacroix et Ouattara, 2000). D'ailleurs plusieurs études effectuées sur l'irradiation de légumes prêts à manger ont démontré que l'emploi de faibles doses (≤ 2 kGy) ne provoquaient pas d'effet négatif sur ces aliments et permettaient la conservation de vitamines comme le β -carotène et la vitamine C (Boisseau, Jungas et Libert, 1991; Chervin et Boisseau, 1994; Farkas *et al.*, 1997). À des doses supérieures, une perte de texture (dégradation de l'amidon et de la pectine) et une dégradation de certains pigments et vitamines peuvent survenir. Un traitement d'irradiation réalisé en absence d'oxygène et à basse température

permet de réduire les pertes en vitamines. Les vitamines A, E, C, K et B-1 (thiamine) retrouvées dans les aliments sont plutôt radio-sensibles alors que d'autres vitamines B, telles que la riboflavine et la niacine, ainsi que la vitamine D sont beaucoup plus stables (ICGFI, 1992b). Notamment, la complexité de la composition des aliments empêche souvent la radiodécomposition des différentes vitamines. Enfin, l'irradiation n'a pas plus d'incidence négative sur la valeur nutritive d'un aliment que d'autres méthodes de traitement ou de conservation.

1.3.4.6 Réglementations en matière d'irradiation

En 1981, l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (OAA), l'Organisation mondiale de la santé (OMS) et l'Agence internationale de l'énergie atomique (AIEA) ont approuvé l'irradiation des aliments. Ces comités internationaux ont conclu que les denrées alimentaires irradiées à des doses inférieures à 10 kGy ne sont aucunement toxiques et que leur valeur nutritive est comparable à celle obtenue à partir de l'utilisation d'autres méthodes de conservation. En 1999 (FAO/IAEA/WHO study group), ces mêmes comités ont reconnu que des doses supérieures à 10 kGy pouvaient être utilisées pour différents produits, incluant la viande, sans occasionner de problème de santé.

1) Canada

Depuis plus de 30 ans, l'irradiation des aliments est réglementée au Canada. À ses débuts, ce traitement était considéré comme un additif alimentaire. Par la suite, Santé Canada a reconnu l'irradiation des aliments comme un traitement (Agriculture et Agroalimentaire Canada, 1987). Les premières denrées alimentaires irradiées et approuvées ont été les pommes de terre (0.15 kGy) en 1960, suivies des oignons (0.15 kGy) en 1965, afin d'inhiber leur germination pendant l'entreposage. Dans le but de prévenir l'infestation du blé, de la farine et de la farine de blé par des insectes, l'irradiation de ces aliments à des doses d'au plus de 0.75 kGy a été rendue possible en 1969. Depuis 1984, les épices entières ou moulues et les assaisonnements déshydratés

peuvent être irradiés à des doses maximales de 10 kGy afin de réduire leur charge microbienne. Jusqu'à tout récemment, l'irradiation des aliments au Canada n'était autorisée que pour ces quatre produits alimentaires. Depuis décembre 2002, l'irradiation des mangues (0.25 à 1.5 kGy), la volaille fraîche (1.5 à 3 kGy), la volaille congelée (2 à 5 kGy), les crevettes fraîches, préparées ou séchées (1.5 à 3 kGy), les crevettes congelées (1.5 à 5 kGy), le bœuf haché frais (1.5 à 4.5 kGy) et le bœuf haché congelé (2 à 7 kGy) a été recommandée par Santé Canada auprès du gouvernement canadien. L'irradiation de certains fruits et légumes est présentement en instance pour approbation par notre gouvernement.

2) États-Unis

La réglementation de l'irradiation est effectuée par le «Food and Drug Administration» (FDA) et par le «Food Safety and Inspection Service» (FSIS) du département de l'agriculture (USDA). L'utilisation de l'irradiation est permise sur une plus vaste gamme d'aliments en comparaison avec le Canada. Notamment pour le porc et certains fruits. La volaille fraîche peut être irradiée depuis 1992, alors que l'irradiation de la viande rouge n'est autorisée que depuis 1997. Toutefois, contrairement au Canada où l'irradiation des crevettes a été permise récemment, l'autorisation d'irradier des crevettes, des crustacés et d'autres fruits de mer n'est pas encore accordée aux États-Unis.

1.4 PROBLÉMATIQUE

Les carottes prêtes à manger sont des produits très périssables à cause des multiples conditions auxquelles elles sont exposées de leur production jusqu'à leur distribution. Les cas de gastro-entérites associés avec la consommation des légumes minimalement transformés ont augmenté au cours des dernières années suite à l'expansion du marché. À ce jour, aucune étape de la transformation des légumes fraîchement coupés n'assure une élimination efficace des micro-organismes. La solution est d'utiliser l'irradiation gamma seule ou en combinaison avec d'autres traitements pour obtenir un effet synergique. L'emploi d'un enrobage antimicrobien et/ou d'une atmosphère modifiée augmenteraient l'efficacité d'un traitement d'irradiation sans affecter les aspects physiques et microbiologiques des carottes prêtes à manger.

1.4.1 Hypothèse

L'utilisation de faibles doses d'irradiation en combinaison avec un enrobage antimicrobien et/ou une atmosphère modifiée permet de stabiliser les carottes fraîchement coupées au niveau microbiologique par l'élimination des pathogènes et la préservation de leurs aspects organoleptiques.

1.4.2 Objectifs

- a) Évaluer la sensibilité à l'irradiation de la bactérie *E. coli* dans un bouillon nutritif et déterminer l'effet de l'irradiation gamma sur la bactérie *E. coli*, contenue dans des carottes râpées.
- b) Déterminer l'effet de l'irradiation couplée à l'atmosphère modifiée sur la bactérie *E. coli* contenue dans des carottes râpées.

- c) Déterminer l'effet de l'irradiation gamma combinée à un enrobage antimicrobien et à une atmosphère modifiée sur les aspects physiques et microbiologiques de carottes miniatures.
- d) Identifier la forme de colonies jaunes, retrouvées lors des expériences impliquant les carottes.
- e) Déterminer la sensibilité à l'irradiation de la bactérie *Pantoea agglomerans* dans un bouillon nutritif.
- f) Évaluer l'adaptation de la bactérie *P. agglomerans* à l'irradiation.
- g) Analyser le protéome de la bactérie *P. agglomerans* suite à un traitement d'irradiation.
- h) Analyser par FT-IR les dommages causés à l'ADN de *P. agglomerans* par irradiation.

1.4.3 Moyens pour atteindre les objectifs

- a) La sensibilité à l'irradiation de la bactérie *E. coli* sera évaluée par la détermination de la D_{10} en irradiant à différentes doses (0.15, 0.3, 0.45, 0.6, 0.7 et 0.9 kGy) des bouillons nutritifs TSBensemencés avec la bactérie. Le dénombrement des survivants se fera sur le milieu TSA suivant le traitement d'irradiation. L'effet de l'irradiation sur les populations d'*E. coli*, contenues dans des carottes râpées, sera estimé par des comptes bactériens d'*E. coli* pendant 28 jours sur milieu TSA incubé à 35°C. Les carottes seront contaminées artificiellement avec une solution de 10^7 UFC/ml et irradiées à 0, 0.5, 1, 1.5 et 2 kGy pour finalement être entreposées à 10°C avant d'amorcer les analyses microbiologiques.

- b) L'irradiation couplée à un MAP (60% O₂, 30% CO₂ et 10% N₂) sera réalisée à 0, 0.15, 0.3, 0.6 et 0.9 kGy sur des carottes râpées contaminées préalablement avec un inoculum d'*E. coli* de 10⁷ UFC/ml. Après ces traitements, les carottes seront entreposées à 4°C. Les populations de cette bactérie seront dénombrées pendant 50 jours sur le milieu TSA à une température de 35°C. La D₁₀ sera également déterminée avec les doses 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 et 0.3 kGy pour chacune des conditions atmosphériques employées (air et MAP).
- c) Les carottes vont être enrobées à l'aide d'un enrobage fabriqué à partir de protéines laitières. Un groupe d'échantillons servira de contrôle non enrobé. Toutes ces carottes seront emballées sous deux conditions: air et MAP (60% O₂, 30% CO₂ et 10% N₂). Un traitement d'irradiation sera réalisé à différentes doses (0, 0.5 et 1 kGy). Les échantillons seront entreposés à 4°C pendant 21 jours. Leur texture sera analysée à l'aide d'un texturomètre et leur couleur par l'entremise d'un colorimètre pour l'obtention de l'indice de blanchiment. De plus, la flore mésophile totale sera évaluée par dénombrement sur milieu TSA à 35°C. Une D₁₀ sera établie pour les groupes de carottes enrobées et non enrobées puis emballées sous air ou sous MAP.
- d) Les identifications bactériennes ont été entreprises avec des tests conventionnels (Gram, état frais, isolement sur milieux sélectifs, oxydase, catalase, galeries API) suivis de l'isolement de l'ARNr 16S du micro-organisme.
- e) La sensibilité à l'irradiation de la bactérie *P. agglomerans* sera accomplie par la détermination de la D₁₀ en irradiant à différentes doses (1, 2, 3, 4 et 4.5 kGy) des bouillons nutritifs TSBensemencés avec la bactérie. Le dénombrement des survivants se fera sur le milieu TSA, incubé à 30°C, suivant le traitement d'irradiation.
- f) Des bouillons de *P. agglomerans* seront irradiés à 2kGy et 4 kGy. L'antibiotique chloramphénicol (chloromycétine) aura été ajouté à certains bouillons à une

concentration finale de 50 µg/ml afin de déterminer si la synthèse de protéines est nécessaire à ce micro-organisme pour survivre à des traitements non létaux d'irradiation. Le taux de survie des bactéries sera calculé par le dénombrement des survivants sur milieu TSA. Une période d'adaptation de 24 heures à la température optimale de croissance de la bactérie (30°C) aura lieu pour les groupes de traitement irradiés à 2 kGy. Une seconde dose de 2 kGy sera appliquée à ces groupes une fois cette période d'adaptation terminée. Cette expérience est basée sur celle de Lim *et al.* (2001).

- g) Les bouillons nutritifs TSBensemencés avec la bactérie *P. agglomerans* ont été irradiés à différentes doses. Les protéines cytoplasmiques de cette bactérie ont été récupérées par la lyse des cellules bactériennes à l'aide d'un sonicateur. Le dosage de ces dernières a été fait à partir de la méthode de Bradford (trousse Bio-Rad). Après avoir incorporé les protéines dans les languettes par réhydratation, la première dimension (la focalisation isoélectrique) a été réalisée, suivie de l'équilibration des languettes. Enfin, l'électrophorèse en deux dimensions a été accomplie. Un premier essai sera effectué pour un intervalle de pH de 3 à 10 afin de visualiser dans quelle région se retrouvent la majorité des protéines. Une coloration au nitrate d'argent a permis de visualiser les protéines.
- h) Des bouillons TSB contenant la bactérie *P. agglomerans* ont été irradiés à 0, 2, 4, 5, 8 et 16 kGy. L'ADN de ces bactéries a été isolé à partir de la méthode selon Marmur (1961). Une fois l'isolement terminé, les échantillons d'ADN ont été lyophilisés. Par la suite, l'ADN isolé a été introduit dans des pastilles fabriquées à partir de KBr. Les pastilles ont ensuite été soumises à une analyse infrarouge à l'aide d'un spectromètre FT-IR Spectrum One. Un total de 50 scans a été réalisé comme arrière-plan. L'analyse des échantillons a été accomplie dans la région spectrale de 4000 et 650 cm⁻¹. Une quantité de 256 scans a été recueillie pour chaque échantillon.

2. Approche expérimentale

2.1 LISTE DES PRODUITS CHIMIQUES UTILISÉS

Acétate de sodium	Sigma
Acétone	Anachemia (Accusolv)
Acide acétique	BDH
Acide phosphorique	J.T. Baker
Acide propionique 99%	Sigma
Acrylamide	Roche
Adénine 99%	Sigma
Agarose	Roche
Alanate 380	NZMP
Bleu de bromophénol	Bio-Rad
Bromure d'éthidium	Boehringer Mannheim
Bromure de potassium IR grade	Sigma
Carbonate de sodium	BDH
CHAPS	Roche
Chloramphénicol	Sigma
Chloroforme	Aldrich
Chlorure de sodium	Laboratoire Mat
CMC basse viscosité	Sigma
Cytosine 99%	Sigma
Dithiothréitol	Amersham Pharmacia Biotech
D-ribose	Nutritional Biochemical Corporation
Éthanol	Gouvernement du Québec
Formaldéhyde	Roche
γ -globuline	NEB
Glycérol 99%	Laboratoire Mat
Glycine	Bio-Rad
Guanine Grade II 99%	Sigma
Huile minérale	Amersham Pharmacia Biotech
Iodoacétamide	Sigma
KiloBase marqueur ADN	Amersham Pharmacia Biotech
Lambda-PstI marqueur ADN	NEB
Lysozyme	Boehringer Mannheim
Mac Conkey	Difco
Méthanol	Gouvernement du Québec
Nitrate d'argent	BDH
Pectine	Hercules
Peroxyde d'hydrogène 33%	Laboratoire Mat
Phénol	BDH
Phosphate de sodium monobasique	Fisher
Pwo ADN polymérase	Roche
Réactif à oxydase	Difco
Résine AG® 501-X8 (D)	Bio-Rad
Ribonucléase A	Roche

SDS	Bio-Rad
Tampon pour IPG	Amersham Pharmacia Biotech
TCA	J. T. Baker
Thiosulfate de sodium	EM Science
Thymine 99%	Sigma
Tris	EM Science
TSA	Difco
TSB	Difco
Urée	USB
WPI	BIPRO

2.2 SOUCHES BACTÉRIENNES

L'espèce bactérienne *Escherichia coli* ATCC 25922 utilisée lors de ces travaux de recherche provient de l'American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, États-Unis). La bactérie *Pantoea agglomerans* a été isolée dans notre laboratoire en effectuant des dénombrements bactériens totaux sur un milieu gélosé de soja tryptique (TSA) à partir d'échantillons de carottes râpées, suivis de tests biochimiques pour son identification. Ces souches bactériennes étaient conservées à - 80°C sous forme d'aliquot de 1 ml dans du bouillon de soja tryptique (TSB) contenant du glycérol (10%; v/v). Ces pré-cultures servaient d'inoculum aux cultures mères pour chaque expérience. Un premier transfert avait lieu dans 10 ml de TSB (1:10) pour un cycle de croissance de 24 heures à 35°C pour *E. coli* et à 30°C pour *P. agglomerans*. Un second transfert était effectué dans du TSB à partir de la culture de 24 heures (1:100) pour un cycle de croissance de 18 heures, aux températures respectives, dans le but d'obtenir des cultures actives contenant approximativement 10^8 UFC/ml pour *E. coli* et *P. agglomerans*.

2.3 EFFET DE L'IRRADIATION SUR LA BACTÉRIE *E. COLI* ENSEMENCÉE DANS DES CAROTTES RÂPÉES

2.3.1 Préparation et transformation des carottes

Les carottes ont été achetées à un supermarché local (IGA, Laval, Canada) en sacs de 25 livres de même marque. Les légumes étaient conservés à 4°C entre le temps de l'achat et de leur transformation, n'excédant pas trois heures. Les carottes entières ont été rincées à l'eau du robinet afin d'éliminer la terre à leur surface. Elles ont été pelées et leurs extrémités ont été coupées. La transformation des carottes entières en carottes râpées a été réalisée à l'aide d'un robot culinaire (Hamilton Beach/Proctor-Silex Inc, États-Unis). Les échantillons de carottes râpées (25 ± 1 g) ont été disposés dans des sacs WIN 68 (Winpak, St-Léonard, Canada) de 80 μ m d'épaisseur (composition: 0.8 mm nylon/2.4 mm Eva Copolymère; taux de transmission d'O₂, 52 cm³/m²/24 h à 23°C et 0% d'humidité relative; taux de transmission de la vapeur d'eau, 8 g/m²/24 h à 38.7°C et 90%

d'humidité relative). Les sacs, de grandeur approximative de 21 x 15.5 cm, ont été scellés avec une emballeuse (Sipromac Inc., modèle 350, Canada) sous air ambiant. Ces échantillons de carottes ont été conservés à -80°C pendant 15 heures avant le traitement d'irradiation.

2.3.2 Stérilisation des carottes râpées par irradiation

Les sacs de 25 g de carottes râpées ont été irradiés au Centre d'Irradiation du Canada (CIC; Laval, Canada) à l'aide d'un irradiateur de recherche UC-15A de type «underwater calibrator» équipé d'une source de cobalt 60 (MDS Nordion, Kanata, Canada). Les échantillons ont reçu une dose de 5 kGy et le traitement a été réalisé à un débit de dose de 29.825 kGy/h. Cet irradiateur a été certifié par l'Institut national des standards et de la technologie (Gettysburg, Maryland, États-Unis) et le débit de dose a été établi à l'aide d'un facteur de correction en fonction de la décroissance de la source. Suite au traitement d'irradiation, les sacs de carottes prêtes à manger ont été entreposés à 4°C pendant deux heures et 30 minutes, afin de les décongeler avant de procéder à la contamination artificielle.

2.3.3 Contamination artificielle des carottes râpées

L'inoculum a été préparé à partir d'une culture mère d'*E. coli*, contenant 10^8 UFC/ml, qui a été diluée avec une solution d'eau physiologique (NaCl 0.85%) pour obtenir une suspension bactérienne de 10^7 UFC/ml. L'extérieur des sacs de 25 g de carottes râpées irradiées a été désinfecté avec de l'éthanol 70% et les emballages ont été ouverts à l'aide de ciseau stérile. Un volume de 5 ml de l'inoculum a été pipeté et réparti de façon homogène sur les carottes râpées contenues dans le sac. Cette quantité avait été déterminée préalablement en pipétant différents volumes (5, 7 et 10 ml) d'eau colorée avec du cristal violet afin d'observer l'absorption du liquide par les légumes, en plus de la répartition du liquide à travers les 25 g de carottes. Une fois l'inoculum appliqué, le sac était refermé à l'aide de ruban gommé et une agitation manuelle était apposée sur

l'emballage de manière à ce que le liquide soit entièrement absorbé par les carottes. Un groupe de sacs a été conservé comme témoin non contaminé et par conséquent, ces sacs n'ont pas été ouverts. Enfin, tous les sacs de carottes contaminées et non contaminées ont été maintenus à 4°C pendant une nuit entière (15 heures) afin d'éviter des fluctuations quant à l'inoculum appliqué, avant le traitement d'irradiation.

2.3.4 Traitement d'irradiation

Les sacs de carottes râpées ont été assignés de façon aléatoire en six groupes: deux groupes non irradiés et quatre irradiés aux doses suivantes: 0.5, 1, 1.5 et 2 kGy. L'appareil choisi pour l'irradiation des légumes a été un irradiateur de recherche UC-15B de type «underwater calibrator», équipé d'une source de cobalt 60 (MDS Nordion). Le traitement a été réalisé à un débit de dose de 8.497 kGy/h. Suite à l'irradiation, tous les sacs de carottes ont été entreposés à 10°C afin de reproduire les conditions d'entreposage retrouvées dans les supermarchés. Deux sacs de 25 g de carottes râpées par groupe de traitement ont été prélevés à 1, 3, 7, 10, 14, 21 et 28 jours d'analyse pour réaliser des décomptes de la bactérie *E. coli*. Le jour 1 correspond au jour de traitement d'irradiation.

2.3.5 Analyses microbiologiques

L'extérieur des sacs irradiés et non irradiés de 25 g de carottes râpées a été désinfecté avec de l'éthanol 70% et les sacs ont été ouverts à l'aide de ciseau stérilisé à la flamme. Deux échantillons de 10 ± 0.3 g ont été prélevés par sac de 25 g de carottes minimalement transformées. Chaque échantillon a été homogénéisé pendant deux minutes dans 90 ml d'eau peptonée stérile (0.1%) à l'aide d'un stomacher Lab-blender 400 (Laboratory Equipment, Londres, Royaume-Uni). À partir de l'homogénat obtenu, une série de dilutions a été préparée avec 9 ml d'eau peptonée (0.1%) et les dilutions appropriées, en duplicata, ont été coulées en masse dans le milieu TSA. Les boîtes de Petri ont été incubées à 35°C pendant 48 heures.

2.4 EFFET DE L'IRRADIATION COUPLÉE À UNE ATMOSPHÈRE MODIFIÉE SUR LA BACTÉRIE *E. COLI* ENSEMENCÉE DANS DES CAROTTES RÂPÉES

2.4.1 Préparation et stérilisation des carottes

Des sacs de 25 livres de carottes ont été achetés à un supermarché local (IGA, Laval, Canada). Les légumes étaient conservés à 4°C entre le temps de l'achat et de leur transformation, n'excédant pas trois heures. Les carottes entières ont été rincées à l'eau du robinet afin d'éliminer la terre à leur surface. Elles ont été pelées et leurs extrémités ont été coupées. La transformation des carottes entières en carottes râpées a été réalisée à l'aide d'un robot culinaire (Hamilton Beach/Proctor-Silex Inc, États-Unis). Des échantillons de carottes râpées (30 ± 1 g) ont été disposés dans des sacs GOLD (Winpak) de 62 μm d'épaisseur (composition: 0.5 mm polyester métallisé/2 mm Eva Copolymère; taux de transmission d'O₂, 0.7 cm³/m²/24 h à 23°C et 0% d'humidité relative; taux de transmission de la vapeur d'eau, 1.2 g/m²/24 h à 38.7°C et 90% d'humidité relative) et ces derniers ont été scellés sous air ambiant. Les sacs avaient une grandeur approximative de 30.5 cm x 21 cm. Les emballages ont été conservés à - 80°C pendant 15 heures avant le procédé d'irradiation pour l'expérience nécessitant des carottes scellées sous air ambiant. Une période d'attente de 1 à 4 jours à - 80°C a été nécessaire avant de pouvoir utiliser l'irradiateur pour le traitement des sacs scellés sous MAP (atmosphère modifiée). Tous ces sacs ont été irradiés à 7 kGy dans l'irradiateur UC-15A, à un débit de dose de 25.632 kGy/heure. Après le traitement d'irradiation, les sacs de carottes prêtes à l'emploi ont été entreposés à 4°C pendant deux heures et 30 minutes, afin de les décongeler avant de procéder à la contamination artificielle.

2.4.2 Contamination artificielle des carottes râpées

Une quantité de 30 g de carottes râpées, contenues dans les sacs, a été contaminée avec un inoculum de 10⁷ UFC/ml. Après avoir été refermés avec du ruban gommé, les sacs étaient transportés pour être scellés sous les conditions atmosphériques choisies. Une expérience nécessitait des emballages sous air ambiant et une autre étude, les carottes

étaient emballées sous MAP. Cette atmosphère modifiée était composée de 30% CO₂, 60% O₂ et 10% de N₂ (Praxair, Mississauga, Canada). Quant au groupe de sacs ayant été conservé comme témoin non contaminé, ces derniers étaient ouverts de manière stérile, refermés à l'aide de ruban gommé et finalement étaient transportés pour être scellés sous le conditionnement désigné. Tous ces emballages ont été maintenus à 4°C pendant une nuit entière afin d'éviter des fluctuations quant à l'inoculum appliqué avant le traitement d'irradiation.

2.4.3 Traitement d'irradiation et analyses microbiologiques

Pour chaque condition atmosphérique, les sacs ont été assignés de façon aléatoire en six groupes consistant en deux groupes non irradiés et quatre irradiés aux doses suivantes: 0.15, 0.3, 0.6 et 0.9 kGy. L'appareil choisi pour l'irradiation des légumes a été l'irradiateur de recherche UC-15A, possédant un débit de dose de 25.623 kGy/heure. Suite à l'irradiation, tous les sacs de carottes, irradiées et non irradiées, ont été entreposés à 4°C afin de reproduire les conditions d'entreposage des légumes d'un réfrigérateur de consommateur. Deux sacs de 30 g de carottes râpées par groupe de traitement ont été prélevés à 1, 5, 7, 9, 12, 15, 20, 26, 30, 34, 41 et 50 jours d'analyse pour des décomptes d'*E. coli* sur deux échantillons de 10 g de carottes râpées par sac (se référer à la section 2.3.5). Le jour 1 correspond au jour de traitement d'irradiation.

2.4.4 Détermination de la D₁₀

Une valeur de D₁₀ a été obtenue pour les deux conditions atmosphériques à l'étude en irradiant des sacs de carottes râpées à des doses supplémentaires lors du traitement d'irradiation. Ces doses étaient de 0.05, 0.1, 0.2 et 0.25 kGy et ont été réalisées au CIC dans l'irradiateur de type «Gammacell 220 Excel», possédant un débit de dose de 0.686 kGy/heure.

2.5 EFFET DE L'IRRADIATION COMBINÉE À UN ENROBAGE ANTIMICROBIEN ET À UNE ATMOSPHÈRE MODIFIÉE SUR DES CAROTTES MINIATURES

2.5.1 Préparation de l'enrobage stérile

Un litre de solution d'enrobage a été préparé avec 2.5% (p/p) de caséinate de calcium (Alanate 380; 93% de protéines), 2.5% (p/p) d'isolat de protéines de lactosérum (WPI; whey protein isolate, 97.8% de protéines), 0.25% (p/p) de CMC (carboxyméthylcellulose), 0.1% (p/p) de pectine et 2.5% (p/p) de glycérol, à partir d'une méthode développée dans notre laboratoire (Letendre, 1998). Afin d'obtenir un enrobage antimicrobien, 0.3% (v/v) d'acide propionique a été incorporé au mélange. Avant d'être appliqué, la solution d'enrobage était filtrée à l'aide d'une passoire stérilisée par autoclave à 121°C pendant 30 minutes.

2.5.2 Traitement des solutions

Les composants protéiques ont été dissous dans de l'eau distillée et le glycérol a été additionné à ce mélange. Après homogénéisation de cette mixture, un vide de 60 minutes était appliqué afin de retirer l'air dissous dans la solution. Toujours sous agitation, le mélange était saturé sous atmosphère inerte (protoxyde d'azote; Praxair) pour un intervalle de 30 minutes. Avec le flux de ce gaz, un transfert de la solution dans une bouteille en verre avec bouchon était effectué. Ce mélange a été irradié à une dose optimale de 32 kGy, ayant déjà été mise au point dans les laboratoires. Le traitement d'irradiation a été réalisé avec l'appareil UC-15A, à un débit de dose de 24.993 kGy/heure.

Les poudres de CMC et de pectine ont été stérilisées par irradiation à une dose de 15 kGy dans l'irradiateur UC-15A. Quant au glycérol, sa stérilité a été assurée par un autoclavage à 121°C pendant 20 minutes.

2.5.3 Source des carottes miniatures

Les carottes miniatures ont été achetées à un supermarché local (IGA, Laval, Canada) sous forme de sacs de 32 onces. Les légumes ont été conservés à 4°C entre le temps de l'achat et de l'application de l'enrobage, n'excédant pas cinq heures.

2.5.4 Application de l'enrobage

Les carottes miniatures ont été étalées sur le plancher d'une enceinte biologique ayant été préalablement exposé aux rayons ultraviolets et désinfecté par vaporisation avec de l'éthanol 70%. La solution d'enrobage a été appliquée par vaporisation. Chacun des côtés (deux) des carottes miniatures a été vaporisé deux fois, avec un temps de 15 minutes alloué au séchage entre chaque application.

2.5.5 Traitement d'irradiation et emballage

Après avoir été entièrement enrobées, les carottes prêtes à manger ont été disposées dans des sacs GOLD (Winpak). Ces derniers avaient préalablement reçu une dose d'irradiation de 20 kGy, dans l'irradiateur UC-15A, pour les stériliser. Ces sacs, contenant six carottes miniatures chacun, ont été scellés avec une emballeuse selon les conditions atmosphériques déterminées (tableau VII).

Tableau VII. Description des groupes de traitement de carottes miniatures.

# Groupes	Enrobage	Atmosphère	Irradiation (kGy)
1	- ^a	MAP ^b	-
2	+	MAP	-
3	-	MAP	0.5
4	+	MAP	0.5
5	-	MAP	1
6	+	MAP	1
7	-	air	-
8	+	air	-
9	-	air	0.5
10	+	air	0.5
11	-	air	1
12	+	air	1

^a Absence du traitement servant de contrôle

^b MAP: 60% CO₂, 30% O₂ et 10% N₂

Les carottes non enrobées ont tout simplement été déposées dans les sacs GOLD, à l'aide de pince stérile, et les sacs ont été scellés avec l'emballeuse. Tous ces emballages ont été mis à 4°C pendant une nuit entière avant le traitement d'irradiation. L'UC-15A a servi d'irradiateur pour le procédé exécuté à un débit de 24.993 kGy/heure. Dans le cadre de cette expérience, les sacs ont été entreposés à 4°C suivant l'irradiation et les analyses microbiologiques et physiques ont suivi. Un sac de six carottes miniatures, enrobées et non enrobées, a été prélevé à 1, 7 14 et 21 jours d'analyse pour un dénombrement bactérien de la flore totale, tandis qu'un sac de six carottes pour chaque groupe de traitement a servi à la fois aux analyses de couleur et de texture. Le jour 1 correspond au traitement d'irradiation.

2.5.6 Détermination de la D₁₀

Une valeur de D₁₀ a été obtenue pour chacune des conditions atmosphériques à l'étude, effectuée avec des carottes enrobées et non enrobées, en irradiant des sacs de carottes miniatures à des doses supplémentaires lors du traitement d'irradiation. Ces doses étaient de 0.07, 0.15, 0.3 et 0.75 kGy et ont été réalisées au CIC dans l'irradiateur de type UC-15A, à un débit de dose de 24.993 kGy/heure.

2.5.7 Analyses microbiologiques

L'extérieur des sacs, contenant six carottes miniatures, a été désinfecté avec de l'éthanol 70% et les sacs ont été ouverts à l'aide de ciseau stérilisé à la flamme. Deux échantillons de 10 ± 0.3 g ont été prélevés par sac. Chaque échantillon a été homogénéisé pendant deux minutes dans 90 ml d'eau peptonée stérile (0.1%) à l'aide d'un stomacher Lab-blender 400. Une série de dilutions a été préparée, à partir de l'homogénat obtenu, avec 9 ml d'eau peptonée (0.1%). Les dilutions appropriées ont été coulées en masse dans le milieu TSA et les boîtes de Petri ont été incubées à 35°C pendant 48 heures. Un sac de six carottes miniatures a été analysé par groupe de traitement pour obtenir un dénombrement total. Les dilutions ont été effectuées en triplicata.

2.5.8 Analyses colorimétriques

L'évaluation de la couleur a été effectuée avec un colorimètre (Instrumar limited, St John's, Canada) utilisant le système de couleur standard CIELAB (1976) et permettant d'obtenir les valeurs L (luminosité), a (quantité de rouge) et b (quantité de jaune). Deux lectures sur différents sites de la carotte ont été réalisées pour chaque carotte. Six carottes de chaque groupe de traitement ont été analysées. L'intensité du blanchiment de surface des carottes a été estimée par l'indice de blanchiment (Whiteness Index; WI; échelle de 0 à 100) qui est obtenu par la formule suivante (Bolin et Huxsoll, 1991):

$$WI = 100 - ([100 - L]^2 + a^2 + b^2)^{0.5}$$

Plus les valeurs du WI sont élevées, plus elles représentent une coloration blanchâtre de surface importante.

2.5.9 Analyses de la texture

La fermeté des carottes miniatures a été déterminée à l'aide d'un texturomètre Voland Stevens-LFRA (modèle TA-100, Texture technologies corp., New York, États-Unis) relié à une imprimante (Linseis, modèle L 6512, New Jersey, États-Unis). La vitesse de déroulement du papier était ajustée à 50 cm/minute. L'étalonnage de l'appareil a été réalisé à partir d'un standard de masse (100 à 1000 g) pour une poussée maximale de 700 g. Un poinçon (modèle TA-9), en forme d'aiguille de 0.2 cm² de surface, a été utilisé pour les analyses de fermeté. La vitesse de descente de cette sonde était réglée à 1 mm/s. Une distance de 5 mm était parcourue par le poinçon après contact avec la carotte.

La force de pénétration a été calculée de la façon suivante:

$$FP = 9.81 \cdot F$$

FP: Force de pénétration (1 N = 1 kg . m . s⁻²)

F: Poussée du poinçon (g)

9.81: Valeur de l'accélération de la pesanteur (m . s⁻²)

Puisque le papier de l'imprimante était gradué de 0 à 100 et que le texturomètre a été calibré pour une poussée maximale de 700 g, la hauteur du graphe permettait de calculer l'intensité réelle de la résistance du tissu du légume à la poussée du poinçon, soit:

$$F = 7 \cdot X$$

X: Poussée du poinçon lue sur l'échelle 0-100 g du graphe (g)

La longueur de l'ordonnée 0-100 g sur le papier de l'imprimante étant de 25 cm (figure 4), l'équation devient alors:

$$F = 7 \cdot \frac{100 \cdot h}{25}$$

h: Hauteur du pic sur le graphe (cm)

L'équation finale prend donc la forme suivante:

$$FP = 9.81 \cdot 28 h$$

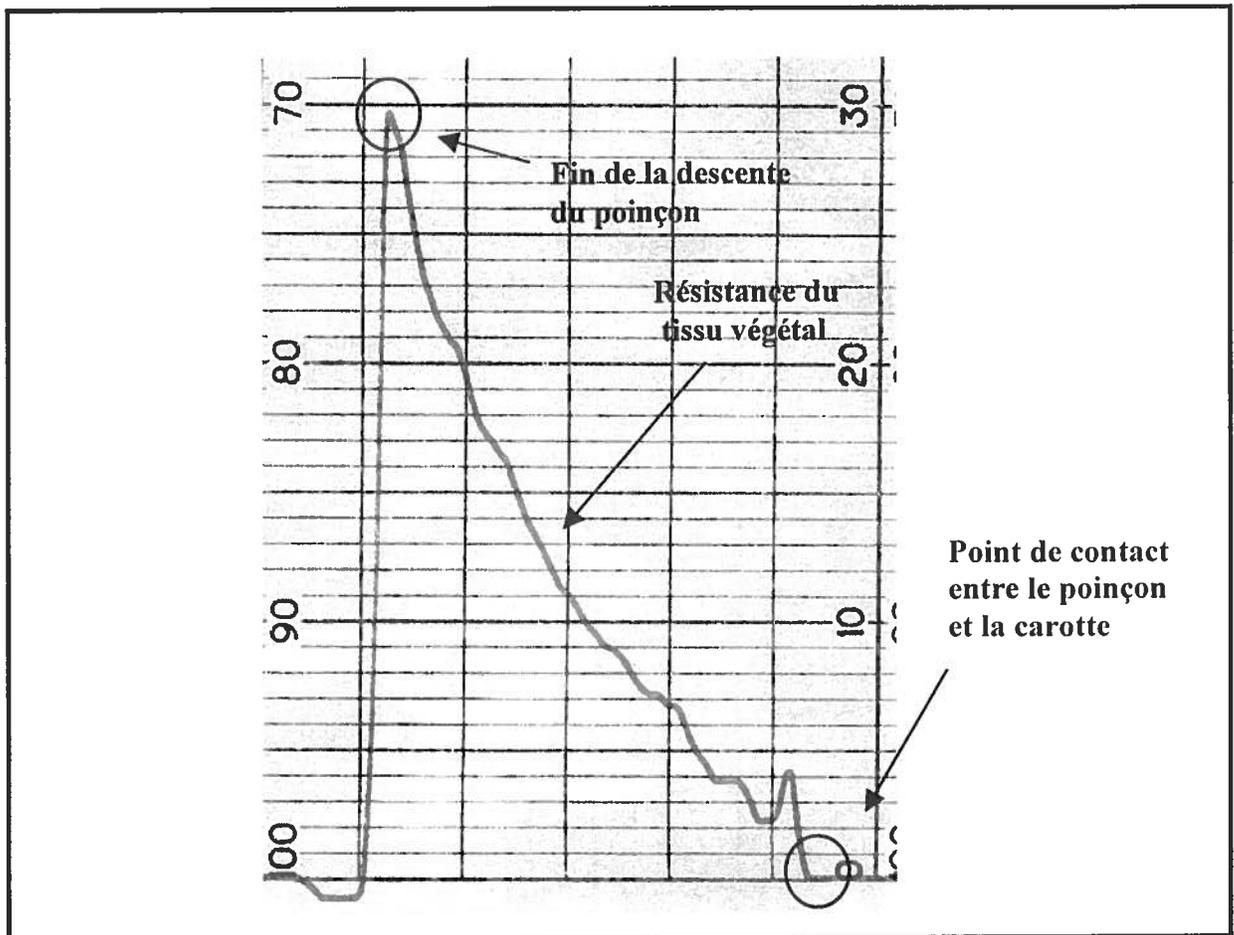


Figure 4. Graphique obtenu lors d'un test de fermeté sur les carottes miniatures (la résistance du tissu végétal se lit de droite à gauche).

2.6 ANALYSES STATISTIQUES

Pour l'étude portant sur la bactérie *E. coli* et l'atmosphère modifiée, un design expérimental complet de $2 \times 2 \times 2 \times 5 \times 12$ a été réalisé de façon aléatoire représentant deux répliques, deux pré-traitements, deux conditions atmosphériques, cinq doses d'irradiation et 12 jours d'échantillonnage. L'expérience touchant l'enrobage des carottes miniatures a suivi le design suivant; $2 \times 2 \times 2 \times 3 \times 4$ correspondant à deux répliques, deux pré-traitements, deux conditions atmosphériques, trois doses d'irradiation et quatre jours d'échantillonnage.

Les effets interactifs entre les deux conditions atmosphériques (air et MAP) et le traitement d'enrobage de même que les différences entre les échantillons enrobés et non enrobés ont été déterminés par le test *t* de Student du programme SPSS (SPSS, Chicago, IL, États-Unis). Afin de déterminer les principaux effets des doses d'irradiation, les données ont été analysées par la procédure ANOVA du programme SPSS. La comparaison des moyennes a été basée sur le test multiple de Duncan. Le test *t* de Student a été utilisé pour évaluer l'effet des jours d'échantillonnage pour chaque lot de traitement. Les différences entre les moyennes ont été considérées significatives lorsque $p \leq 0.05$.

2.7 IDENTIFICATIONS BACTÉRIENNES

Les colonies à identifier sur le milieu TSA ont été repiquées dans 10 ml de milieu nutritif TSB et ces bouillons ont été incubés à 35°C pendant 24 heures. À partir de ces cultures, une série de tests a été réalisée (tableau VIII).

Tableau VIII. Description des tests pour identification.

Test	Informations recherchées
Coloration Gram	appartenance aux groupes Gram – ou +
État frais	mobilité, pureté
Isolement sur milieux gélosés (TSA, Mac Conkey)	pureté, morphologie coloniale, fermentation du lactose, isolation d' <i>Enterobacteriaceae</i> et bacilles à Gram -

La détection de l'oxydase a été effectuée à partir de bactéries à Gram négatif, isolées sur le milieu TSA. Un papier filtre Whatman #1, imbibé de réactif à oxydase, a été ensemencé par striation à l'aide d'une anse bactériologique en platine, chargée de bactéries. De façon instantanée ou dans un délai de 10 à 30 secondes, les réactions positives étaient observées par le virage des bactéries au violet ou pourpre. La détection de la catalase était aussi réalisée à partir d'un isolat sur milieu TSA. Une quantité importante de bactéries était déposée sur une lame de microscope à l'aide d'une tige de verre. Une goutte d'une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène 3% était versée sur la lame et la formation instantanée de bulles d'air confirmait la présence de l'enzyme catalase.

Puisque la majorité des bactéries à identifier étaient des bacilles à Gram négatif, un système basé sur des tests biochimiques nommé galeries API 20E (bioMérieux Canada Inc., St-Laurent, Canada), a été utilisé pour compléter ces tests élémentaires. L'identité des bactéries inconnues a été obtenue en comparant les profils récoltés avec ces galeries à

l'aide du logiciel APILAB+ (bioMérieux Canada Inc.) et de l'index API 20E (Analytical profile index, 10^e édition, bioMérieux Vitek Inc., Canada).

2.8 ISOLEMENT DE LA BACTÉRIE *P. AGGLOMERANS* DANS DES CAROTTES RÂPÉES IRRADIÉES

Des sacs de carottes de 25 livres de diverses marques ont été achetés à un supermarché local (IGA, Laval, Canada). La transformation des carottes a été réalisée telle que définie à la section 2.3.1. Le robot-culinaire servant à la transformation des carottes entières a été désinfecté avec de l'éthanol 70% entre chaque nouvelle variété de carottes à râper. Des échantillons de carottes râpées (25 ± 1 g) ont été disposés dans des sacs WIN 68 et scellés sous air ambiant. Ces emballages ont été conservés à -80°C durant 15 heures avant le traitement d'irradiation. Après cet intervalle d'entreposage, les sacs de carottes râpées ont été irradiés à 5 kGy avec l'irradiateur UC-15A, à un débit de dose de 29.228 kGy/heure. Suite au traitement d'irradiation, tous les sacs de carottes prêtes à manger ont été entreposés à 4°C pendant 15 heures afin de reproduire les mêmes conditions de traitement apposées aux carottes aux sections 2.3.2 et 2.3.3, mais sans contamination artificielle avec la bactérie *E. coli*. Par la suite, les emballages ont été conservés à 10°C et un sac de 25 g de carottes râpées a été prélevé à 1 (traitement d'irradiation), 5, 6, 7 et 12 jours d'analyse pour procéder à une énumération microbienne totale, permettant d'isoler la bactérie *P. agglomerans* (se référer à la section 2.3.5).

2.9 CARACTÉRISATION DE LA BACTÉRIE *P. AGGLOMERANS* PAR SÉQUENÇAGE DE L'ARNr 16S

2.9.1 Extraction de l'ADN chromosomique

Les procédures décrites ci-dessous sont adaptées de Marmur (1961). Deux tubes de 5 ml d'une culture de 18 heures de *P. agglomerans* ont été centrifugés (IEC Clinical centrifuge, International equipment, Massachusetts, États-Unis) 10 minutes à 2000 x g. Les cellules bactériennes ont été lavées avec 500 µl de tampon Tris (Tris 100 mM, pH 8.0) et centrifugées à 13000 x g (Baxter Canlab modèle Biofuge 13, Heraeus instruments, États-Unis) pendant une minute. Le culot obtenu a été resuspendu dans 500 µl de tampon Tris contenant 10 mg/ml de lysozyme et la solution résultante a été incubée à 37°C pendant 30 minutes. Un examen microscopique a été effectué avec une goutte de SDS 10% afin de vérifier l'efficacité de la lyse cellulaire. Puisque la paroi de ces bactéries semblait résistante, une incubation supplémentaire de 15 minutes à 37°C a été nécessaire. Après cet intervalle de temps, 50 µl de SDS 10% a été ajouté. L'ADN a été isolé avec deux étapes d'extraction phénol-chloroforme 1:1 (v/v) suivies d'une extraction au chloroforme (un volume) afin d'enlever le phénol résiduel. L'ADN de la phase aqueuse a été précipité avec 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M et deux volumes d'éthanol 95% pendant au moins 30 minutes à -20°C. Une centrifugation de deux minutes à 13000 x g a suivi cette manipulation. Le culot d'ADN a ensuite été resolubilisé dans 100 µl d'eau distillée stérile. Un traitement à la ribonucléase a été réalisé pendant 10 minutes à 37°C en ajoutant 5 µl de ribonucléase A (10 mg/ml). Une deuxième précipitation à l'éthanol a été accomplie. Le culot a de nouveau été resuspendu dans 100 µl d'eau.

2.9.2 Détermination de la concentration d'ADN

L'extrait d'ADN a été dilué 1/100 dans de l'eau et la densité optique (DO) à 260 nm a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. La concentration d'ADN en µg/ml a été calculée en fonction qu'à cette longueur d'onde, une DO de 1 est équivalent à 50

µg/ml d'ADN double brin. Une autre méthode a été utilisée pour évaluer approximativement la quantité d'ADN de l'extrait. Cette technique consistait à faire migrer par électrophorèse sur gel d'agarose un volume de 5 µl d'échantillon d'ADN en présence d'un marqueur d'ADN standard, soit le marqueur Lambda-Pst1. Ce dernier était préparé en digérant l'ADN du phage Lambda avec l'enzyme de restriction *Pst*1. Ainsi, les bandes obtenues avec l'échantillon étaient analysées par densitométrie et comparées aux fragments d'ADN témoins dont la concentration était connue.

2.9.3 Amplification élective *in vitro*

L'amplification a été réalisée dans un volume de 100 µl contenant du tampon 10X Pwo polymérase (Tris-HCl 100 mM pH 8.85, KCl 250 mM, (NH₄)₂SO₄ 50 mM, MgSO₄ 20 mM), 800 µM de dNTP, 0.5 µM de chacune des amorces (tableau IX), 8 ng de l'extrait nucléique et de 2.5 U de l'enzyme Pwo ADN polymérase. L'appareil Genius (Techne) a été utilisé pour effectuer l'amplification avec le programme suivant: deux minutes allouées pour le réchauffement du couvercle, trois minutes de dénaturation initiale à 95°C (ajout de l'enzyme), suivi de 30 cycles de 30 secondes de dénaturation à 94°C, une minute d'appariement à 55°C et une minute de synthèse à 72°C. Un dernier cycle de sept minutes à 72°C permet de compléter la réaction d'amplification.

Tableau IX. Séquences des amorces.

Amorce	Séquences	Position*
pA	5' AGA GTT TGA TC ^(C/A) TGG CTC AG 3'	8-27
pH	5' AAG GAG GTG ATC CA ^(G/A) CCG CA 3'	1541-1522

* Position relative aux gènes de l'ARNr 16S de la bactérie *E. coli* (Bruce *et al.*, 1992)

Les amorces pA et pH sont des amorces universelles correspondant à des régions très conservées des gènes de l'ARNr 16S de toutes les eubactéries. Des fragments de 1500-1600 pb sont générés par ces amorces lors d'amplifications par PCR. Ces amorces ont été synthétisées à l'aide du Gene Assembler (Pharmacia, Baie d'Urfé, Canada) dans le laboratoire du professeur François Shareck (INRS-Institut Armand-Frappier).

2.9.4 Purification de l'extrait d'ADN

Un volume de 80 µl du produit de PCR a été purifié à l'aide de la trousse commerciale GFX™ PCR DNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech, New Jersey, États-Unis). Cette dernière consiste en l'utilisation d'un agent chaotropique dénaturant les protéines et favorisant l'attachement de l'ADN double brin à une colonne composée d'une matrice en fibres de verre. L'ADN purifié a été élué de la colonne avec 50 µl de tampon TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM).

2.9.5 Électrophorèse sur gel d'agarose

Trois échantillons de l'extrait purifié d'ADN ont été mélangés à un tampon de charge LB 6X (glycérol 30%, xylène cyanol 0.25%, bleu de bromophénol 0.25%) et ont été séparés par électrophorèse sur un gel composé de 0.7% d'agarose dissous dans un tampon TBE (Tris-Borate 89 mM, EDTA 2mM pH 8.3) et additionné de bromure d'éthidium à une concentration finale de 0.5 µg/ml. Les marqueurs utilisés étaient le marqueur ADN KiloBase et Lambda-Pst1. La migration a été effectuée pendant 17 heures à 30 volts dans une chambre électrophorétique (mini DNA SUB CELL, Bio-Rad, Mississauga, Canada). Les fragments d'ADN ont été visualisés sous rayonnement ultraviolet à l'aide du Gel Doc 1000 (Bio-Rad) et une image digitalisée du gel a pu être obtenue.

2.9.6 Séquençage et analyse des séquences

Afin de concentrer davantage l'extrait d'ADN, les fragments obtenus ont été purifiés à l'aide de la trousse GFX™ Gel Band Purification Kit (section 2.9.4.). Cette même trousse permet de purifier de l'ADN provenant de gel d'agarose, car le même agent chaotrope permet de dissoudre l'agarose. Une électrophorèse sur gel d'agarose 0.7% a été effectuée pour vérifier les produits de purification et permettre le dosage de l'ADN à séquencer.

La préparation d'ADN purifié a été séquencée au service de séquençage de l'Institut Armand-Frappier. Une quantité de 40 ng d'ADN a été nécessaire pour la réaction de séquençage, basée selon la méthode de Sanger *et al.* (1977), en utilisant des didéoxynucléosides triphosphates couplés à des fluorochromes comme terminateurs de l'élongation. La réaction de séquençage a été accomplie à l'aide de la trousse DTCS (Dye Terminator Cycle Sequencing, Beckman, États-Unis) avec une Taq polymérase modifiée assortie d'une pyrophosphatase en plus des amorces universelles pA et pH. Le séquenceur CEQ 2000XL (Beckman Coulter, États-Unis) est muni d'un système d'électrophorèse à capillaires permettant la séparation des fragments générés.

La séquence obtenue de l'ARNr 16S a été analysée avec le logiciel Chromas afin de s'assurer de son exactitude. Une analyse d'homologie BLAST (National Center for Biotechnology Information; NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) a été réalisée pour effectuer le traitement, l'édition, les analyses et les comparaisons de séquences des gènes.

2.10 ÉVALUATION DE LA D₁₀ DES BACTÉRIES *E. COLI* ET *P. AGGLOMERANS* IRRADIÉES DANS UN BOUILLON NUTRITIF

Des volumes de 5 ml de culture de 18 heures d'*E. coli* et de *P. agglomerans* ont été séparément disposés dans des tubes de 15 ml stériles (17 x 120 mm; Sarstedt, St-Léonard, Canada) avant d'être irradiés. Les tubes de culture (sauf ceux conservés comme témoins) ont été irradiés à différentes doses dans l'irradiateur de recherche UC-15A, à un débit de dose de 25.374 kGy/heure. Afin d'obtenir une courbe de survie composée de six points, chaque culture a reçu un minimum de six doses (le témoin non irradié correspondant à la dose 0 kGy) dans un intervalle tenant compte de la radiorésistance de chaque souche. Les doses appliquées aux cultures étaient 0, 0.15, 0.3, 0.45, 0.6, 0.7 et 0.9 pour *E. coli* et 0, 1, 2, 3, 4 et 4.5 pour *P. agglomerans*. Suite au traitement d'irradiation, les tubes ont été placés à 4°C et des dilutions décimales étaient effectuées dans les plus brefs délais dans des tubes contenant 9 ml d'eau peptonée 0.1%. Les dilutions appropriées ont été coulées en masse dans du TSA et les boîtes de Petri ont été incubées à 35°C pour *E. coli* et à 30°C pour *P. agglomerans*, pendant 48 heures. Ces expériences ont été accomplies en duplicata et les dilutions ont été effectuées en triplicata.

2.11 ADAPTATION DE *P. AGGLOMERANS* À L'IRRADIATION

Une culture de 18 heures de *P. agglomerans* a été distribuée en volume de 40 ml dans des tubes de 50 ml (28 x 114 mm; Sarstedt). Quatre groupes de traitement ont été déterminés (tableau X). Du chloramphénicol (Cm) a été additionné aux bouillons de culture, à la concentration finale de 50 µg/ml, avant le procédé initial d'irradiation. L'irradiateur utilisé a été le UC-15A, à un débit de dose de 25.494 kGy/heure. Pour chaque groupe, un dénombrement bactérien a été réalisé avant et après le traitement d'irradiation, en effectuant une série de dilutions avec 9 ml d'eau peptonée (0.1%) à partir du bouillon irradié et en coulant en masse, dans le milieu TSA, les dilutions appropriées. Les boîtes de Petri ont été incubées à 30°C pendant 48 heures. Le chloramphénicol n'a pas été inhibé avant d'effectuer le dénombrement tel que décrit dans les travaux de Lim *et al.* (2001) dont ces derniers ont servi de patron pour cette expérience. Pour le groupe des bactéries adaptées, les cultures bactériennes ont été incubées à 30°C pour une période de

24 heures suivant la première dose de 2 kGy reçue. Suite au second traitement d'irradiation, une détermination du nombre de survivants a été réalisée sur milieu TSA. Deux tubes de 40 ml de culture par groupe ont été analysés et les dilutions ont été accomplies en triplicata. Le taux de survie a été calculé en tenant compte des résultats des dénombrements des survivants avant le traitement d'irradiation et après. Dans le cas de l'application de deux doses d'irradiation, le taux de survie était calculé de la même façon. Des dénombrements bactériens ont tout de même été réalisés avant et après la période d'adaptation afin d'observer l'impact de cette période sur le nombre de survivants.

Tableau X. Description des groupes de traitements.

Groupe	Dose d'irradiation (kGy)
Bactéries non adaptées	1 x 4
Bactéries non adaptées + Cm	1 x 4
Bactéries adaptées	2 x 2
Bactéries adaptées + Cm	2 x 2

2.12 ANALYSE DU PROTÉOME DE *P. AGGLOMERANS* IRRADIÉ

2.12.1 Conditions de culture

Une culture de 18 heures de *P. agglomerans* a été distribuée dans des micro-tubes de 1.5 ml. Trois micro-tubes ont été centrifugés à 13000 x g (Baxter Canlab modèle Biofuge 13, Heraeus instruments, États-Unis) pendant 5 minutes afin de récupérer les bactéries. Les culots ont été conservés à -20°C en attente de la préparation des échantillons protéiques. Ces cellules correspondaient au témoin de culture non irradiée. Les autres micro-tubes ont été congelés à -80°C pendant 15 heures avant d'appliquer le traitement d'irradiation. Les bactéries ont été irradiées à 5 kGy à l'aide d'un irradiateur de recherche UC-15A de type «underwater calibrator» équipé d'une source de cobalt 60

(MDS Nordion, Kanata, Canada). Le procédé a été réalisé à un débit de dose de 28.062 kGy/h. Les micro-tubes contenant le bouillon bactérien irradié ont été incubés à 10°C et les cellules microbiennes ont été récupérées par centrifugation (5 minutes à 13000 x g) aux jours 3, 5 et 7 à raison aussi de trois micro-tubes de 1.5 ml pour chacun des jours d'échantillonnage. Enfin, les culots ont été conservés à -20°C. Toutes ces étapes ont été réalisées dans le but de reproduire les conditions auxquelles les populations bactériennes de *P. agglomerans* ont été exposées (témoin non contaminé) lors de l'expérience portant sur les carottes râpées contaminées avec *E. coli* (section 2.3). Les carottes ont ainsi été remplacées par le bouillon nutritif TSB.

La deuxième analyse protéomique de *P. agglomerans* a été effectuée avec une culture bactérienne de 18 heures irradiée aux doses suivantes: 0, 3, 5 et 8 kGy. Deux tubes de 5 ml de culture ont été irradiés pour chacune des doses choisies. Une centrifugation de 10 minutes à 2000 x g (IEC Clinical centrifuge, International equipment, Massachusetts, États-Unis) a permis de récupérer les cellules et de les congeler à -20°C pour éventuellement récupérer les protéines intracellulaires.

2.12.2 Préparation des échantillons protéiques

Les culots bactériens de chacun des micro-tubes ont été dégelés légèrement et resuspendus dans 250 µl de tampon phosphate de sodium 20 mM à pH 7.0. Les volumes des trois micro-tubes, pour chacun des jours d'échantillonnage, ont été regroupés pour l'obtention d'un volume final de 750 µl. Quant aux culots obtenus à partir des cultures de 5 ml, ces derniers ont été resuspendus dans 500 µl du même tampon. Par la suite, les cellules ont été lysées aux ultrasons à deux reprises pendant 30 secondes avec un sonicateur XL (Mandel). Une pause de 30 secondes était prise entre chaque période de sonication. Lors de la lyse cellulaire, les cellules étaient maintenues sur glace dans le but de minimiser l'activité des protéases. Une centrifugation à 13000 x g pendant 15 minutes à 4°C a permis de récupérer le surnageant contenant les protéines cytoplasmiques.

2.12.3 Dosage des protéines

La concentration en protéines des échantillons à analyser a été déterminée par la méthode de Bradford (trousse Bio-Rad). La protéine standard employée était la γ -globuline. La concentration en protéines des échantillons a été estimée par spectrophotométrie à une DO de 595 nm à l'aide d'une courbe standard de la DO en fonction de la concentration en γ -globuline.

2.12.4 Électrophorèse en deux dimensions

2.12.4.1 Incorporation des protéines par réhydratation des languettes

Les protéines ont été précipitées par deux volumes de TCA 10%/acétone, DTT 20 mM pendant un minimum d'une heure à -20°C . Ensuite, une centrifugation à 4°C pendant 5 minutes a suivi et le culot récupéré a été lavé avec de l'acétone (conservé à -20°C) à deux reprises afin d'éliminer le TCA résiduel. Un séchage de 15 minutes à l'air libre a permis de laisser évaporer l'acétone restant. Finalement, les protéines présentes dans le culot ont été solubilisées pendant au moins une heure avec agitation dans le tampon de réhydratation correspondant à l'intervalle de pH choisi (urée 9 M déionisée avec la résine AG® 501-X8 (D), CHAPS 4% (p/v), tampon pour IPG 0.5% (v/v), DTT 15 mM et quelques grains de bleu de bromophénol). Un volume de 350 μl de tampon, contenant les protéines, a été déposé au centre du portoir en évitant les bulles d'air. Par la suite, la partie gel de la languette a été déposée doucement sur le liquide de manière à éviter que du tampon regagne la partie supérieure du film protecteur. Par l'entremise de pinces, la languette a été glissée de gauche à droite afin de permettre à toute la surface du gel d'être humidifié. Pour s'assurer que la solution se retrouve de façon uniforme en dessous du gel, le contour de la languette a été suivi à l'aide d'un scalpel pour distribuer le liquide non absorbé par capillarité. Afin d'éviter l'évaporation et la cristallisation de l'urée, chaque languette a été recouverte d'huile minérale appliquée goutte à goutte en débutant à une extrémité du portoir. Avant de démarrer la réhydratation des languettes, un couvercle a été déposé sur chacun des portoirs. Les gels ont été réhydratés pendant 12

à 16 heures à 20°C. Toutes les étapes de la réhydratation du gel IPG des languettes déshydratées (Amersham Pharmacia Biotech) pour la focalisation isoélectrique ont été réalisées selon la méthode décrite dans le manuel du fabricant. L'appareil IPGphor™ (Amersham Pharmacia Biotech) a été utilisé pour la réhydratation de même que la focalisation isoélectrique. Ce dernier est muni d'une source de courant et d'un système de réfrigération intégré.

2.12.4.2 La première dimension: la focalisation isoélectrique

Cette procédure consiste en la séparation des protéines selon leur charge dans le gradient de pH immobilisé dans le gel des languettes. Elle a été réalisée selon la méthode décrite dans le manuel d'électrophorèse en 2-D de la compagnie Amersham Pharmacia Biotech. Les portoirs ont été positionnés de manière à ce que l'extrémité pointue soit déposée sur l'anode. Le courant a été réglé à 50 μ A par languette. Les conditions d'électrophorèse utilisées dans ce présent travail ont été les suivantes: une première étape avec un voltage maximum de 500 V jusqu'à l'obtention de 500 Vh, une deuxième étape à 1000 V jusqu'à 1000 Vh. Pour la dernière étape, le nombre de volt-heures à atteindre varie selon l'intervalle de pH et la longueur de la languette. Un voltage de 8000 V jusqu'à 100000 Vh a été réglé lors de ce projet. Ces étapes de focalisation isoélectrique ont été effectuées avec l'option de voltage par paliers «step-n-hold». Enfin, une fois la première dimension terminée, les languettes ont été conservées à -80°C ou équilibrées immédiatement avant de procéder à la deuxième dimension.

2.12.4.3 Équilibration des languettes

Dans le but de permettre aux protéines de migrer de la première dimension à la deuxième dimension, les languettes ont été équilibrées dans le tampon d'équilibration (urée 6M, glycérol 30% (p/v), SDS 2% (p/v) et Tris-HCl 0.05M pH 8.8). Cette étape a été accomplie selon le protocole établi par Görg, Postel et Günther (1988) et Görg *et al.* (1995). Cette procédure est retrouvée dans le manuel d'électrophorèse 2-D de la compagnie Amersham Pharmacia Biotech. Suite à la focalisation isoélectrique, les

languettes ont été mises dans un tube de verre contenant 10 ml de tampon I (10 ml de tampon d'équilibration, 100 mg de DTT et 50 µl de la solution de bleu de bromophénol 0.25% (p/v)) et équilibrées pendant 15 minutes sur un agitateur. Par la suite, un transfert des languettes a été réalisé dans un autre tube contenant 10 ml de tampon II (10 ml de tampon d'équilibration, 250 mg d'iodoacétamide et 50 µl de la solution de bleu de bromophénol 0.25% (p/v)) et équilibrées pendant 15 minutes sur un agitateur.

2.12.4.4 La deuxième dimension: l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS

L'électrophorèse a été réalisée selon la méthode développée par Laemmli (1970) avec l'appareil Protean® II de Bio-Rad. La deuxième dimension permet de séparer les protéines selon leur masse moléculaire dans un gel de polyacrylamide de 12.5% de 20 cm x 20 cm x 0.15 cm. Après l'étape de l'équilibration, la languette a été trempée à trois reprises dans le tampon d'électrophorèse 1X (Tris-HCl 25 mM pH 8.3, glycine 1.4% (p/v), SDS 0.1% (p/v)) afin d'éliminer le surplus de tampon d'équilibration. La languette a été positionnée sur le dessus du gel. Afin d'assurer un contact efficace entre le gel et la languette, cette dernière a été pressée légèrement sur le gel avec une spatule. L'électrophorèse a été effectuée pendant 30 minutes avec un courant maximum de 15 mA par gel et ensuite avec un courant maximum de 30 mA par gel jusqu'à la fin de la migration. Le faible courant lors du démarrage de la migration facilite le transfert des protéines du gel de la languette à celui de la deuxième dimension.

2.12.5 Coloration au nitrate d'argent

Une fois la migration terminée, les protéines du gel ont été fixées avec 400 ml d'une solution de méthanol 50% (v/v) et d'acide acétique 5% (v/v) pendant une heure et par la suite avec 400 ml d'une solution de méthanol 50% (v/v) pendant 10 minutes. Deux rinçages de 10 minutes chacun avec 400 ml d'eau déionisée ont suivi. Après ces lavages, le gel a été incubé dans 300 ml d'une solution de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.02% (p/v) pendant une minute. Après avoir rincé le gel à deux reprises avec 400 ml d'eau déionisée pendant une

minute, la coloration a été réalisée avec 300 ml d'une solution d'AgNO₃ 0.2% (p/v) pendant 20 minutes. Deux lavages d'une minute avec 400 ml d'eau déionisée ont précédé le développement qui a été effectué par l'ajout de 300 µl de formaldéhyde 37% à 300 ml d'une solution de Na₂CO₃ 2% (p/v). Une fois que le développement a été jugé suffisant selon la coloration, la réaction est arrêtée en incubant le gel dans une solution d'acide acétique 5% (v/v). Les solutions de Na₂S₂O₃·5H₂O, d'AgNO₃ et de Na₂CO₃ sont préférablement utilisées lorsqu'elles sont fraîchement préparées.

2.12.6 Analyse des gels 2-D

Après l'étape de la coloration, les images de gels ont été numérisées avec un système de capture d'image par caméra CCD (Kodak Image Station IS440CF) et elles ont été enregistrées directement dans le format approprié. Le logiciel d'analyse de gels 2-D ImageMaster 2-D Elite v3.01 (Amersham Pharmacia Biotech) a été employé afin de détecter automatiquement et de façon manuelle les protéines, d'évaluer et de normaliser leur volume, d'exclure le bruit de fond et les stries et de réaliser des correspondances de protéines entre les différents gels.

2.13 ANALYSE PAR FT-IR DES DOMMAGES CAUSÉS À L'ADN DE *P. AGGLOMERANS* PAR IRRADIATION

2.13.1 Irradiation de la culture

Un litre de culture de 18 heures de *P. agglomerans* a été préparé pour chaque dose d'irradiation (0, 2, 4, 5, 8 et 16 kGy). Ces cultures ont été irradiées dans l'irradiateur UC-15A à un débit de dose de 25.883 kGy/heure. Les cultures ont été maintenues sur glace jusqu'au début des procédures pour l'extraction de l'ADN chromosomique.

2.13.2 Extraction de l'ADN chromosomique

Les cultures de 18 heures de *P. agglomerans*, irradiées et non irradiées, ont été centrifugées à deux reprises (centrifugeuse Beckman modèle J2-21, rotor JA20) pendant 15 minutes à 5000 x g. Les culots obtenus ont été resuspendus dans 20 ml de tampon Tris (Tris 100 mM pH 8.17) contenant 10 mg/ml de lysozyme. La solution résultante a été incubée à la température de la pièce pendant 45 minutes. Un examen microscopique a été effectué après l'ajout d'une goutte de SDS 10% afin de vérifier l'efficacité de la lyse cellulaire. Puisque la paroi de ces bactéries semblait résistante, une incubation supplémentaire de 90 minutes à 37°C a été nécessaire, afin d'obtenir un test de lyse cellulaire positif. Après cet intervalle de temps, 10 ml de SDS 10% a été ajouté. L'ADN a été isolé avec trois étapes d'extraction phénol-chloroforme 1:1 (v/v) suivies d'une extraction au chloroforme (un volume) afin d'enlever le phénol résiduel. Un volume de 15 ml d'éthanol 95% (-20°C) a été ajouté à la phase aqueuse, récoltée aux étapes précédentes et conservée sur glace. L'ADN précipité a été recueilli en faisant tourbillonner le mélange avec une pipette Pasteur à longue tige. Lorsqu'il y avait une bonne agglomération sur la pipette, cette dernière était changée. Cette manipulation a été effectuée jusqu'à ce que l'interface de la phase aqueuse et de l'éthanol ait disparue. Après avoir fait sécher les pipettes contenues dans des tubes de verre, 2 ml d'une solution Tris-EDTA pH 8.0 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM), additionnée de 20 µl de ribonucléase A (1 mg/ml) ont été ajoutés. Ce traitement à la ribonucléase a été réalisé

pendant 30 minutes sous agitation lente, suivi de 15 minutes à 37°C. Chaque volume contenu dans le tube de verre a été séparé en trois micro-tubes de 1.5 ml, contenant 500 µl chacun. Une extraction phénol-chloroforme (0.5: 0.5; v/v) suivie d'une extraction au chloroforme (0.5 volume) a été accomplie pour éliminer la ribonucléase. L'ADN contenu dans la nouvelle phase aqueuse a été précipité avec 0.1 volume d'acétate de sodium 3 M et de 2 volumes d'éthanol 95% pendant au moins 60 minutes à - 20°C. Une deuxième précipitation à l'éthanol a été effectuée. Les culots récoltés après centrifugation ont été resolubilisés dans 450 µl d'eau distillée.

2.13.3 Estimation de la pureté des extraits d'ADN

La pureté des solutions obtenues a été estimée par spectrophotométrie à 260 et 280 nm. Le ratio des DO 260/280 nous informe sur la pureté des extraits d'ADN. Pour une solution pure, ce ratio se situe entre 1.8 et 2.

2.13.4 Fabrication des pastilles pour analyses au FT-IR

Après leur extraction, les échantillons d'ADN purifiés ont été lyophilisés à l'aide d'un évaporateur rotatif (SpeedVac, Savant) pendant trois heures. Des pastilles ont été confectionnées en compressant environ 200 mg de bromure de potassium (KBr) à 0.5 tonne dans un moule (modèle #3619, 13 mm, Laboratory Equipment CARVER Inc., Wabash, IN, États-Unis) à l'aide d'une presse hydraulique (modèle # 3912, CARVER). Une perforation a été effectuée au centre de ces capsules à l'aide d'une spatule et cette cavité a été remplie d'ADN lyophilisé. La capsule résultante a été compressée à trois tonnes. Des pastilles ont été fabriquées de la même façon avec des bases azotées (adénine, cytosine, guanine et thymine) en plus du sucre D-ribose et du phosphate de sodium monobasique.

2.13.5 Analyses par FT-IR

Les pastilles composées de l'échantillon à analyser (1 à 3%) et de KBr ont été soumises à une analyse infrarouge à l'aide d'un spectromètre FT-IR Spectrum One (Perkin Elmer Instruments, Norwalk, États-Unis), accompagné d'un accessoire d'échantillonnage Universal ATR (Attenuated Total Reflectance) comportant un cristal à base de composite de sélénure de zinc (ZnSe) et de diamant. L'accessoire se définit comme étant un plateau muni d'un bras de pression pour analyser des surfaces solides. Pour l'examen des pastilles fabriquées lors de ce projet de recherche, un adaptateur conique du bras (modèle L120-2049) a été utilisé avec le plateau adaptateur (modèle L120-5418) spécifique à l'analyse de surfaces planes solides. L'UATR peut être aussi utilisé sans bras de pression pour analyser des liquides. Pour ce travail de recherche, de l'acide phosphorique a été analysé par FT-IR en appliquant directement ce liquide sur le plateau.

Avant de procéder aux spectres des échantillons, 50 scans ont été réalisés comme arrière-plan afin de diminuer le bruit de fond dans la région spectrale $2200-1800\text{ cm}^{-1}$ due à l'absorption liée au diamant. Pour l'analyse des échantillons, tous les spectres ont été récoltés pour l'intervalle 4000 et 650 cm^{-1} . Pour chaque spectre accompli, 256 scans ont été recueillis. Ces derniers ont été compilés et normalisés avec le logiciel Spectrum 3.02 (Perkin Elmer). Les spectres ont été obtenus à une résolution de 4 cm^{-1} .

2.13.6 Électrophorèse sur gel d'agarose

Afin de visualiser l'effet de l'irradiation sur l'ADN de la bactérie *P. agglomerans*, une électrophorèse sur gel d'agarose a été réalisée. Les échantillons d'ADN ont été mélangés à un tampon de charge LB 6X (glycérol 30%, xylène cyanol 0.25%, Bleu de bromophénol 0.25%) et ont été séparés par électrophorèse sur un gel composé de 0.7% d'agarose dissous dans un tampon TBE (Tris-Borate 89 mM, EDTA 2mM pH 8.3) et additionné de bromure d'éthidium à une concentration finale de $0.5\text{ }\mu\text{g/ml}$. Le témoin de fragments d'ADN standards utilisé était le marqueur ADN KiloBase. La migration a été

effectuée pendant 20 heures à 25 volts dans une chambre électrophorétique (mini DNA SUB CELL, Bio-Rad). Les fragments d'ADN ont été visualisés sous rayonnement ultraviolet à l'aide du Gel Doc 1000 (Bio-Rad) et une image digitalisée du gel a pu être obtenue.

3. Résultats

3.1 APPLICATION DE L'IRRADIATION SEULE OU EN COMBINAISON AVEC D'AUTRES TRAITEMENTS

3.1.1 Effet de l'irradiation sur la bactérie *E. coli*ensemencée dans des carottes râpées

L'influence de l'irradiation gamma sur la bactérie *E. coli*, contenue dans des carottes râpées conservées à 10°C, est illustrée à travers le tableau XI. Lorsque les carottes râpées ont été soumises au traitement d'irradiation afin de les stériliser, une inhibition complète de la flore microbienne des légumes a été observée pendant les six premiers jours d'entreposage par l'entremise du contrôle stérile. Au jour 7, une forme cultivable de bactéries, produisant des colonies jaunes, est apparue sur le milieu solide TSA. Cette forme particulière de bactéries a été remarquée pour le contrôle stérile jusqu'à la fin de la période d'analyse. La croissance bactérienne pour le témoin contaminé (non traité par une irradiation subséquente) a démontré une légère augmentation entre le jour 1 et le jour 28, représentant une hausse de 1.84 log pour cette période de temps. Une dose d'irradiation de 0.5 kGy, appliquée aux carottes râpées et contaminées avec *E. coli*, a permis une réduction de 4.5 log du niveau bactérien d'*E. coli*, s'élevant au départ à 6 log. Une élimination totale de la population bactérienne a été notée avec une dose égale ou supérieure à 1 kGy. L'apparition d'*E. coli* (1.96 log) a été observée au 14^e jour avec un traitement d'irradiation de 1 kGy. Toutefois, après 21 jours d'entreposage, seulement un niveau de 2.66 log a été observé. Au jour 28, la présence de colonies jaunes a aussi été décelée à travers les colonies d'*E. coli*. Pour les échantillons de carottes traitées aux doses 1.5 et 2.0 kGy, aucune apparition du micro-organisme *E. coli* n'a été détectée. Cependant, les colonies jaunes sont apparues au jour 21.

Ces résultats suggèrent que l'application d'une dose d'irradiation de 5 kGy dans le but de stériliser des carottes râpées ne semble pas suffisante pour enrayer complètement la flore microbienne totale des légumes. Par contre, la croissance de la bactérie *E. coli* a été inhibée complètement lors de traitements à faibles doses (≥ 1.5 kGy).

Tableau XI. Effet de l'irradiation sur la croissance de la bactérie *E. coli* ensemencée dans des carottes râpées conservées à 10°C.

Doses d'irradiation (kGy)	log UFC/g pour la période d'échantillonnage de 28 jours ^a						
	1	3	7	10	14	21	28
Contrôle stérile ^b	< ^c	<	+ ^d	+	+	+	+
Contrôle contaminé	6.01 ± 0.11	6.03 ± 0.12	6.55 ± 0.43	6.96 ± 0.22	7.13 ± 0.25	7.40 ± 0.26	7.85 ± 0.56
0.5	1.46 ± 0.55	2.07 ± 0.44	4.47 ± 0.63	5.30 ± 0.74	6.14 ± 0.47	6.76 ± 0.11	6.80 ± 0.56
1.0	<	<	<	<	1.96 ± 0.17	2.66 ± 0.03	+/- ^c
1.5	<	<	<	<	<	+	+
2.0	<	<	<	<	<	+	+

^a Le jour 1 correspond à l'application du traitement d'irradiation.

^b Les carottes râpées ont été stérilisées sous des conditions de congélation (-80°C) à 5 kGy.

^c < = sous la limite de détection (< 10 UFC/g)

^d Le signe (+) indique la présence d'une quantité non estimée d'une forme cultivable de colonies jaunes apparaissant après 7 jours. Le signe (+/-) souligne la présence de colonies jaunes en plus des populations d'*E. coli*.

3.1.2 Effet de l'irradiation combinée à une atmosphère modifiée sur la bactérie *E. coli* ensemencée dans des carottes râpées

L'effet de faibles doses d'irradiation, appliquées sous air ou sous MAP, sur la bactérie *E. coli* est démontré à la figure 5. Les carottes râpées étaient conservées à 4°C. Le couplage d'un traitement d'irradiation de 0.15 kGy pour les deux conditions atmosphériques a permis une diminution significative ($p \leq 0.05$) des comptes d'*E. coli* au jour 1. Une réduction de 61.82% (6.05 log à 2.31 log) a été observée pour les populations d'*E. coli* ensemencées dans les carottes râpées emballées sous MAP tandis que la baisse enregistrée pour les échantillons conservés sous air était de l'ordre de 55.08% (5.81 log à 2.61 log) (tableau XII). Une inhibition complète des bactéries *E. coli* présentes dans les carottes râpées conservées sous MAP et traitées avec une dose de 0.3 kGy a été obtenue dès le jour 1 et a été maintenue pendant les 50 jours d'échantillonnage. Pour les échantillons correspondants, emballés sous air, aucune bactérie *E. coli* n'a été détectée au jour 1. Une reprise de croissance de ce micro-organisme a été notée au jour 5 et sa présence a persisté jusqu'au jour 15. Toutefois, ces populations bactériennes sont demeurées constantes et peu nombreuses (légèrement au-dessus de la limite de détection), bien qu'une hausse significative ($p \leq 0.05$) de 16.67% (1.38 log à 1.61 log) ait été enregistrée entre le jour 5 et le jour 15. En ce qui a trait aux carottes râpées irradiées à 0.6 kGy, aucune population d'*E. coli* n'a été détectée pour les deux atmosphères pendant les 50 jours d'entreposage. La meilleure combinaison de traitements a été obtenue avec un procédé d'irradiation de 0.9 kGy appliqué sous air ou sous MAP, permettant une inhibition complète de toutes formes de micro-organismes, présents dans les carottes râpées, pendant les 50 jours d'analyse.

La sensibilité à l'irradiation de la bactérie *E. coli*, ensemencée dans des carottes râpées emballées sous air ou sous MAP, est illustrée à la figure 6. La dose requise, pour réduire d'un log les populations d'*E. coli* présentes dans les carottes prêtes à manger, a été de 0.05 kGy quelles que soient les conditions d'entreposage (air ou MAP). Les analyses statistiques ont démontré qu'il n'y avait aucune différence significative ($p > 0.05$) entre les deux traitements et ce, jusqu'au jour 20. Après 20 jours d'entreposage, le niveau d'*E. coli* détecté dans les carottes râpées emballées sous MAP était significativement ($p \leq 0.05$) plus faible que celui détecté dans les échantillons emballés sous air (tableau XII). Enfin, les résultats regroupés dans la figure 6 ont permis d'affirmer qu'une dose de 0.25 kGy est suffisante pour réduire considérablement les populations d'*E. coli* sous la limite de détection (< 10 UFC/g).

La fin de la période d'échantillonnage a concordé avec l'apparition d'une bactérie autre qu'*E. coli* présente seulement dans les échantillons de carottes emballées sous MAP. Ce micro-organisme a été identifié comme étant *Pantoea agglomerans*. Pour le témoin contaminé, une détection mutuelle des micro-organismes *E. coli* et *P. agglomerans* a été notée au jour 30, 34 et 41. Le dénombrement le plus important de *P. agglomerans* a été observé au jour 34 pour le témoin stérile comportant des populations s'élevant à 6-7 log, tandis que ces dernières étaient de l'ordre de 4-5 log au 30^e jour d'échantillonnage. L'apparition de *P. agglomerans* (4-5 log) a été observée au jour 26 pour les carottes irradiées à 0.15 kGy et ce, jusqu'au jour 41. Par ailleurs, ces mêmes échantillons renfermaient aussi la présence d'*E. coli*, notée seulement au jour 26. La bactérie *P. agglomerans* est apparue au jour 20, au nombre de 2-3 log, pour les échantillons irradiés à 0.3 et 0.6 kGy (tableau XII). Cette proportion de *P. agglomerans* a augmenté à 4-5 log au jour 26 pour les carottes irradiées à 0.3 kGy et ce nombre a persisté jusqu'au jour 34. Concernant les échantillons irradiés à 0.6 kGy, un niveau de 4-5 log a été décelé dans les carottes au jour 41. Au jour 50, ces populations ont diminué pour atteindre une quantité de 2-3 log.

Lors de cette expérience, l'étape de stérilisation des carottes râpées a été réalisée par l'application d'un traitement d'irradiation de 7 kGy plutôt que de 5 kGy. C'est en regard des résultats obtenus précédemment que cette dose a été convenue. Cependant, nos données recueillies dans le cadre de cette expérimentation suggèrent que l'apparition de la bactérie *P. agglomerans* est le résultat d'une résistance à de fortes doses d'irradiation. Finalement, les faibles comptes bactériens obtenus au cours de cette étude, dès l'application d'un traitement d'irradiation, ont persisté tout au long de la période d'analyse, excepté pour les échantillons de carottes emballées sous MAP dans lesquelles la présence d'une bactérie autre qu'*E. coli* a été détectée.

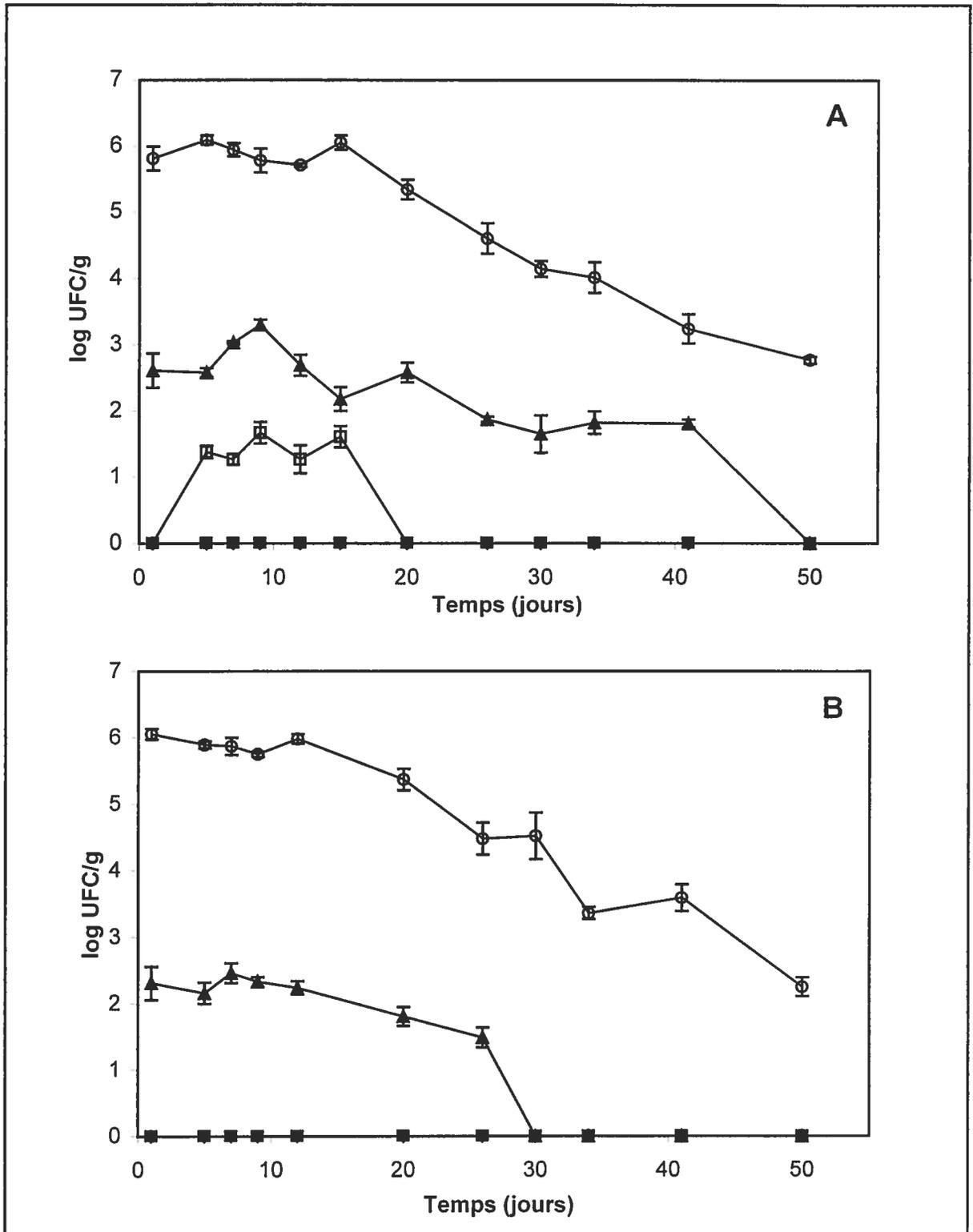


Figure 5. Effet de l'irradiation appliquée sous air (A) ou sous MAP (B) sur les populations d'*E. coli* ensemencées dans des carottes râpées conservées à 4°C.

● = Témoin stérile. ○ = Témoin contaminé. ▲ = Irradiation 0.15 kGy.
 □ = Irradiation 0.3 kGy. ■ = Irradiation 0.6 kGy. ◆ = Irradiation 0.9 kGy

Tableau XII. Effet d'un traitement d'irradiation combiné à une atmosphère modifiée sur des populations d'*E. coli*, ensemencées dans des carottes râpées entreposées pendant 50 jours à 4°C.

		Comptes <i>E. coli</i> (log UFC/g) ^{1,2}											
Traitements		Jour 1	Jour 5	Jour 7	Jour 9	Jour 12	Jour 15	Jour 20	Jour 26	Jour 30	Jour 34	Jour 41	Jour 50
MAP													
Témoins stérile	< ³	<	<	<	<	<	ND ⁴	<	<	< ** ⁵	< ***	<	<
Témoins contaminés	6.05 ± 0.08 ^a	5.89 ± 0.05 ^a	5.87 ± 0.13 ^b	5.75 ± 0.04 ^c	5.98 ± 0.07 ^{ab}	5.98	ND	5.37 ± 0.16 ^d	4.48 ± 0.24 ^e	4.52 ^{**} ± 0.35 ^e	3.36 ^{**} ± 0.09 ^f	3.59 [*] ± 0.20 ^g	2.25 ± 0.14 ^h
Irradiation (0.15 kGy)	2.31 ± 0.25 ^b	2.16 ± 0.16 ^b	2.46 ± 0.15 ^b	2.33 ± 0.07 ^b	2.24 ± 0.10 ^b	2.24	ND	1.81 ± 0.14 ^b	1.49 ^{**} ± 0.15 ^b	< **	< **	< **	<
Irradiation (0.3 kGy)	<	<	<	<	<	<	ND	< *	< **	< **	< **	<	<
Irradiation (0.6 kGy)	<	<	<	<	<	<	ND	< *	<	<	<	< **	< *
Irradiation (0.9 kGy)	<	<	<	<	<	<	ND	<	<	<	<	<	<
Air													
Témoins stérile	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<
Témoins contaminés	5.81 ± 0.18 ^a	6.09 ± 0.07 ^b	5.94 ± 0.10 ^c	5.78 ± 0.18 ^a	5.71 ± 0.03 ^d	6.05	6.05	5.34 ± 0.15 ^e	4.60 ± 0.23 ^f	4.14 ± 0.12 ^g	4.01 ± 0.23 ^h	3.24 ± 0.22 ⁱ	2.77 ± 0.05 ^j
Irradiation (0.15 kGy)	2.61 ± 0.26 ^b	2.58 ± 0.07 ^b	3.03 ± 0.02 ^b	3.30 ± 0.08 ^b	2.69 ± 0.16 ^b	2.18	2.18	2.58 ± 0.15 ^b	1.87 ± 0.04 ^b	1.65 ± 0.28 ^{eg}	1.82 ± 0.17 ^g	1.81 ± 0.06 ^f	<
Irradiation (0.3 kGy)	<	1.38 ± 0.09 ^c	1.27 ± 0.08 ^a	1.67 ± 0.16 ^b	1.27 ± 0.21 ^c	1.61	1.61	<	<	<	<	<	<
Irradiation (0.6 kGy)	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<
Irradiation (0.9 kGy)	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<

¹ Les moyennes à l'intérieur d'une colonne, pour chaque atmosphère combinée avec un traitement d'irradiation, affichant une lettre minuscule différente, sont significativement différentes ($p \leq 0.05$) tel que déterminé par le test de Duncan ou le test *t* de Student. ² Les moyennes de chaque ligne affichant une lettre majuscule différente, pour la période d'échantillonnage, sont significativement différentes ($p \leq 0.05$). ³ < : sous la limite de détection (<10 UFC/g). ⁴ ND: non disponible. ⁵ Présence de *Pantoea agglomerans*: * 2-3 log, ** 4-5 log, *** 6-7 log.

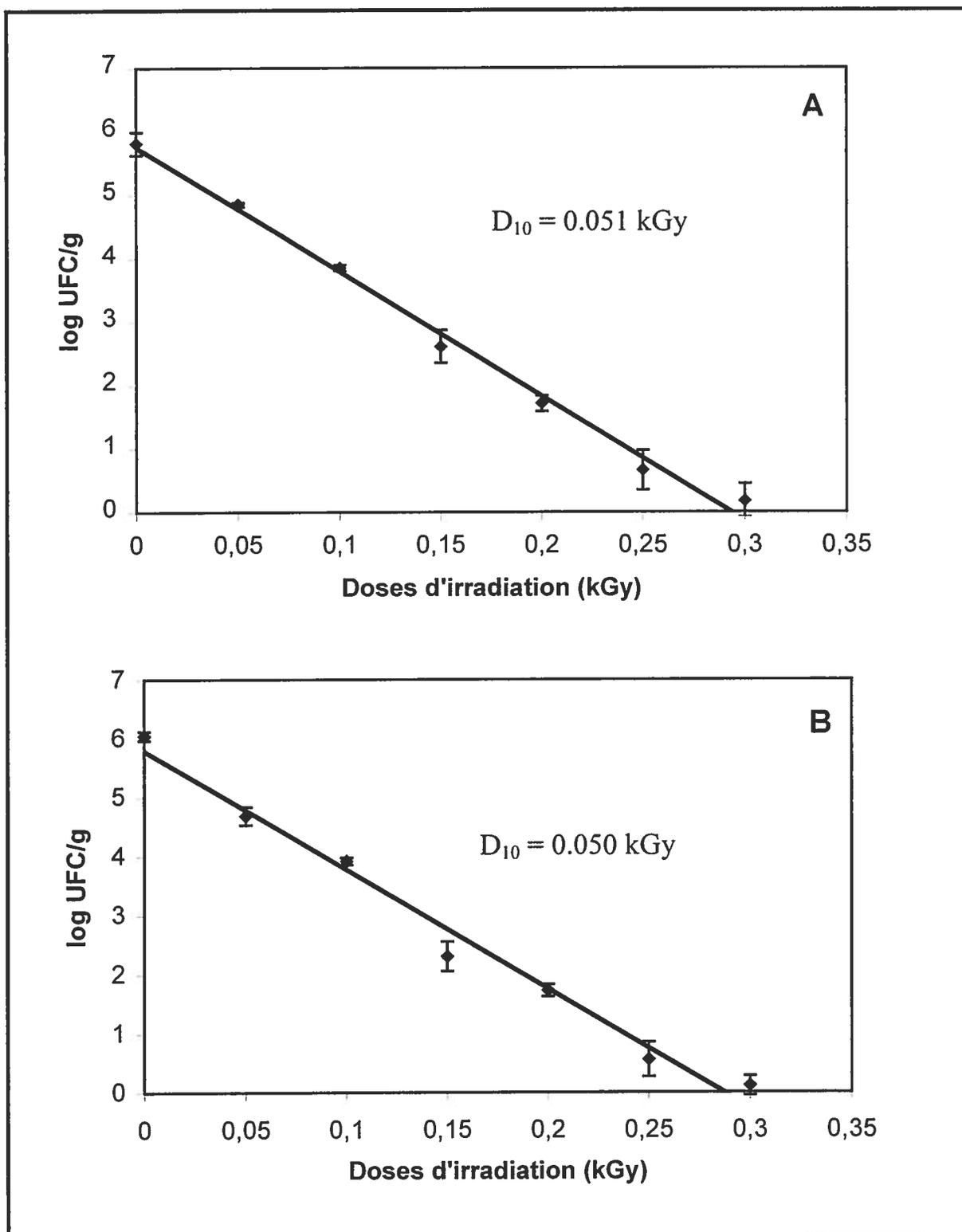


Figure 6. Sensibilité à l'irradiation de la bactérie *E. coli* ensemencée dans des carottes râpées emballées sous air (A) ou sous MAP (B).

3.1.3 Effet d'un traitement d'irradiation combiné à un enrobage antimicrobien et à une atmosphère modifiée sur des carottes miniatures

1) Aspect microbiologique

L'influence de l'irradiation gamma, couplée à un emballage sous MAP ou sous air, sur les populations bactériennes mésophiles totales de carottes miniatures enrobées avec un enrobage antimicrobien ou non enrobées est démontrée à la figure 7. Le niveau de contamination des carottes miniatures avant leur enrobage a été évalué à 4.4 log UFC/g. La limite d'acceptabilité pour la qualité microbiologique des légumes prêts à manger est de 10^6 - 10^8 UFC/g en ce qui a trait aux comptes totaux (tableau III). Les comptes des échantillons témoin non enrobés et emballés sous air et sous MAP sont demeurés constants pendant toute la période d'échantillonnage à une valeur de 10^4 - 10^6 UFC/g (figure 7A et B). La croissance bactérienne dans les échantillons enrobés et non irradiés a augmenté pour atteindre la limite d'acceptabilité après 7 jours pour les carottes emballées sous air et après 14 jours pour celles enrobées et conservées sous MAP (figure 7C et D; tableau XIII).

L'application d'un traitement d'irradiation à des carottes miniatures (enrobées ou non) emballées sous air ou sous MAP a réduit drastiquement les comptes totaux au jour 1 (tableau XIII; figure 7). L'attribution d'une dose de 0.5 kGy a permis de réduire à 10^1 - 10^2 UFC/g la charge microbiologique des échantillons non enrobés, conservés sous air, et de ceux enrobés et emballés sous MAP alors qu'aucune bactérie n'a été détectée au jour 1 pour les autres lots irradiés à 0.5 kGy (carottes non enrobées, entreposées sous MAP et les carottes enrobées, emballées sous air). Pour ces deux derniers lots d'échantillons, la reprise de croissance bactérienne a été notée après 7 jours pour les carottes conservées sous air ambiant tandis que cette reprise a été observée après 14 jours pour les carottes emballées sous MAP. Une inhibition complète des populations bactériennes a été observée pour tous les lots de traitements ayant reçu une dose de 1 kGy. Lors de cette expérimentation, la meilleure combinaison de traitements, ayant permis d'obtenir les comptes totaux les plus faibles à la fin de la période d'analyse, a été un traitement d'irradiation de 1 kGy effectué sous MAP, sans l'application d'un enrobage sur les

carottes (figure 7B). Pour la plupart des lots de carottes irradiées, une hausse considérable des comptes totaux a été enregistrée entre les jours 7 et 14. Les carottes miniatures enrobées, conservées sous MAP et irradiées à 1 kGy ont démontré la plus importante augmentation pour les comptes totaux passant de < 10 à 10^4 - 10^6 UFC/g (tableau XIII).

La sensibilité à l'irradiation des populations bactériennes mésophiles totales contenues dans des carottes enrobées et non enrobées, puis emballées sous deux conditions atmosphériques différentes est illustrée à la figure 8. Une valeur de D_{10} a été déterminée pour chaque combinaison de traitements représentant la dose requise pour réduire les populations bactériennes mésophiles totales d'un log. Ces dernières présentes dans les carottes non enrobées et irradiées sous MAP ont démontré la plus grande sensibilité à l'irradiation avec une D_{10} de 0.24 kGy (figure 8B). Le lot correspondant d'échantillons irradiés sous air a affiché une D_{10} de 0.28 kGy, alors que la sensibilité à l'irradiation pour les deux lots de carottes enrobées et conservées sous air et sous MAP a été évaluée à une valeur de D_{10} de 0.26 kGy. Ces valeurs similaires de D_{10} obtenues pour chacun des lots de traitements semblent démontrer l'effet limité du conditionnement modifié employé sur les populations bactériennes mésophiles totales. Enfin, les données regroupées dans la figure 8 ont permis de définir qu'une dose de 0.75 kGy est suffisante pour abaisser la flore mésophile totale des carottes miniatures sous la limite de détection (< 10 UFC/g).

2) Aspect physique

Les effets combinés de l'irradiation et d'un emballage, sous MAP ou sous air, sur le blanchiment des carottes miniatures enrobées et non enrobées sont représentés à la figure 9. Les carottes non enrobées, irradiées et conservées sous MAP de même que les carottes enrobées, irradiées à 0.5 kGy et emballées sous les mêmes conditions n'ont montré aucune réaction de blanchiment entre le jour 1 et le jour 21. Pour ces deux jours d'échantillonnage, aucune différence significative ($p > 0.05$) de l'indice de blanchiment (WI) n'a été observée (tableau XIV). Toutefois, l'ensemble des autres lots ont affiché une hausse significative ($p \leq 0.05$) de blanchiment au cours de l'entreposage.

Les augmentations significatives ($p \leq 0.05$) les plus élevées de blanchiment tout au long de l'entreposage ont été observées avec les échantillons non enrobés et conservés sous air (figure 9A). Une hausse des valeurs de WI de 70.31% (18.93 à 32.24), 67.58% (20.73 à 34.74) et 60.68% (21.16 à 34) a été enregistrée entre le jour 1 et le jour 21 pour les lots correspondant au contrôle et aux échantillons traités à 0.5 et 1 kGy respectivement. Une valeur moyenne de WI de 34 a été recueillie au jour 21 quelle que soit la dose d'irradiation employée. Ces valeurs similaires de ces lots irradiés et du contrôle suggèrent qu'un traitement d'irradiation n'a pas d'influence sur le blanchiment à la surface des carottes miniatures.

L'application d'un enrobage comestible sur des carottes miniatures conservées sous air a permis de retarder le blanchiment du légume prêt à manger (figure 9C). Le développement du blanchiment n'a augmenté de seulement 22.70% (21.23 au jour 1 à 26.05 au jour 21) pour les échantillons enrobés et non irradiés en comparaison à 70.31% pour le lot correspondant d'échantillons non enrobés. Par ailleurs, l'analyse statistique a démontré une différence significative ($p \leq 0.05$) pour les 21 jours d'entreposage entre les indices de blanchiment des carottes enrobées et non enrobées puis conservées sous air ambiant. Un traitement d'irradiation apposé sur des carottes enrobées, conservées sous air, n'a pas eu d'impact majeur sur le blanchiment des carottes au cours de l'entreposage. Une différence significative ($p \leq 0.05$), entre le contrôle et les échantillons irradiés, n'a

été observée seulement qu'au jour 7, quelle que soit la dose d'irradiation, alors qu'au jour 21, cette différence a été notée entre le contrôle et les échantillons traités à 1 kGy. Parmi ce groupe de carottes enrobées et conservées sous air, le lot irradié à 1 kGy a affiché la hausse la plus élevée de blanchiment au cours de l'entreposage, correspondant à 39.60% (21.64 au jour 1 à 30.21 au jour 21) (tableau XIV).

Une augmentation similaire a été observée pour les lots non irradiés de carottes emballées sous MAP après 21 jours étant de l'ordre de 35.17% (20.47 au jour 1 à 27.67 au jour 21) pour les carottes non enrobées et de 38.61% (21.24 au jour 1 à 29.44 au jour 21) pour celles enrobées. L'ajout d'un traitement d'irradiation aux lots de carottes emballées sous MAP (enrobées ou non enrobées) a eu peu d'impact sur le phénomène de coloration blanchâtre des légumes. Pour les carottes non enrobées, une différence significative ($p \leq 0.05$) a été notée au jour 1, entre le contrôle et les deux lots irradiés, ainsi qu'au jour 21 entre le témoin et le lot irradié à 1 kGy. Quant aux carottes enrobées et conservées sous MAP, aucun effet significatif ($p > 0.05$) sur le développement de blanchiment n'a été enregistré, excepté au jour 1, entre le contrôle et les échantillons traités à 0.5 kGy, et au jour 21 entre le lot témoin et les carottes traitées à 1 kGy. Ainsi, puisque cette analyse statistique n'a pas démontré clairement d'effets constants d'un traitement d'irradiation, tout au long de l'entreposage des carottes, sur leur blanchiment, les résultats récoltés permettent d'affirmer que l'irradiation n'a pas d'impact favorisant l'accroissement de la coloration blanchâtre des carottes miniatures.

Les effets combinés d'un emballage, sous MAP ou sous air, et de l'irradiation sur la fermeté des carottes miniatures enrobées et non enrobées sont démontrés à la figure 10. De façon générale, une baisse significative ($p \leq 0.05$) de la fermeté a été observée pour tous les lots de carottes miniatures pendant l'entreposage. Cette diminution est représentée par l'obtention de faibles forces requises pour briser les tissus végétaux des carottes. Toutefois, 42% (5/12 lots) des échantillons ont affiché une augmentation significative ($p \leq 0.05$) de leur fermeté entre le jour 7 et le jour 14 (tableau XV). Ces échantillons correspondaient aux lots suivants:

- 1) carottes non enrobées – MAP – 0 kGy;
- 2) carottes non enrobées – MAP – 1 kGy;
- 3) carottes non enrobées – air – 0.5 kGy;
- 4) carottes enrobées – MAP – 0 kGy;
- 5) carottes enrobées – air – 0 kGy.

Parmi ces lots, le groupe contrôle et celui irradié à 1 kGy des carottes non enrobées et emballées sous MAP ont démontré les hausses les plus importantes de fermeté s'élevant à 27.69% (1669.83 N au jour 7 à 2132.20 N au jour 14) à 27.45% (1530.20 N au jour 7 à 1950.23 N au jour 14) respectivement. Une diminution significative ($p \leq 0.05$) de la fermeté des échantillons a été notée pour l'ensemble des 12 lots, quel que soit le traitement subi, entre le jour 14 et le jour 21.

Pour les carottes non enrobées et conservées sous air, les pertes de fermeté enregistrées entre le début et la fin de l'entreposage ont affiché des valeurs similaires pour le contrôle (17.54%; 2000.59 N à 1649.61 N), les carottes irradiées à 0.5 kGy (16.35%; 1911.32 N à 1598.87 N) et à 1 kGy (18.40%; 1884.99 N à 1538.21 N) (tableau XV, figure 10A). En ce qui a trait au groupe de carottes enrobées et conservées dans les mêmes conditions, un traitement d'irradiation de 0.5 kGy n'a pas eu d'effet significatif ($p > 0.05$) sur la texture des légumes, excepté au jour 14. Quant au lot irradié à 1 kGy, l'analyse statistique a démontré une différence significative ($p \leq 0.05$) entre le lot témoin et les échantillons traités à 1 kG pour toute la durée de la période d'analyse (tableau XV). Bien que ces carottes enrobées et conservées sous air aient affiché une perte considérable de texture suite à l'application d'une dose d'irradiation de 1 kGy, la baisse de fermeté observée pour les 21 jours d'échantillonnage pour ces carottes a été la plus faible parmi tous les lots, soit 15.80% (1796.10 N au jour 1 à 1512.27 N au jour 21). Cependant, puisque aucune différence significative ($p > 0.05$) n'a été obtenue entre les valeurs des forces pour les carottes enrobées et non enrobées, emballées sous air; l'enrobage et l'irradiation semblent n'avoir aucune influence sur la fermeté des échantillons conservés sous air ambiant. Par ailleurs, les valeurs des forces nécessaires pour briser les tissus

végétaux, qui ont été récoltées au jour 21 pour ces deux groupes d'échantillons, sont très semblables (tableau XV).

La perte significative ($p \leq 0.05$) de fermeté la plus considérable notée pour les 21 jours d'entreposage a été observée pour les carottes enrobées, emballées sous MAP et non irradiées dont la force de rupture est passée de 2015.46 N à 1063.01 N, correspondant à une baisse de 47.26% (tableau XV). Quand un traitement d'irradiation a été appliqué à ces carottes, un effet significatif ($p \leq 0.05$) a été noté par rapport au contrôle tout au long de l'entreposage, excepté au jour 7 pour la dose 0.5 kGy et au jour 21 pour la dose 1 kGy. Pour les carottes non enrobées et emballées sous MAP, les pertes de fermeté, calculées à la fin de la période d'entreposage, correspondent à des valeurs similaires pour les trois lots: 23.65% pour le lot témoin (1780.84 N à 1359.67 N), 22.15% pour les carottes irradiées à 0.5 kGy (1728.96 N à 1345.93 N) et 29.95% pour celles irradiées à 1 kGy (1776.84 N à 1244.64 N). Les traitements d'irradiation de 0.5 et 1 kGy ont eu un effet significatif ($p \leq 0.05$) sur la texture seulement au jour 7 et 14. Enfin, les résultats recueillis concernant les carottes emballées sous MAP ont démontré que ce type de conditionnement avait un effet dommageable sur la texture des carottes miniatures après 14 jours d'entreposage de ces dernières (figure 10B et D).

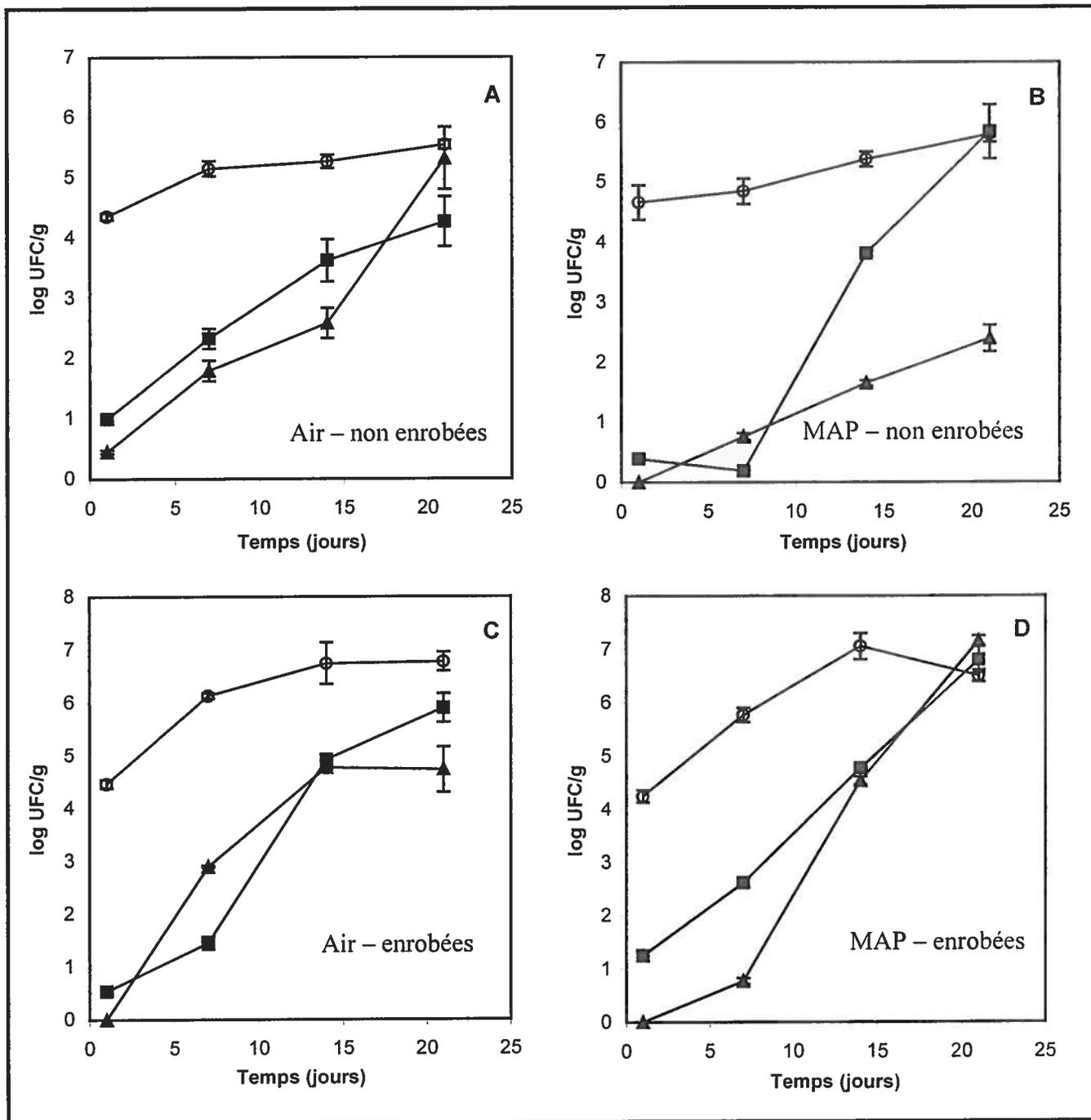


Figure 7. Effet de l'irradiation sur les populations bactériennes mésophiles totales de carottes miniatures non enrobées (A et B) et enrobées (C et D), emballées sous air (A et C) ou sous MAP (B et D) pour une période de 21 jours d'entreposage à 4°C. ○ = 0 kGy. ■ = 0.5 kGy. ▲ = 1 kGy.

Tableau XIII. Effet d'un traitement d'irradiation couplé à un emballage sous MAP sur les populations bactériennes mésophiles totales de carottes miniatures non enrobées et enrobées, puis entreposées à 4°C pendant 21 jours.

Traitements		Comptes totaux ^a				
		Jour 1	Jour 7	Jour 14	Jour 21	
<i>Carottes non enrobées</i>						
MAP	0 kGy	+++	+++	+++	+++	
	0.5 kGy	-	-	++	+++	
	1 kGy	-	-	+	++	
Air	0 kGy	+++	+++	+++	+++	
	0.5 kGy	+	++	++	+++	
	1 kGy	-	+	++	+++	
<i>Carottes enrobées</i>						
MAP	0 kGy	+++	+++	++++	++++	
	0.5 kGy	+	++	+++	++++	
	1 kGy	-	-	+++	++++	
Air	0 kGy	+++	++++	++++	++++	
	0.5 kGy	-	+	+++	+++	
	1 kGy	-	++	+++	+++	

^a Signification des valeurs (UFC/g) : (-) < 10 ; (+) 10¹-10² ; (++) 10²-10⁴ ; (+++) 10⁴-10⁶ ; (++++) 10⁶-10⁸.

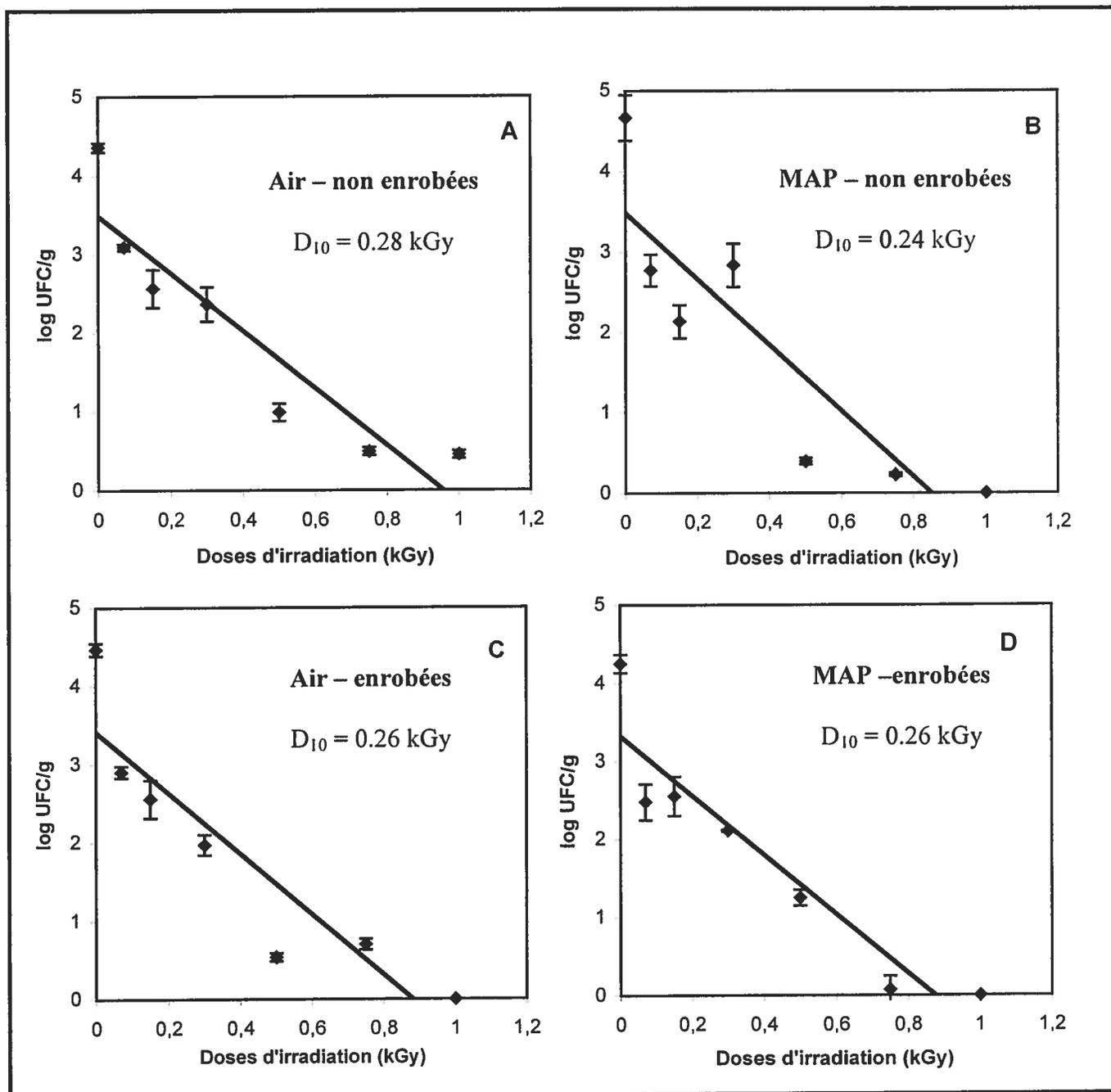


Figure 8. Sensibilité à l'irradiation des populations bactériennes mésophiles totales présentes sur des carottes miniatures non enrobées (A et B) et enrobées (C et D), conservées sous air (A et C) ou sous MAP (B et D).

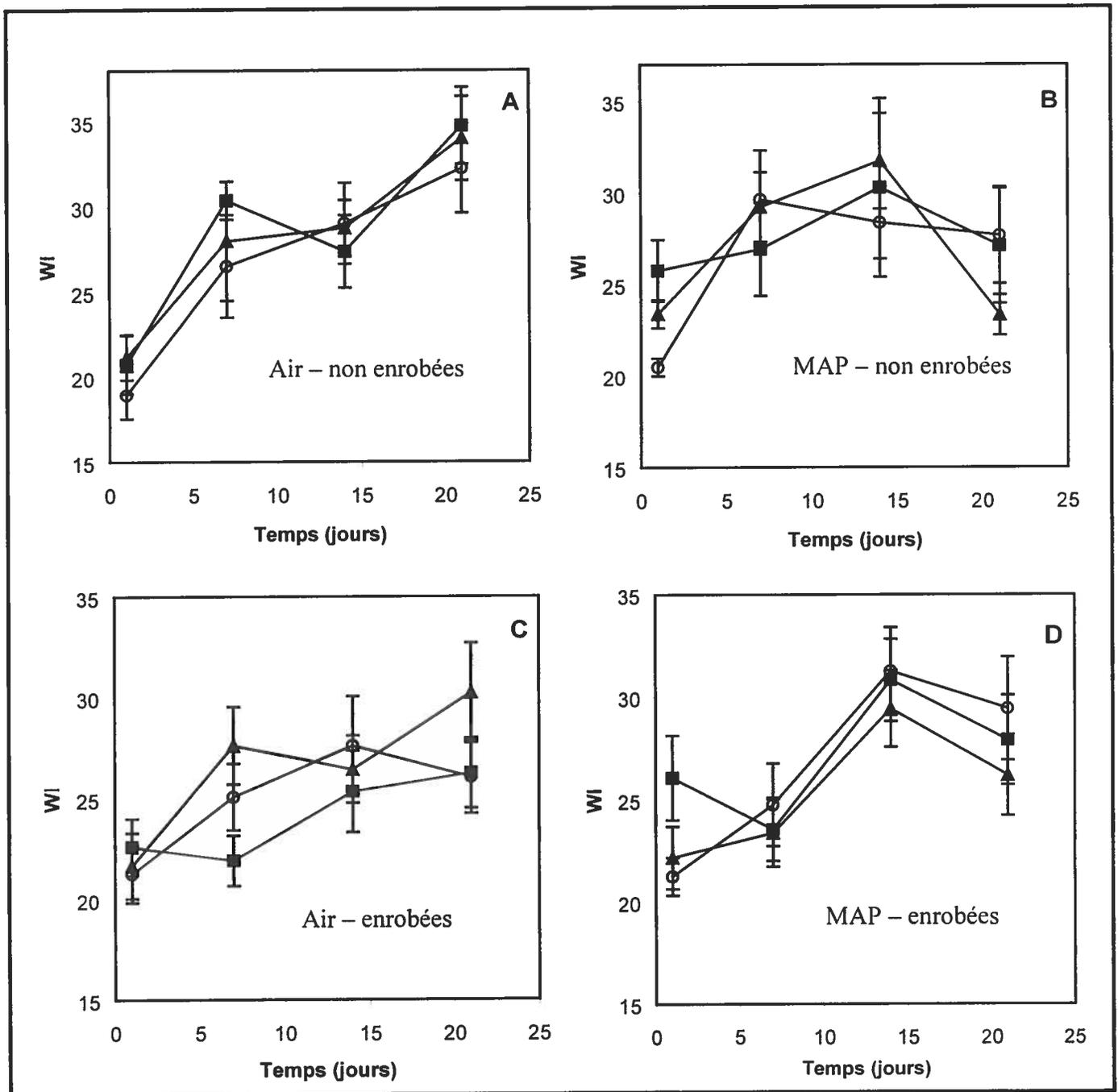


Figure 9. Suivi de la coloration blanchâtre de carottes non enrobées (A et B) et enrobées (C et D), traitées avec trois doses d'irradiation, emballées sous air (A et C) ou sous MAP (B et D) puis conservées à 4°C. ○ = 0 kGy. ■ = 0.5 kGy. ▲ = 1 kGy.

Tableau XIV. Effet d'un traitement d'irradiation couplé à un emballage, sous MAP ou sous air, sur le blanchiment de carottes miniatures non enrobées et enrobées, puis entreposées à 4°C pendant 21 jours.

Traitements		Indice de blanchiment (WI) ^{1,2}			
		Jour 1	Jour 7	Jour 14	Jour 21
<i>Carottes non enrobées</i>					
MAP	0 kGy	20.47 ± 0.49 ^A	29.64 ± 2.65 ^B	28.37 ± 1.97 ^A	27.67 ± 2.63 ^A
	0.5 kGy	25.76 ± 1.68 ^B	26.92 ± 2.54 ^A	30.28 ± 4.87 ^B	27.10 ± 3.14 ^{AB}
	1 kGy	23.39 ± 0.76 ^C	29.22 ± 1.90 ^B	31.73 ± 2.60 ^A	23.33 ± 1.11 ^B
Air	0 kGy	18.93 ± 1.41 ^d	26.52 ± 3.01 ^B	29.01 ± 2.37 ^B	32.24 ± 2.61 ^C
	0.5 kGy	20.73 ± 1.73 ^C	30.37 ± 1.11 ^B	27.37 ± 2.13 ^B	34.74 ± 2.27 ^D
	1 kGy	21.16 ± 1.34 ^C	27.98 ± 3.49 ^B	28.74 ± 1.64 ^B	34.00 ± 2.48 ^C
<i>Carottes enrobées</i>					
MAP	0 kGy	21.24 ± 0.92 ^f	24.75 ± 2.02 ^B	31.26 ± 2.14 ^C	29.44 ± 2.51 ^d
	0.5 kGy	26.07 ± 2.07 ^g	23.55 ± 1.55 ^B	30.82 ± 2.00 ^C	27.91 ± 2.18 ^{de}
	1 kGy	22.17 ± 1.53 ^f	23.37 ± 1.65 ^A	29.43 ± 1.86 ^B	26.20 ± 1.97 ^e
Air	0 kGy	21.23 ± 1.42 ^h	25.08 ± 1.65 ^d	27.61 ± 2.42 ^d	26.05 ± 1.82 ^f
	0.5 kGy	22.57 ± 1.40 ^h	21.90 ± 1.26 ^A	25.33 ± 2.04 ^B	26.24 ± 1.74 ^f
	1 kGy	21.64 ± 1.63 ^h	27.61 ± 1.90 ^f	26.43 ± 1.67 ^{de}	30.21 ± 2.47 ^g

¹ Les moyennes à l'intérieur d'une colonne, pour chaque atmosphère combinée avec un traitement d'irradiation, affichant une lettre minuscule différente, sont significativement différentes ($p \leq 0.05$) tel que déterminé par le test de Duncan ou le test t de Student. ² Les moyennes de chaque ligne affichant une lettre majuscule différente, pour la période d'échantillonnage, sont significativement différentes ($p \leq 0.05$).

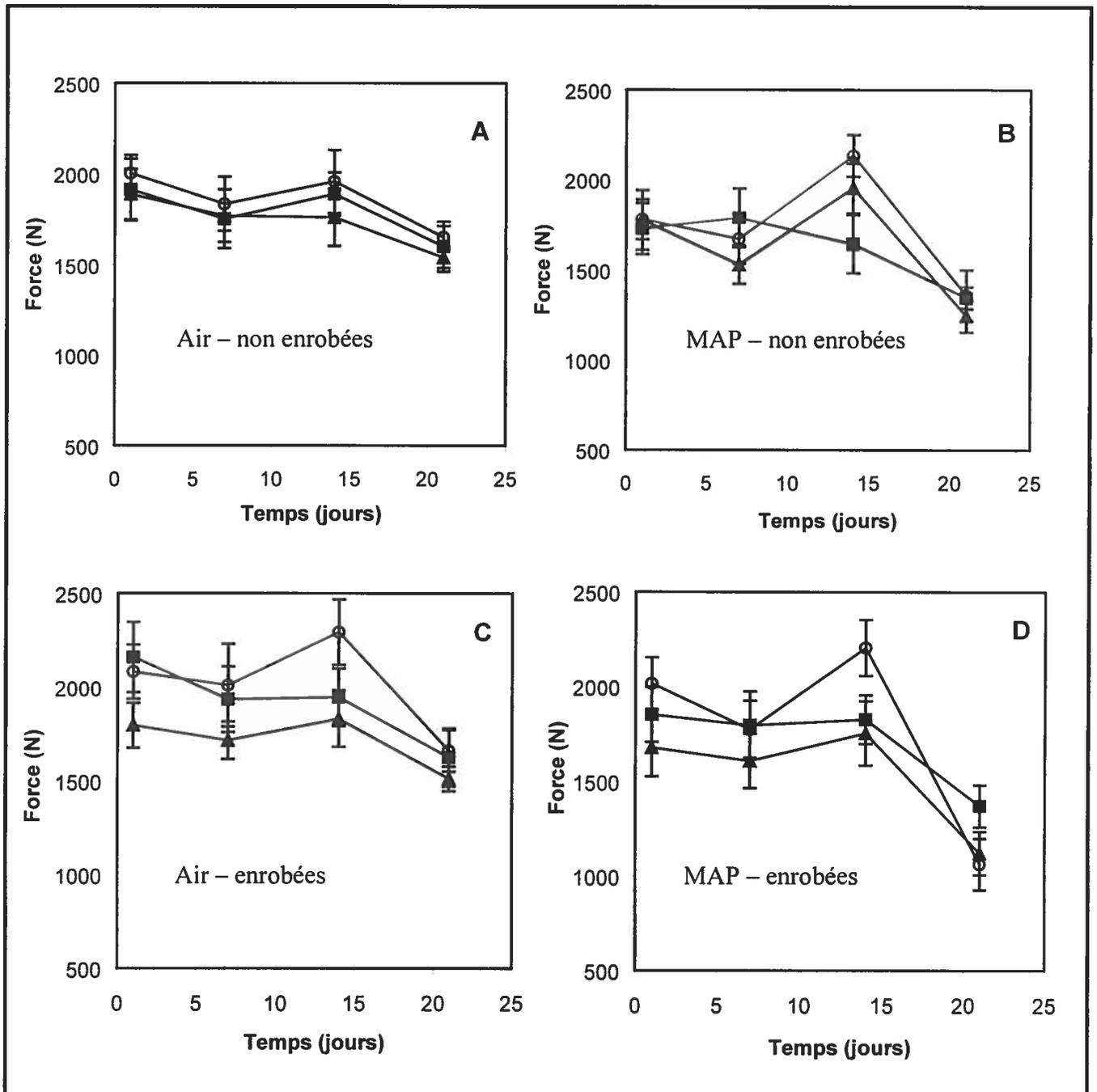


Figure 10. Suivi de la fermeté de carottes non enrobées (A et B) et enrobées (C et D), traitées avec trois doses d'irradiation, emballées sous air (A et C) ou sous MAP (B et D), puis conservées à 4°C.

○ = 0 kGy. ■ = 0.5 kGy. ▲ = 1 kGy.

Tableau XV. Effet d'un traitement d'irradiation couplé à un emballage, sous MAP ou sous air, sur la texture de carottes miniatures non enrobées et enrobées, puis entreposées à 4°C pendant 21 jours.

Traitements	Force (N) ^{1,2}			
	Jour 1	Jour 7	Jour 14	Jour 21
<i>Carottes non enrobées</i>				
MAP				
0 kGy	1780.84 ± 110.70 ^a A	1669.83 ± 133.86 ^a B	2132.20 ± 118.54 ^a C	1359.67 ± 142.07 ^a D
0.5 kGy	1728.96 ± 141.81 ^a A	1787.71 ± 163.96 ^b A	1643.50 ± 159.18 ^b A	1345.93 ± 61.42 ^a B
1 kGy	1776.84 ± 164.47 ^a A	1530.20 ± 104.67 ^b B	1950.23 ± 137.93 ^c C	1244.64 ± 88.38 ^a D
Air				
0 kGy	2000.59 ± 99.99 ^b A	1832.12 ± 148.65 ^d B	1955.38 ± 174.33 ^d AB	1649.61 ± 62.35 ^b C
0.5 kGy	1911.32 ± 170.32 ^b A	1749.71 ± 160.45 ^d B	1887.05 ± 118.00 ^{de} A	1598.87 ± 137.65 ^{bc} C
1 kGy	1884.99 ± 138.47 ^b A	1767.57 ± 144.05 ^d A	1759.33 ± 156.79 ^e A	1538.21 ± 57.62 ^b B
<i>Carottes enrobées</i>				
MAP				
0 kGy	2015.46 ± 138.35 ^a A	1773.98 ± 150.05 ^e B	2205.07 ± 148.57 ^f C	1063.01 ± 135.82 ^d D
0.5 kGy	1852.37 ± 145.24 ^d A	1795.72 ± 177.22 ^e A	1826.62 ± 128.10 ^g A	1371.44 ± 111.13 ^e B
1 kGy	1677.51 ± 149.91 ^e A	1608.02 ± 143.26 ^f A	1754.03 ± 168.90 ^g A	1121.61 ± 114.80 ^d B
Air				
0 kGy	2081.68 ± 144.23 ^f A	2009.74 ± 220.71 ^g A	2292.43 ± 175.54 ^h B	1661.81 ± 110.73 ^f C
0.5 kGy	2158.99 ± 187.66 ^f A	1934.21 ± 174.46 ^g B	1945.08 ± 152.92 ⁱ B	1625.76 ± 153.98 ^{fg} C
1 kGy	1796.10 ± 119.49 ^g A	1716.75 ± 98.76 ^h A	1831.20 ± 149.11 ⁱ A	1512.27 ± 65.31 ^g B

¹ Les moyennes à l'intérieur d'une colonne, pour chaque atmosphère combinée avec un traitement d'irradiation, affichant une lettre minuscule différente, sont significativement différentes ($p \leq 0.05$) tel que déterminé par le test de Duncan ou le test t de Student. ² Les moyennes de chaque ligne affichant une lettre majuscule différente, pour la période d'échantillonnage, sont significativement différentes ($p \leq 0.05$).

3.2 IDENTIFICATIONS BACTÉRIENNES

3.2.1 Analyse biochimique

L'objectif premier d'entreprendre des identifications bactériennes a été de préciser la nature des bactéries, produisant des colonies jaunes, détectées lors de la première expérimentation. Ces micro-organismes ont été isolés de carottes râpées, conservées à 10°C, ayant reçu un pré-traitement d'irradiation de 5 kGy comme étape de stérilisation. Puisque plusieurs répétitions de cette expérience ont été effectuées et que les mêmes formes cultivables de bactéries ont été observées, la détermination de la nature de ces bactéries permettra de confirmer si toutes les formes cultivables isolées des échantillons analysés possèdent la même identité. Par ailleurs, une recherche élaborée sur leur identité définira si ces micro-organismes isolés sont susceptibles de se retrouver dans des carottes fraîches. Au total, sept morphologies coloniales ont été étudiées dont la divergence était marquée davantage au niveau de la couleur allant du beige au jaune foncé. Pour l'identification, ces colonies ont été prélevées à partir des milieux solides TSA utilisés pour le dénombrement des bactéries *E. coli* lors de l'expérience sur les carottes râpées. De façon générale, les colonies affichaient un diamètre de 1 à 3 mm et étaient de forme circulaire avec rebords unis, translucides, de consistance visqueuse et de texture rugueuse. L'observation au stéréoscope a permis de déterminer le genre d'élévation de ces colonies qui était de type plateau.

Les identifications ont débuté par des tests conventionnels dont les données ont été compilées à travers le tableau XVI. À la lumière de ces résultats obtenus, une analyse de l'utilisation de substrats par les bactéries inconnues a été entreprise par l'emploi d'un système basé sur des tests biochimiques: les galeries API 20E. Les sept différentes colonies se sont avérées être de nature identique. Deux profils ont été récoltés avec les galeries API 20E: 1007333 et 1005333. Ces codes divergeaient dans la capacité de la bactérie à hydrolyser la gélatine à l'aide de l'enzyme gélatinase. Dans certains cas, le profil à sept chiffres est insuffisamment discriminant et par conséquent, d'autres tests complémentaires sont nécessaires tels que:

- réduction des nitrates en nitrites
- réduction des nitrates en azote
- mobilité
- culture sur gélose Mac Conkey
- oxydation du glucose
- fermentation du glucose

Pour les identifications entreprises lors de ce projet de recherche, les tests de mobilité et les tests de culture sur milieu Mac Conkey avaient été effectués avant l'emploi des galeries API 20E. Ainsi, les résultats recueillis à partir de ces deux tests ont servi de complément aux profils obtenus avec le système miniaturisé API 20E. La consultation du catalogue analytique pour galeries API 20E, avec les codes 1007333 et 1005333, a permis d'identifier l'inconnue comme étant *Enterobacter agglomerans*, alors qu'avec le logiciel APILAB+, les deux codes correspondaient au genre *Pantoea* spp. à 99.4% et à 99.8% respectivement.

Une recherche élaborée à partir de l'identité de cette bactérie a permis de définir que l'espèce *Enterobacter agglomerans* est le synonyme de *Pantoea agglomerans*. Donc, l'identité de la forme bactérienne cultivable, donnant des colonies jaunes, est *P. agglomerans*. Cette bactérie est grandement distribuée dans la nature et peut être isolée de la surface des plantes, des semences, des légumes, du sol, du sang et d'urine d'animaux et d'humains malades. Ce micro-organisme est un pathogène humain opportuniste et est reconnu comme un phytopathogène. Enfin, le fait que cette bactérie ait été isolée des carottes analysées lors de l'expérimentation demeure plausible et n'est donc pas la cause d'une contamination externe. Toutefois, sa détection implique que *P. agglomerans* semble être capable de résister à de fortes doses d'irradiation puisqu'un pré-traitement de 5 kGy avait été apposé aux carottes dans le but d'éliminer la flore endogène des légumes.

Tableau XVI. Résultats des tests conventionnels d'identification effectués sur les bactéries inconnues produisant des colonies jaunes.

Tests	Caractéristiques
Coloration Gram	Bâtonnet Gram négatif 0.5-1.0 x 1-3 μm
État frais	Mobile avec ciliature péritriche
Isolement sur milieu Mac Conkey	Croissance +
	Fermentation du lactose + (colonies rouges)
Oxydase	-
Catalase	+

3.2.2 Isolement de la bactérie *P. agglomerans* dans des carottes râpées irradiées à 5 kGy

Cette expérience a été réalisée afin de vérifier si *P. agglomerans* peut être présente dans la flore endogène de carottes autres que celles employées pour l'étude portant sur l'effet de l'irradiation sur la bactérie *E. coli*,ensemencée dans des carottes râpées conservées à 10°C. Les analyses ont été effectuées sur une période de 12 jours puisque le micro-organisme apparaissait après 7 jours d'entreposage des carottes. Au total, huit marques de carottes ont été étudiées pour l'isolement du phytopathogène accompli dans les mêmes conditions observées précédemment. Ces carottes ont été achetées sous la forme de carottes miniatures, de carottes entières avec ou sans feuillage ainsi que des carottes râpées et prêtes à la cuisson. Les résultats sont présentés à la figure 11.

Après 7 jours d'analyse, les milieux solides TSA ont révélé la présence de colonies jaunes, isolées des échantillons de carottes. Les identifications ont confirmé qu'environ 60% des carottes à l'étude renfermaient la bactérie *P. agglomerans* dans leur flore endogène. Pour les variétés de carottes ne démontrant pas la présence de la bactérie, les analyses ont été prolongées jusqu'au 12^e jour d'entreposage. Après cette période de temps, l'apparition du phytopathogène n'était toujours pas observée pour trois marques de carottes testées. La présence ou l'absence de la bactérie *P. agglomerans* a été notée autant pour des carottes produites aux États-Unis qu'au Canada (tableau XVII). Par ailleurs, les carottes avec feuillage vendues sans emballage ont affiché des comptes élevés de *P. agglomerans*.

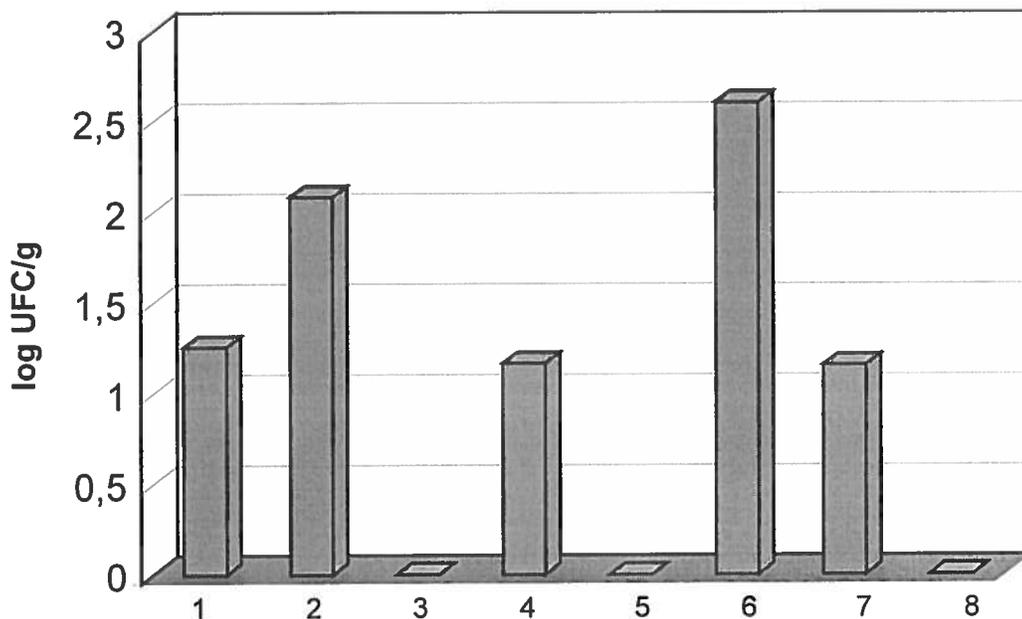


Figure 11. Dénombrement de la bactérie *P. agglomerans* obtenu après 7 jours d'entreposage à 10°C des carottes provenant de huit marques différentes.

Tableau XVII. Origine des échantillons de carottes analysées et valeurs des dénombrements de la bactérie *P. agglomerans* après 7 jours d'entreposage des carottes à 10°C.

Variétés	Origine	log UFC/g
1	Californie	1.26 ± 0.10
2	Laval	2.09 ± 0.25
3	Ontario	< 10
4	Sherrington	1.17 ± 0.55
5	Californie	< 10
6	Californie	2.61 ± 0.25
7	Mirabel	1.16 ± 0.12
8	St-Roch de l'Achigan	< 10

3.2.3 Analyse génétique

L'expérience précédente a permis d'établir que *P. agglomerans* compose majoritairement la flore épiphytique des carottes. Toutefois, ce micro-organisme a été isolé, lors de la première expérimentation, après avoir survécu à un traitement d'irradiation de 5 kGy. Ainsi, dans le but éventuel d'expliquer cette résistance à l'irradiation par des études davantage élaborées, une analyse génétique a été entreprise afin de s'assurer de l'exactitude des résultats obtenus lors des identifications par une analyse biochimique. Pour ce faire, la caractérisation de la bactérie *P. agglomerans* par séquençage du gène de l'ARNr 16S a été réalisée. L'isolat bactérien ayant servi à cette analyse génétique provenait d'un échantillon de carottes fraîches produites au Canada (se référer à la section 3.2.2).

Une amplification élective *in vitro* a été réalisée suite à l'extraction de l'ADN chromosomique de l'isolat bactérien. Cette réaction de PCR a été accomplie avec les amorces universelles pA et pH. Un fragment de longueur attendu, soit de 1650 pb, a été obtenu (figure 12). Ce produit de PCR a ensuite été purifié et le résultat de la purification a été vérifié par une électrophorèse sur gel d'agarose 0.7%, pour finalement être séquencé. Une séquence de 785 pb a été obtenue avec l'amorce pA alors que le résultat du séquençage recueilli avec l'amorce pH s'élevait à 698 pb. À partir de ces séquences corrigées, une analyse de similitude avec les banques de données, à l'aide du programme BLAST, a été effectuée. Une liste de sept micro-organismes, possédant les séquences de leur gène ARNr 16S les plus similaires aux séquences obtenues du même gène provenant de l'isolat bactérien, a ensuite été dressée (tableau XVIII). Ces résultats confirment l'identité de la forme cultivable de bactéries, produisant des colonies jaunes, retrouvées dans des échantillons de carottes râpées comme étant *E. agglomerans* (synonyme de *P. agglomerans*).

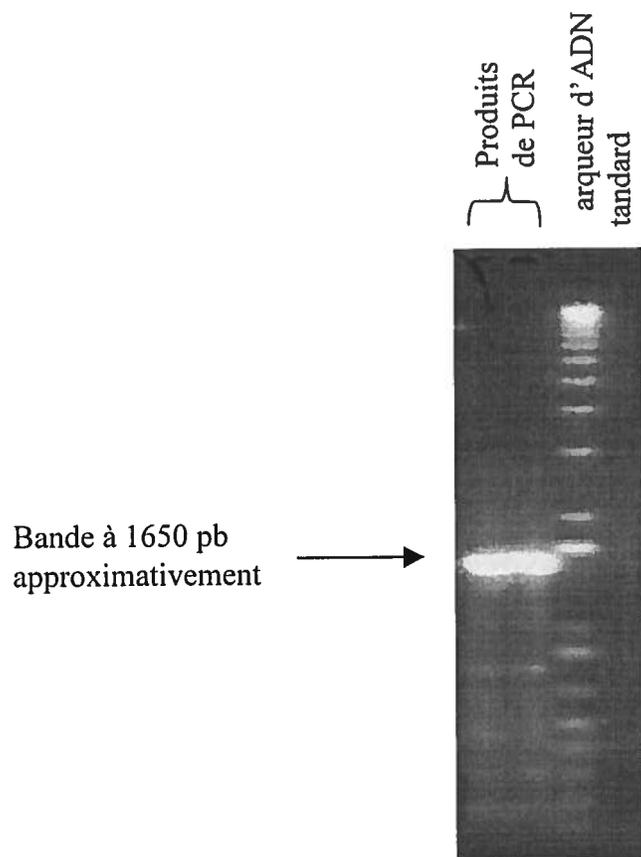


Figure 12. Produits d'amplification par PCR du gène de l'ARNr 16S de l'isolat bactérien *P. agglomerans*.

Tableau XVIII. Liste de micro-organismes dont la séquence de leur gène ARNr 16S est similaire aux séquences obtenues, à l'aide de l'amorce pA (A) et pH (B), du même gène provenant de l'isolat bactérien *P. agglomerans*.

A)

Micro-organismes	% d'homologie de séquence
Bactérie non identifiée (AB004759.1) ¹	98
<i>Pantoea ananatis</i> souche LMG 20103 (AF364847)	98
<i>Erwinia herbicola</i> (AB004757.1)	98
<i>Pantoea agglomerans</i> souche GSPB 450 (AF373197.1)	97
<i>Pantoea agglomerans</i> souche LMG 2565 (AF373196.1)	97
<i>Enterobacter agglomerans</i> souche A65 (AF130934)	97
Bactérie non cultivée L3-17C7 (AY048885.1)	98

B)

Micro-organismes	% d'homologie de séquence
<i>Enterobacter agglomerans</i> souche A17 (AF130896)	97
<i>Erwinia herbicola</i> (EHU80202)	97
<i>Enterobacter agglomerans</i> souche ATCC 27155 (AF130953)	97
<i>Enterobacter agglomerans</i> souche A83 (AF130947)	97
<i>Enterobacter agglomerans</i> souche A40 (AF130912)	97
<i>Enterobacter agglomerans</i> souche A59 (AF130929)	97
<i>Enterobacter agglomerans</i> souche A123 (AF130884)	97

¹ Le numéro d'accèsion à la banque de gènes GeneBank est indiqué entre parenthèses.

3.3 RADIORÉSISTANCE

3.3.1 Détermination de la D_{10} : courbes de survie des bactéries *P. agglomerans* et *E. coli*

Après avoir clairement établi l'identification de la bactérie *Pantoea agglomerans*, une étude a été entreprise afin de déterminer l'effet de différentes doses d'irradiation sur la survie de ce micro-organisme. Puisque au départ cette bactérie avait été isolée d'échantillons de carottes irradiées à 5 kGy, l'intervalle des doses utilisées pour l'expérience de la détermination de la D_{10} a été choisi en fonction de ces conditions. La variante du milieu d'irradiation a aussi été considérée, car cette expérimentation a été réalisée dans un bouillon nutritif (TSB) inoculé avec la bactérie par opposition aux carottes râpées. La sensibilité à l'irradiation, de la bactérie *E. coli*, a aussi été déterminée à des fins de comparaison, puisque ce micro-organisme est très sensible aux rayons ionisants et qu'il est une bactérie à Gram négatif comme *P. agglomerans*. Les courbes de survie à l'irradiation des deux bactéries sont démontrées à la figure 13 (tableaux XIX et XX).

Une valeur de D_{10} a été déterminée, pour chacun des micro-organismes, représentant la dose requise pour réduire les populations bactériennes d'un log. Avec la bactérie *E. coli*, une D_{10} de 0.107 kGy a été obtenue. Quant à *P. agglomerans*, une dose de 0.516 kGy a été nécessaire pour réduire la charge microbienne d'un facteur de 10. Cette valeur de D_{10} est cinq fois plus élevée que celle recueillie pour la bactérie *E. coli*. Ces résultats suggèrent que le micro-organisme *P. agglomerans* est cinq fois plus résistant à l'irradiation qu'*E. coli*, malgré le fait que ces deux bactéries appartiennent à la même famille; soit les Entérobactéries. Par ailleurs, à travers la figure 13, les données obtenues ont permis d'affirmer qu'une dose de 0.9 kGy est suffisante pour abaisser les populations d'*E. coli* sous la limite de détection (< 10 UFC/ml) alors que pour le phytopathogène *P. agglomerans*, une dose supérieure à 4.5 kGy est nécessaire.

Ces résultats démontrent bien que la bactérie *P. agglomerans* est résistante à des fortes doses d'irradiation. Puisque ce micro-organisme fait partie de la microflore épiphytique des carottes, une dose de 5 kGy appliquée à des carottes râpées ne semble donc pas suffisante pour enrayer les populations bactériennes de *P. agglomerans*.

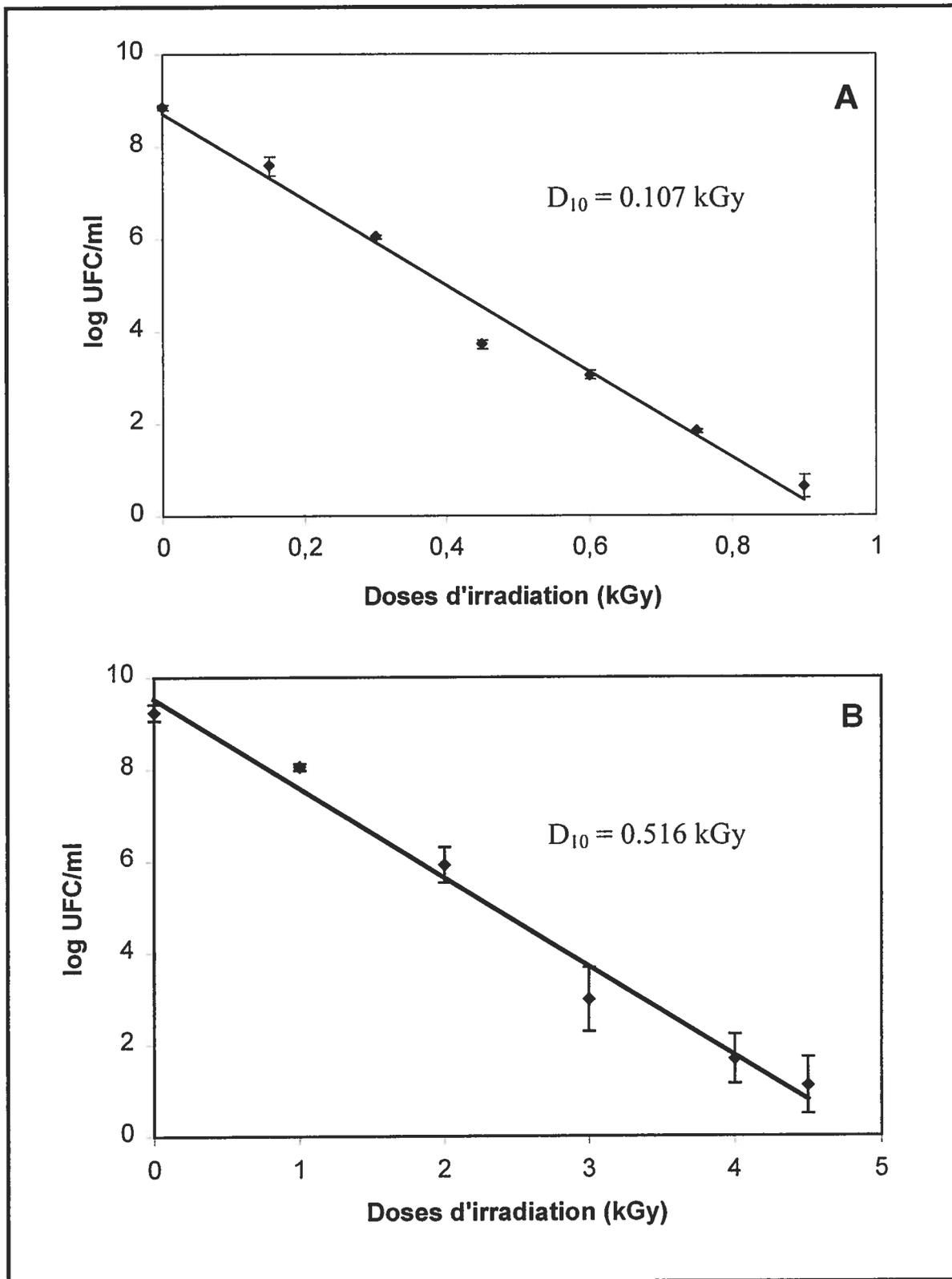


Figure 13. Sensibilité à l'irradiation des bactéries *E. coli* (A) et *P. agglomerans* (B) irradiées dans le bouillon nutritif TSB.

Tableau XIX. Sensibilité à l'irradiation de la bactérie *E. coli* irradiée dans le bouillon nutritif TSB.

Doses d'irradiation (kGy)	log UFC/ml
0	8.85 ± 0.06
0.15	7.58 ± 0.20
0.30	6.05 ± 0.05
0.45	3.72 ± 0.10
0.60	3.05 ± 0.09
0.70	1.83 ± 0.04
0.90	0.63 ± 0.24

Tableau XX. Sensibilité à l'irradiation de la bactérie *P. agglomerans* irradiée dans le bouillon nutritif TSB.

Doses d'irradiation (kGy)	log UFC/ml
0	9.23 ± 0.18
1	8.05 ± 0.08
2	5.92 ± 0.38
3	2.98 ± 0.69
4	1.69 ± 0.54
4.5	1.10 ± 0.62

3.3.2 Adaptation de la bactérie *Pantoea agglomerans* à l'irradiation

Les résultats obtenus avec la courbe de survie à l'irradiation du micro-organisme *Pantoea agglomerans* ont démontré que cette bactérie peut résister à de fortes doses d'irradiation. En revanche, une expérience a été entreprise afin de déterminer si des cellules microbiennes, ayant préalablement reçu une dose d'irradiation, peuvent développer une résistance à un traitement d'irradiation subséquent. Le micro-organisme *P. agglomerans* a été soumis à des doses d'irradiation non létales (< 5 kGy) et le taux de survie a été calculé suite au traitement. Puisque l'ADN est la cible principale des rayons ionisants et que plusieurs protéines semblent impliquées dans sa réparation, un antibiotique bloquant la traduction protéique bactérienne a été utilisé. Le chloramphénicol a été employé dans le but de vérifier si la synthèse protéique est nécessaire à *P. agglomerans* pour résister à des traitements d'irradiation.

Le taux de survie au stress d'irradiation (dose de 4 kGy) de la bactérie *P. agglomerans* (non adaptée) a été calculé. Ce même test de survie a été réalisé avec la bactérie adaptée. L'adaptation consistait en un pré-traitement d'irradiation de 2 kGy suivi d'une période de récupération de 24 heures à la température optimale de croissance (30°C) puis de l'application d'une seconde dose d'irradiation de 2 kGy totalisant 4 kGy. Les taux de survie pour chacun des groupes de traitements sont illustrés à la figure 14. Les bactéries adaptées ne semblent pas être plus résistantes à l'irradiation que celles non adaptées puisque les taux de survie mesurés ont été respectivement de 31.78% et 32.01%. L'addition de chloramphénicol a cependant réduit le nombre de survivants autant pour le groupe de bactéries adaptées (31.78% à 24.47%) que celui des non adaptées (32.01% à 25.84%). Ces résultats suggèrent fortement qu'un traitement d'irradiation appliqué à *P. agglomerans* n'induit pas de synthèse protéique chez ce micro-organisme pour contrer les effets néfastes des rayons ionisants.

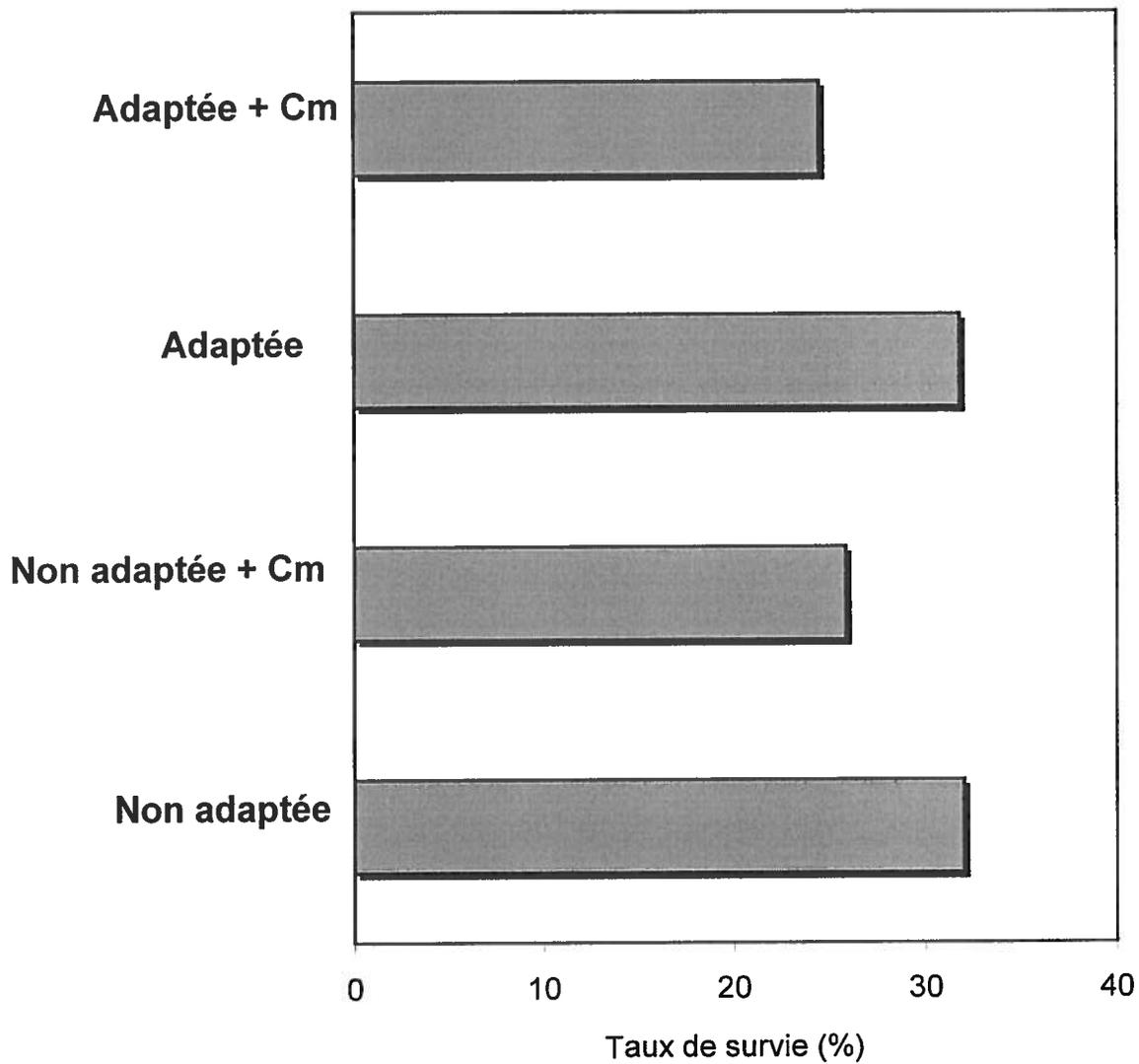


Figure 14. Taux de survie de la bactérie *P. agglomerans* pour chacun des groupes de traitements.

3.3.3 Analyse du protéome de *P. agglomerans*

Une analyse de la réponse au stress de l'irradiation de *P. agglomerans* a été entreprise par une approche protéomique. Cette étude était axée sur la mise en évidence de protéines pouvant intervenir dans la radiorésistance de *P. agglomerans*. Les résultats de l'analyse protéomique sont retrouvés aux figures 15 et 16. L'analyse a été divisée en deux parties. Dans un premier temps, des électrophorèses bidimensionnelles ont été effectuées dans le but d'observer la dynamique se produisant au niveau des protéines intracellulaires de la bactérie *P. agglomerans*, qui réapparaissait après 7 jours dans des carottes râpées suite à un traitement d'irradiation de 5 kGy. Pour ce faire, le micro-organisme a été cultivé dans les mêmes conditions que les carottes avaient été exposées lors de cette expérience (se référer à la section 2.3). Ainsi, *P. agglomerans* a subi une irradiation à 5 kGy sous des conditions de congélation, une décongélation à 4°C suivie d'une incubation à 10°C. Après la préparation des protéines de *P. agglomerans*, une pré-analyse, à l'aide d'un intervalle de pH de 3-10, a été préalablement réalisée afin de déterminer l'écart de pH où étaient regroupées la majorité des protéines. Puisque la plupart des protéines se trouvaient dans la région des valeurs de pH acide, les languettes de gradient de pH acide (4,0 à 7,0) ont été utilisées pour la séparation des protéines cytoplasmiques. Ainsi, la figure 15 démontre les gels contenant des protéines qui possèdent des valeurs de pI entre 5 et 6. De façon générale, les protéines semblent bien séparées et résolues sur l'ensemble de la surface des gels, alors que les stries horizontales sont peu apparentes. Visuellement, un patron de protéines a été observé pour les jours suivant l'irradiation et non pour la bactérie non irradiée (jour 0) (figure 15). Ce patron suggère que des protéines sont produites par *P. agglomerans* suite à un traitement d'irradiation de 5 kGy.

La deuxième analyse protéomique a été réalisée suite aux données obtenues avec la détermination de la D_{10} de *P. agglomerans*. Ainsi, des électrophorèses bidimensionnelles ont été accomplies avec des protéines cytoplasmiques de la bactérie non irradiée et irradiée à 3, 5 et 8 kGy. L'objectif premier était d'observer si des changements majeurs étaient produits en regard au contrôle suite à un traitement d'irradiation sous-létal (3 kGy) et létal (≥ 5 kGy). La figure 16 démontre les résultats recueillis. Les protéines semblent être davantage concentrées dans l'intervalle des pH acides. Les stries horizontales sont beaucoup plus présentes dans cette figure témoignant d'une résolution plus faible. Par la visualisation des gels, il a été possible de noter que des protéines semblent plus importantes, en terme de quantité (surface), et plus intenses (coloration) que d'autres. Toutefois, l'analyse des gels 2-D avec le logiciel ImageMaster 2-D Elite n'a pas démontré de variations majeures entre les différents gels dans le patron des protéines en comparaison avec le témoin.

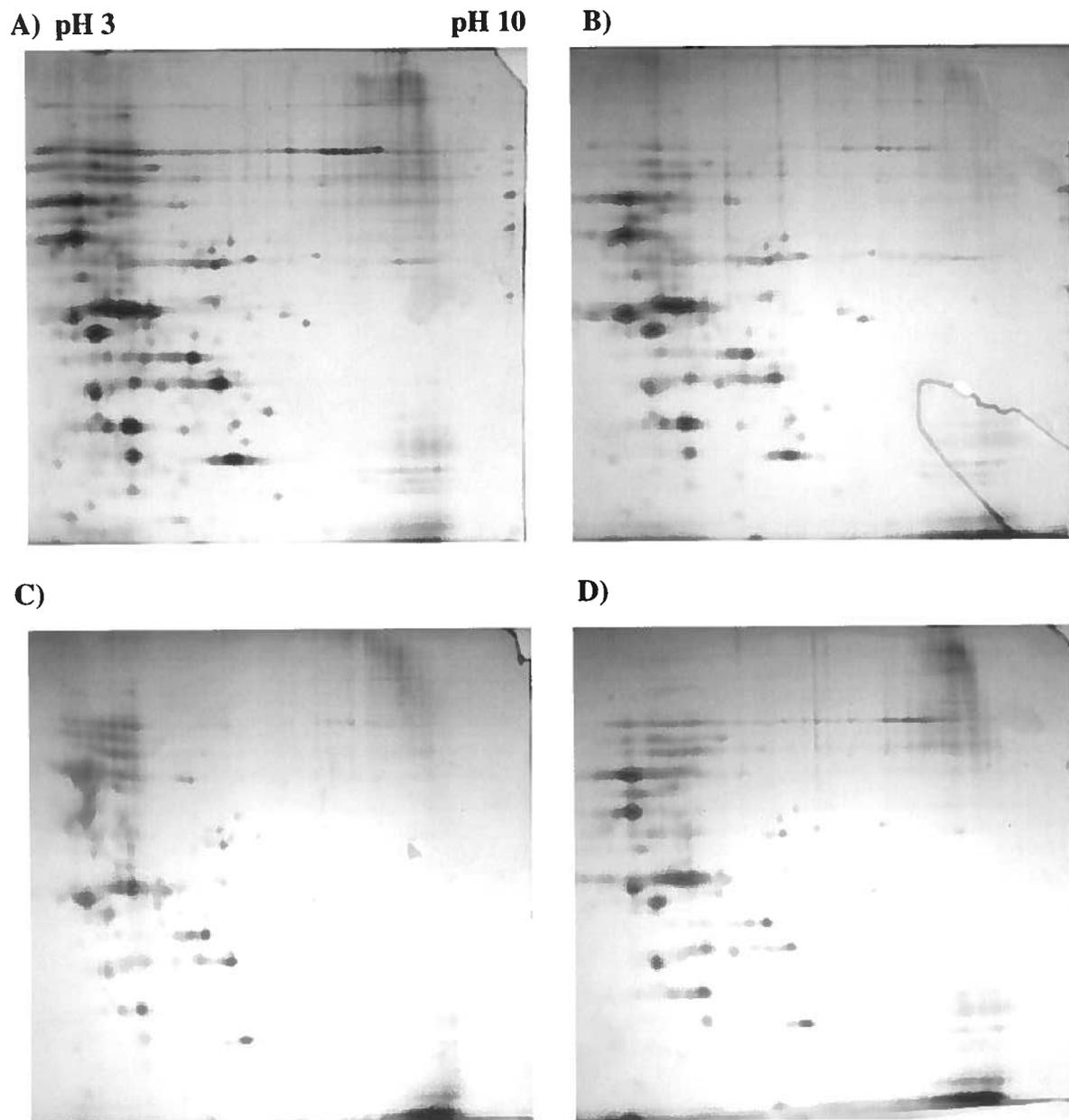


Figure 16. Gels en 2-D de pH 3 à 10 (18 cm) des protéines cytoplasmiques de la bactérie *P. agglomerans* non irradiée (A) et irradiée à 3 kGy (B), 5 kGy (C) et 8 kGy (D). La croissance des cellules a été effectuée dans le milieu TSB. Une quantité de 100 μ g de protéines a été incorporée dans chacun des gels.

3.3.4 Analyse par FT-IR des dommages causés à l'ADN de la bactérie *P. agglomerans* par irradiation

Afin de cerner davantage la radiorésistance de *Pantoea agglomerans*, suite aux résultats obtenus avec la courbe de survie à l'irradiation, une approche par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) a été élaborée. Cette analyse avait pour but de mettre en évidence les dommages de l'ADN, causés par irradiation, et d'évaluer dans quelles mesures le micro-organisme est apte à les réparer. Des changements biomoléculaires ont été observés en fonction de traitements d'irradiation à faibles doses (sous-létaux; < 5 kGy) et à fortes doses (létaux; ≥ 5 kGy). L'étude a débuté par une analyse générale des groupements fonctionnels composant l'ADN du micro-organisme *P. agglomerans* non irradié, suivie de la détermination des changements de ces groupements reliés à l'ADN de la bactérie irradiée.

La figure 17 représente l'aspect général des spectres infrarouges, obtenus à partir des échantillons d'ADN purifiés, pour la région $4000-600\text{ cm}^{-1}$. Bien que le profil de chacun des spectres semble similaire, des changements ont été notés dans des régions spectrales pouvant être attribuables à des modifications subies suite à l'exposition de la molécule d'ADN à des rayons gamma. L'analyse de ces changements a été réalisée dans la région spectrale $1800-600\text{ cm}^{-1}$ (empreinte digitale), car elle représente spécifiquement les groupements fonctionnels particuliers. Les spectres infrarouges correspondant à cet intervalle de nombre d'ondes sont illustrés à la figure 18 et les bandes d'absorption littérales, caractéristiques de ces groupes, sont résumées dans le tableau XXI.

3.3.4.1 Analyse d'ADN extraits de bactéries non irradiées

Dans la région spectrale $1720-1630\text{ cm}^{-1}$, la bande 1696 cm^{-1} serait attribuable à la vibration par élongation du lien carbonyle (C=O) des bases azotées composant l'ADN. À l'intérieur de cette même région se chevauche la zone de fréquence, correspondant à l'élongation de la double liaison imine (C=N) des bases azotées, assignée à la bande retrouvée à 1648 cm^{-1} . La vibration par élongation du groupement fonctionnel C=C serait

également possible à 1648 cm^{-1} . La région $1630\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ correspondrait à la déformation angulaire du groupement amine (N-H_2). Le lien N-H afficherait le même type de vibrations qui seraient absorbées à 1564 cm^{-1} . À 1484 cm^{-1} , cette bande serait également assignée à des vibrations de déformation angulaire causées par le lien C=N . Enfin, dans la région $1470\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$, la bande centrée à 1406 cm^{-1} serait due à des déformations angulaires du lien C-H.

La région spectrale $1300\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ représenterait les vibrations imputables aux groupements fonctionnels touchant les liaisons phosphodiester et le sucre: deux éléments composant le squelette de l'ADN. Les bandes 1237 et 1068 cm^{-1} seraient attribuables aux vibrations, non symétriques et symétriques respectivement, par élongation des groupements du phosphate (PO_4^-). À 1150 cm^{-1} , cette absorption serait le résultat du chevauchement des vibrations par élongation des groupements fonctionnels C-O et P-O-C (liaison C-O-P-O-C) provenant de la structure du sucre et du lien impliquant le phosphate. L'élongation du lien C-O serait aussi retrouvée dans la zone de fréquences 1042 cm^{-1} .

3.3.4.2 Analyse d'ADN extraits de bactéries irradiées

Une légère augmentation de la bande 1696 cm^{-1} , assignée à la vibration par élongation du lien carbonyle, a été notée pour tous les spectres infrarouges réalisés à partir d'échantillons d'ADN irradiés (figure 18). Ce même effet a été observé à 1648 cm^{-1} , excepté pour les spectres d'ADN irradiés à 2 et 4 kGy, qui ont plutôt affiché une baisse. Par ailleurs, une hausse de l'absorption, en rapport avec les doses d'irradiation, a également été remarquée pour la bande 1598 cm^{-1} . Cette observation est davantage apparente pour les échantillons d'ADN provenant des bactéries irradiées à fortes doses (8 et 16 kGy). Une élévation des absorbances des spectres à 1564 cm^{-1} , pour les échantillons d'ADN issus de bactéries traitées à 2, 4 et 5 kGy, a été enregistrée alors qu'une diminution de l'absorbance a été observée pour ceux traités à des doses au-dessus de la dose létale ($> 5\text{ kGy}$). À 1484 cm^{-1} , l'absorbance de cette bande semble avoir augmenté graduellement en fonction de la dose d'irradiation appliquée. Une très forte absorption a été observée à 1406 cm^{-1} , correspondant à la déformation angulaire du lien C-H, pour les échantillons d'ADN de *P. agglomerans* irradié à 2, 4 et 5 kGy. Les ADN

extraits et purifiés de bactéries irradiées à 8 et 16 kGy semblaient plutôt démontrer une baisse d'absorbance pour cette même bande comparativement au spectre d'ADN de bactéries non irradiées. En ce qui a trait à l'absorption à 1237 cm^{-1} , l'exposition de l'ADN à des rayons gamma n'a pas entraîné de modification à l'état des vibrations du phosphate non symétrique alors que pour le phosphate symétrique (1068 cm^{-1}), une légère augmentation de l'absorbance pour les spectres d'ADN de bactéries irradiées à fortes doses (8 et 16 kGy) a été enregistrée. Finalement, l'absorption notée à 1150 cm^{-1} pour les vibrations par élongation des liens C-O et P-O-C semble avoir diminué pour les spectres d'ADN de bactéries irradiées à 8 et 16 kGy. Cette observation a aussi été perçue pour la bande à 1042 cm^{-1} correspondant aux vibrations par élongation du groupement C-O.

Afin de visualiser l'ampleur de la dégradation de l'ADN par des traitements d'irradiation, les échantillons d'ADN, étudiés par FT-IR, ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 0.7% (additionné de bromure d'éthidium à une concentration finale de $0.5\text{ }\mu\text{g/ml}$). La figure 19 illustre les profils de migration des différents échantillons. De façon générale, il semble que plus la dose d'irradiation est élevée, plus l'échantillon, représenté par la bande, affiche une distance de migration plus longue. Le phénomène de traînée a été observé avec les échantillons d'ADN provenant de bactéries irradiées à 8 et 16 kGy. De plus, un dépôt de faible intensité, sous forme d'une bande, a été noté au niveau des puits du gel. Cependant, ce dépôt n'a pas été observé pour l'ADN de *P. agglomerans* non irradié.

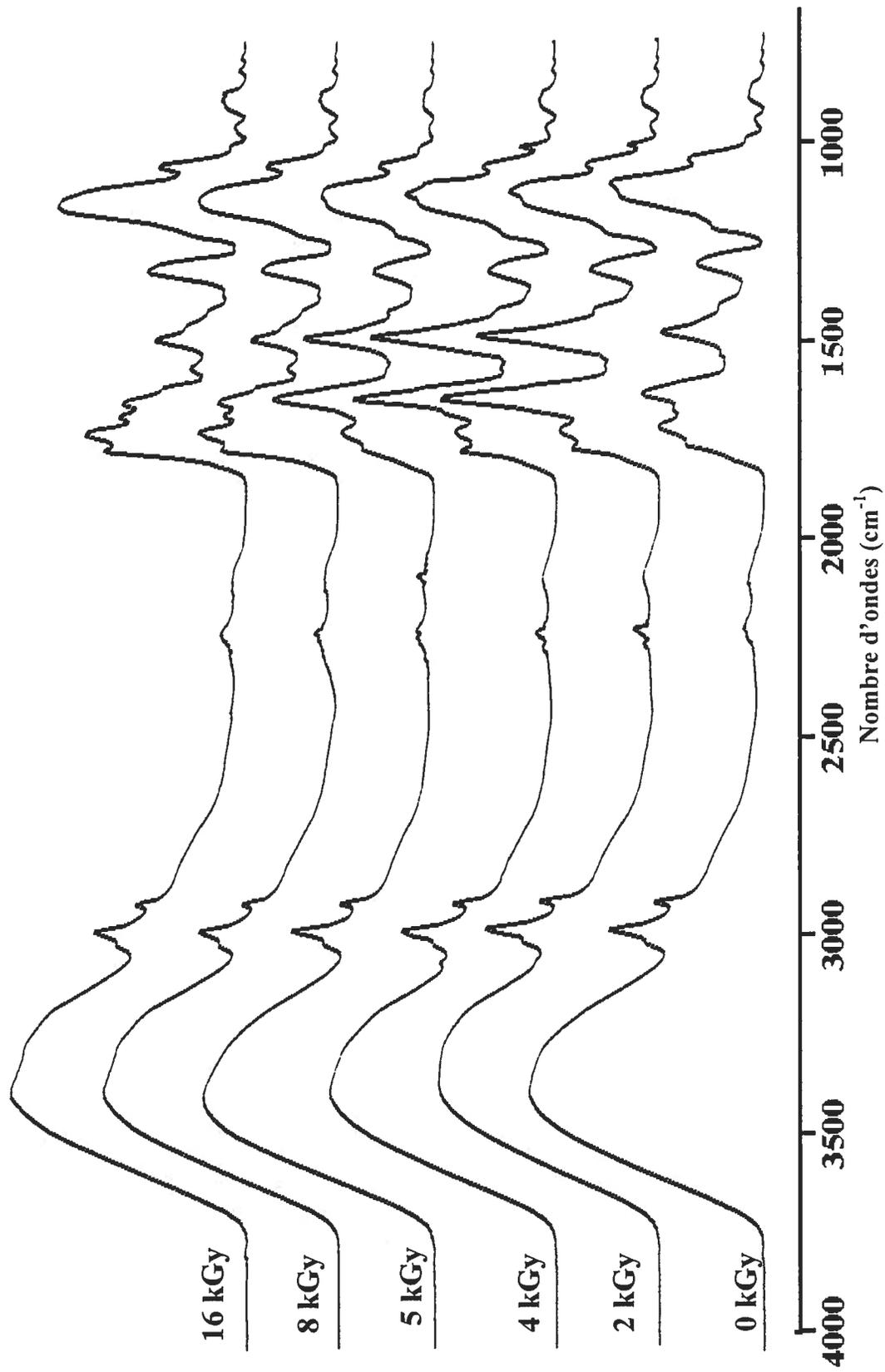


Figure 17. Spectres infrarouges, obtenus à partir d'échantillons d'ADN extraits et purifiés de la bactérie *P. agglomerans* non irradiée et irradiée à différentes doses, pour la région 4000-600 cm⁻¹.

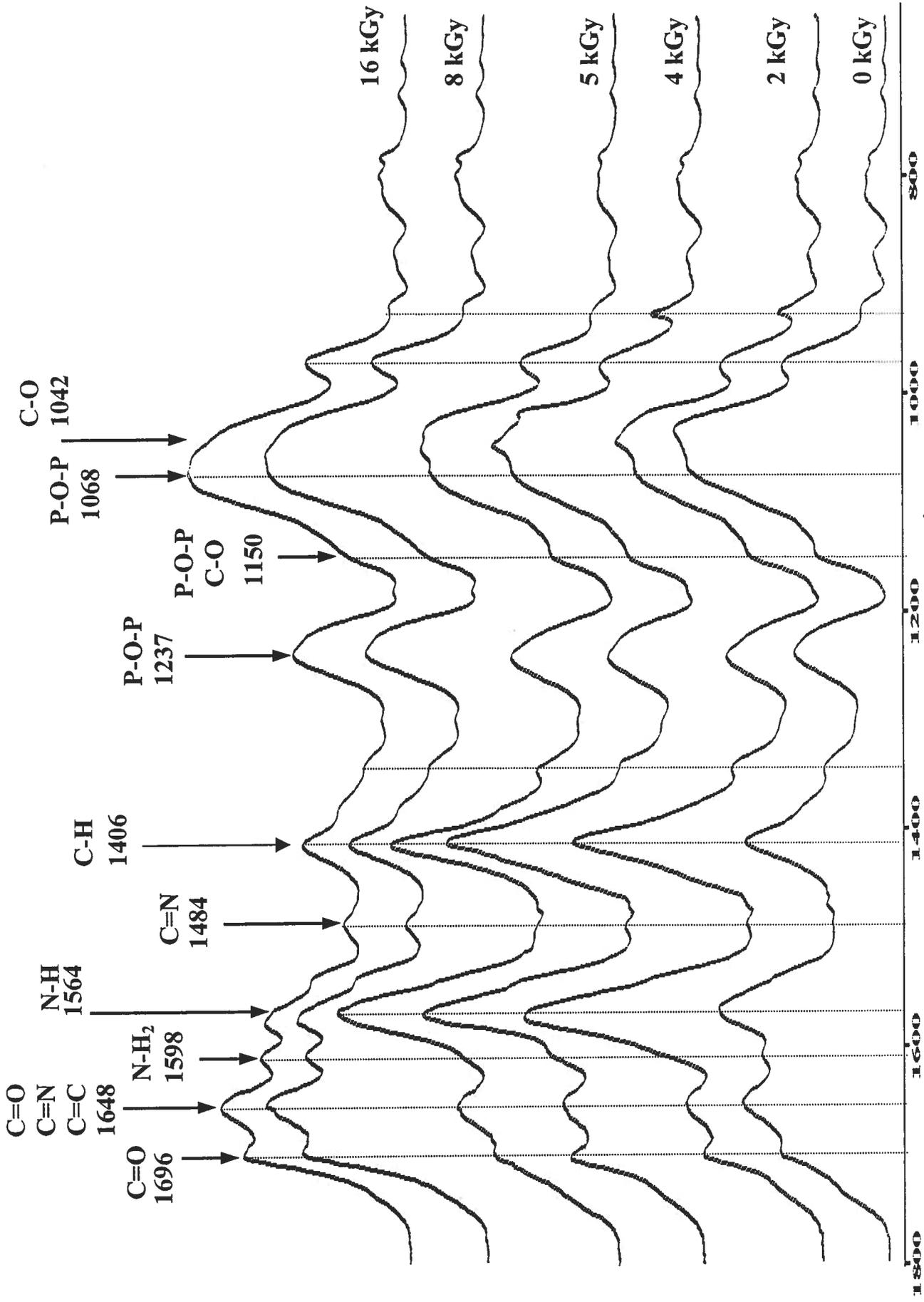


Figure 18. Spectres infrarouges, région spectrale de 1800-600 cm^{-1} , pour les différents échantillons d'ADN de *P. agglomerans*.

Tableau XXI. Caractéristiques des fréquences de vibration de groupements fonctionnels observés par FT-IR pour l'ADN extrait et purifié de la bactérie *Pantoea agglomerans* non irradiée.

Groupements fonctionnels	Modes de vibration	Zones de fréquence observées (cm ⁻¹)	Références
C=O	élongation	1696 et 1648	Liquier <i>et al.</i> , 1993. LeGal, Manfait et Theophanides, 1991. Melin, Perromat et Déléris, 2001. Mohammadi <i>et al.</i> , 1998.
C=C et C=N	élongation	1648	Dagneaux, Liquier et Taillandier, 1995. Melin, Perromat et Déléris, 2001. Mohammadi <i>et al.</i> , 1998.
N-H ₂	déformation angulaire	1598	Dagneaux, Liquier et Taillandier, 1995. Melin, Perromat et Déléris, 2001.
N-H	déformation angulaire	1564	Melin, Perromat et Déléris, 2001.
C=N	déformation angulaire	1484	Dagneaux, Liquier et Taillandier, 1995.
C-H	déformation angulaire	1406	Malins, Polissar et Gonselman, 1997. Melin, Perromat et Déléris, 2001.
PO ₂ ⁻	élongation	1237 et 1068	Melin, Perromat et Déléris, 2001. Mohammadi <i>et al.</i> , 1998.
C-O	élongation	1150 et 1042	Malins et Gonselman, 1994. Melin, Perromat et Déléris, 2001. Mohammadi <i>et al.</i> , 1998.
P-O-C	élongation	1150	Dovbeshko <i>et al.</i> , 2000. Melin, Perromat et Déléris, 2001.

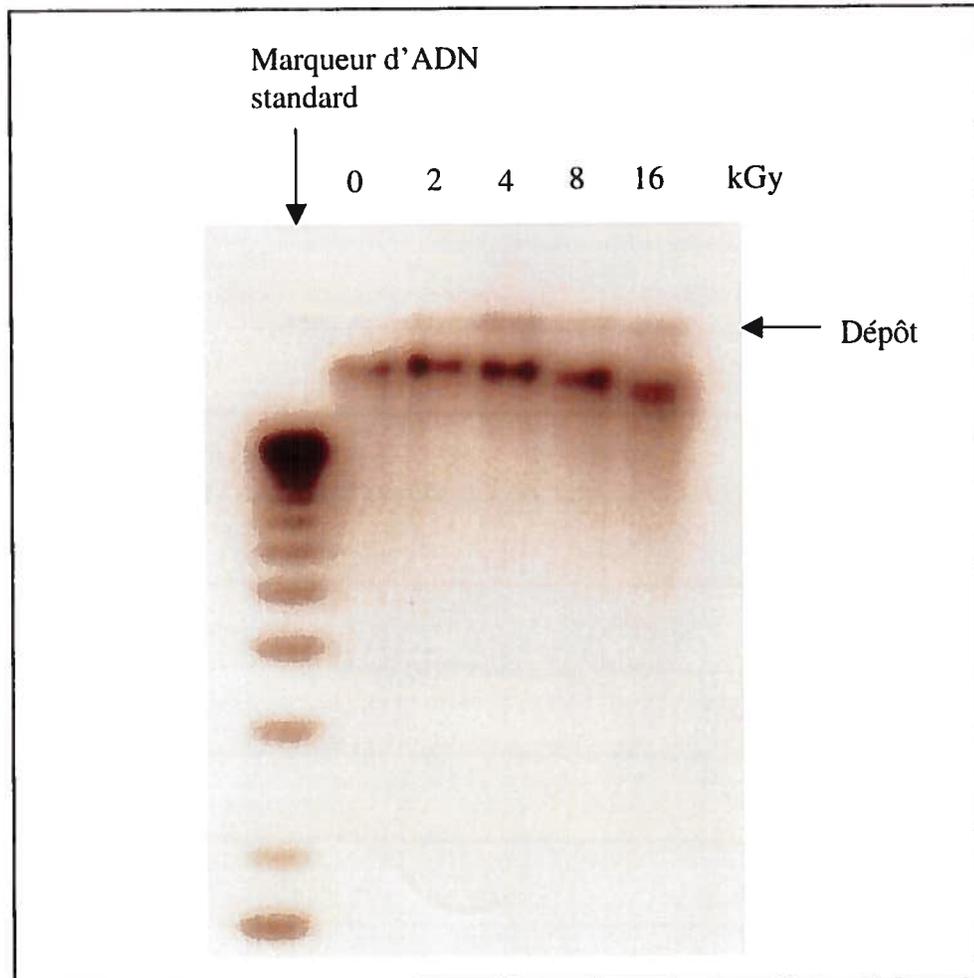


Figure 19. Observation de la dégradation d'extraits d'ADN purifiés, issus de la bactérie *P. agglomerans* non irradiée et irradiée à différentes doses, par électrophorèse sur gel d'agarose 0.7%.

4. Discussion

4.1 APPLICATION DE L'IRRADIATION SEULE OU EN COMBINAISON AVEC D'AUTRES TRAITEMENTS

4.1.1 Effet de l'irradiation sur la bactérie *E. coli*ensemencée dans des carottes râpées

À travers cette étude, les résultats ont démontré que l'application de faibles doses d'irradiation (1.5 et 2 kGy) a permis d'enrayer complètement les populations d'*E. coli* ensemencées dans des carottes râpées conservées à 10°C (tableau XI). En outre, considérant que le temps de conservation des carottes prêtes à manger est de 7 à 8 jours, l'irradiation de ces légumes à 1 kGy a prolongé leur durée de vie de plus de 6 jours. Effectivement, au jour 14, une quantité de 2 log de bactéries *E. coli* a été dénombrée dans les échantillons, correspondant à la limite d'acceptabilité pour les légumes prêts à manger (tableau III).

L'irradiation semble donc être un moyen efficace de conservation des carottes râpées afin de retarder la croissance bactérienne et conséquemment d'allonger leur état de fraîcheur. Et ce, même si ces denrées périssables sont entreposées à des températures abusives telles que 10°C. Farkas *et al.* (1997) ont démontré qu'une dose d'irradiation de 1 kGy était suffisante pour assurer l'innocuité et la stabilité microbiologique de carottes prêtes à l'emploi par l'augmentation d'un facteur de 2 à 4 de leur qualité, dépendamment de la température d'entreposage. Selon Donald Thayer du Centre de Recherche USDA-ARS (Agricultural Research Service) aux États-Unis, l'irradiation a le potentiel de contrôler à la fois les micro-organismes, impliqués dans la détérioration des légumes frais, et les pathogènes (Hines, 2000). En fait, les cellules végétatives des pathogènes fréquemment retrouvés dans les légumes prêts à manger sont sensibles à de faibles doses d'irradiation. La collègue de M. Thayer, Mme Rajkowski, a souligné qu'une dose de 2 kGy peut permettre de contrôler le pathogène *E. coli* et de l'éliminer (Hines, 2000).

Comme pour tous les autres moyens de conservation des aliments, les micro-organismes ont démontré des résistances naturelles au cours de l'évolution leur permettant d'échapper aux effets néfastes de ces technologies. Les données compilées dans le tableau XI suggèrent la présence d'une forme cultivable de bactéries radiorésistantes pouvant survivre à un traitement d'irradiation de plus de 5 kGy. Ces cellules microbiennes n'ont été retrouvées que seulement dans les échantillons correspondant au contrôle stérile de même que ceux irradiés à 1.0, 1.5 et 2 kGy. Sa présence a été notée respectivement au jour 7, 28 et 21 pour les deux dernières doses employées. La principale raison, pouvant expliquer le fait que cette bactérie, produisant des colonies jaunes, n'ait pas été isolée du contrôle contaminé et des carottes irradiées à 0.5 kGy, serait la présence considérable de populations d'*E. coli* dans ces échantillons. Une compétition a pu s'établir entre les deux micro-organismes.

Les colonies jaunes, apparaissant après un certain temps d'entreposage des carottes râpées, peuvent être identifiées comme des cellules viables non cultivables (CVNC). Dans le cas du contrôle stérile par exemple, les résultats des analyses effectuées au jour 1 n'ont pas démontré de croissance bactérienne. La période d'entreposage aurait permis ainsi l'apparition de la forme cultivable du micro-organisme. En fait, plusieurs études ont établi que la résurrection d'une bactérie de son état CVNC requière une période de temps pour réparer les dommages causés par les rayons gamma suite à un traitement d'irradiation ou à d'autres stress. Pitonzo, Amy et Rudin (1999) ont observé le phénomène de l'état CVNC adapté par des micro-organismes, provenant de roches exposées à des rayons gamma, qui ont ressuscité après deux mois d'entreposage des roches à 4°C. En comparaison avec nos résultats, cette période de temps correspond à 6 jours pour le contrôle stérile. Par ailleurs, ce groupe d'échantillons a affiché la plus petite période de réapparition de la forme cultivable. Ainsi, puisque les carottes râpées n'ont pas été contaminées avec le pathogène *E. coli*, la croissance du micro-organisme en état CVNC n'a pas ou être ralentie par la présence d'une autre bactérie

Toutes les formes de bactéries cultivables, donnant des colonies jaunes et ayant survécu aux traitements d'irradiation lors de cette expérience, ont été identifiées comme étant *P. agglomerans*. La recherche de ce micro-organisme dans différentes sortes de carottes a permis de déterminer que sa présence était importante dans ce genre de légumes provenant des États-Unis et du Canada. Cependant, il est évident que les résultats de cette dernière expérimentation ont pu être influencés par la période saisonnière à laquelle l'analyse a été réalisée. Néanmoins, il ne fut pas étonnant de détecter *P. agglomerans* dans les carottes, car cette bactérie compose majoritairement la microflore épiphytique des légumes prêts à manger. Par ailleurs, des études réalisées sur la détermination de la microflore de légumes ont démontré la présence de ce micro-organisme. Notamment, *Enterobacter agglomerans* a été l'entérobactérie la plus fréquemment isolée de carottes prêtes à l'emploi (Carlin *et al.*, 1989) alors qu'elle composait 71% des entérobactéries détectées dans des échantillons de tomates achetées dans des supermarchés aux États-Unis (Senter *et al.*, 1985). Cette même bactérie a été retrouvée dans des échantillons de petits pois tout au long de la chaîne de transformation et même après l'étape de congélation (Senter *et al.*, 1984). Par ailleurs, cette dernière étude démontre la résistance au stress de ce micro-organisme. En outre, le genre *Enterobacter* inclut des espèces thermotolérantes et ceci peut expliquer l'abondance de ces espèces dans des légumes blanchis (Splittstoesser, 1983). Enfin, Magnuson, King et Török (1990) ont déterminé qu'*Enterobacter agglomerans* était communément retrouvé dans des échantillons de laitue. Cependant, ces auteurs ont soulevé le fait que cet isolat appartient à un genre de bactéries ayant des espèces qui sont reconnues comme étant des pathogènes. De fait, la bactérie *P. agglomerans* est un pathogène opportuniste puisque l'espèce n'est pas normalement associée à des gastro-entérites (Holt *et al.*, 1994). Néanmoins, ce micro-organisme peut causer une variété d'infections extra-intestinales incluant des bactériémies, des méningites de même que des infections urinaires, respiratoires et cutanées. Par ailleurs, Hamilton-Miller et Shah (2001) ont mené une étude dans le but d'identifier les entérobactéries composant la flore de carottes et d'autres légumes à salades, en plus de leur susceptibilité à des antibiotiques. Ils ont observé que *P. agglomerans* et *Pseudomonas fluorescens* étaient les espèces les plus retrouvées et ils ont

conclu que les légumes crus sont une source potentielle de pathogènes opportunistes hautement résistants.

Finalement, les données recueillies à travers cette étude ont démontré le potentiel de faibles doses d'irradiation d'assurer l'innocuité des carottes prêtes à manger, contaminées avec *E. coli*. Toutefois, les possibilités que les micro-organismes résistent à cette technologie sont à considérer. L'étude de ces cas de résistance permet tout de même de faire avancer la recherche fondamentale en découvrant les causes réelles de ces résistances.

4.1.2 Effet de l'irradiation combinée à une atmosphère modifiée sur la bactérie *E. coli* ensemencée dans des carottes râpées

L'application de faibles doses d'irradiation (< 1 kGy) a permis de réduire considérablement les populations d'*E. coli* ensemencées dans des carottes râpées conservées à 4°C et emballées sous air ou sous MAP (tableau XII). Une diminution de plus de 3 log des comptes bactériens a été observée au jour 1 avec un traitement de seulement 0.15 kGy. L'obtention de populations microbiennes si peu nombreuses après un tel procédé concorde avec le fait que la plupart des bactéries à Gram négatif, pouvant causer des infections alimentaires comme *E. coli* et les autres membres de la famille des *Enterobacteriaceae*, sont peu résistantes à l'irradiation (International Commission on Microbiological Specifications for Foods; ICMSF, 1980). Notamment, Hagenmaier et Baker (1998) ont noté que des carottes râpées irradiées à 0.45 kGy affichaient des populations d'entérobactéries de l'ordre de 200 UFC/g pour les échantillons irradiés et 12000 UFC/g pour ceux non irradiés, après deux jours d'entreposage des légumes à 2°C.

De façon générale, les faibles comptes, obtenus dès le premier jour d'analyse suite aux traitements d'irradiation, ont persisté jusqu'à la fin de la période d'échantillonnage; excepté pour les carottes râpées emballées sous MAP dans lesquelles la présence de *P. agglomerans* a été détectée. Cependant, la température employée dans cette étude (4°C) semble avoir contribué au maintien de ces populations d'*E. coli* à un bas niveau. En effet, le témoin contaminé a démontré une baisse significative ($p \leq 0.05$) de 62.81% (6.05 au jour 1 à 2.25 log au jour 50) pour les échantillons témoin conservés sous MAP tandis que les échantillons correspondants emballés sous air ont affiché une baisse de 52.32% (5.81 log au jour 1 à 2.77 log au jour 50) (tableau XII). Nos données suggèrent que la bactérie *E. coli* est peu tolérante à des températures de réfrigération. Selon Lacasse (1995), les températures d'inhibition de croissance du micro-organisme *E. coli* sont de 4 à 10°C. Le comportement de la bactérie *E. coli*, dans des carottes minimalement transformées, a été le sujet d'une étude basée sur un modèle d'analyse multivariable. Les auteurs ont observé que l'entreposage des légumes à 2°C n'influence pas de façon considérable le nombre des populations d'*E. coli* (Bharathi, Ramesh et Varadaraj, 2001). Ils ont conclu que

l'innocuité des légumes dépend largement de la charge microbienne initiale contenue dans l'aliment, de la durée de l'entreposage et de la température.

Bien que cette expérience ait été réalisée avec une étape de stérilisation de 7 kGy et à une température de 4°C, plutôt qu'un traitement d'irradiation de 5 kGy et d'une température de 10°C, ces conditions n'ont pas empêché l'apparition du phytopathogène *P. agglomerans* dans les échantillons de carottes. Cette bactérie semble véritablement adapter un état CVNC. Néanmoins, sa résurrection a nécessité 29 jours pour cette expérience en comparaison à 6 jours lorsqu'un traitement de 5 kGy et une température de 4°C étaient utilisés (tableaux XI et XII). Cette période prolongée de réapparition serait attribuable aux changements apportés aux conditions de départ. Cette constatation pourrait aussi être valable pour la bactérie *E. coli* qui n'a pas été détectée au jour 1, pour le lot de carottes irradiées à 0.3 kGy et emballées sous air, puis qui est apparue au jour 5. Ces résultats sous-entendent plutôt que toutes les populations d'*E. coli* n'ont pas été complètement inhibées suite au traitement d'irradiation, à l'opposé des échantillons analysés au jour 1.

Puisque les légumes entiers provenaient du même cultivar, ceci supposait que *P. agglomerans* était aussi présent dans les carottes râpées conservées sous air ambiant. Cependant, la bactérie n'a pas été détectée dans ces échantillons. Son isolement n'a été observé que dans les carottes emballées sous MAP et semblait très hétérogène. Par exemple, le micro-organisme n'a pas été détecté dans le contrôle stérile au jour 26 alors qu'il était présent dans les échantillons irradiés à 0.3 et 0.6 kGy pour le même jour d'analyse (tableau XII). En fait, cette hétérogénéité dans les résultats obtenus ne représente que des fluctuations produites suite à un échantillonnage réalisé de façon aléatoire pour l'analyse des décomptes bactériens. Parmi tous les lots de traitements des carottes emballées sous MAP, c'est le témoin stérile qui a démontré les populations de *P. agglomerans* les plus nombreuses. Cette observation suppose que l'absence de population d'*E. coli* dans ces carottes conservées à titre de contrôle non contaminé aurait permis à *P. agglomerans* de croître sans compétition pour les éléments nutritifs contrairement aux autres échantillons.

Les données recueillies à travers le tableau XII suggèrent que la bactérie *P. agglomerans* peut résister à des doses d'irradiation de plus de 7 kGy. En effet, une étape de stérilisation (7 kGy) a été réalisée dans un premier temps suivie de traitements subséquents à faibles doses. Cependant, puisque le micro-organisme n'a pas été isolé dans les carottes irradiées à 0.9 kGy, ceci suppose que *P. agglomerans* peut survivre à des doses pouvant aller jusqu'à 7.6 kGy, malgré le fait que cette bactérie soit à Gram négatif et que ce groupe soit reconnu comme étant le plus sensible à l'irradiation (Farkas, 1989). Néanmoins, la température à laquelle le traitement d'irradiation a été effectué (- 80°C) a pu influencer la survie de ce micro-organisme. De fait, la résistance d'une cellule microbienne à l'irradiation dépend de plusieurs facteurs touchant les conditions environnementales extracellulaires comme la température. Les micro-organismes sont considérablement plus résistants à l'irradiation si ce procédé est réalisé à des températures sous le point de congélation plutôt qu'à la température de la pièce (Monk, Beuchat et Doyle, 1995). L'effet protecteur de la congélation est principalement dû à l'immobilisation des molécules d'eau restreignant la diffusion des radicaux libres.

Un autre facteur qui a pu influencer l'effet bactéricide de l'irradiation sur la survie de *P. agglomerans* est la nature des gaz atmosphériques en contact avec les cellules présentes dans l'aliment. Les bactéries sont davantage susceptibles aux effets de l'irradiation en présence d'oxygène que sous des conditions d'anaérobiose (Monk, Beuchat et Doyle, 1995). De façon générale, les radicaux libres produits suite à un traitement d'irradiation sont issus majoritairement de l'oxygène et de l'eau. D'ailleurs, puisque les légumes contiennent 80-95% d'eau et que leur espace intracellulaire (près de 20% du volume total) contient de l'oxygène, les principaux radicaux libres proviennent de ces éléments (Kader, 1986). Toutefois, selon Amanatidou, Smid et Gorris (1999), les micro-organismes ont développé des stratégies dans le but d'éviter les dommages létaux de l'oxygène comme l'induction d'enzymes pouvant dégrader les produits de l'oxygène (catalase, peroxydase, superoxyde dismutase) et des piègeurs de radicaux libres. Ainsi, *P. agglomerans* a pu échapper à ces dommages par l'utilisation d'un de ces systèmes.

L'emploi d'une atmosphère modifiée, composée de 60% d'oxygène et de 30% de gaz carbonique (complément: 10% d'azote), a permis de retarder la croissance de la bactérie *E. coli* dans cette expérience. L'effet dommageable du conditionnement modifié, attribué principalement au gaz carbonique (Daniels, Krishnamurt et Rizvi, 1985; Dixon et Kell, 1989), a été observé pour les échantillons irradiés à 0.15 et 0.3 kGy. Un traitement de 0.15 kGy couplé à un emballage sous MAP a permis d'inhiber la croissance d'*E. coli* à partir du 30^e jour d'entreposage alors que pour les échantillons correspondants conservés sous air, cette bactérie a été détectée jusqu'au jour 41 d'analyse (tableau XII). Quant aux carottes irradiées à 0.3 kGy, aucune croissance n'a été notée pour les légumes conservés sous MAP, tandis qu'*E. coli* a été dénombré jusqu'au jour 15 dans les échantillons emballés sous air. Ceci suppose qu'à la lumière de ces résultats, les effets d'un conditionnement modifié sur les bactéries sont davantage observés pendant l'entreposage des aliments emballés. En effet, les données recueillies à la figure 6 ont démontré que l'emballage sous MAP n'a pas eu d'effet marquant sur la survie de la bactérie *E. coli* après l'application de différentes doses d'irradiation réalisées sous air et sous MAP.

En ce qui a trait à la bactérie *P. agglomerans*, les résultats semblent démontrer que l'emballage sous MAP a favorisé la croissance de ce micro-organisme. Généralement, tout au long de la période d'entreposage, des produits vivants comme des carottes génèrent des conditions atmosphériques équilibrées à l'intérieur de l'emballage atteignant de bas niveaux en oxygène (2-3%) et des niveaux modérément élevés en gaz carbonique (5-20%) (Amanatidou, Smid et Gorris, 1999). De ce fait, puisque notre conditionnement modifié était élevé en oxygène (60%), ceci suppose qu'une quantité considérable de ce gaz était disponible afin de promouvoir la prolifération de *P. agglomerans*. Quelques études répertoriées dans la littérature montrent toutefois des résultats contradictoires. Amanatidou *et al.* (2000) ont démontré que les bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* sont inhibées lorsque les carottes prêtes à manger sont conservées dans un emballage sous 50% d'oxygène et 30% de gaz carbonique, mais que ces mêmes bactéries sont stimulées sous 80% ou 90% d'oxygène. Alors qu'Ogihara *et al.* (1993) ont découvert qu'une culture pure d'*Enterobacter* spp. n'était pas complètement inhibée par un taux élevé d'oxygène ou de gaz carbonique ou un mélange des deux gaz, mais son

taux de croissance était réduit dans une proportion augmentant avec le ratio de gaz carbonique présent dans le mélange. Finalement, une étude menée sur l'effet de niveaux élevés en oxygène et gaz carbonique sur la croissance en surface de micro-organismes présents dans la microflore de légumes, comme *Enterobacter agglomerans*, a établi qu'une réduction de croissance de cette bactérie était notée avec une combinaison de 80% d'oxygène et de 20% de gaz carbonique (Amanatidou, Smid et Gorris, 1999).

Selon Babic *et al.* (1993), un emballage MAP peut influencer le contenu en phénols des carottes pendant leur entreposage. Comparativement à la conservation sous air, les conditionnements modifiés dans cette étude (30% CO₂ et 70% air; 30% CO₂ et 70% N₂) ont entraîné une réduction massive de l'accumulation des composés phénoliques. Ces substances possèdent des propriétés antimicrobiennes et sont synthétisées par le végétal lors du mécanisme de cicatrisation afin de prévenir l'infection de la plante par des micro-organismes. De par cette observation, la présence de *P. agglomerans*, notée seulement dans les échantillons conservés sous MAP, pourrait être expliquée par une diminution des phénols dans les carottes emballées sous MAP.

Plusieurs études ont mis l'emphase sur le fait que l'irradiation doit être envisagée fortement selon une approche d'effet «barrière» (Leistner, 1992) à titre de moyen de conservation efficace pour contrôler les populations microbiennes dans des produits frais comme les carottes prêtes à l'emploi (Hines, 2000). Dès lors, les efforts sont concentrés sur la recherche de la meilleure combinaison de traitements (dose d'irradiation – MAP – température) afin d'optimiser la conservation des végétaux minimalement transformés tout en offrant aux consommateurs des produits de qualité supérieure sans risque microbiologique. À travers cette étude, les résultats ont démontré que l'emballage sous MAP, couplé à de faibles doses d'irradiation et à une température de réfrigération, ont permis de prolonger la durée de conservation des carottes.

4.1.3 Effet d'un traitement d'irradiation combiné à un enrobage antimicrobien et à une atmosphère modifiée sur des carottes miniatures

1) Aspect microbiologique

Les résultats récoltés ont démontré que l'irradiation, en combinaison avec un emballage sous MAP et un enrobage antimicrobien, est efficace pour retarder la croissance bactérienne et prolonger la durée de conservation des carottes miniatures. Généralement, l'application d'un traitement d'irradiation permet d'obtenir des comptes bactériens très faibles qui persistent tout au long de l'entreposage des légumes prêts à manger (Nguyen-the et Carlin, 1994). Toutefois, les résultats récoltés, représentant des dénombrements peu élevés obtenus avec le traitement d'irradiation appliqué au jour 1, n'ont pas suivi cette tendance pour les 21 jours d'analyse (tableau XIII). En effet, les comptes totaux des échantillons enrobés, irradiés et emballés sous MAP ont augmenté considérablement tout au long de la période d'échantillonnage pour atteindre la limite d'acceptabilité au jour 21 alors que les lots d'échantillons correspondants conservés sous air ont affiché des populations bactériennes de 10^4 - 10^6 UFC/g. En outre, les comptes totaux étaient plus élevés au jour 21 pour les échantillons non irradiés et enrobés que ceux non irradiés et non enrobés. Les données suggèrent ainsi que l'emploi de l'acide propionique, comme agent antimicrobien incorporé à l'enrobage, ne semble pas efficace, avec ou sans combinaison avec des traitements comme l'irradiation, pour contrôler la croissance des populations microbiennes durant l'entreposage. L'acide propionique et ses sels ont été utilisés dans les aliments comme antimicrobiens depuis des siècles (Wagner et Moberg, 1989). Cet acide organique représente plus de 75% approximativement de tous les agents chimiques de conservation consommés aujourd'hui dans l'industrie alimentaire. Plusieurs études ont démontré sa capacité d'inhiber certains micro-organismes (Chichester et Tanner, 1972; Shin, Suzuki et Morishita, 2002). Notamment, l'acide propionique inhibe la croissance de plusieurs bactéries (*Lactobacillus plantarum*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*), mais cet agent antimicrobien a aussi des effets limités contre d'autres bactéries (Davidson, 1997). Ceci peut alors expliquer en partie les comptes élevés recueillis avec les échantillons enrobés et finalement démontrer que le choix d'un agent antimicrobien, pour

son incorporation dans un enrobage comestible, est déterminant afin d'obtenir un effet antimicrobien maximal. L'enrobage en soi demeure une source d'éléments nutritifs pour les micro-organismes. L'addition d'un agent antimicrobien et le choix de sa concentration sont des facteurs importants à considérer. Dans ce cas-ci, l'acide propionique a été ajouté pour obtenir une concentration finale de 0.3%: soit la limite recommandée si ce composé est employé à titre d'additif alimentaire.

D'après le tableau XIII, les micro-organismes inhibés par l'application d'un traitement d'irradiation sont réapparus après 7 jours d'entreposage pour les carottes emballées sous air ambiant comparativement à 14 jours pour celles conservées sous MAP. Cette observation porte à croire que les bactéries, composant la flore microbienne des carottes miniatures, adoptent un état de CVNC afin de réparer les dommages subis suite à l'exposition aux rayonnements gamma. Par le fait même, ce phénomène peut se percevoir comme une forme de radorésistance. De façon similaire à d'autres agents antimicrobiens, la réponse d'une cellule microbienne, et par conséquent sa résistance à l'irradiation, dépend de facteurs multiples comme la nature et la quantité des dommages directs causés aux micro-organismes et l'influence de l'environnement (Farkas, 1989). Selon les résultats, le conditionnement modifié semble avoir joué un rôle dans le retardement de l'apparition des bactéries puisque ce phénomène est observé tardivement (au jour 7) pour les échantillons irradiés et conservés sous air et plus tard (jour 14) pour les échantillons correspondants emballés sous MAP. Notamment, la meilleure combinaison de traitements ayant permis d'obtenir des comptes totaux peu élevés après 21 jours d'analyse est le lot de carottes irradiées à 1 kGy et emballées sous MAP, sans addition d'un enrobage. Bennik *et al.* (1998) ont démontré qu'un entreposage sous conditionnement modifié peut causer une suppression sélective de la croissance de différentes populations épiphytiques présentes dans des légumes prêts à manger.

L'emballage sous MAP, employé lors de cette étude, était composé d'un niveau élevé en oxygène (60%) et en gaz carbonique (30%; complément de 10% d'azote). Bien que des concentrations élevées en dioxyde de carbone (> 20%) ne soient pas généralement recommandées, pour l'entreposage des produits vivants comme les carottes, Carlin *et al.* (1989) ont rapporté des concentrations élevées de 30 et 40% de ce gaz dans des emballages contenant des carottes prêtes à manger. Dans le cas des carottes enrobées et conservées sous MAP, les lots irradiés ont affiché des comptes totaux élevés comparativement aux autres lots (tableau XIII). Les données suggèrent que l'enrobage semble promouvoir davantage la croissance des bactéries contenues dans les carottes conservées sous MAP. Puisque l'enrobage agit à titre de barrière protectrice, il se crée une atmosphère modifiée à la surface de la carotte miniature qui permet d'augmenter la résistance à la déshydratation par exemple. Les propriétés barrières aux gaz des enrobages comestibles dépendent de l'humidité relative à laquelle les légumes enrobés sont entreposés (Baldwin, Nisperos-Carriedo et Baker, 1995). Sur la surface coupée des carottes minimalement transformées, l'humidité relative est élevée et les caractéristiques quant à la perméabilité de l'enrobage sont difficiles à prédire. Ainsi, le couplage d'un emballage MAP et d'un enrobage pour la conservation des carottes miniatures a permis de maintenir une humidité relative considérablement élevée à la surface des légumes favorisant ainsi la croissance microbienne.

Des fluctuations au niveau des comptes totaux pour la plupart des lots de carottes irradiées ont été notées entre le jour 7 et le jour 14 (tableau XIII). Cette augmentation pourrait être expliquée par la température d'entreposage utilisée dans cette étude qui était de 4°C. Puisque les légumes prêts à manger sont normalement conservés à des températures de réfrigération, ces conditions favorisent probablement les micro-organismes psychrotrophes (Nguyen-the et Carlin, 1994). Ces bactéries sont capables de croître à 0°C avec un optimum de croissance de 15°C et moins ainsi qu'un minimum d'approximativement de 20°C. La méthode conventionnelle de détection de ces bactéries est d'incuber les boîtes de milieux solides nutritifs (TSA ou PCA) à 7°C pour 10 jours. Cette période d'incubation correspond justement à l'observation d'un nombre élevé de micro-organismes entre le jour 7 et le jour 14 de cette expérience. Plusieurs légumes

contiennent un nombre significatif de bactéries psychrotrophes. Par ailleurs, plusieurs études menées sur l'analyse de la microflore des légumes minimalement transformés, comme celle de Garg, Churey et Splittstoesser (1990), ont obtenu des comptes identiques pour les mésophiles et les psychrotrophes dans les carottes miniatures.

2) Aspect physique

Les colorations blanchâtres les plus marquantes des carottes ont été observées avec le groupe d'échantillons non enrobés et conservés à l'air ambiant (figure 9). Cette constatation n'est pas étonnante puisque Cisneros-Zevallos, Saltveit et Krochta (1995) avaient démontré que le mécanisme de coloration blanchâtre correspondait à la déshydratation des couches extérieures suivant l'enlèvement du périoderme des légumes par épluchage. Ainsi, l'exposition des carottes à l'air ambiant pendant leur entreposage n'a qu'accentué le blanchiment des légumes, observé par l'obtention d'indices de blanchiment élevés. De plus, les résultats recueillis pour les carottes enrobées ont mis en évidence le fait que l'application d'un enrobage permette d'éviter la perte d'eau du légume et de conserver la couleur orange originale.

Plusieurs études ont remarqué que le mécanisme de coloration blanchâtre des carottes était le résultat d'une réponse réversible à l'épluchage, par la déshydratation des couches supérieures, et d'une réponse irréversible comme la formation de lignine. Le blanchiment observé pendant l'entreposage des carottes pourrait aussi être expliqué par la réponse irréversible puisque ce phénomène augmenterait la réflexion de la lumière lors des tests de coloration et par conséquent, le développement du blanchiment. En outre, une réhydratation incomplète du périoderme, due à l'aspect hydrophobe de la lignine, a pu être une autre cause de la coloration blanchâtre des carottes. Cisneros-Zevallos, Saltveit et Krochta (1995) ont démontré que lorsqu'un excès d'humidité était présent à la surface des carottes épluchées, le taux de développement du blanchiment diminuait drastiquement. C'est par le trempage des carottes dans l'eau que les auteurs sont parvenus à de telles conclusions. Selon Avena-Bustillos, Cisneros-Zevallos et Krochta (1993), le blanchiment est dépendant de l'humidité relative présente sur les carottes. De

ce fait, nos données suggèrent que les groupes de carottes emballées sous MAP, qui n'ont pas démontré de hausse significative de l'indice de blanchiment entre le jour 1 et le jour 21, auraient retenu leur couleur orange due au conditionnement modifié. En effet, l'emballage sous MAP, élevé en oxygène, aurait entraîné la formation de gouttelettes d'eau à la surface de l'emballage permettant une hydratation des couches externes des carottes miniatures mises en contact avec cette eau résiduelle (Cisneros-Zevallos, Saltveit et Krochta, 1995).

Lorsque les consommateurs effectuent l'achat de produits frais, l'apparence de ces derniers est un critère essentiel dont la couleur est probablement le principal facteur qu'ils prennent en considération (Kays, 1999). Les résultats ont démontré, de façon générale, que l'irradiation n'a pas eu d'incidence sur la coloration blanchâtre des carottes. De fait, ce procédé ne cause pas de hausse significative de température dans l'aliment et n'a donc pas causé de perte d'eau ayant pu entraîner la déshydratation du légume. Il semble que les doses d'irradiation utilisées lors de cette étude n'aient pas affecté le contenu en β -carotène des carottes qui est responsable de leur couleur originale. Farkas *et al.* (1997) ont observé que le β -carotène des carottes était protégé par la combinaison d'une température de réfrigération et de l'irradiation. Après 10 jours d'entreposage des cubes de carottes (1, 10 et 16°C), le contenu en β -carotène des échantillons irradiés était similaire voire même supérieur dans certains cas par rapport aux échantillons contrôle.

Parmi les propriétés actives d'un enrobage figure la rétention de composés responsables de la couleur et/ou de la saveur de l'aliment. Li et Barth (1998) ont observé que l'enrobage de carottes miniatures, conservées pendant 28 jours à 1°C, a permis de conserver 50% du β -carotène comparativement à 33% pour les légumes non enrobés. L'application d'un enrobage lors de cette expérience a d'ailleurs permis de réduire considérablement la coloration blanchâtre des carottes. L'utilisation de l'acide propionique comme agent antimicrobien incorporé dans l'enrobage a aussi pu influencer la rétention de la couleur orangée des carottes. En effet, une étude réalisée par Juliot, Lindsay et Ridley (1989) sur l'acidification de bâtonnets de carottes a permis d'observer

que l'emploi de l'acide propionique permettrait une importante conservation de la couleur des carottes, en plus de leur texture.

Pendant les 21 jours d'entreposage des carottes, une baisse générale de la fermeté des légumes a été notée. Toutefois, des fluctuations ont été observées pour certains lots de traitements correspondant à une hausse de la fermeté entre le jour 7 et 14 et à une baisse entre le jour 14 et 21 (tableau XV). L'augmentation des forces requises pour briser le tissu des végétaux pourrait être expliquée par le phénomène de lignification (Bolin et Huxsoll, 1991). Lorsque la couche externe de l'épiderme des carottes est enlevée par épluchage, des changements physiologiques se produisent dans le légume afin d'initier la production d'une nouvelle couche protectrice. La lignine, produite suite à une réaction enzymatique, est alors formée comme une barrière favorisant la cicatrisation du légume. Cette couche donne un aspect inextensible et rigide aux carottes demandant des forces supérieures pour briser le tissu de la plante. Quant à la baisse de fermeté notée à la fin de la période d'entreposage, cette dernière concorderait avec les comptes totaux élevés recueillis des échantillons. Ces résultats pourraient être justifiés par la dégradation des composantes des cellules végétales par ces bactéries impliquées dans l'altération des carottes telles que des bactéries pectinolytiques.

L'ensemble des résultats suggèrent que l'irradiation des carottes n'a pas contribué à l'altération de leur texture. L'application du traitement a par ailleurs été réalisé avec de faibles doses d'irradiation (≤ 1 kGy). Chervin et Boisseau (1994) ont démontré que des doses de plus de 2 kGy n'ont pas diminué la qualité sensorielle des carottes prêtes à manger. Selon Kon (1978), l'impact de l'irradiation sur la texture des carottes est limité dû à leur faible radiosensibilité et à l'application de doses moyennes.

La baisse de fermeté la plus importante, enregistrée après 21 jours, a été pour les échantillons enrobés et emballés sous MAP, sans traitement d'irradiation. Ces résultats supposent que l'addition d'un enrobage à la surface des carottes, où l'humidité relative est élevée, de même que le couplage d'un MAP élevé en oxygène, favorisent l'humidification des légumes, affectant leur fermeté.

Enfin, le couplage de différents moyens de conservation des aliments peut sembler prometteur pour assurer l'innocuité des carottes prêtes à l'emploi. Cette combinaison a pour but de réduire l'intensité de chacun des traitements afin de réaliser des économies d'énergie, sans toutefois réduire leur efficacité. La baisse des doses d'irradiation et un entreposage moins prolongé des denrées à une température de réfrigération en sont des exemples. Néanmoins, des recherches davantage approfondies sur les répercussions du couplage de chacun des moyens sont nécessaires pour éviter que des effets néfastes affectent la qualité du produit.

4.2 RADIORÉSISTANCE

4.2.1 Détermination de la D_{10} : courbes de survie des bactéries *P. agglomerans* et *E. coli*

À la lumière des D_{10} obtenues pour chacun des micro-organismes, il a été possible d'affirmer que *P. agglomerans* est cinq fois plus résistante aux rayons gamma que la bactérie *E. coli*. En effet, le phytopathogène peut survivre à des doses de plus de 4.5 kGy, lorsqu'il est irradié dans un bouillon nutritif comparativement à *E. coli* dont sa croissance est inhibée avec une dose de 0.9 kGy (figure 13). Ces deux bactéries font partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Toutefois, cette constatation n'insinue pas que les cellules bactériennes doivent démontrer des radiorésistances similaires, puisque des différences peuvent survenir entre deux genres de micro-organismes, entre certaines espèces du même genre ainsi qu'entre souches de la même espèce (Farkas, 1989). Les variations résident dans les mécanismes de protection aux radiations qui sont propres à chacune des cellules microbiennes. Une caractéristique importante qui différencie *P. agglomerans* d'*E. coli* est que la bactérie *P. agglomerans* produit des colonies pigmentées jaunes. Cette observation a été notée lors des identifications bactériennes. Or, les premières investigations réalisées sur les micro-organismes démontrant une radiorésistance ont mis en évidence que ces derniers étaient généralement fortement pigmentés (Nasim et James, 1978). Les chercheurs spéculaient que ces substances agissaient à titre de réservoir d'énergie pour les micro-organismes. De nos jours, les recherches sont centrées sur la bactérie *Deinococcus radiodurans*; la plus résistante aux radiations U.V. et ionisantes. Notamment, le rôle des caroténoïdes, responsables de sa couleur rose, est discutable selon les résultats des études scientifiques. De fait, les caroténoïdes peuvent protéger la cellule en réprimant l'oxygène singulet et en inhibant les réactions de radicaux libres (Melin *et al.*, 1998). Cependant, ce mécanisme de protection ne semble pas être entièrement garant de cette radiorésistance. D'autres systèmes enzymatiques et non enzymatiques comme la présence d'antioxydants (vitamines A et E) et des enzymes telles que la catalase et la superoxyde dismutase peuvent réduire l'effet néfaste des espèces réactives de l'oxygène et celles issues de l'eau. Pour conclure sur le

rôle possible des caroténoïdes dans la résistance à l'irradiation de *P. agglomerans*, la création d'un mutant non pigmenté pourrait confirmer si ces substances sont nécessaires à la bactérie afin de résister aux rayons gamma.

Une autre caractéristique de la bactérie *D. radiodurans* demeure que sa résistance extrême à l'irradiation serait attribuée à sa possible adaptation à la dessiccation (Mattimore et Battista, 1996). Puisque le micro-organisme *P. agglomerans* a été isolé de carottes fraîches et qu'il fait partie de la flore épiphytique des végétaux, ces constatations suggèrent que cette bactérie est capable de survivre à des conditions environnementales extrêmes retrouvées dans les champs telles que la dessiccation, les engrais chimiques et les rayons solaires. Au cours de l'évolution, cette bactérie a pu s'adapter à ces conditions pour survivre. Par ailleurs, sa thermotolérance de même que sa survie à des traitements de cryocongélation pour légumes congelés ont fait l'objet de discussion dans les sections précédentes.

À travers la figure 13B, les résultats ont indiqué qu'à partir d'une dose de 4.5 kGy, la croissance de *P. agglomerans* était sous le seuil de détection (< 10 UFC/g). L'expérience réalisée sur l'effet de l'irradiation combinée à un emballage sous MAP sur les populations d'*E. coli*ensemencées dans des carottes râpées a toutefois démontré que *P. agglomerans* avait survécu à un traitement d'irradiation de 7.6 kGy. La principale variation qui existe entre les valeurs 4.5 et 7.6 kGy est que le procédé d'irradiation n'a pas été appliqué au même milieu contenant la bactérie. Ce dernier point demeure un facteur à considérer lorsqu'il est question de comparer l'effet de doses de rayonnements gamma. Notamment, une étude réalisée sur l'effet d'extraits d'épices sur la sensibilité à l'irradiation de certaines espèces bactériennes a démontré que les antioxydants curcumin et piperine, contenus dans le turmeric et le poivre noir, offraient une protection contre la dégradation de l'ADN des bactéries par les rayons gamma (Sharma, Gautam et Jadhav, 2000). Par rapport à nos résultats, dans le premier cas, le traitement a été effectué dans un bouillon nutritif ne comportant aucune trace de matière organique pouvant protéger *P. agglomerans* des effets néfastes des radiations ionisantes. Alors que dans les carottes, le déplacement des radicaux libres, issus du traitement, était ralenti par la matière solide.

Un autre élément à considérer est que les carottes renferment une quantité considérable de β -carotène. Or, cette substance est reconnue pour ses capacités de piéger les radicaux libres et de neutraliser l'oxygène singulet. Par ce fait même, la forte résistance de *P. agglomerans* notée lors de l'expérience serait attribuable aux bénéfices tirés du milieu en plus de ses propres mécanismes de protection.

4.2.2. Adaptation de la bactérie *P. agglomerans* à l'irradiation

Les résultats recueillis dans la figure 14 sous-entendent que les bactéries ayant bénéficié de la période d'adaptation, dans le but de réparer les dommages subis par les rayons gamma, n'affichent pas une radiorésistance plus élevée à l'irradiation que celles non adaptées. Pour cette étude, plusieurs facteurs étaient à considérer dans la période d'adaptation: la durée, la température et la disponibilité des nutriments. Une durée de 24 heures a été allouée aux bactéries pour récupérer. Lors de la première expérience effectuée dans ce projet, l'apparition de *P. agglomerans* survenait après 6 jours de récupération suite à un traitement de 5 kGy qui était effectué dans des carottes. De cette observation, un jour a été jugé suffisant pour la période d'adaptation du micro-organisme irradié à 2 kGy (une dose sous-létale) dans un bouillon nutritif. En ce qui a trait à la température d'incubation, le choix s'était arrêté à la température optimale de croissance de *P. agglomerans* qui est de 30°C afin de visualiser si le nombre de survivants aux traitements d'irradiation était supérieur comparativement aux autres expériences réalisées antérieurement à des températures de réfrigération. Or, les conditions environnementales post-irradiation concernant l'incubation telles que la composition du milieu (le pH, l'activité de l'eau, les nutriments), l'atmosphère et la température ont été étudiées largement, démontrant leur influence sur le taux de survie (Ray, 1979; 1986.). Notamment, la survie d'*E. coli* suivant un traitement d'irradiation a augmenté quand l'incubation a été réalisée à des températures sous-optimales, spécifiquement à 18°C (Lucht, Blank et Borsa, 1998). Les auteurs stipulent que les températures optimales de croissance activent la division des bactéries ne leur permettent pas de réparer leur ADN. Quant à la source de nutriments, aucune source exogène d'éléments nutritifs n'a été

ajoutée pendant la période d'adaptation. Toutefois, les micro-organismes survivants ont pu récupérer grâce aux nutriments relâchés dans le milieu par les cellules mortes.

Un autre facteur qui a pu influencer la survie de *P. agglomerans* est la concentration employée de chloramphénicol. Cette dernière a été fixée à 50 µg/ml en regard à d'autres expériences ayant utilisé cet antibiotique (50 à 100 µg/ml) pour vérifier si la synthèse protéique était nécessaire à la survie du micro-organisme exposé aux rayons gamma (Tanaka *et al.*, 1996; Lim *et al.*, 2001). Cependant, puisque aucune analyse d'antibiogramme n'a été effectuée préalablement afin de déterminer la concentration inhibitrice minimale du chloramphénicol par rapport à *P. agglomerans*, il se peut que la concentration de 50 µg/ml ait été trop élevée ou faible, ayant pu influencer les résultats obtenus. À cet égard, Gilles et Alper (1959) ont rapporté une forte récupération de la bactérie *E. coli* irradiée, lorsque sa croissance était retardée par l'addition de chloramphénicol dans le milieu.

4.2.3 Analyse du protéome de *P. agglomerans*

Suite à un stress, les micro-organismes doivent mettre en action des mécanismes nécessaires pour la réparation des dommages causés par ce dernier. Dans plusieurs cas, la synthèse protéique est apparue nécessaire pour aider à récupérer des cellules endommagées par le froid, la dessiccation, la chaleur et le manque de nutriments (Busta, 1976). Notamment, la survie de *Staphylococcus aureus* à la limitation de nutriments est dépendante d'une biosynthèse de protéines (Watson, Clements et Foster, 1998). En ce qui a trait au stress de l'irradiation, des dommages étendus à l'ADN d'*E. coli* ont entraîné l'induction du système de réparation SOS qui implique la synthèse de protéines (Sargentini et Smith, 1986). Tanaka *et al.* (1996) ont observé des changements majeurs concernant les protéines cellulaires de *Deinococcus radiodurans* suite à un traitement d'irradiation.

Les résultats de l'analyse protéomique à la figure 15 ont démontré un patron de protéines suggérant que ces dernières soient produites par *P. agglomerans* suite à un traitement de 5 kGy. Afin de confirmer cette hypothèse, à savoir si ce patron est le résultat de protéines nouvellement synthétisées, une autre expérience pourrait être entreprise avec la variante de marquer les protéines avec des isotopes radioactifs. Toutefois, il faut noter que cette première analyse protéomique a été réalisée avant la détermination de D_{10} de *P. agglomerans*. Ainsi, puisque ces résultats, issus des courbes de survie, avaient démontré que le micro-organisme ne pouvait survivre à des doses de plus de 5 kGy lorsqu'il était irradié dans un bouillon nutritif, il est fort probable que ce patron de protéines noté à la figure 15 soit la conséquence de dégradation de protéines.

Quant aux résultats de la figure 16, il semble que la synthèse protéique n'est pas impliquée dans la radiorésistance de la bactérie *P. agglomerans* puisque aucune différence notable n'a été détectée avec le logiciel ImageMaster 2-D Elite. Cependant, les résultats issus d'études protéomiques reflètent les conditions de culture dans lesquelles les cellules ont été cultivées. Ainsi, dans notre cas, une période d'incubation allouée aux cultures bactériennes irradiées aurait pu influencer les protéines cytoplasmiques récoltées à la fin de cet intervalle de temps. Néanmoins, les résultats tirés de cette étude protéomique suggèrent que *P. agglomerans* pourrait posséder d'autres systèmes afin de contrer les effets néfastes des rayons gamma d'un traitement d'irradiation, ne nécessitant pas la synthèse de nouvelles protéines.

4.2.4 Analyse par FT-IR des dommages causés à l'ADN de la bactérie *P. agglomerans* par irradiation

4.2.4.1 Modifications à faibles doses

L'analyse des spectres infrarouges des ADN extraits et purifiés à partir des bactéries *P. agglomerans* irradiées et non irradiées, a permis de mettre en évidence des changements au niveau des bases azotées faisant partie du squelette de la molécule d'ADN. La bande observée à 1696 cm^{-1} avait été assignée aux vibrations par élongation du lien carbonyle (C=O) des bases azotées retrouvées dans l'ADN (figure 18). Liquier *et al.* (1993) ont étudié la structure de polynucléotides, composés de cytosine et guanine, par spectroscopie infrarouge. Ils ont noté deux fortes absorptions, localisées à 1689 et 1645 cm^{-1} , qu'ils ont attribué aux vibrations par élongation des groupements carbonyle de la guanine (C₆=O₆) et de la cytosine (C₂=O₂). La même analyse, réalisée à partir de polynucléotides d'adénine et de thymine, a également démontré deux bandes distinctes, à 1696 et 1662 cm^{-1} , pour ces liens carbonyle de la thymine (C₂=O₂ et C₄=O₄ respectivement). Par ailleurs, une expérience utilisant une approche par FT-IR, pour l'étude de la sensibilité de la bactérie *Deinococcus radiodurans* à l'irradiation, a permis de constater que les vibrations des liens carbonyle des acides nucléiques étaient détectées à 1712 cm^{-1} approximativement (Melin, Perromat et Délérís, 2001).

Parmi les données compilées dans la figure 18, la bande 1648 cm^{-1} a été attribuée aux vibrations par élongation des groupements fonctionnels C=C et C=N. Dagneaux, Liquier et Taillandier (1995) ont observé une bande à 1622 cm^{-1} lors de l'analyse de polynucléotides d'adénine et de thymine par FT-IR. Selon ces chercheurs, cette absorption correspondrait aux vibrations par élongation des liens C=C et C=N de la structure cyclique de l'adénine, en plus des vibrations par déformation angulaire du groupement amine (N-H₂). Or, puisque ce sont des molécules d'ADN, composé des quatre bases azotées, qui ont été étudiées dans le présent travail, cela suppose que les vibrations des groupements C=C et C=N, détectées à 1648 cm^{-1} , seraient imputables à ces dernières. Quant au lien amine, les vibrations assignées à la bande 1598 cm^{-1} proviendraient des bases adénine, guanine et cytosine. Dans cette même région,

l'existence d'une bande à 1564 cm^{-1} a été reliée aux vibrations par déformation angulaire du lien N-H. Melin, Perromat et Déléris (2001) ont remarqué des résultats similaires correspondant à une absorption à 1545 cm^{-1} . Les spectres infrarouges retrouvés à la figure 18 ont également affiché une faible absorption à 1484 cm^{-1} , ayant été attribuée aux vibrations par déformation angulaire du lien C=N. Une étude portant sur la formation de triple hélices d'ADN a d'ailleurs observé une bande à environ 1490 cm^{-1} pour de tels complexes. Cette absorption a été assignée aux vibrations par déformation angulaire du lien N₇-C₈-H de l'adénine et de la guanine (Dagneaux, Liquier et Taillandier, 1995). Enfin, une analyse par FT-IR des effets de composés chimiques sur les ADN a démontré que la région entre 1720 et 1450 cm^{-1} comporte généralement des absorptions correspondant à de fortes vibrations par élongation des liens carbonyle et des vibrations par déformation angulaire du groupement amine, alors que la région spectrale 1450 - 1300 cm^{-1} est davantage assignée à de faibles vibrations du lien N-H et à des déformations des groupements C-H (Malins, Polissar et Gunselman, 1997). Les résultats de cette étude correspondent bien à nos données récoltées à la figure 18.

À travers la région spectrale 1800 - 1300 cm^{-1} , des changements ont été observés quant à l'absorption de certaines bandes. Globalement, il semble qu'à faibles doses d'irradiation ($< 5\text{ kGy}$), l'ADN de la bactérie *P. agglomerans* réagit avec les espèces radicalaires, issues de l'eau et de l'oxygène telles que le radical hydroxyle (OH•), créant ainsi un déséquilibre dans l'appariement des bases azotées. En effet, l'abstraction d'un proton, par les radicaux libres, causerait un affaiblissement des interactions entre les bases azotées, amenant un changement de conformation dans la structure de l'ADN. Ces interactions correspondent aux liaisons hydrogène qui permettent de stabiliser les chaînes polynucléotidiques pour former la double hélice d'ADN (figure 2). La présence de radicaux libres entraînerait une interruption ou une diminution des ponts hydrogène. Une telle explication proviendrait du fait qu'une augmentation de l'absorption de la bande 1696 cm^{-1} ait été observée pour les spectres infrarouges d'ADN extrait de bactéries irradiées à faibles doses. Elle serait attribuable au groupement fonctionnel carbonyle (C=O) libre qui ne serait pas impliqué dans une liaison hydrogène suite à son bris, d'où la détection de ces mouvements moléculaires absorbés de façon plus importante. En

conséquence, la diminution de l'intensité de l'absorbance, observée à 1648 cm^{-1} , correspondrait aux bases azotées associées avec les autres bases complémentaires, engendrant une baisse de la vibration du groupement carbonyle. Liquier *et al.* (1993) ont notamment observé ce phénomène de bases azotées liées et libres en rapport avec l'implication du groupement C=O dans les liaisons hydrogène. Les fluctuations d'absorption notées au niveau des bandes 1598 et 1564 cm^{-1} , concernant les liens N-H₂ et N-H libres, seraient également attribuables à la participation de ces groupements aux liaisons hydrogène comme en témoigne l'élévation considérable de l'absorption de la bande 1564 cm^{-1} pour les spectres d'ADN extrait de bactéries irradiées à 2, 4 et 5 kGy. La baisse d'absorbance de cette même bande pour les échantillons d'ADN provenant de bactéries irradiées à fortes doses supposerait la présence d'autres dommages. Par ailleurs, le bris des liaisons hydrogène, autant à faibles doses qu'à fortes doses d'irradiation, influencerait les groupements voisins comme le lien C-H observé à 1406 cm^{-1} . En effet, la hausse d'absorption de cette bande pour les spectres d'ADN issus de *P. agglomerans* irradié à 2, 4 et 5 kGy serait imputable aux bris des liaisons stabilisant l'ADN.

Enfin, l'ensemble de ces constatations supposent qu'à faibles doses d'irradiation (sous la dose létale de 5 kGy), les dommages créés par les rayons gamma, représentés par la coupure des appariements des bases azotées, peuvent être réparés par la bactérie *P. agglomerans*. Ces résultats concordent avec les données observées à la figure 19. Notamment, les profils de migration des échantillons d'ADN extraits et purifiés des bactéries non irradiées et irradiées à 2 et 4 kGy sont similaires, à savoir que les échantillons ne semblent pas être fortement dégradés.

4.2.4.2 Modifications à fortes doses

L'application de fortes doses d'irradiation entraîne davantage la production de radicaux libres créant un stress oxydatif plus fort à l'intérieur du micro-organisme. Ces espèces radicalaires s'attaquent principalement aux liaisons doubles des bases azotées composant l'ADN entraînant la modification de celles-ci (Melin, Perromat et Déléris, 2001). Pour les bases pyrimidiques (thymine et cytosine), les attaques se font préférentiellement en position 5 de leur cycle, sans oublier le groupement méthyle de la thymine (Pouget, 2000). Quant aux bases puriques (adénine et guanine), l'addition des radicaux a lieu en position 4 ou 8. L'augmentation de l'absorption de la bande 1648 cm^{-1} , pour les spectres d'ADN extrait de bactéries irradiées aux doses 8 et 16 kGy, représenterait ces modifications. Notamment, la bande détectée à 1484 cm^{-1} , dont l'absorption s'accroît plus la dose d'irradiation est élevée, pourrait être expliquée par l'attaque du noyau imidazole des bases puriques par les radicaux libres.

Une autre modification envisageable, par l'attaque des espèces radicalaires à fortes doses d'irradiation, serait la formation de dimères des bases azotées, tel qu'observé avec les rayons ultraviolets (dimères des bases pyrimidines) (Moseley, 1984; Nasim et James, 1978; Setlow, 1966). Ces deux bases formeraient des liens covalents entre elles conduisant à la réticulation de l'ADN. Ce phénomène pourrait alors expliquer l'observation de dépôts d'ADN, de poids moléculaires élevés, dans les puits du gel d'agarose (figure 19) présents pour les échantillons extraits de bactéries irradiées et absents pour le contrôle.

Les modifications du phosphate et du sucre, retrouvés dans la structure de l'ADN, ont été observées dans la région spectrale $1300\text{-}900\text{ cm}^{-1}$. Les bandes, 1237 et 1068 cm^{-1} , avaient été assignées aux vibrations non symétriques et symétriques du phosphate, impliqué dans les liaisons phosphodiester présentes dans l'ADN. Des absorptions similaires de 1245 et 1085 cm^{-1} ont été rapportées par Melin, Perromat et Déléris (2001). Bien qu'une étude, réalisée par Arai et Sparks (2001) sur l'analyse de l'acide phosphorique par FTIR, ait démontré qu'une protonation affecte significativement la

symétrie du phosphate, l'exposition des molécules d'ADN à des rayons gamma n'a pas entraîné de changement quant à l'absorption observée pour la bande 1237 cm^{-1} . Cependant, l'absorbance de la bande retrouvée à 1068 cm^{-1} a augmenté légèrement pour les spectres d'ADN extrait de bactéries irradiées à 8 et 16 kGy. Ceci serait probablement dû à la coupure du lien ester P-O-C. Cette modification peut être visualisée par les profils obtenus des spectres dans la zone de fréquence 1150 cm^{-1} . Cette bande a été attribuée aux vibrations par élongation des liens C-O-P-O-C. Dans la littérature, Malins et Gunselman (1994) ont assigné la bande 1145 cm^{-1} aux vibrations par élongation du lien C-O de la structure osidique du désoxyribosyl alors que des modifications au niveau de la structure de la liaison phosphodiester et désoxyribose ont été notées par Melin, Perromat et Déléris (2001) en position 1120 cm^{-1} . Or, la figure 18 démontre qu'une diminution est visible à la bande 1150 cm^{-1} pour les spectres des ADN provenant de *P. agglomerans* irradié à 8 et 16 kGy. Cette baisse serait attribuable à la dégradation de la liaison phosphodiester (3' ou 5') par les radicaux libres. Il semble ainsi qu'à faibles doses, le phosphate est peu ou pas altéré, tandis qu'à fortes doses, une dégradation se produit.

La zone de fréquences 1042 cm^{-1} a aussi été assignée aux vibrations par élongation du lien C-O (figure 18). Selon Petibois *et al.* (1999), cette bande correspondrait à ce type de vibrations liées au sucre ribose. Nos données recueillies ont démontré une diminution se produisant pour cette bande au niveau des spectres d'ADN issu de bactéries irradiées à 8 et 16 kGy. Cette baisse reflèterait des modifications au niveau des groupements fonctionnels composant le sucre de l'ADN. D'ailleurs, dans la littérature, des dommages causés aux structures osidiques dans les acides nucléiques ont été notés par une baisse d'absorption au niveau des bandes 1145 et 1040 cm^{-1} , assignées respectivement au désoxyribose et au ribose (Melin, Perromat et Déléris, 2001). Ces observations pourraient être dues à des altérations du sucre entraînant la dégradation de l'ADN. Par ailleurs, ces résultats sont concordants avec ceux obtenus par électrophorèse sur gel d'agarose (figure 19): plus la dose d'irradiation est élevée, plus l'ADN est dégradé. Par conséquent, la distance de migration des échantillons d'ADN, provenant de bactéries irradiées à fortes doses, est davantage prolongée par rapport au témoin et le profil de migration de ces échantillons est accentué par une longue traînée.

Finalement, en plus de la coupure de l'appariement entre les bases azotées, les changements observés pour l'ADN provenant de bactéries irradiées à fortes doses sont la dégradation caractérisée par le bris ester des groupements du phosphate et l'altération du sucre. En outre, la réticulation de l'ADN serait probablement causée par la formation de dimères entre les bases azotées. Ainsi, selon les résultats récoltés, il semble qu'à fortes doses, incluant la dose létale, le micro-organisme ne peut être en mesure de survivre à ces modifications majeures.

5. Conclusion

Cette étude a permis de démontrer qu'une dose d'irradiation supérieure ou égale à 1.5 kGy permettrait d'inhiber complètement *E. coli* dans des carottes râpées conservées à 10°C. Selon les normes établies pour la bactérie *E. coli* et les résultats obtenus, la dose de 1 kGy prolongerait la durée de vie de ces légumes de 7 à 13 jours. Cette expérience a donc démontré l'efficacité germicide de l'irradiation utilisée seule pour conserver les carottes minimalement transformées.

La combinaison d'un traitement d'irradiation et d'un emballage sous MAP a permis d'augmenter l'effet antimicrobien de l'irradiation. Une dose de 0.3 kGy a inhibé complètement les populations d'*E. coli*,ensemencées dans des carottes conservées sous MAP et ce, pendant une période d'entreposage de plus de 50 jours. Alors qu'une dose de 0.6 kGy était nécessaire pour éliminer complètement *E. coli* lorsque les carottes étaient emballées sous air. Toutefois, la combinaison permettant un meilleur contrôle de la croissance microbienne pendant l'entreposage est l'application d'une dose de 0.9 kGy sur des carottes emballées sous MAP. Les résultats des valeurs des D_{10} sur *E. coli* n'ont révélé aucune différence entre l'irradiation réalisée sous air ou sous MAP. Il semble que l'effet antimicrobien des gaz composant le MAP est observé plutôt au cours de l'entreposage.

Les résultats recueillis sur la combinaison d'un enrobage couplé à une atmosphère modifiée et à un traitement d'irradiation ont montré que l'ajout de l'acide propionique, comme agent antimicrobien, ne semble pas efficace pour contrôler les populations bactériennes présentes dans les carottes. Par ailleurs, la meilleure combinaison de traitements ayant permis d'obtenir des comptes totaux peu élevés après 21 jours d'analyse est le lot de carottes irradiées à 1 kGy et emballées sous MAP, sans la présence d'un enrobage. Les colorations blanchâtres les plus importantes ont été observées avec le groupe d'échantillons non enrobés et conservés à l'air ambiant. En outre, un emballage sous MAP permettrait la stabilisation de la couleur orange au cours de l'entreposage des carottes miniatures. Une baisse générale de fermeté a été enregistrée pour l'ensemble des lots de traitements pendant les 21 jours d'entreposage et l'emballage sous MAP a favorisé

la perte de texture. L'irradiation n'a eu aucun effet nuisible sur les propriétés physico-chimiques des carottes au cours de leur entreposage.

Ce projet a également permis d'observer la présence d'une espèce nommée *P. agglomerans*, dans la flore normale de la carotte, qui peut résister à une dose de 7.6 kGy. Les résultats de la détermination des D_{10} , réalisée dans un bouillon nutritif, ont révélé que cette bactérie est cinq fois plus résistante qu'*E. coli*. De plus, les expériences ont montré que l'emballage sous MAP favoriserait la croissance de cette bactérie.

L'expérimentation sur l'adaptation à l'irradiation de *P. agglomerans* n'a pas démontré clairement si la synthèse protéique est nécessaire pour réparer les dommages causés par les rayons gamma. Par ailleurs, les études protéomiques sur cette bactérie ont également démontré le fait que des nouvelles protéines ne semblent pas être produites par ce micro-organisme pour résister à des traitements d'irradiation. Finalement, par l'analyse par FT-IR des dommages causés à l'ADN de *P. agglomerans* par irradiation, il a été possible de démontrer qu'à faibles doses d'irradiation (< 5 kGy), cette bactérie est capable de réparer les dommages créés par les rayons gamma, qui sont représentés par la coupure des appariements entre les bases azotées. À fortes doses, en plus d'observer ces dommages, une dégradation caractérisée par le bris ester des groupements phosphate et une altération du sucre ont été observées. Suite à ces dommages, la bactérie n'est pas capable de les réparer et donc de résister à ces doses d'irradiation. Une réticulation de l'ADN, par la formation de dimères entre les bases azotées, semblerait se produire à fortes doses.

L'ensemble des résultats de ce présent travail démontre que l'irradiation est un moyen de conservation qui présente un avenir fort prometteur. Des études davantage approfondies sur ses effets, pour rentabiliser son emploi et rechercher les meilleures combinaisons de traitements, permettraient de diminuer les doses d'irradiation requises pour assurer l'innocuité des légumes prêts à manger ou autres aliments. Bien que l'irradiation, comme les autres moyens de conservation, ne fasse pas exception à la règle quant à la résistance microbienne, des recherches fondamentales, sur la détermination des

bactéries pouvant résister à l'irradiation, pourraient aider à mieux adapter cette technologie par la mise au point d'un procédé efficace contre ces micro-organismes.

BIBLIOGRAPHIE

- ABDELNOOR, A. M., R. Batshoun et B. M. Roumani. 1983. «The bacterial flora of fruits and vegetables in Lebanon and the effect of washing on the bacterial content». Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig., B 177, p. 342-349.
- ACIA. 2000. Code d'usage relatif aux légumes prêts à manger minimalement transformés. Division des aliments d'origine végétale. Canada. <http://www.inspection.gc.ca>
- AGRICULTURE ET AGROALIMENTAIRE CANADA. 1987. L'irradiation des aliments. Centre d'édition du gouvernement du Canada. Ottawa. <http://www.agr.ca>
- AGRICULTURE ET AGROALIMENTAIRE CANADA. 2002. Les légumes: situation et tendances au Canada 2000-2001. Centre d'édition du gouvernement du Canada. Ottawa. <http://www.agr.ca>
- ALASALVAR, C., J. M. Grigor, D. Zhang, P. C. Quantick et F. Shahidi. 2001. «Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties». J. Agric. Food Chem., vol. 49, p. 1410-1416.
- ALLENDE, A., L. Jacxsens, F. Devlieghere, J. Debevere et F. Artés. 2002. «Effect of superatmospheric oxygen packaging on sensorial quality, spoilage, and *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas caviae* growth in fresh processed mixed salads». J. Food Prot., vol. 65, p. 1565-1573.
- AMANATIDOU, A., E. J. Smid et L. G. M. Gorris. 1999. «Effect of elevated oxygen and carbon dioxide on the surface growth of vegetable-associated micro-organisms». J. Appl. Microbiol., vol. 86, p. 429-438.
- AMANATIDOU, A., R. A. Slump, L. G. M. Gorris et E. J. Smid. 2000. «High oxygen and high carbon dioxide modified atmospheres for shelf-life extension of minimally processed carrots». J. Food Sci., vol. 65, p. 61-66.
- ANDERSON, R. et K. Hansen. 1985. «Structure of a novel phosphoglycolipid from *Deinococcus radiodurans*». J. Biol. Chem., vol. 260, p. 12219-12223.
- ARAI, Y. et D. L. Sparks. 2001. «ATR-FTIR spectroscopic investigation on phosphate adsorption mechanisms at the ferrihydrite-water interface». J. Colloid Interface Sci., vol. 241, p. 317-326.
- ARUMUGASWAMY, R. K., G. R. R. Ali et S. N. B. A. Hamid. 1994. «Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods in Malaysia». Int. J. Food Microbiol., vol. 23, p. 117-121.

AVENA-BUSTILLOS, R. et J. M. Krochta. 1993. «Water vapor permeability of caseinate-based edible films as affected by pH, calcium crosslinking and lipid content». J. Food Sci., vol. 58, p. 904-907.

AVENA-BUSTILLOS, R., L. Cisneros-Zevallos et J. M. Krochta. 1993. «Optimization of edible coatings on minimally processed carrots to reduce white blush using response surface methodology». Trans. Amer. Soc. Agric. Engr., vol. 36, p. 801-805.

AVENA-BUSTILLOS, R., L. Cisneros-Zevallos, J. M. Krochta et M. E. Salveit. 1993. «Application of casein-lipid edible film emulsions to reduce white blush on minimally processed carrots». Postharvest Biol. Tec., vol. 4, p. 319-329.

BABIC, I., C. Nguyen-the, M. J. Amiot et S. Aubert. 1994. «Antimicrobial activity of shredded carrot extracts on food-borne bacteria and yeast». J. Appl. Bacteriol., vol. 76, p. 135-141.

BABIC, I., G. Hilbert, C. Nguyen-the et J. Guiraud. 1992. «The yeast flora of stored ready-to-use carrots and their role in spoilage». Int. J. Food Sci. Tech., vol. 27, p. 473-484.

BABIC, I., M. J. Amiot, C. Nguyen-the et S. Aubert. 1993. «Changes in phenolic content in fresh ready-to-use shredded carrots during storage». J. Food Sci., vol. 58, p. 351-356.

BALDWIN, E. A., M. O. Nisperos-Carriedo et R. A. Baker. 1995. «Edible coatings for lightly processed fruits and vegetables». HortScience, vol. 30, p. 35-38.

BANWART, G. J. 1989. Basic food microbiology. 2^e édition. New York: Chapman et Hall.

BELL, A. A. 1981. «Biochemistry of disease resistance». Ann. Rev. Plant Phys., vol. 32, p. 40-46.

BENNIK, M. H. J., W. Vorstman, E. J. Smid et L. G. M. Gorris. 1998. «The influence of oxygen and carbon dioxide on the growth of prevalent *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* species isolated from fresh and controlled-atmosphere-stored vegetables». Food Microbiol., vol. 15, p.459-469.

BEUCHAT, L. R. 1996. «Pathogenic microorganisms associated with fresh produce». J Food Prot., vol. 59, p. 204-216.

BHARATHI, S., M. N. Ramesh et M. C. Varadaraj. 2001. «Predicting the behavioural pattern of *Escherichia coli* in minimally processed vegetables». Food Control, vol. 21, p. 275-284.

BOISSEAU, P. C. Jungas et M. F. Libert. 1991. «Effets des traitements combinés sur les qualités microbiologiques et organoleptiques des végétaux frais peu transformés». In Les actes du XVIII^e Congrès de réfrigération (Montréal), vol. 4, p. 1647-1651, Paris: Institut International du Froid.

BOLIN, H. R. et C. C. Huxsoll. 1991. «Control of minimally processed carrot (*Daucus carota*) surface discoloration caused by abrasion peeling». J. Food Sci., vol. 56, p. 416-418.

BROCKLEHURST, T. F., C. M. Zaman-Wong et B. M. Lund. 1987. «A note on the microbiological of retail packs of salad vegetables». J. Appl. Bacteriol., vol. 63, p. 409-415.

BRUCE, K. D., W. D. Hiorns, J. L. Hobman, A. M. Osborn, P. Strike et D. A. Ritchie. 1992. «Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction». Appl. Environ. Microbiol., vol. 58, p. 3413-3416.

BUICK, R. et A. Damoglou. 1987. «The effect of vacuum packaging on the microbial spoilage and shelf-life of ready-to-use sliced carrots». J. Sci. Food Agr., vol. 38, p. 167-175.

BUSTA, F. F. 1976. «Practical implications of injured microorganisms in food». J. Milk Food Technol., vol. 39, p. 138-145.

CALLISTER, S. M. et W. A. Agger. 1987. «Enumeration and characterization of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas caviae* isolated from grocery store produce». Appl. Environ. Microbiol., vol. 53, p. 249-253.

CARLIN, F., C. Nguyen-the, G. Hilbert et Y. Chambroy. 1990. «Modified atmosphere packaging of fresh, ready-to-use grated carrots in polymeric films». J. Food Prot., vol. 55, p. 1033-1038.

CARLIN, F., C. Nguyen-the, Y. Cudennec et M. Reich. 1989. «Microbial spoilage of fresh ready-to-use grated carrots». Sci. Alim., vol. 9, p. 371-386.

CHEN, H. 1995. «Functional properties and applications of edible films made of milk proteins». J. Dairy Sci., vol. 78, p. 2563-2583.

CHERVIN, C. L. et P. Boisseau. 1994. «Quality maintenance of ready-to-use shredded carrots by gamma irradiation». J. Food Sci., vol. 59, p. 359-361.

CHICHESTER, D. F. et F. W. Tanner. 1972. «Antimicrobial food additives». In T. E. Furia, (éd.). Handbook of food additives. Cleveland, Ohio: Chem. Rubber Pub. Co., p. 115.

CIELAB. 1976. «Method of measuring and specifying color rendering properties of light sources». Publication CIE N° 13-2 (TC.3.2), Paris: Bureau central de la CIE.

CISNEROS-ZEVALLOS, L., M. E. Saltveit et J. M. Krochta. 1995. «Mechanism of surface white discoloration of peeled (minimally processed) carrots during storage». J. Food Sci., vol. 60, p. 320-323, 333.

CISNEROS-ZEVALLOS, L., M. E. Saltveit et J. M. Krochta. 1997. «Hygroscopic coatings control surface white discoloration of peeled (minimally processed) carrots during storage». J. Food Sci., vol. 62, p. 363-366, 398.

COMO-SABETTI, K., S. Reagan, K. Allaire, C. M. Parrott, S. Simonds, S. Hrabowy, B. Ritter *et al.* 1997. «Outbreaks of *E. coli* O157:H7 associated with eating alfalfa sprouts – Michigan and Virginia, June-July 1997». Morbidity and Mortality Weekly Report, vol. 46, p. 741-744.

CUMAIRA-MAPAQ. 1995. Critères microbiologiques pour l'interprétation des résultats en analyse alimentaire. Québec.

DAGNEAUX, C., J. Liquier et E. Taillandier. 1995. «Sugar conformations in DNA and RNA-DNA triple helices determined by FTIR spectroscopy: role of backbone composition». Biochemistry, vol. 34, p. 16618-16623.

DANIELS, J. A., R. Krishnamurt et S. S. H. Rizvi. 1985. «A review of effects of CO₂ on microbial growth and food quality». J. Food Prot., vol. 48, p. 532-537.

DAVIDSON, P. M. 1997. «Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds». In M. P. Doyle, L. R. Beuchat et T. J. Montville (éd.). *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. Washington, DC.:ASM Press, p. 520-555.

DEBEAUFORT, F., J. A. Quezada-Gallo et A. Voilley. 1998. «Edible films and coatings: tomorrow's packagings: a review». Crit. Rev. Food Sci., vol 38, p. 299-313.

DIXON, N. M. et D. B. Kell. 1989. «The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of microorganisms». J. Appl. Bacteriol., vol. 67, p. 109-136.

DOVBESHKO, G. I., N. Y. Gridina, E. B. Kruglova et O. P. Pashchuk. 2000. «FTIR spectroscopy studies of nucleic acid damage». Talanta, vol. 53, p. 233-246.

ELLIOTT, J. G. 1999. «Application of antioxidant vitamins in foods and beverages». Food Technol., vol. 53, p. 46-48.

ERCOLANI, G. L. 1976. «Bacteriological quality assessment of fresh marketed lettuce and fennel». Appl. Environ. Microbiol., vol. 31, p. 847-852.

FAN, X. et K. J. B. Sokorai. 2002. «Sensorial and chemical quality of gamma-irradiated fresh-cut iceberg lettuce in modified atmosphere packages». J. Food Prot., vol. 65, p. 1760-1765.

- FAN, X., P. M. A. Toivonen, K. T. Rajkowski et K. J. B. Sokorai. 2003. «Warm water treatment in combination with modified atmosphere packaging reduces undesirable effects of irradiation on the quality of fresh-cut iceberg lettuce». J. Agr. Food Chem., vol. 51, p. 1231-1236.
- FAO/IAEA/WHO study group. 1999. High dose irradiation: wholesomeness of food irradiated with doses >10 kGy. Geneva: World Health Organization. WHO technical report series 890, 199 p.
- FARBER, J. M. 1991. «Microbiological aspects of modified atmosphere packaging technology – a review». J. Food Prot., vol. 54, p. 58-70.
- FARBER, J. M., A. O. Carter, P. V. Varughese, F. E. Ashton et E. P. Ewan. 1990. «Listeriosis traced to the consumption of alfalfa tablets and soft cheese». N. Engl. J. Med., vol. 322, p. 338.
- FARKAS, J. 1989. «Microbiological safety of irradiated foods». Int. J. Food Microbiol., vol. 9, p. 1-15.
- FARKAS, J., T. Saray, C. Mohacsi-Farkas, K. Horti et É. Andrassy. 1997. «Effects of low-dose gamma radiation on shelf-life and microbiological safety of pre-cut/prepared vegetables». Adv. Food Sci., vol. 19, p. 111-119.
- FOWLER, J. L. et J. F. Foster. 1976. «A microbiological survey of three fresh green salads – can guidelines be recommended for these foods ?». J. Milk Food Technol., vol. 39, p. 111-118.
- FRANCIS, G. A., C. Thomas et D. O'Beirne. 1999. «The microbiological safety of minimally processed vegetables – a review article». Int. J. Food Sci. Tech., vol. 34, p. 1-22.
- FRICKER, C. R. et S. Tompsett. 1989. «*Aeromonas* spp. in foods: a significant cause of food poisoning ?». Int. J. Food. Microbiol., vol. 9, p. 17-23.
- GARG, N., J. J. Churey et D. F. Splittstoesser. 1990. «Effect of processing conditions on the microflora of fresh-cut vegetables». J. Food Prot., vol. 53, p. 701-703.
- GARROD, B., B. G. Lewis et D. T. Coxon. 1978. «*Cis*-heptadeca-1, 9-diene-4' 6-diyne-3, 8-diol, an antifungal polyacetylene from carrot root tissue». Physiol. Plant Pathology, vol. 13, p. 241-246.
- GARROD, B., E. J. A. Lea et B. G. Lewis. 1979. «Studies on the mechanism of action of the antifungal compound falcarindiol». New Phytol., vol. 83, p. 463-471.

- GAVINI, F., J. Mergaert, A. Beji, C. Mielcarek, D. Izard, K. Kersters et J. De Ley. 1989. «Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) ewing and fife 1972 to *Pantoea* gen. Nov. as *Pantoea agglomerans* comb. Nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov.». Int. J. Syst. Bacteriol., vol. 39, p. 337-345.
- GELDREICH, E. E. et R. H. Bordner. 1971. «Fecal contamination of fruits and vegetables during cultivation and processing for market: a review». J. Milk Food Technol., vol. 34, p. 184-195.
- GENNADIOS, A. et C. L. Weller. 1990. «Edible films and coatings from wheat and corn proteins». Food Technol., vol. 44, p. 63-69.
- GILLES, N. E. et T. Alper. 1959. «Reduction in the lethal effects of radiations on *Escherichia coli* B by treatment with chloramphenicol». Nature, vol. 183, p. 237-240.
- GÖRG, A., W. Postel et S. Günther. 1988. «The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients». Electrophoresis, vol. 9, p. 531-546.
- GÖRG, A., G. Boguth, C. Obermaier, A. Posch et W. Weiss. 1995. «Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): The State of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems». Electrophoresis, vol. 16, p. 1079-1086.
- HAGENMAIER, R. D. et R. A. Baker. 1998. «Microbial population of shredded carrots in modified atmosphere packaging as related to irradiation treatment». J. Food Sci., vol. 63, p. 162-164.
- HAMILTON-MILLER, J. M. et S. Shah. 2001. «Identity and antibiotic susceptibility of enterobacterial flora of salad vegetables.» Int. J. Antimicrob. Agents., vol. 18, p. 81-83.
- HANSEN, M. T. 1978. « Multiplicity of genome equivalents in the radiation-resistant bacterium *Micrococcus radiodurans*». J. Bacteriol., vol. 134, p. 71-75.
- HANSEN, M. T. 1980. «Four proteins synthesized in response to deoxyribonucleic acid damage in *Micrococcus radiodurans*». J. Bacteriol., vol. 141, p. 81-86.
- HEDBERG, C. W., K. L. MacDonald et M. T. Olsterholm. 1994. «Changing epidemiology of food-borne disease: a Minnesota perspective». Clin. Infect. Dis., vol. 18, p. 671-682.
- HEIMDAL, H., B. F. Kuhn, L. Poll et L. M. Larsen. 1995. «Biochemical changes and sensory quality of shredded and MA-packaged iceberg lettuce». J. Food Sci., vol. 60, p. 1265-1268, 1276.
- HEISICK, J. E., F. M. Harrell, E. H. Peterson, S. McLaughlin, D. E. Wagner, I. V. Wesley et J. Bryner. 1989. «Comparaison of four procedures to detect *Listeria* spp. in foods». J. Food Prot., vol. 52, p. 154-157.

HELM, D., H. Labischinski, G. Schallehn et D. Naumann. 1991. «Classification and identification of bacteria by Fourier-Transform Infrared spectroscopy». J. Gen. Microbiol., vol. 137, p. 69-79.

HINES, E. 2000. «The microbiology of fresh and fresh-cut produce: studies in population». Food Quality, Janvier, p. 18-25.

HO, J. L., K. N. Shands, G. Freidland, P. Eckind et D. W. Fraser. 1986. «An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals». Arch. Intern. Med., vol. 146, p. 520-524.

HOLT, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sheath, J. T. Staley et S. Williams. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9^e édition. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.

HORBACH, I., D. Naumann et F. Fehrenbach. 1988. «Simultaneous infections with different serogroups of *Legionella pneumophila* investigated by routine methods and Fourier-Transform infrared spectroscopy». J. Clin. Microbiol., vol. 26, p. 1106-1110.

HOTCHKISS, J. H. 1988. «Experimental approaches to determining the safety of food packaged in modified atmospheres». Food Technol., vol. 42, p. 55-64.

HOUANG, E., P. Bodnaruk et Z. Ahmet. 1991. «Hospital green salads and the effects washing them». J. Hosp. Infect., vol. 17, p. 125-131.

HOWARD, L. R., D. Braswell, H. Heymann, Y. Lee, L. M. Picket et J. Aselage. 1995. «Sensory attributes and instrumental analysis relationships for strained processed carrot flavor». J. Food Sci., vol. 60, p. 145-148.

HOWARD, L. R. et L. E. Griffin. 1993. «Lignin formation and surface discoloration of minimally processed carrot sticks». J. Food Sci., vol. 58, p. 1065-1067.

HOWARD, L. R. et T. Dewi. 1995. «Sensory, microbiological and chemical quality of mini-peeled carrots as affected by edible coating treatment». J. Food Sci., vol. 60, p. 142-144.

HOWARD, L. R. et T. Dewi. 1996. «Minimal processing and edible coating effects on composition and sensory quality of mini-peeled carrots». J. Food Sci., vol. 61, p. 643-645, 651.

HUXSOLL, C. C. et H. R. Bolin. 1989. «Processing and distribution alternatives for minimally processed fruit and vegetables». Food Technol., vol. 43, p. 124-128.

ICGFI. 1992a. Dossier sur l'irradiation des denrées alimentaires. Fiche d'information no. 2 ICGFI, Vienne.

ICGFI. 1992b. Dossier sur l'irradiation des denrées alimentaires. Fiche d'information no. 5 ICGFI, Vienne.

ICMSF. 1980. «Ionizing irradiation». In J. H. Silliker, R. P. Elliott, A. C. Baird-Parker, F. L. Bryan, J. H. B. Christian, D. S. Clark, J. C. Jr. Olson et T. A. Roberts (éd.). *Microbial ecology of food: Factors affecting life and death of microorganisms*. Toronto: Academic Press. vol. I., p. 46-69.

JACXSENS, L., F. Devlieghere, C. Van der Steen et J. Debevere. 2001. «Effect of high oxygen modified atmosphere packaging on microbial growth and sensorial qualities of fresh-cut produce». Int. J. Food Microbiol., vol. 71, p. 197-210.

JULIOT, K. N., R. C. Lindsay et S. C. Ridley. 1989. «Directly-acidified carrot slices for ingredients in refrigerated vegetable salads». J. Food Sci., vol. 54, p. 90-95.

JUVEN, B. J., P. Lindner et H. Weisslowicz. 1985. «Pectin degradation in plant material by *Leuconostoc mesenteroides*». J. Appl. Bacteriol., vol. 58, p.533-538.

KADER, A. A. 1986. «Potential applications of ionizing radiation in postharvest handling of fresh fruits and vegetables». Food Technol., vol. 40, p. 117-121.

KADER, A. A., D. Zagory et E. L. Kerbel. 1989. «Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables». Crit. Rev. Food Sci. Nutr., vol. 28, p. 1-30.

KAYS, S. J. 1999. «Preharvest factors affecting appearance». Postharvest Biol. Technol., vol. 15, p. 233-247.

KESTER, J. J. et O. R. Fennema. 1988. «Edible films and coatings: a review». Food Technol., vol. 42, p. 47-59.

KON, S. 1978. «Effects of oxygen free radicals on plant polysaccharides». Food Technol., vol. 32, p. 84-90, 94.

KUROSAKI, F. et A. Nishi. 1983. «Isolation and antimicrobial activity of the phytoalexin 6-methoxymellein from cultured carrot cells». Phytochemistry, vol. 22, p.669-672.

LACASSE, D. 1995. Introduction à la microbiologie alimentaire. Montréal: Les Éditions St-Martin, 702 p.

LACROIX, M. et B. Ouattara. 2000. «Combined industrial processes with irradiation to assure innocuity and preservation of food products – a review». Food Res. Int., vol. 33, p. 719-724.

LAEMMLI, U. K. 1970. «Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4». Nature, vol. 227, p. 680-685.

LEGAL, J. M., M. Manfait et T. Theophanides. 1991. «Applications of FTIR spectroscopy in structural studies of cells». J. Mol. Struct., vol. 242, p. 397-407.

LEISTNER, L. 1978. «Hurdle effect and energy saving». In W. K. Downey (éd.). Food quality and nutrition. Londres: Applied Science Publishers, 553 p.

LEISTNER, L. 1992. «Food preservation by combined methods». Food Res. Int., vol. 25, p. 151-158.

LETENDRE, M. 1998. «Utilisation de protéines laitières pour la fabrication de pellicules d'emballage et d'enrobage biodégradables et caractérisation de leur réticulation». Mémoire de maîtrise en microbiologie appliquée, Laval, INRS-Institut Armand Frappier, Université du Québec.

LI, P. et M. M. Barth. 1998. «Impact of edible coatings on nutritional and physiological changes in lightly-processed carrots». Postharvest Biol. Tec., vol. 14, p. 51-60.

LIM, E. M., A. Lafon, L. Dridi, S. Boudebouze, S. D. Ehrlich et E. Maguin. 2001. «Identification de protéines de stress chez *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* par électrophorèse bidimensionnelle». Lait, vol. 81, p. 317-325.

LIQUIER, J., R. Letellier, C. Dagneaux, M. Ouali, F. Morvan, B. Raynier, J. L. Imbach et E. Taillandier. 1993. «Triple helix formation by α -oligodeoxynucleotides: a vibrational spectroscopy and molecular modeling study». Biochemistry, vol. 32, p. 10591-10598.

LONGNECKER, M. P., P. A. Newcomb, R. Mittendorf, E. R. Greenberg et W. C. Willett. 1997. «Intake of carrots, spinach, and supplements containing vitamin A in relation to risk of breast cancer». Cancer Epidem. Biomar., vol. 6, p. 887-892.

LUCHT, L., G. Blank et J. Borsa. 1998. «Recovery of foodborne microorganisms from potentially lethal radiation damage». J. Food Prot., vol. 61, p. 586-590.

LUND, B. M. 1971. «Bacterial spoilage of vegetables and certain fruits». J. Appl. Bacteriol., vol. 34, p. 9-20.

MACGOWAN, A. P., K. Bowker, J. McLauchlin, P. M. Bennett et D. S. Reeves. 1994. «The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria* spp. in shop bought food stuffs, human faeces, sewage and soil from urban sources». Int. J. Food Microbiol., vol 21, p. 325-334.

MADDEN, J. M. 1992. «Microbial pathogens in fresh produce – the regulatory perspective». J. Food Prot., vol. 55, p. 821-823.

MAGNUSON, J. A., A. D. Jr. King et T. Török. 1990. «Microflora of partially processed lettuce». Appl. Environ. Microbiol., vol. 56, p. 3851-3854.

MALINS, D. C., N. L. Polissar et S. J. Gunselman. 1997. «Infrared spectral models demonstrate that exposure to environmental chemicals leads to new forms of DNA». Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 94, p. 3611-3615.

MALINS, D. C. et S. J. Gunselman. 1994. «Fourier-Transform infrared spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry reveal a remarkable degree of structural damage in the DNA of wild fish exposed to toxic chemicals». Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 91, p. 13038-13041.

MAPAQ. 2001, 2002. Rappel initié par le MAPAQ. Direction de l'appui à l'inspection des aliments. Montréal. <http://www.agr.gouv.qc.ca>

MARCHETTI, R., M. A. Casadei et M. E. Guerzoni. 1992. «Microbial populations dynamics in ready-to-use vegetables salads». Ital. J. Food Sci., vol. 2, p. 97-108.

MARMUR, J. 1961. «A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms». J. Mol. Biol., vol. 3, p. 208-218.

MATTIMORE, V. et J. R. Battista. 1996. «Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation». J. Bacteriol., vol. 178, p. 633-637.

MEI, Y., Y. Zhao, J. Yang et H. C. Furr. 2002. «Using edible coating to enhance nutritional and sensory qualities of baby carrots». J. Food Sci., vol. 67, p. 1964-1968.

MELIN, A. M., A. Perromat et G. Délérís. 2001. «Sensitivity of *Deinococcus radiodurans* to γ -irradiation: a novel approach by Fourier Transform Infrared spectroscopy». Arch. Biochem. Biophys., vol. 394, p. 265-274.

MELIN, A. M., E. Peuchant, A. Perromat et M. Clerc. 1998. «Sensitivity to oxidative damage of two *Deinococcus radiodurans* strains». J. Appl. Microbiol., vol. 84, p. 531-537.

MOHAMMADI, S., M. Perrée-Fauvet, N. Gresh, K. Hillairet et E. Taillandier. 1998. «Joint molecular modeling and spectroscopic studies of DNA complexes of a bis (arginyl) conjugate of a tricationic porphyrin designed to target the major groove». Biochemistry, vol. 37, p. 6165-6178.

MOLINS, R. A., Y. Motarjemi et F. K. Käferstein. 2001. «Irradiation: a critical control point in ensuring the microbiological safety of raw foods». Food Control, vol. 12, p. 347-356.

MONK, J. D., L. R. Beuchat et M. P. Doyle. 1995. «Irradiation inactivation of food-borne microorganisms». J. Food Prot., vol. 58, p. 197-208.

- MOSELEY, B. E. B. 1984. «Radiation damage and its repair in non-sporulating bacteria». In M. H. E. Andrew et A. D. Russel (éd.). *The revival of injured microbes*. Londres: Academic Press, p. 147-174.
- MYERS, R. A. 1989. «Packaging considerations for minimally processed fruits and vegetables». Food Technol., vol 43, p. 120-124.
- NASIM, A. et A. P. James. 1978. «Life under conditions of high irradiation». In D. J. Kushner, (éd.). *Microbial life in extreme environment*. London: Academic Press, p. 409-440.
- NAUMANN, D., V. Fijala, H. Labischinski et P. Giesbrecht. 1988. «The rapid differentiation and identification of pathogenic bacteria using Fourier Transform Infrared spectroscopic and multivariate statistical analysis». J. Mol. Struct., vol. 174, p. 165-170.
- NGUYEN-THE, C. et B. M. Lund. 1991. «The letal effect of carrot on *Listeria* species». J. Appl. Bacteriol., vol. 70, p. 479-488.
- NGUYEN-THE, C. et B. M. Lund. 1992. «An investigation of the antibacterial effect of carrot on *Listeria monocytogenes*». J. Appl. Bacteriol., vol. 73, p. 23-30.
- NGUYEN-THE, C. et F. Carlin. 1994. «The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables». Crit. Rev. Food Sci. Nutr., vol. 34, p. 371-401.
- OGIHARA, H., M. Kanie, N. Jano et M. Haruta. 1993. «Effect of carbon dioxide, oxygen and their gas mixtures on the growth of some food borne pathogens and spoilage bacteria in modified atmosphere package of food». J. Food Hyg. Soc. Japan. vol 34. p. 283-288.
- O'MAHONY, M., J. Cowden, B. Smyth, D. Lynch, M. Hall, B. Rowe, E. L. Teare, R. E. Tettmar, A. M. Coles, R. J. Gilbert, E. Kincott et C. L. R. Bartlett. 1990. «An outbreak of *Salmonella saintpaul* infection associated with beansprouts». Epidemiol. Infect., vol. 104, p. 229-235.
- OUATTARA, B., M. Giroux, W. Smoragiewicz, L. Saucier et M. Lacroix. 2002. «Combined effect of gamma irradiation, ascorbic acid, and edible coating, on the improvement of microbial and biochemical characteristics of ground beef». J. Food Prot., vol. 65, p. 981-987.
- OUATTARA, B., S. F. Sabato et M. Lacroix. 2001. «Combined effect of antimicrobial coating and gamma irradiation on shelf life extension of pre-cooked shrimp (*Penaeus* spp.)». Int. J. Food Microbiol., vol. 68, p. 1-9.
- PEROMBELON, M. C. M et A. Kelman. 1980. «Ecology of the soft rot *Erwinias*». Annu. Rev. Phytopathol., vol. 18, p. 361-387.

- PETIBOIS, C., V. Rigalleau, A. M. Melin, A. Perromat et G. Déléris. 1999. «Determination of glucose in dried serum samples by Fourier-Transform infrared spectroscopy». Clin. Chem., vol. 45, p. 1530-1535.
- PITONZO, B. J., P. S. Amy et M. Rudin. 1999. «Resuscitation of microorganisms after gamma irradiation». Radiation Research, vol. 152, p. 71-75.
- POUGET, J. P. 2000. «Effet du rayonnement ionisant sur l'ADN cellulaire: mesure des bases puriques et pyrimidiques modifiées». Thèse de doctorat, Grenoble, Université de Paris XI, 253 p.
- PRESCOTT, L., J. P. Harley et D. A. Klein. 1995. Microbiologie. Traduit de l'anglais par C. M. Baqc-Calberg, J. Coyette, P. Hoet et M. Nguyen-the-Distèche. Bruxelles: De Boeck-Wesmael S. A., 1014 p.
- PROKOPOWICH, D. et G. Blank. 1991. «Microbiological evaluation of vegetable sprouts and seeds». J. Food Prot., vol. 54, p. 560-562.
- RAY, B. 1979. «Methods to detect stressed microorganisms». J. Food Prot., vol. 42, p. 346-355.
- RAY, B. 1986. «Impact of bacterial injury and repair in food microbiology: its past, present and future». J. Food Prot., vol. 49, p. 651-655.
- ROBINS, D. 1991. The preservation of food by irradiation – a factual guide to the process and its effect on food. Grande-Bretagne: The Bath Press Group, 119 p.
- ROCHE VITAMINES. 2001. Points d'intérêts sur les vitamines et les caroténoïdes. Programme d'information sur les vitamines. Laval.
- SANGER, F., S. Nicklen, et A. R. Coulson. 1977. «DNA sequencing with chain terminating inhibitors». Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 69, p. 1408-1412.
- SANTÉ CANADA. 1999. Valeur nutritive de quelques aliments usuels. Éditions du gouvernement du Canada. Canada. <http://www.hc-sc.gc.ca>
- SARGENTINI, N. J. et K. C. Smith. 1986. «Quantification of the involvement of the recA, recB, recC, recF, recJ, recN, lexA, radA, radB, uvrD, and umuC genes in the repair of X-ray-induced DNA double-strand breaks in *Escherichia coli*». Radiat. Res., vol. 107, p. 58-72.
- SARKAR, S. K. et C. T. Phan. 1979. «Naturally-occurring and ethylene-induced phenolic compounds in the carrot root». J. Food Prot., vol. 42, p. 526-534.
- SAURIOL, P. 2001. «Les carottes dans un cul-de-sac». Le bulletin des agriculteurs. Octobre 2001. <http://www.lebulletin.com>

- SCHLECH, W. F., P. M. Lavigne, R. A. Bortolussi, A. C. Allen, E. V. Haldane, A. J. Wort, A. W. Hightower, S. E. Johnson, S. H. King, E. S. Nicholis et C. V. Broome. 1983. «Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food». N. Engl. J. Med., vol. 308, p. 203-206.
- SENER, S. D., N. A. Cox, J. S. Bailey et F. I. Meredith. 1984. «Effects of harvesting, transportation, and cryogenic processing on the microflora of Southern peas». J. Food Sci., vol. 49, p. 1410-1411, 1437.
- SENER, S. D., N. A. Cox, J. S. Bailey et W. R. Jr. Forbus. 1985. «Microbiological changes in fresh market tomatoes during packing operations». J. Food Sci., vol. 50, p. 254-255.
- SETLOW, J. K. 1966. «The molecular basis of biological effects of ultraviolet radiation and photoreactivation». In M. Ebert et A. Howard (éd). Current topics in radiation research. Amsterdam: North Holland Publishing Co., p. 195-248.
- SHARMA, A., S. Gautam et S. S. Jadhav. 2000. «Spice extracts as dose-modifying factors in radiation inactivation». J. Agric. Food Chem., vol. 48, p. 1340-1344.
- SHIN, R., M. Suzuki et Y. Morishita. 2002. «Influence of intestinal anaerobes and organic acids on the growth of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7». J. Med. Microbiol., vol. 51, p. 201-206.
- SIDDHURAJU, P., H. P. S. Makkar et K. Becker. 2002. «The effect of ionizing radiation on antinutritional factors and the nutritional value of plant materials with reference to human and animal food». Food Chemistry, vol. 78, p.187-205.
- SIMON, P. W., C. E. Peterson et R. C. Lindsay. 1982. «Genotype, soil, and climate effects on sensory and objective components of carrot flavor». J. Am. Soc. Hortic. Sci., vol. 107, p. 644-648.
- SOLOMON, H. M. et D. A. Kautter. 1986. «Growth and toxin production by *Clostridium botulinum* in sauteed onions». J. Food Prot., vol. 49, p. 618-620.
- SOLOMON, H. M. et D. A. Kautter. 1988. «Outgrowth and toxin production by *Clostridium botulinum* in bottled chopped garlic». J. Food Prot., vol. 51, p. 862-868.
- SOLOMON, H. M., D. A. Kautter, T. Lilly et E. J. Rhodehamel. 1990. «Outgrowth of *Clostridium botulinum* in shredded cabbage at room temperature under modified atmosphere». J. Food Prot., vol. 53, p. 831-833.
- SPEIZER, F. E., G. A. Colditz, D. J. Hunter, B. Rosner, C. Hennekens. 1999. «Prospective study of smoking, antioxidant intake, and lung cancer in middle-aged women (USA)». Cancer Cause. Control, vol. 10, p. 475-482.

- SPLITTSTOESSER, D. F. 1983. «Indicator organisms on frozen blanched vegetables». Food Technol., vol. 37, p. 105-106.
- STATISTIQUE CANADA. 2000. Statistiques sur les aliments au Canada. Éditions du gouvernement du Canada. Canada. <http://www.statcan.ca>
- STATISTIQUE CANADA. 2001. Production de fruits et de légumes. Éditions du gouvernement du Canada. Canada. <http://www.statcan.ca>
- TAMMINGRA, S. K., R. R. Beumer et E. K. Kampelmacher. 1978. «The hygienic quality of vegetables grown in or imported into The Netherlands: a tentative survey». J. Hyg. Camb., vol. 80, p.143-154.
- TANAKA, A., H. Hirano, M. Kikuchi, S. Kitayama et H. Watanabe. 1996. «Changes in cellular proteins of *Deinococcus radiodurans* following γ -irradiation». Radiat. Environ. Bioph., vol. 35, p. 95-99.
- TATSUMI, Y., A. Watada et P. Ling. 1993. «Sodium chloride treatment or waterjet slicing effects on white tissue development of carrot sticks». J. Food Sci., vol. 58, p. 1390-1392.
- TATSUMI, Y., A. Watada et W. Wergin. 1991. «Scanning electron microscopy of carrot stick to determine cause of white translucent appearance». J. Food Sci., vol. 56, 1357-1359.
- THORNLEY, M. J. 1963. «Radiation resistance among bacteria». J. Appl. Bacteriol., vol. 26, p. 334-345.
- URBAIN, W. M. 1984. «Irradiated foods: a giant step beyond appert». Nutrition Today, vol. 19, p.2-7.
- URBAIN, W. M. 1986. Food irradiation. Orlando, Floride: Academic Press. vol. 33, p. 99-103.
- USDA. 1999. U. S. Food expenditures. Economic research service. États-Unis. <http://www.usda.gov>
- USDA. 2002. Vegetables and melons outlook. Economic research service. États-Unis. <http://www.usda.gov>
- VACHON, C., G. D'Aprano, M. Lacroix et M. Letendre. 2003. «Effect of edible coating process and irradiation treatment of strawberry *fragaria* spp. on storage-keeping quality». J. Food Sci., vol. 68, p. 608-612.
- WAGNER, M. K. et L. J. Moberg. 1989. «Present and future use of traditional antimicrobials». Food Technol., vol. 43, p. 143-147, 155.

WANG, P et H. E. Schellhorn. 1995. «Induction of resistance to hydrogen peroxide and radiation in *Deinococcus radiodurans*». Can. J. Microbiol., vol. 41, p. 170-176.

WASINGER, V. C., S. J. Cordwell, A. Cerpa-Poljak, J. X. Yan., A. A. Gooley, M. R. Wilkins, M. W. Duncan, R. Harris, K. L. Williams et I. Humphery-Smith. 1995. «Progress with gene product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*». Electrophoresis, vol. 16, p. 1090-1094.

WATSON, S. P., M. O. Clements et S. J. Foster. 1998. «Characterization of the starvation-survival response of *Staphylococcus aureus*». J. Bacteriol., vol 180, p. 1750-1758.

WEERATNA, R. D. et M. P. Doyle. 1991. «Detection and production of verotoxin 1 of *Escherichia coli* O157:H7 in food». Appl. Environ. Microbiol., vol. 57, p. 2951-2955.

ZAGORY, D. 1999. «Effects of post-processing handling and packaging on microbial populations». Postharvest Biol. Tec., vol. 15, p. 313-321.

ZEPEDA-LOPEZ, H., M. Ortega-Rodriguez, E. I. Quinonez-Ramirez et C. Vazquez-Salinas. 1995. «Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from vegetables». Annu. Mtg. Am. Soc. Microbiol. (Abstracts) Washington, D. C.