

N° d'ordre 314-99

Année 1999

THESE

présentée

devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTORAT
(arrêté du 30 mars 1992)

présentée et soutenue publiquement le
15 décembre 1999

par

Jean-Christophe AUGUSTIN

MODELISATION DE LA DYNAMIQUE DE CROISSANCE DES POPULATIONS DE *Listeria monocytogenes* DANS LES ALIMENTS

Directeur de thèse : Vincent CARLIER

JURY: Jean-Pierre FLANDROIS, Président
Camille DUBY, Rapporteur
Jacques POURQUIE, Rapporteur
Cécile LAHELLEC
Olivier CERF
Patrick JOLIVET
Laurent ROSSO

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	9
PARTIE I	13
CHAPITRE 1	
MICROBIOLOGIE PREVISIONNELLE : ETAT DES LIEUX	13
A. La cinétique de croissance des populations bactériennes et les modèles primaires de croissance	13
a. La cinétique de croissance des populations bactériennes	13
b. Les modèles primaires de croissance	16
B. L'influence des facteurs environnementaux et les modèles secondaires	20
a. Nature des facteurs environnementaux	20
b. Les modèles secondaires	21
CHAPITRE 2	
CONSTRUCTION DE LA BANQUE DE DONNEES SUR LA CROISSANCE DE <i>Listeria monocytogenes</i>	29
A. Récolte des données	29
B. Ajustement du modèle primaire de croissance aux jeux de données	32
C. Correction des paramètres de croissance en fonction du modèle primaire utilisé	33
D. Renseignement des facteurs environnementaux	37
CHAPITRE 3	
MODELE SECONDAIRE SANS INTERACTIONS	41
A. Elaboration du modèle secondaire	41
B. Estimation des paramètres du modèle	43
a. Estimation des valeurs cardinales de <i>L. monocytogenes</i>	43
b. Estimation des concentrations minimales inhibitrices	45
c. Estimation de l'effet des facteurs qualitatifs	49
d. Estimation de l'effet de la nature du substrat	50
e. Estimation du taux de croissance optimum μ_{opt} et du produit $\mu_{max}lag$	52
C. Performance du modèle secondaire sans interactions	55
a. Modélisation du taux de croissance maximum de <i>L. monocytogenes</i>	55
b. Modélisation du temps de latence de <i>L. monocytogenes</i>	59

PARTIE II	63
CHAPITRE 1	
MODELE SECONDAIRE AVEC INTERACTIONS	63
A. Modélisation des interactions	63
a. Interactions entre température, pH et activité de l'eau	63
b. Interactions entre température, pH ou activité de l'eau et substances inhibitrices	66
c. Cas particuliers des interactions $pH_{\min}$ - acide et $aw_{\min}$ - soluté	68
B. Modèle secondaire avec interactions	71
C. Estimation des paramètres du modèle	72
a. Estimation des valeurs cardinales minimales absolues et des concentrations minimales inhibitrices absolues	72
b. Estimation du taux de croissance optimum de <i>L. monocytogenes</i>	77
D. Performance du modèle secondaire avec interactions	79
a. Modélisation du taux de croissance maximum de <i>L. monocytogenes</i>	79
b. Modélisation du temps de latence de <i>L. monocytogenes</i>	81
E. Importance de l'effet de la souche	83
CHAPITRE 2	
MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE SIMPLE D'ACQUISITION DES PARAMETRES DE CROISSANCE	87
A. Relation entre la densité optique et la concentration en cellules viables	88
B. Méthodes d'estimation des paramètres de croissance	91
C. Application au taux de croissance maximum	95
D. Application au temps de latence	98
CHAPITRE 3	
MODELISATION DU TEMPS DE LATENCE	103
A. Variabilité du produit $\mu_{\max}lag$	103
a. Interprétation physiologique du produit $\mu_{\max}lag$	103
b. Effet de l'environnement sur le produit $\mu_{\max}lag$	104
c. Effet de l'état physiologique de l'inoculum sur le produit $\mu_{\max}lag$	105
d. Effet de la taille de l'inoculum sur le produit $\mu_{\max}lag$	108
B. Modélisation de l'effet de l'histoire thermique de l'inoculum sur le temps de latence à la re-croissance	109
a. Protocole expérimental	109
b. Evolution du produit $\mu_{\max}lag$ avec le temps de pré-incubation de l'inoculum	111
c. Evolution des paramètres primaires avec la température de pré-incubation de l'inoculum	115
d. Modèle global d'évolution de $\mu_{\max}lag$ avec la durée et la température de pré-incubation de l'inoculum	117

e. Conséquences pour la prévision des cinétiques de croissance en conditions de température variables	122
C. Importance de l'effet de la taille de l'inoculum sur le temps de latence	124
a. Protocole expérimental	125
b. Effet de la taille de l'inoculum sur la durée de la phase de latence	127
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	135
BIBLIOGRAPHIE	145
ANNEXES	157
1. Estimation of temperature dependent growth rate and lag time of <i>Listeria monocytogenes</i> by optical density measurements	157
2. Mathematical modelling of the growth rate and lag time for <i>Listeria monocytogenes</i>	167
3. Modelling the growth rate of <i>Listeria monocytogenes</i> with a multiplicative type model including interactions between environmental factors	211
4. Significance of inoculum size on the lag time of <i>Listeria monocytogenes</i> ..	247
5. A model describing the effect of temperature history on lag time for <i>Listeria monocytogenes</i>	259
6. Valeurs des produits $\mu_{\max}lag$ obtenus dans l'étude de l'effet de l'histoire thermique de l'inoculum sur le temps de latence à la re-croissance	287

INTRODUCTION

Le statut de *Listeria monocytogenes*, bactérie pathogène décrite pour la première fois par Murray *et al.* (1926), a changé en 1981 lorsqu'au Canada, 17 personnes décédèrent des suites d'une listériose contractée en consommant du chou cru contaminé par la bactérie (Schlech *et al.*, 1983). Depuis cette épidémie qui constitua historiquement la première preuve que la listériose peut être contractée par consommation de denrées contaminées, beaucoup d'autres épidémies ont été décrites dans les pays industrialisés (Ryser, 1999) et en particulier en France (Goulet *et al.*, 1993 ; Jacquet *et al.*, 1994, 1995).

Cette bactérie représente un danger pour la santé publique et provoque actuellement en France, entre 200 et 300 cas annuels de listériose (Jacquet *et al.*, 1999). Ce danger est de plus caractérisé par une forte gravité avec un taux de létalité d'environ 20% (Gellin et Broome, 1989). *L. monocytogenes* est particulièrement d'actualité du fait de deux phénomènes :

- (i) les caractéristiques écologiques de la bactérie (psychrotrophie, relatives acidotolérance, xéro-tolérance et thermorésistance, micro-aérophilie) associées à une très grande ubiquité font que celle-ci est régulièrement présente dans les denrées alimentaires dont la conservation repose sur l'application du froid positif (Lahellec *et al.*, 1996) ;
- (ii) cette maladie se développe principalement chez les personnes dont l'immunité cellulaire est diminuée, or ces groupes à risques sont numériquement de plus en plus importants essentiellement du fait du vieillissement de la population.

L. monocytogenes est certainement le micro-organisme pathogène transmis par les aliments qui a été le plus étudié ces dernières années et de nombreux travaux concernant en particulier l'étude de sa croissance et de son inhibition ont été publiés depuis les années 80.

Parallèlement à l'émergence de ce pathogène, une approche quantitative s'est développée en écologie microbienne des aliments. Cette approche connue sous le nom de *microbiologie prévisionnelle* consiste à prévoir le comportement des micro-organismes dans les aliments à l'aide de modèles statistiques. Cette discipline représente un outil intéressant pour la mise en place de systèmes HACCP (*Hazard Analysis - Critical Control Point*) par les industriels de l'agro-alimentaire, et capital pour les pouvoirs publics dans le cadre de l'*Appréciation Quantitative des Risques* de maladies infectieuses transmises par les aliments.

De nombreux modèles mathématiques ont donc été proposés dans la littérature ces dernières années pour décrire le comportement des micro-organismes dans les aliments et en particulier pour décrire leur croissance en fonction des principales caractéristiques écologiques des denrées.

La démarche générale utilisée dans notre étude pour modéliser le comportement de *L. monocytogenes* se décompose en deux phases. Dans la première partie, nous évaluerons l'efficacité de modèles utilisés aujourd'hui en microbiologie prévisionnelle pour décrire la dynamique de croissance des populations de *L. monocytogenes* dans les aliments. Nous proposerons ensuite dans la seconde partie une amélioration de ces modèles permettant d'une part, de prendre en compte les interactions entre facteurs environnementaux, et d'autre part, d'intégrer l'influence des conditions pré-incubatoires sur le temps de latence de *L. monocytogenes*. Nous évaluerons également l'importance de l'effet de la taille de l'inoculum sur la durée de la phase de latence.

Les aspects méthodologiques n'ont pas été systématiquement détaillés dans cette étude mais ils peuvent être trouvés dans les publications issues de ce travail, présentées en annexes :

Augustin, J.-C., Rosso, L., Carlier, V. 1999. Estimation of temperature dependent growth rate and lag time of *Listeria monocytogenes* by optical density measurements. *Journal of Microbiological Methods* 38, 137-146.

Augustin, J.-C., Carlier, V. Mathematical modelling of the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* (accepté).

Augustin, J.-C., Carlier, V. Modelling the growth rate of *Listeria monocytogenes* with a multiplicative type model including interactions between environmental factors. *International Journal of Food Microbiology* (accepté).

Augustin, J.-C., Brouillaud-Delattre, A., Rosso, L., Carlier, V. Significance of inoculum size on the lag time of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* (accepté).

Augustin, J.-C., Rosso, L., Carlier, V. A model describing the effect of temperature history on lag time for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* (soumis).

La première partie du travail comporte les étapes suivantes (Figure i.1) :

(1.1) après une brève présentation des modèles actuellement utilisés en microbiologie prévisionnelle (partie I, chapitre 1), élaboration d'une banque de données sur la croissance de *L. monocytogenes* (partie I, chapitre 2).

Cette étape comporte plusieurs phases qui sont la récolte des données publiées, l'ajustement du modèle primaire de croissance aux cinétiques publiées, la correction des paramètres primaires de croissance publiés en fonction des modèles utilisés par les auteurs ;

(1.2) une étape d'évaluation des performances d'un modèle secondaire construit à partir de modèles existants pour décrire l'influence des facteurs environnementaux sur le taux de croissance maximum $\mu_{\max}$ et le temps de latence *lag* de *L. monocytogenes* (partie I, chapitre 3).

Cette étape comporte également plusieurs phases qui sont l'élaboration du modèle secondaire, l'estimation des paramètres du modèle, l'appréciation de l'adéquation du modèle à la banque de données qui consistera essentiellement en une comparaison des données théoriques calculées grâce au modèle aux données observées.

Ce modèle prendra en compte comme facteurs de variabilité des facteurs environnementaux (température, pH, activité de l'eau, substances inhibitrices, atmosphère gazeuse, substrat, flores annexes) et des facteurs liés à la technique d'étude (milieu de dénombrement, agitation des substrats liquides).

Les effets combinés (interactions entre les facteurs environnementaux), l'effet des conditions pré-incubatoires et l'effet de la souche seront par contre négligés dans ce modèle ;

La deuxième partie du travail comporte les étapes suivantes :

(2.1) une première étape de modification du modèle secondaire pour prendre en compte l'influence des effets combinés sur $\mu_{\max}$ et *lag* (partie II, chapitre 1).

Cette étape comprend une phase d'élaboration du modèle à partir de données bibliographiques, une phase d'estimation des paramètres et enfin d'appréciation de l'adéquation du modèle à la banque de données.

(2.2) une deuxième étape de modification du modèle secondaire afin de prendre en compte l'effet des conditions pré-incubatoires hormis les conditions de stress physique (chaleur, ionisation...) et chimique (acides, désinfectants...) sur le temps de latence (partie II, chapitre 3).

Cette étape comprend également une phase d'élaboration du modèle qui, cette fois, sera réalisée à partir de données expérimentales, une phase d'estimation des paramètres et d'appréciation de l'adéquation du modèle.

L'acquisition des données expérimentales, faisant appel à une technique originale, sera développée dans le chapitre précédant l'étape de modélisation (partie II, chapitre 2).

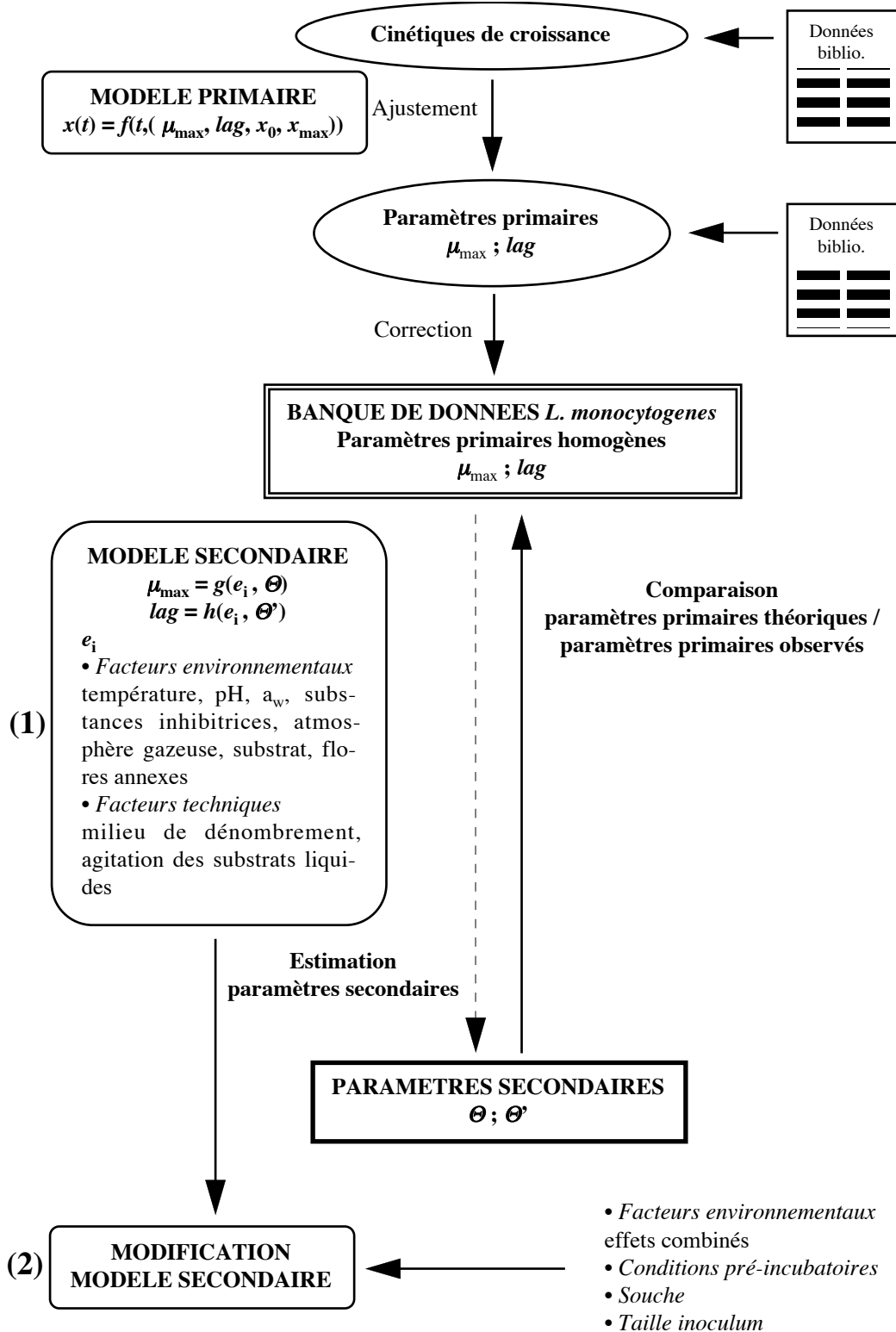


Figure i.1 Démarche générale utilisée pour modéliser le comportement de *L. monocytogenes* dans les aliments. Les différentes phases sont : (1) construction de la banque de données et évaluation d'un modèle secondaire construit à partir de modèles publiés, (2) modification du modèle secondaire.

PARTIE I

CHAPITRE 1

MICROBIOLOGIE PREVISIONNELLE : ETAT DES LIEUX

L'objectif de ce premier chapitre est de faire le point sur les modèles de croissance les plus utilisés aujourd'hui en microbiologie prévisionnelle. Le lecteur intéressé par une revue exhaustive de ces modèles peut se référer aux articles de Skinner et al. (1994) et Ross et McMeekin (1994).

I.1.A. LA CINETIQUE DE CROISSANCE DES POPULATIONS BACTERIENNES ET LES MODELES PRIMAIRES DE CROISSANCE

I.1.A.a. LA CINETIQUE DE CROISSANCE DES POPULATIONS BACTERIENNES

Depuis la première description de Buchanan (1918), il est classique de distinguer plusieurs phases dans la croissance des cultures bactériennes. Ces phases sont caractérisées par certaines valeurs ou variations de la vitesse de multiplication de la culture. On reconnaît classiquement les sept phases successives suivantes (Figure I.1.1) :

(i) la phase stationnaire initiale ou phase de latence. Elle est caractérisée par une vitesse de multiplication nulle. Cette phase correspond à une période d'adaptation de l'inoculum à son nouvel environnement de croissance. La durée de cette période dépend de la nature du milieu d'accueil, de l'état physiologique des cellules inoculées et éventuellement de la taille de l'inoculum (Penfold, 1914 ; Winslow et Wilson, 1939 ; Monod, 1958) ;

(ii) la phase d'augmentation de la vitesse de croissance qui passe plus ou moins rapidement de zéro à sa valeur maximale. Cette phase est considérée par certains auteurs comme faisant partie de la phase de latence (Monod, 1958) ;

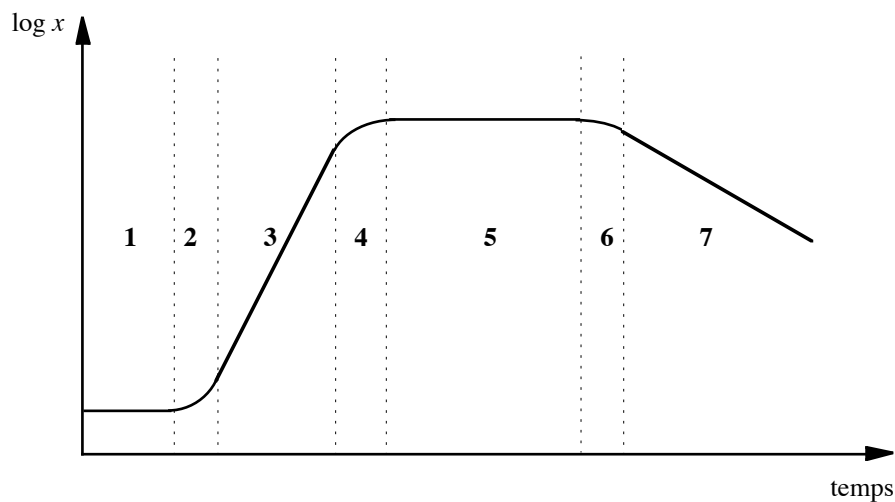


Figure I.1.1 Courbe de croissance d'une culture bactérienne et ses différentes phases (Buchanan, 1918). x représente la densité ou la biomasse de la culture. Les phases sont : (1) phase stationnaire initiale ou de latence, (2) phase d'accélération de la croissance, (3) phase de croissance à vitesse constante, (4) phase de ralentissement de la croissance, (5) phase stationnaire maximale, (6) et (7) phases de décroissance.

(iii) la phase de croissance à vitesse constante maximale ou phase de croissance exponentielle. Elle se présente sous la forme d'une portion linéaire lorsque l'on représente l'évolution du logarithme de la concentration bactérienne ou de la biomasse en fonction du temps. Pour une bactérie donnée, la valeur de cette vitesse de croissance maximale dépend des caractéristiques du milieu de culture ;

(iv) la phase de diminution de la vitesse de croissance qui progressivement devient nulle ;

(v) la phase stationnaire maximale ou plus simplement phase stationnaire qui correspond à un arrêt de la croissance, la culture atteint alors sa densité maximale. Le ralentissement puis l'arrêt de la croissance sont dus à l'épuisement d'une substance nutritive ou à toutes autres modifications des propriétés du milieu de culture le rendant impropre à la croissance des micro-organismes ;

(vi) la phase de début de décroissance ;

(vii) la phase de décroissance à vitesse constante.

La cinétique de croissance des cultures bactériennes est donc essentiellement composée d'une phase de latence suivie d'une phase exponentielle puis d'une phase stationnaire. Les microbiologistes utilisent classiquement les paramètres suivants pour caractériser ces différentes phases : la densité cellulaire initiale (x_0), le temps de latence (*lag*), la vitesse de multiplication maximale ($\mu_{\max}$) ou le temps de génération (T_g) et la densité maximale atteinte ($x_{\max}$).

Le temps de latence, *lag*, est classiquement défini par convention (Lodge et Hinselwood, 1943) comme étant l'intersection de la droite correspondant à la phase exponentielle (en coordonnées semi-logarithmiques) avec la droite horizontale passant par la concentration initiale, x_0 (Figure I.1.2).

Buchanan et Cygnarowicz (1990) ont récemment proposé de définir le temps de latence comme étant le point d'accélération maximale de la vitesse de multiplication.

Ces deux définitions peuvent aboutir à des valeurs différentes de la durée de la phase de latence en fonction du modèle utilisé pour décrire la cinétique de croissance (Zwietering *et al.*, 1992a), nous retiendrons donc dans la suite de cette étude la définition classique du temps de latence.

La vitesse de multiplication ou taux de croissance (vitesse de croissance par unité de densité) maximum, $\mu_{\max}$, est la pente correspondant à la phase exponentielle (en coordonnées semi-logarithmiques). Les microbiologistes utilisent également fréquemment le temps de génération, *Tg*, qui est lié au taux de croissance maximum par la relation : $Tg = \ln 2 / \mu_{\max}$.

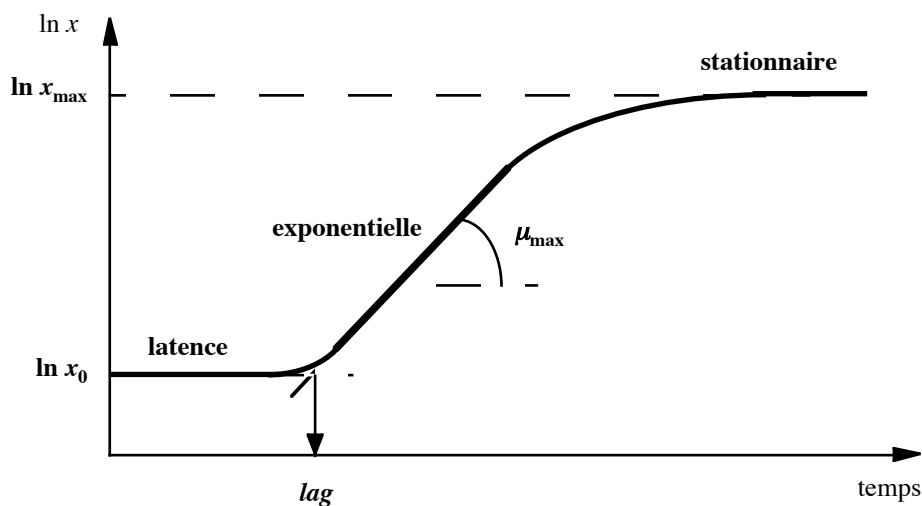


Figure I.1.2 Principales phases de la courbe de croissance bactérienne et paramètres qui les caractérisent. *lag* est le temps de latence, $\mu_{\max}$ est le taux de croissance maximum, x_0 et $x_{\max}$ sont les densités cellulaires initiale et maximale.

I.1.A.b. LES MODELES PRIMAIRES DE CROISSANCE

Les modèles primaires de croissance permettent de décrire la cinétique de croissance des populations microbiennes dans un environnement donné (Whiting et Buchanan, 1993).

Ces modèles sont de la forme :

$$x(t) = f(t, \Theta_1) + \varepsilon_t$$

- $x(t)$ concentration bactérienne à l'instant t
- f fonction de régression
- Θ_1 vecteur des paramètres primaires apparaissant dans la fonction de régression
- ε_t erreur (ou résidu) associée à l'observation $x(t)$

Les ajustements de ces modèles aux courbes de croissance obtenues par dénombrement bactérien sur boîtes de Pétri sont réalisés sur le logarithme de la concentration cellulaire car cette transformation permet de stabiliser la variance des résidus (Dalgaard *et al.*, 1994). Le modèle statistique s'écrit donc plus exactement :

$$\ln x(t) = f(t, \Theta_1) + \varepsilon_t$$

Le premier de ces modèles primaires est le modèle exponentiel (linéaire pour le logarithme) classiquement utilisé par les microbiologistes pour mesurer le taux de croissance d'une culture microbienne. Ce modèle peut être formalisé comme suit :

$$f(t, \Theta_1) = \begin{cases} \ln x_0 & , t \leq lag \\ \ln x_0 + \mu_{\max} \cdot (t - lag) & , t > lag \end{cases} \quad [\text{ I } \cdot \text{ 1 } \cdot \text{ 1 }]$$

- $\Theta_1 = (x_0, lag, \mu_{\max})$
- x_0 concentration bactérienne initiale
- lag temps de latence
- $\mu_{\max}$ taux de croissance maximum

Les modèles de Gompertz et logistique appliqués au logarithme de la concentration microbienne ont été proposés par Gibson *et al.* (1987) pour décrire la courbe de croissance bactérienne.

Le modèle de Gompertz, adopté par une majorité d'auteurs, a été reparamétrisé par Zwietering *et al.* (1990) et Garthright (1991) pour faire apparaître les paramètres de signification biologique classiques :

$$f(t, \Theta_1) = \ln x_0 + A \cdot \exp \left(-\exp \left(\frac{\mu_{\max} \cdot e}{A} \cdot (lag - t) + 1 \right) \right) \quad [I . 1 . 2]$$

$$\Theta_1 = (x_0, x_{\max}, lag, \mu_{\max})$$

$$A = \ln x_{\max} - \ln x_0$$

$x_{\max}$ concentration bactérienne maximale

$$e = \exp(1)$$

Le modèle logistique a également été modifié par Zwietering *et al.* (1990) pour les mêmes raisons :

$$f(t, \Theta_1) = \ln x_0 + \frac{A}{1 + \exp \left(\frac{4 \cdot \mu_{\max}}{A} \cdot (lag - t) + 2 \right)} \quad [I . 1 . 3]$$

$$\Theta_1 = (x_0, x_{\max}, lag, \mu_{\max})$$

Baranyi *et al.* (1993b) ont développé un modèle de croissance basé sur l'équation différentielle suivante :

$$\frac{dx}{xdt} = \mu_{\max} \cdot \alpha_n(t) \cdot f(x) \quad [I . 1 . 4 a]$$

$\alpha_n(t)$ fonction d'ajustement monotone croissante en fonction de t conver-
geant vers 1 permettant de décrire la phase de latence

n paramètre de forme

$f(x)$ fonction de freinage monotone décroissante en fonction de x conver-
geant vers 0 permettant de décrire la phase de saturation

La fonction d'ajustement est supposée dépendante de la concentration en une substance critique pour la division cellulaire selon une cinétique de type Michaelis-Menten. Dans la formulation originale, la production de cette substance est supposée proportionnelle à une puissance n du temps. Ce paramètre n traduit la rapidité de la transition entre les phases de latence et exponentielle.

La fonction de freinage choisie est celle du type logistique.

Ce modèle a par la suite été modifié (Baranyi et Roberts, 1994, 1995 ; Baranyi *et al.*, 1995) en supposant que la production de la substance critique suivait une cinétique du premier ordre. La solution de l'équation différentielle est alors :

$$f(t, \Theta_1) = \ln x_0 + \mu_{\max} \cdot A(t) - \ln \left(1 + \frac{\exp(\mu_{\max} \cdot A(t)) - 1}{\frac{x_{\max}}{x_0}} \right) \quad [I.1.4b]$$

$$\Theta_1 = (x_0, x_{\max}, lag, \mu_{\max}, v)$$

$$A(t) = t + \frac{1}{v} \cdot \ln(\exp(-v \cdot t) + \exp(-h_0) - \exp(-v \cdot t - h_0))$$

v est la vitesse de production de la substance critique supposée constante

h_0 est un paramètre permettant de décrire l'état physiologique de l'inoculum. Il est lié au temps de latence par la relation : $h_0 = v \cdot lag$

Le modèle de Baranyi est habituellement utilisé en supposant $v = \mu_{\max}$ (Baranyi et Roberts, 1994, 1995 ; Baranyi *et al.*, 1995).

Dans le modèle [I.1.4a], nous avons vu que la transition entre les phases de latence et exponentielle dépend de la valeur du paramètre n . Une valeur élevée de n ($n \rightarrow \infty$) correspond à un point de rupture entre ces deux phases. Cette rupture, proposée par Kono (1968) et Broughall *et al.* (1983), conduit à l'équation suivante :

$$f(t, \Theta_1) = \begin{cases} \ln x_0 & , t \leq lag \\ \ln x_{\max} - \ln \left(1 + \left(\frac{x_{\max}}{x_0} - 1 \right) \cdot \exp(-\mu_{\max} \cdot (t - lag)) \right) & , t > lag \end{cases} \quad [I.1.5]$$

$$\Theta_1 = (x_0, x_{\max}, lag, \mu_{\max})$$

Rosso (1995) a montré que ce modèle logistique avec délai et rupture était dans la plupart des cas suffisant pour décrire les cinétiques de croissance obtenues par les méthodes classiques de dénombrement sur boîtes de Pétri.

Les ajustements de ces modèles aux courbes de croissance observées permettent d'estimer les paramètres primaires caractérisant la cinétique de croissance bactérienne : lag , μ_{max} , x_0 , x_{max} . Il faut cependant se méfier de ces estimations car celles-ci diffèrent en fonction du modèle primaire utilisé (Figure I.1.3).

L'utilisation du modèle de Gompertz (équation [I.1.2]) entraîne une surestimation du taux de croissance maximum (Whiting et Cygnarowicz-Provost, 1992 ; Baranyi *et al.*, 1993a ; Labuza et Fu, 1993 ; Dalgaard, 1995 ; Rosso, 1995 ; Farber *et al.*, 1996 ; Membré *et al.*, 1999) et du temps de latence (Whiting et Cygnarowicz-Provost, 1992 ; Labuza et Fu, 1993 ; Farber *et al.*, 1996) par rapport à l'utilisation du modèle exponentiel classique (équation [I.1.1]). L'utilisation du modèle logistique (équation [I.1.3]) entraîne des déviations identiques (Rosso, 1995). Par contre, l'ajustement du modèle logistique avec délai et rupture (équation [I.1.5]) donne des estimations proches de celles obtenues avec la méthode classique (Rosso, 1995).

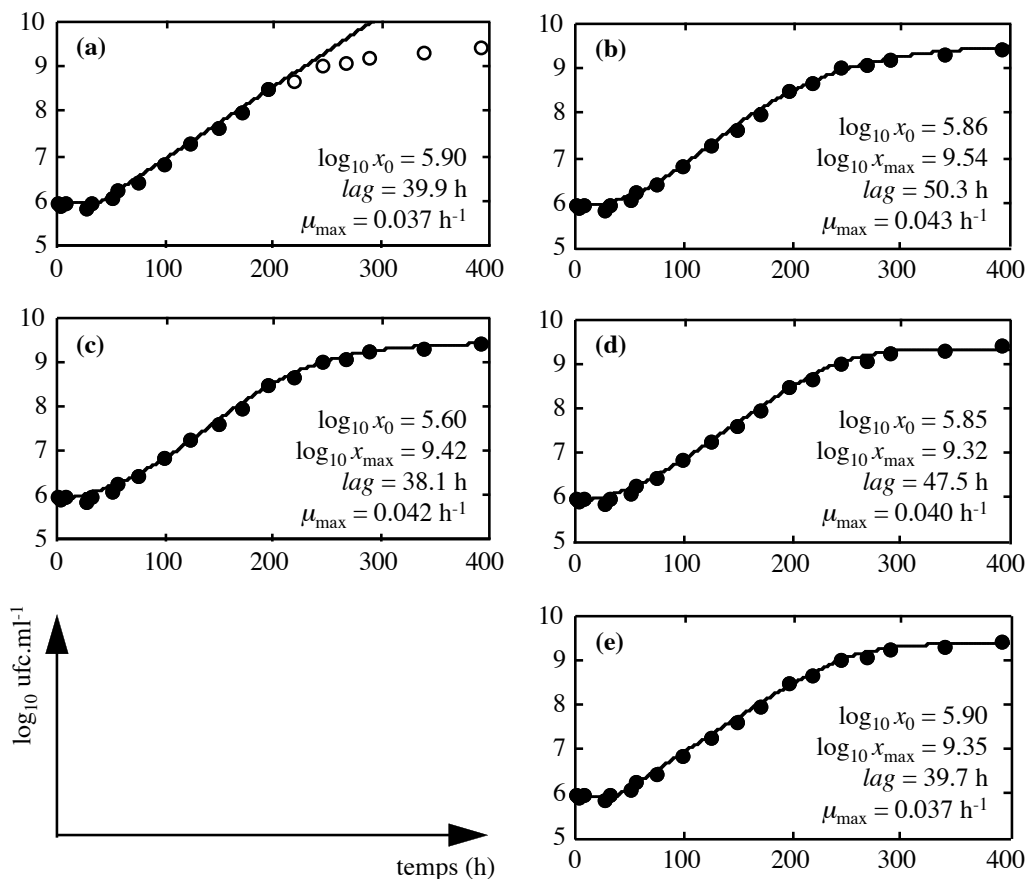


Figure I.1.3 Ajustements de modèles primaires à une courbe croissance de *L. monocytogenes* obtenue à 4°C en bouillon de culture. Les courbes représentent les ajustements des modèles (a) exponentiel [I.1.1], (b) de Gompertz [I.1.2], (c) logistique [I.1.3], (d) de Baranyi [I.1.4b], (e) logistique avec délai et rupture [I.1.5]. Les estimations obtenues pour les paramètres sont portées sur chaque graphe. Le modèle exponentiel est ajusté sur les 13 premiers points (●) correspondant aux phases de latence et exponentielle.

I.1.B. L'INFLUENCE DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX ET LES MODELES SECONDAIRES

I.1.B.a. NATURE DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX

Les facteurs écologiques susceptibles d'agir sur le comportement et donc la croissance des micro-organismes au sein des aliments sont classés en cinq groupes (Mossel et Ingram, 1955 ; Mossel, 1983). On trouve (Figure I.1.4) :

(i) les facteurs intrinsèques. Ce sont les caractéristiques physico-chimiques d'un aliment. Ils englobent le pH, l'activité de l'eau, le potentiel d'oxydoréduction, les substances antimicrobiennes, la composition en nutriments et la structure de l'aliment ;

(ii) les facteurs technologiques. Ce sont les traitements délibérément appliqués aux aliments généralement dans le but de détruire la flore microbienne. Ils consistent pour l'essentiel en l'application de chaleur, de radiations U.V. ou ionisantes, de hautes pressions hydrostatiques, ou en des modifications de la structure de l'aliment (émulsions) ;

(iii) les facteurs extrinsèques. Ils sont appliqués pendant la conservation des denrées alimentaires. Ils consistent essentiellement en l'utilisation de froid positif ou négatif et d'atmosphères modifiées ;

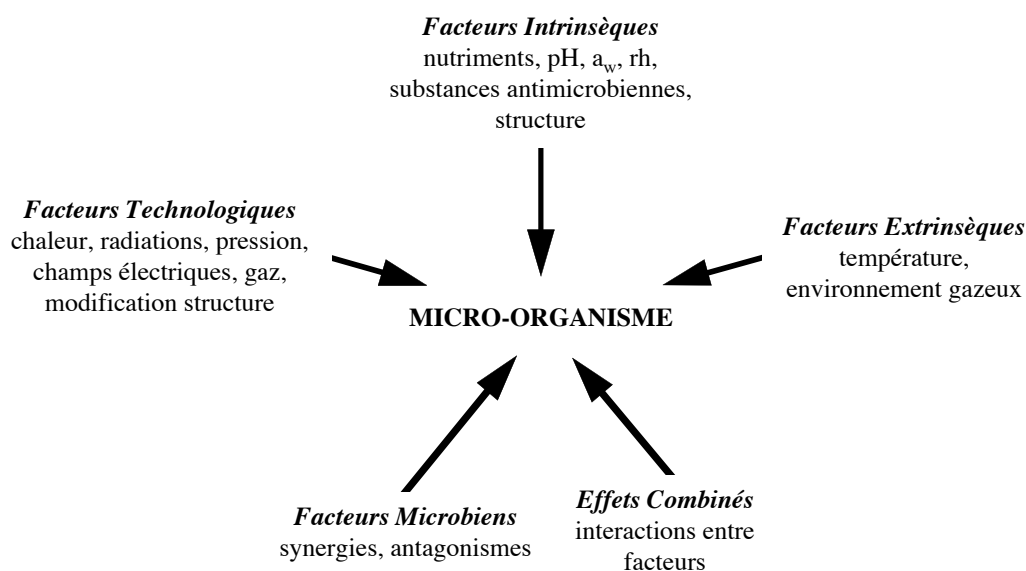


Figure I.1.4 Nature des facteurs environnementaux agissant sur le comportement des micro-organismes dans les aliments.

(iv) les facteurs microbiens. Ce sont les interactions qui peuvent exister avec les autres micro-organismes présents dans l'aliment. Ils peuvent favoriser ou ralentir la croissance des micro-organismes étudiés ;

(v) les effets combinés. Ce sont les interactions qui peuvent exister entre les facteurs cités auparavant. L'effet d'un facteur écologique sur un micro-organisme est généralement dépendant du niveau des autres facteurs. On peut ainsi observer des synergies ou des antagonismes entre les facteurs. Les synergies entre facteurs environnementaux ont été illustrés par Leistner et Rödel (1976) avec le concept des barrières ("*hurdle concept*").

I.1.B.b. LES MODELES SECONDAIRES

Les modèles secondaires permettent de décrire l'influence des facteurs environnementaux sur les paramètres primaires.

On distingue essentiellement deux approches dans l'élaboration de ces modèles secondaires :

(i) la première approche surtout utilisée par les équipes américaines et anglaises permet de décrire l'effet simultané de plusieurs facteurs environnementaux à l'aide de modèles polynomiaux ou modèles surface de réponse.

Ces modèles polynomiaux de degré 2 ou 3 sont utilisés pour décrire l'évolution du temps de latence ou du taux de croissance en fonction de facteurs tels que la température, le pH, le taux de sel, le taux de nitrite ou d'autres substances inhibitrices (Buchanan et Phillips, 1990 ; Palumbo *et al.*, 1991 ; Jones *et al.*, 1994 ; Zaika *et al.*, 1994 ; Fernández *et al.*, 1997).

Ces modèles sont très efficaces lors des procédures d'ajustement aux données et permettent de prendre en compte les interactions entre facteurs environnementaux. Leur inconvénient majeur tient au fait qu'ils ne sont pas extrapolables en dehors de la plage expérimentale (Baranyi *et al.*, 1996) ce qui les rend donc difficilement utilisables en prévision ;

(ii) la deuxième approche utilisée par les équipes australiennes, françaises et néerlandaises s'appuie sur l'étude de l'effet des facteurs environnementaux pris individuellement.

Contrairement à l'approche précédente, elle met en œuvre des modèles robustes comportant peu de paramètres qui généralement ont une signification biologique. Ces modèles peuvent être complexifiés en prenant en compte progressivement plusieurs facteurs écologiques. L'inconvénient de cette approche est que les interactions entre facteurs écologiques sont négligées sur le domaine de croissance des micro-organismes.

Les modèles secondaires sont de la forme :

$$\theta_1 = g(e_i, \Theta_2) + \varepsilon_i$$

- θ_1 valeur du paramètre primaire dans l'environnement défini par le vecteur de facteurs environnementaux e_i
- g fonction de régression
- Θ_2 vecteur des paramètres secondaires apparaissant dans la fonction de régression
- ε_i erreur (ou résidu) associée à l'observation θ_1

Lors des procédures d'ajustement des modèles secondaires à des jeux de données, il est nécessaire de réaliser des transformations des paramètres primaires afin de stabiliser la variance des erreurs. Bien que les lois statistiques de variabilité de ces erreurs ne soient pas connues précisément, la transformation racine carrée semble appropriée pour le taux de croissance (Zwietering *et al.*, 1990 ; Ratkowsky *et al.*, 1991, 1996 ; Schaffner, 1994). La transformation logarithmique est préconisée pour le temps de génération (Alber et Schaffner, 1992 ; Ratkowsky *et al.*, 1996), le temps de latence (Zwietering *et al.*, 1990 ; Ratkowsky *et al.*, 1991 ; Alber et Schaffner, 1992 ; Delignette-Muller, 1998) et pour le produit $\mu_{\max}lag$ (Delignette-Muller, 1998).

Les modèles statistiques d'évolution du taux de croissance maximum en fonction de l'environnement s'écrivent donc :

$$\sqrt{\mu_{\max}} = g(e_i, \Theta_2) + \varepsilon_i$$

Les modèles secondaires les plus populaires sont les modèles de type racine carrée. Le premier de cette famille fut développé par Ratkowsky *et al.* (1982) pour décrire l'influence de la température sur le taux de croissance. Ce modèle dans sa forme originelle n'est applicable que dans une gamme de températures sub-optimales (Zwietering *et al.*, 1991) :

$$g(T, \Theta_2) = \begin{cases} 0 & , T \leq T_{\min} \\ b \cdot (T - T_{\min}) & , T > T_{\min} \end{cases} \quad [\text{ I } \cdot \text{ 1 } \cdot \text{ 6 }]$$

- T température
- $\Theta_2 = (T_{\min}, b)$
- $T_{\min}$ température minimale de croissance du micro-organisme
- b constante sans signification biologique

Cette équation a par la suite été complétée pour décrire l'évolution du taux de croissance sur la totalité de la plage des températures biocinétiques (Ratkowsky *et al.*, 1983). L'influence de l'activité de l'eau sur le taux de croissance maximum a également été décrite par un modèle de ce type (McMeekin *et al.*, 1987, 1992 ; Wijtzes *et al.*, 1993) ainsi que l'influence du pH (Adams *et al.*, 1991 ; McMeekin *et al.*, 1992 ; Wijtzes *et al.*, 1993). Dalgaard (1995) a enfin proposé un modèle de ce type pour décrire l'influence de la proportion de CO₂ sur le taux de croissance.

Rosso *et al.* (1993) ont introduit le modèle des températures cardinales qui permet de décrire l'influence de la température sur le taux de croissance maximum avec uniquement des paramètres ayant une signification biologique. Ce modèle a été généralisé par la suite sous le nom de modèle cardinal (Rosso, 1998a,b) :

$$g(X, \Theta_2) = \sqrt{\mu_{\text{opt}(X)} \cdot CM_n(X)} \quad [\text{ I } . \text{ 1 } . \text{ 7 } \text{ a }]$$

$$CM_n(X) = \begin{cases} 0 & , X \leq X_{\min} \\ \frac{(X - X_{\max}) \cdot (X - X_{\min})^n}{(X_{\text{opt}} - X_{\min})^{n-1} \cdot \left[(X_{\text{opt}} - X_{\min}) \cdot (X - X_{\text{opt}}) - (X_{\text{opt}} - X_{\max}) \cdot ((n-1) \cdot X_{\text{opt}} + X_{\min} - n \cdot T) \right]} & , X_{\min} < X < X_{\max} \\ 0 & , X \geq X_{\max} \end{cases}$$

X facteur environnemental

$\Theta_2 = (\mu_{\text{opt}(X)}, X_{\min}, X_{\text{opt}}, X_{\max})$

$X_{\min}$ valeur cardinale minimale de croissance

X_{opt} valeur cardinale optimale de croissance pour laquelle $\mu_{\max}$ est égal à sa valeur optimale, $\mu_{\text{opt}(X)}$

$X_{\max}$ valeur cardinale maximale de croissance

n paramètre de forme

L'effet de la température sur le taux de croissance maximum est donc décrit par le modèle des températures cardinales avec point d'inflexion, alias CTMI (Rosso *et al.*, 1993) :

$$g(T) = \sqrt{\mu_{\text{opt}(T)} \cdot \tau(T)} \quad \text{a v e c} \quad \tau = CM_2$$

[I.1.7b]

L'effet du pH est décrit par le modèle des pH cardinaux, alias CPM (Rosso *et al.*, 1995) :

$$g(pH) = \sqrt{\mu_{\text{opt}(pH)} \cdot \rho(pH)} \quad \text{avec } \rho = CM_1$$

[I.1.7c]

L'effet de l'activité de l'eau est décrit par le modèle des a_w cardinales, alias CAM (Rosso, 1998a,b) :

$$g(a_w) = \sqrt{\mu_{\text{opt}(a_w)} \cdot \alpha(a_w)} \quad \text{avec } \alpha = CM_2$$

[I.1.7d]

Dans l'approche dite progressive, les interactions entre facteurs environnementaux sont considérées comme négligeables sur le domaine de croissance des micro-organismes. Des modèles imbriqués ont donc été proposés pour décrire simultanément l'effet de la température, du pH et de l'activité de l'eau en supposant que ces facteurs agissent de façon indépendante sur le taux de croissance et que leurs effets peuvent être multipliés (Zwietering *et al.*, 1992b, 1993 ; Wijtzes *et al.*, 1993, 1998 ; Rosso *et al.*, 1995 ; Baranyi *et al.*, 1996) :

$$g(T, pH, aw) = \sqrt{\mu_{\text{opt}} \cdot \omega(T, pH, aw)} \quad [\text{ I . 1 . 8 }]$$

$$\omega(T, pH, aw) = \tau(T) \cdot \rho(pH) \cdot \alpha(aw)$$

μ_{opt} : taux de croissance maximum lorsque les conditions de croissance sont optimales (T_{opt} ; pH_{opt} ; aw_{opt})

Les fonctions τ , ρ et α peuvent être des modèles de type racine carrée ou bien des modèles cardinaux.

La Figure I.1.5 présente l'évolution du taux de croissance maximum en fonction de la température et du pH selon le modèle [I.1.8] utilisé avec les modèles CTMI (équation [I.1.7b]) et CPM (équation [I.1.7c]).

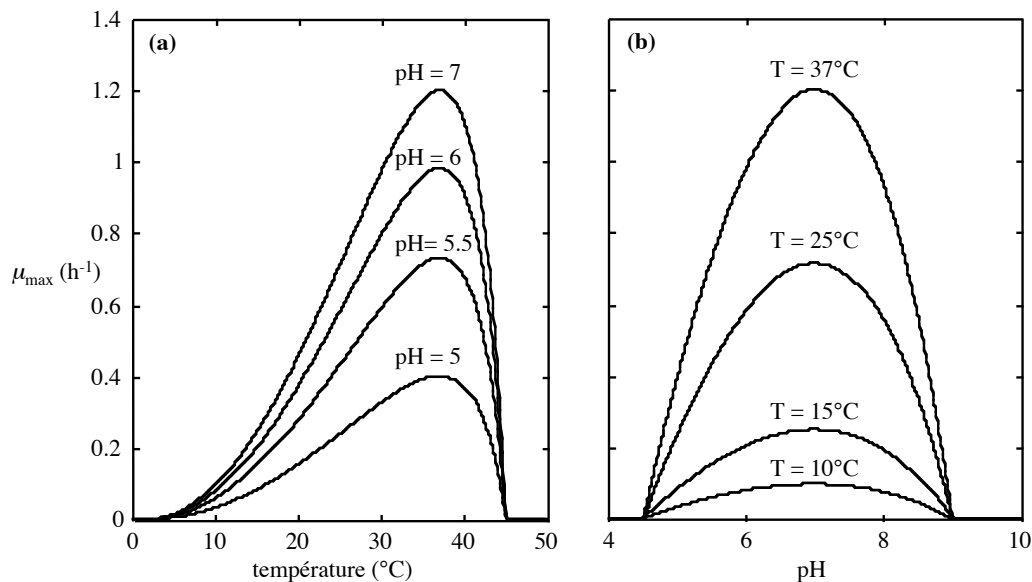


Figure I.1.5 Evolution du taux de croissance maximum μ_{max} en fonction de la température et du pH selon le modèle multiplicatif CTMI $\times$ CPM. Les paramètres utilisés pour cette simulation sont $\mu_{\text{opt}(T,pH)} = 1.2 \text{ h}^{-1}$, $T_{\text{min}} = 5^\circ\text{C}$, $T_{\text{opt}} = 37^\circ\text{C}$, $T_{\text{max}} = 45^\circ\text{C}$, $pH_{\text{min}} = 4.5$, $pH_{\text{opt}} = 7$, $pH_{\text{max}} = 9$.

Des modèles secondaires ont récemment été proposés pour décrire l'interface croissance/non croissance et ainsi prendre en compte les interactions entre facteurs environnementaux. Ces modèles sont basés sur une approche probabiliste et permettent d'estimer la probabilité de croissance des micro-organismes en fonction des combinaisons des facteurs environnementaux (Ratkowsky et Ross, 1995 ; Presser *et al.*, 1998 ; Bolton et Frank, 1999). Les équations utilisées sont de la forme :

$$\text{logit}(p) = \ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = a_0 + a_1 \cdot f(e_1) + \dots + a_n \cdot f(e_n)$$

p	probabilité de croissance
$(a_0, \dots, a_n)$	vecteur des paramètres du modèle
$(e_1, \dots, e_n)$	vecteur des facteurs environnementaux
f	éventuelle transformation des facteurs environnementaux (transformation logarithmique pour Ratkowsky et Ross (1995) et Presser <i>et al.</i> (1998))

Les différents modèles présentés dans cette partie ont généralement été développés pour décrire l'évolution du taux de croissance maximum en fonction des facteurs environnementaux. En ce qui concerne le temps de latence, il est généralement admis que quelques soient les conditions de croissance, celui-ci est inversement proportionnel au taux de croissance maximum (Zwietering *et al.*, 1994 ; Rosso, 1995, 1998a,b) lorsque les conditions pré-incubatoires sont identiques :

$$\ln(\mu_{\max} \cdot \text{lag}) = \ln K + \varepsilon_i \quad [\quad \text{I} \quad . \quad 1 \quad . \quad 9 \quad]$$

K constante dépendant de l'état physiologique de l'inoculum

Bien que, dans certaines études (Delignette-Muller, 1998 ; Robinson *et al.*, 1998), une influence significative des conditions de croissance sur le produit $\mu_{\max} \text{lag}$ ait été observée, Delignette-Muller (1998) a montré que cette relation reste satisfaisante dans la majorité des cas et répond au critère de parcimonie.

Les différents modèles primaires de croissance proposés dans la littérature permettent de décrire de façon satisfaisante la cinétique de croissance des populations bactériennes mais nous avons vu que ces modèles fournissent des estimations différentes des paramètres de croissance. Pour la suite de l'étude, notre choix se portera sur le modèle logistique avec délai et rupture (équation [I.1.5]) qui présente les avantages d'être simple, d'être adapté à la qualité des données issues de dénombrements sur boîtes de Pétri et qui de plus fournit des estimations des paramètres de croissance cohérentes avec celles calculées habituellement par les microbiologistes.

Pour décrire l'effet des facteurs environnementaux sur la croissance, notre choix se portera sur l'approche "progressive". Nous utiliserons les modèles de type racine carrée (équation [I.1.6]) et les modèles cardinaux (équation [I.1.7a]) qui présentent les avantages de comporter peu de paramètres qui généralement ont une signification biologique et qui peuvent être complexifiés pour prendre en compte les effets de nombreux facteurs environnementaux.

*Ceci va permettre d'aboutir à un modèle secondaire dont la pertinence sera testée sur des données de croissance concernant *L. monocytogenes*. Le but est d'obtenir un modèle secondaire simple permettant de décrire convenablement la croissance des populations de *L. monocytogenes* dans des conditions environnementales très variées.*

Tableau I.1.1. Modèles primaires et secondaires publiés.

Modèles primaires		$\ln x(t) = f(t, \Theta_1) + \varepsilon_t$
exponentiel	éq. [I.1.1]	$f(t) = \begin{cases} \ln x_0 & , t \leq lag \\ \ln x_0 + \mu_{\max} \cdot (t - lag) & , t > lag \end{cases}$
Gompertz	éq. [I.1.2]	$f(t) = \ln x_0 + A \cdot \exp\left(-\exp\left(\frac{\mu_{\max} \cdot e}{A} \cdot (lag - t) + 1\right)\right)$
logistique	éq. [I.1.3]	$f(t) = \ln x_0 + \frac{A}{1 + \exp\left(\frac{4 \cdot \mu_{\max}}{A} \cdot (lag - t) + 2\right)}$
Baranyi	éq. [I.1.4b]	$f(t) = \ln x_0 + \mu_{\max} \cdot A(t) - \ln\left(1 + \frac{\exp(\mu_{\max} \cdot A(t)) - 1}{\frac{x_{\max}}{x_0}}\right)$ $A(t) = t + \frac{1}{\mu_{\max}} \cdot \ln\left(\exp(-\mu_{\max} \cdot t) + \exp(-\mu_{\max} \cdot lag) - \exp(-\mu_{\max} \cdot t - \mu_{\max} \cdot lag)\right)$
logistique avec délai et rupture	éq. [I.1.5]	$f(t) = \begin{cases} \ln x_0 & , t \leq lag \\ \ln x_{\max} - \ln\left(1 + \left(\frac{x_{\max}}{x_0} - 1\right) \cdot \exp(-\mu_{\max} \cdot (t - lag))\right) & , t > lag \end{cases}$
Modèles secondaires		$\sqrt{\mu_{\max}} = g(e_i, \Theta_2) + \varepsilon_i$
racine carrée	éq. [I.1.6]	$g(T) = \begin{cases} 0 & , T \leq T_{\min} \\ b \cdot (T - T_{\min}) & , T > T_{\min} \end{cases}$
cardinaux	éq. [I.1.7a]	$g(X) = \sqrt{\mu_{\text{opt}(X)} \cdot CM_n(X)}$ $CM_n(X) = \begin{cases} 0 & , X \leq X_{\min} \\ \frac{(X - X_{\max}) \cdot (X - X_{\min})^n}{(X_{\text{opt}} - X_{\min})^{n-1} \cdot \left[(X_{\text{opt}} - X_{\min}) \cdot (X - X_{\text{opt}}) - (X_{\text{opt}} - X_{\max}) \cdot ((n-1) \cdot X_{\text{opt}} + X_{\min} - n \cdot T)\right]} & , X_{\min} < X < X_{\max} \\ 0 & , X \geq X_{\max} \end{cases}$
	éq. [I.1.9]	$\ln(\mu_{\max} \cdot lag) = \ln K$

PARTIE I

CHAPITRE 2

CONSTRUCTION DE LA BANQUE DE DONNEES SUR LA CROISSANCE DE *Listeria monocytogenes*

Dans cette partie, nous allons présenter la démarche utilisée pour construire la banque de données sur la croissance de L. monocytogenes dans les aliments.

I.2.A. RECOLTE DES DONNEES

74 publications et des données personnelles non publiées ont permis d'élaborer une banque de données sur la croissance de *L. monocytogenes* dans les substrats suivants : bouillons de culture, produits laitiers, produits à base de viande, coule d'œuf et produits de la mer (Tableau I.2.1).

Cette banque de données est constituée de 1865 taux de croissance maximum dont 453 nuls qui correspondent à des données de non croissance (croissance non observée par les auteurs sur la période expérimentale utilisée) et de 1294 temps de latence.

Les données brutes étaient constituées de cinétiques de croissance, de valeurs de taux de croissance ou de temps de génération et de valeurs de temps de latence. Seules les données issues de dénombrements sur boîtes ont été prises en compte. Les paramètres de croissance obtenus avec d'autres techniques, *i.e.*, spectrophotométrie ou impédancemétrie, ont été utilisés dans les phases d'élaboration des modèles mais n'ont pas été inclus dans la banque de données car comme nous le verrons plus loin, ces techniques peuvent conduire à une sous-estimation des paramètres de croissance (Baranyi *et al.*, 1993a ; Dalgaard *et al.*, 1994 ; Hudson et Mott, 1994).

I.2. Construction de la banque de données sur la croissance de *L. monocytogenes*

Tableau I.2.1 Banque de données relative à la croissance de *L. monocytogenes*.

Substrats	Nb $\mu_{\max}$ publi. ^a	Nb $\mu_{\max}$ estim. ^b	Nb lag publi.	Nb lag estim.	Références
Bouillons de culture	56	—	14	7	El-Shenawy et Marth (1988a)
	48	8	29	9	El-Shenawy et Marth (1988b)
	20	—	—	—	George <i>et al.</i> (1988)
	56	—	8	—	Ahamad et Marth (1989)
	160	—	131	—	Buchanan <i>et al.</i> (1989)
	—	3	—	3	Denis et Ramet (1989)
	14	—	—	—	Katoh (1989)
	2	—	—	—	McClure <i>et al.</i> (1989)
	27	—	—	—	Petran et Zottola (1989)
	38	—	—	—	Sorrells <i>et al.</i> (1989)
	10	—	4	—	Buchanan et Klawitter (1990)
	11	4	11	4	Buchanan et Phillips (1990)
	11	—	—	—	Cole <i>et al.</i> (1990)
	5	—	—	—	Conner <i>et al.</i> (1990)
	20	50	18	39	Pearson et Marth (1990b)
	6	—	—	4	Pearson et Marth (1990c)
	16	10	14	10	Walker <i>et al.</i> (1990)
	14	—	14	—	Buchanan et Klawitter (1991)
	123	—	—	—	McClure <i>et al.</i> (1991)
	12	—	—	—	Tapia de Daza <i>et al.</i> (1991)
	14	—	12	—	Yousef <i>et al.</i> (1991)
	26	—	24	—	George et Lund (1992)
	23	—	10	—	Miller (1992)
	16	—	—	—	Nolan <i>et al.</i> (1992)
	15	—	14	—	Duh et Schaffner (1993)
	54	—	—	46	Oh et Marshall (1993)
	14	—	14	—	Duffy <i>et al.</i> (1994a)
	4	5	11	2	Johansen <i>et al.</i> (1994)
	3	—	—	—	Brocklehurst <i>et al.</i> (1995b)
	23	—	—	—	Bajard <i>et al.</i> (1996)
	9	—	—	—	Bal'a et Marshall (1996b)
	—	—	21	—	Buncic et Avery (1996)
	43	—	40	—	Farber <i>et al.</i> (1996)
	19	6	—	8	George <i>et al.</i> (1996)
	2	—	—	—	Patchett <i>et al.</i> (1996)
	—	—	60	—	Avery et Buncic (1997)
	3	—	—	—	Blom <i>et al.</i> (1997)
	6	—	6	—	Dufrenne <i>et al.</i> (1997)
	11	6	—	7	Fernández <i>et al.</i> (1997)
	44	—	44	—	McKellar <i>et al.</i> (1997)
	—	14	—	4	Membré <i>et al.</i> (1997)
	14	—	10	—	Wang et Johnson (1997)
	37	—	37	—	Robinson <i>et al.</i> (1998)
	4	—	5	—	Membré <i>et al.</i> (1999)
	—	144	—	144	données personnelles
Produits laitiers	—	35	—	35	Donnelly et Briggs (1986)
	56	—	—	32	Rosenow et Marth (1987a)
	12	4	—	16	Rosenow et Marth (1987b)
	15	4	—	19	Marshall et Schmidt (1988)
	24	—	—	—	Ryser et Marth (1988)
	—	14	—	14	Schaack et Marth (1988a)
	—	18	—	18	Schaack et Marth (1988b)
	—	4	—	4	Denis et Ramet (1989)
	16	—	—	8	Papageorgiou et Marth (1989)
	16	28	—	36	Pearson et Marth (1990a)
	6	—	—	4	Pearson et Marth (1990c)
	10	2	8	2	Walker <i>et al.</i> (1990)
	2	—	2	—	Buchanan et Klawitter (1991)
	30	6	—	36	El-Gazzar <i>et al.</i> (1991)
	4	—	—	—	Lanciotti <i>et al.</i> (1992)
	5	—	5	—	Gay <i>et al.</i> (1996)
	13	—	13	—	Murphy <i>et al.</i> (1996)
	—	10	—	10	Wang et Johnson (1997)

Tableau I.2.1 suite.

Viandes	3	—	—	—	Kaya et Schmidt (1989)
	6	—	6	—	Buchanan et Klawitter (1991)
	—	8	—	2	Hart <i>et al.</i> (1991)
	—	9	—	9	Marshall <i>et al.</i> (1991)
	—	19	—	12	Chen et Shelef (1992)
	8	—	6	1	Grant <i>et al.</i> (1993)
	76	—	73	—	Grau et Vanderlinde (1993)
	4	—	4	—	Hudson et Mott (1993a)
	4	—	4	—	Hudson et Mott (1993c)
	5	—	—	—	Manu-Tawiah <i>et al.</i> (1993)
	53	—	53	—	Duffy <i>et al.</i> (1994b)
	4	—	3	—	Hudson <i>et al.</i> (1994)
	7	—	4	—	Beumer <i>et al.</i> (1996)
	—	6	—	3	Blom <i>et al.</i> (1997)
	—	7	—	5	Wang et Johnson (1997)
Coule d'œuf	16	—	—	—	Foegeding et Leasor (1990)
Produits de la mer	—	4	—	3	Wang et Shelef (1992)
	3	—	—	2	Dorsa <i>et al.</i> (1993)
	4	—	4	—	Hudson et Mott (1993b)
	2	—	—	—	Oh et Marshall (1994)
Total	1437	428	736	558	

^apubliés.^bestimés à partir des cinétiques de croissance publiées.

La procédure d'acquisition des cinétiques de croissance (graphiques scannés et calcul des coordonnées des points) a été validée en comparant les paramètres de croissance estimés à partir de celles-ci aux paramètres de croissance correspondants publiés par les auteurs. Les racines carrées de 35 taux de croissance maximum estimés et les logarithmes de 34 temps de latence estimés n'étaient pas significativement différents de ceux publiés ($P = 0.26$ et 0.86). La méthode utilisée pour obtenir les cinétiques de croissance est donc fidèle.

Cette procédure d'acquisition des cinétiques de croissance est bien évidemment à l'origine d'une erreur sur les paramètres estimés. L'erreur moyenne est généralement (Baranyi et Roberts, 1995 ; Baranyi *et al.*, 1996, 1999 ; Ross, 1996 ; Fernández *et al.*, 1997) estimée par le facteur de précision ("accuracy factor") :

$$A_f = \exp\left(\sqrt{E(X^2)}\right)$$

$E(.)$ espérance mathématique de la variable entre parenthèses (estimée par la moyenne)

$X = \ln x_{\text{estimée}} - \ln x_{\text{observée}}$

x taux de croissance maximum, temps de génération ou temps de latence

Les pourcentages d'erreur ("*per cent discrepancy*") sur les paramètres estimés sont de $100 \times (A_f - 1)\%$ (Baranyi et Roberts, 1995 ; Baranyi *et al.*, 1996, 1999 ; Fernández *et al.*, 1997).

Nous obtenons pour le temps de génération et le temps de latence les précisions suivantes : 23% et 95%.

Cette forte imprécision du temps de latence est essentiellement due à une seule estimation éloignée de la valeur publiée. En effet, sans cette valeur, la précision pour le temps de latence est de 27%.

I.2.B. AJUSTEMENT DU MODELE PRIMAIRE DE CROISSANCE AUX JEUX DE DONNEES

Lorsque seules des cinétiques de croissance étaient publiées, les paramètres de croissance ont été estimés à partir de celles-ci par ajustement du modèle logistique avec délai et rupture (équation [I.1.5]).

Ces ajustements ont été réalisés par régression non linéaire selon le critère des moindres carrés (Box *et al.*, 1978). Les estimateurs ont donc été obtenus en minimisant la somme des carrés des écarts, *SCE* :

$$SCE = \sum_{i=1}^n \left(\text{valeur}(i)_{\text{observée}} - \text{valeur}(i)_{\text{ajustée}} \right)^2$$

n nombre de points

428 taux de croissance maximum et 558 temps de latence ont ainsi été estimés à partir de cinétiques de croissance publiées (Tableau I.2.1).

Remarque : Le critère des moindres carrés a été utilisé pour tous les ajustements de modèles linéaires ou non linéaires dans cette étude et ceci grâce aux procédures REGRESS et NLINFIT du logiciel MATLAB 5.2 (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA).

I.2.C. CORRECTION DES PARAMETRES DE CROISSANCE EN FONCTION DU MODELE PRIMAIRE UTILISE

Certains taux de croissance sont obtenus par les auteurs par ajustement des modèles aux données de croissance en logarithme décimal et non en logarithme népérien. Ces taux de croissance notés μ ("*maximum exponential growth rate*") diffèrent donc des taux de croissance maximum $\mu_{\max}$ ("*maximum specific growth rate*") et l'on a : $\mu = \mu_{\max} / \ln 10$. La première opération d'harmonisation des données consiste donc à multiplier ces taux de croissance par $\ln 10$.

Les paramètres de croissance publiés ont été obtenus par ajustement du modèle exponentiel (équation [I.1.1]), du modèle de Gompertz (équation [I.1.2]), du modèle logistique (équation [I.1.3]) ou du modèle de Baranyi (équation [I.1.4]). Comme nous l'avons vu précédemment (cf. § I.1.A.b), ces différents modèles conduisent à des estimations différentes des paramètres de croissance, il faut donc harmoniser les taux de croissance et les temps de latence publiés en fonction des modèles primaires utilisés.

Le modèle logistique avec délai et rupture (équation [I.1.5]) est choisi comme modèle primaire de référence. L'objectif de ce travail est d'obtenir des relations liant les estimations des taux de croissance maximum et des temps de latence obtenues avec les différents modèles à celles obtenues avec le modèle de référence.

Les modèles de Gompertz, logistique, de Baranyi et logistique avec délai et rupture ont été ajustés à 505 cinétiques de croissance. Pour la comparaison avec le modèle exponentiel, le modèle de référence a été ajusté à 180 courbes de croissance publiées pour lesquelles les auteurs spécifiaient les paramètres de croissance (180 taux de croissance maximum et 59 temps de latence) obtenus selon la méthode classique (modèle exponentiel). Les comparaisons des paramètres de croissance ont été réalisées sur les racines carrées des taux de croissance maximum et sur les logarithmes des temps de latence afin de stabiliser les variances des résidus (cf. § I.1.B.b).

La comparaison des taux de croissance maximum a donc été réalisée sur 505 données pour les modèles de Gompertz, logistique et de Baranyi et sur 180 données pour le modèle exponentiel.

La comparaison des temps de latence a été réalisée sur respectivement 485, 443 et 492 données pour les modèles de Gompertz, logistique et de Baranyi du fait de valeurs estimées négatives et sur 59 données pour le modèle exponentiel.

Pour tous les modèles, de bonnes corrélations linéaires ont été observées entre les paramètres estimés et les paramètres de référence (Figures I.2.2 et I.2.3) et un modèle de régression linéaire a pu être utilisé pour décrire les relations entre ces estimations.

Une relation de proportionnalité entre les taux de croissance maximum a pu être utilisée car les termes constants des droites de régression pour ce paramètre n'étaient pas significativement différents de 0.0 (Figure I.2.2). Les valeurs médianes des rapports des racines des taux de croissance ont permis d'estimer les coefficients de proportionnalité pour les différents modèles.

Les coefficients suivants (applicables directement sur les taux de croissance maximum) ont été obtenus pour respectivement les modèles exponentiel, de Gompertz, logistique et de Baranyi : 1.00, 0.84, 0.86 et 0.97.

On retrouve bien une cohérence entre la méthode classique (modèle exponentiel) et le modèle logistique avec délai et rupture et une surestimation du taux de croissance par les modèles de Gompertz et logistique (cf. § I.1.A.b).

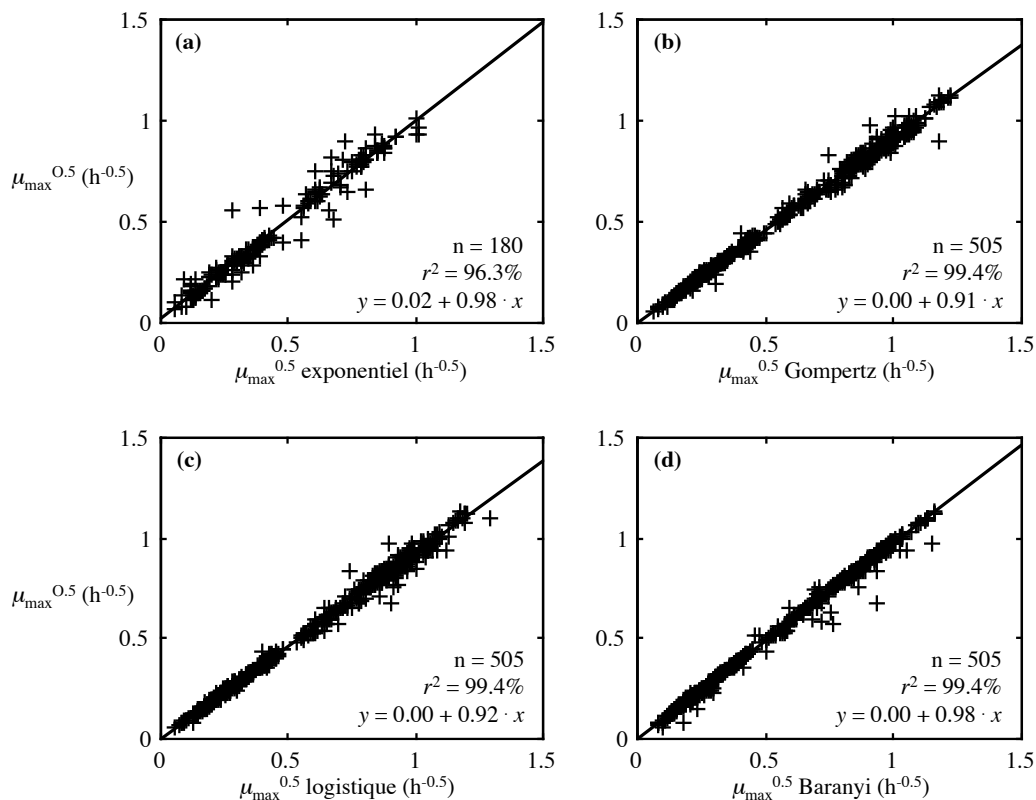


Figure I.2.2 Relations entre les taux de croissance maximum obtenus avec les modèles (a) exponentiel, (b) de Gompertz, (c) logistique et (d) de Baranyi et ceux obtenus avec le modèle logistique avec délai et rupture. Le nombre de points utilisés, l'équation de la droite de régression et son coefficient de détermination sont portés sur chaque graphe.

Une relation de proportionnalité entre les temps de latence a également été supposée car les pentes des droites de régression des $\ln lag$ n'étaient pas significativement différentes de 1.0 (Figure I.2.3). Les coefficients de proportionnalité ont été estimés à partir des médianes du logarithme des rapports des temps de latence.

Les coefficients suivants (applicables directement sur les temps de latence) ont été obtenus pour respectivement les modèles exponentiel, de Gompertz, logistique et de Baranyi : 1.00, 0.82, 0.97 et 0.95.

On retrouve donc également pour le temps de latence, la cohérence entre la méthode classique et le modèle logistique avec délai et rupture et la surestimation lors de l'utilisation des modèles de Gompertz et logistique (cf. § I.1.A.b).

Comme aucune corrélation n'a pu être observée entre les rapports des taux de croissance ou des temps de latence et les paramètres de croissance ($\log_{10} x_0$, $\log_{10} x_{\max}$, $\mu_{\max}^{0.5}$, $\ln lag$), les taux de croissance maximum et les temps de latence publiés ont été corrigés par les coefficients de proportionnalité obtenus.

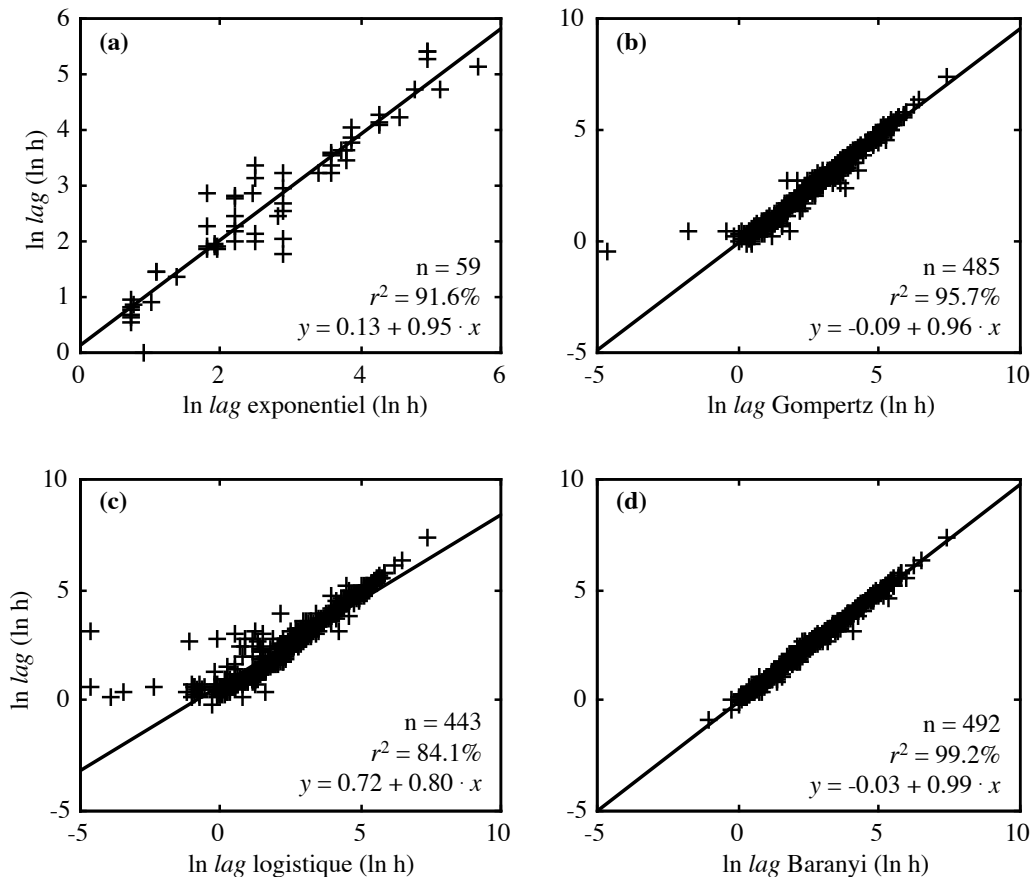


Figure I.2.3 Relations entre les temps de latence obtenus avec les modèles (a) exponentiel, (b) de Gompertz, (c) logistique et (d) de Baranyi et ceux obtenus avec le modèle logistique avec délai et rupture. Le nombre de points utilisés, l'équation de la droite de régression et son coefficient de détermination sont portés sur chaque graphique.

Cette étape de correction des paramètres de croissance est à l'origine d'une erreur sur les paramètres corrigés.

Pour le temps de génération, nous obtenons les précisions suivantes pour les modèles exponentiel, de Gompertz, logistique et de Baranyi : 37%, 9%, 9% et 13%.

Pour le temps de latence, nous obtenons les précisions suivantes pour les modèles exponentiel, de Gompertz, logistique et de Baranyi : 48%, 37%, 111% et 14%.

La banque de données contient donc des paramètres de croissance que l'on peut supposer estimés avec le même modèle primaire de croissance : le modèle logistique avec délai et rupture.

Les distributions des taux de croissance maximum et des temps de latence présents dans la banque de données sont présentées par la Figure I.2.4 (exceptés les 453 et 29 taux de croissance et temps de latence nuls).

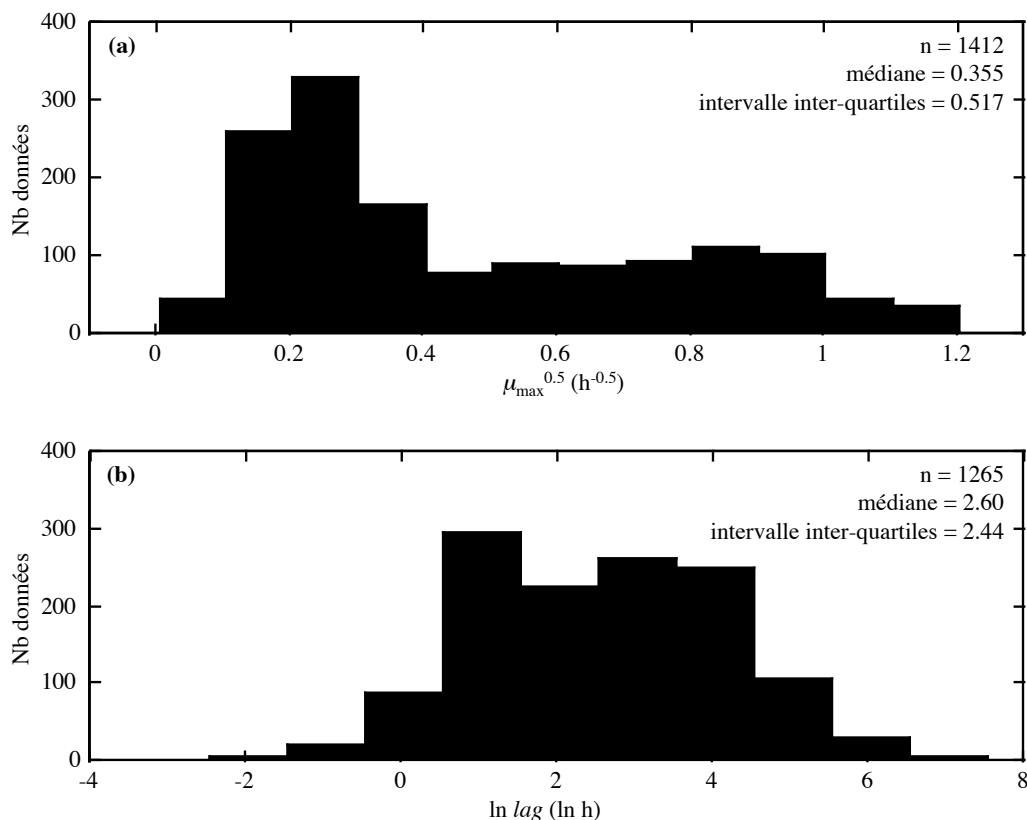


Figure I.2.4 Distributions (a) des racines carrées des taux de croissance maximum et (b) des logarithmes des temps de latence inclus dans la banque de données sur *L. monocytogenes*. Les caractéristiques des distributions sont portées sur chaque graphe.

I.2.D. RENSEIGNEMENT DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX

Pour réaliser l'ajustement d'un modèle secondaire à l'ensemble de la banque de données il est bien sûr nécessaire de connaître toutes les valeurs des facteurs environnementaux.

Cela n'a posé aucun problème pour la température qui est systématiquement précisée dans les études, par contre, les valeurs du pH et de l'activité de l'eau n'étaient spécifiées que pour 20 et 65% des taux de croissance maximum de la banque de données. Il a donc fallu les estimer lorsqu'ils n'étaient pas précisés.

Le pH des bouillons de culture a été fixé à 7.10.

Le pH du lait a été fixé à 6.6 qui est la médiane de 8 valeurs publiées (6.2 à 6.9) pour ce produit.

Les pH du beurre et de la crème ont été fixés à 7.0 et 6.4 (Murphy *et al.*, 1996).

Le pH des conserves de viande a été fixé à 6.3 qui est une valeur publiée pour du *corned beef* (Grau et Vanderlinde, 1992).

Le pH des pépites de poulets a été fixé à 5.85 qui est la médiane de pH publiés pour le blanc de poulet (5.8 à 6.3).

Le pH de la coule d'œuf a été fixé à 6.56 (Erickson et Jenkins, 1992).

Le pH de la langouste a été fixé à 6.0 (George *et al.*, 1996).

Connaissant les concentrations de solutés (chlorure de sodium, glycérol, sucre) utilisés dans les milieux liquides, leurs activités de l'eau (a_w) ont été calculées en appliquant l'équation de Ross (1975) ou ont été directement trouvées dans la littérature (Petran et Zottola, 1989 ; Nolan *et al.*, 1992 ; Brocklehurst *et al.*, 1995a).

Les a_w des bouillons de culture et du lait ont été fixés à 0.997 (Nolan *et al.*, 1992).

Les concentrations de chlorure de sodium du lait chocolaté, de la crème, du Camembert, de la coule d'œuf et de la langoustine ont été supposées être de respectivement 2.5% (Buchanan et Phillips, 1990), 0.5% (McClure *et al.*, 1997), 2.4% (McClure *et al.*, 1997), 0.5% (Erickson et Jenkins, 1992 ; McClure *et al.*, 1997) et 3% (Hudson et Mott, 1993b). Ces concentrations correspondent respectivement à des a_w de 0.986, 0.997, 0.986, 0.997 et 0.976.

L' a_w de la viande fraîche a été fixée à 0.994 (Chen et Shelef, 1992 ; Duffy *et al.*, 1994b) et celles des conserves de viande et du jambon cuit ont été fixées à 0.97 (Grau et Vanderlinde, 1992).

Nous pouvons observer que les taux de croissance maximum inclus dans la banque de données ont essentiellement été obtenus dans des conditions sub-optimales de croissance (Figure I.2.5).

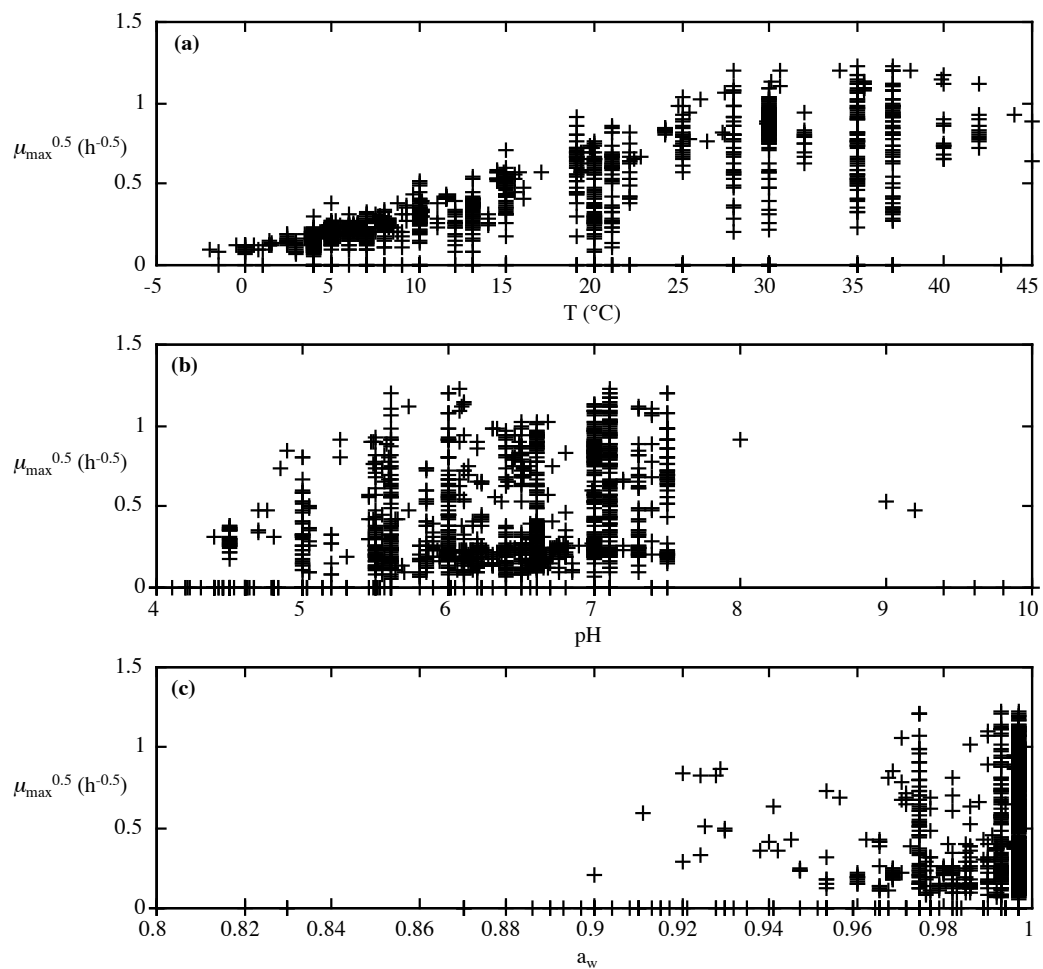


Figure I.2.5 Gammes de variation de (a) la température, (b) du pH et de (c) l'activité de l'eau correspondant aux taux de croissance maximum inclus dans la banque de données sur *L. monocytogenes*.

Nous disposons donc d'une banque de données sur la croissance de L. monocytogenes constituée de 1865 taux de croissance maximum et 1294 temps de latence obtenus dans des conditions environnementales connues ou estimées.

Nous allons maintenant utiliser cette banque de données pour évaluer l'aptitude des modèles secondaires à décrire l'influence des facteurs environnementaux sur les paramètres de croissance de L. monocytogenes.

PARTIE I

CHAPITRE 3

MODELE SECONDAIRE SANS INTERACTIONS

*Nous avons vu que de nombreux modèles de croissance étaient aujourd'hui disponibles en microbiologie prévisionnelle. Dans ce chapitre nous allons confronter un modèle secondaire construit à partir des modèles existants à la banque de données sur *L. monocytogenes*. Ce modèle prend en compte des facteurs environnementaux et des facteurs liés à la technique d'étude mais l'effet des conditions pré-incubatoires et les effets combinés sont négligés d'où son nom de modèle secondaire sans interactions.*

I.3.A. ELABORATION DU MODELE SECONDAIRE

Les effets combinés sont négligés sur le domaine de croissance des micro-organismes et les effets des facteurs environnementaux sur $\mu_{\max}$ sont donc multipliés (cf. § I.1.B.b).

Le produit $\mu_{\max}lag$ est supposé indépendant des facteurs environnementaux et l'effet des conditions pré-incubatoires sur le produit est négligé dans ce modèle.

Nous avons choisi la famille des modèles cardinaux (équation [I.1.7a]) pour modéliser l'influence de la température, du pH et de l'activité de l'eau sur $\mu_{\max}$.

Pour décrire l'influence des substances inhibitrices sur le taux de croissance maximum, nous proposons un modèle de type racine carrée (équation [I.1.6]).

Les facteurs qualitatifs (nature du substrat, agitation des milieux liquides...) sont supposés avoir un effet multiplicatif sur $\mu_{\max}$.

I.3. Modèle secondaire sans interactions

Le modèle secondaire sans interactions décrivant l'effet de l'environnement sur $\mu_{\max}$ et lag est donc de la forme :

$$\begin{cases} \sqrt{\mu_{\max}} = \sqrt{\mu_{\text{opt}} \cdot \omega(T, pH, aw, c_{1:n}, k_{1:p})} + \varepsilon \\ \ln(\mu_{\max} \cdot lag) = \ln K + \varepsilon' \end{cases} \quad [\text{ I } . \text{ 3 } . \text{ 1 }]$$

$$\omega(T, pH, aw, c_{1:n}, k_{1:p}) = \tau(T) \cdot \rho(pH) \cdot \alpha(aw) \cdot \prod_{i=1}^n \gamma(c_i) \cdot \prod_{j=1}^p k_{jl}$$

μ_{opt} taux de croissance maximum dans le milieu de référence en conditions de croissance optimales

$$\tau = CM_2$$

$$\rho = CM_1$$

$$\alpha = CM_2$$

$$\gamma(c_i) = \begin{cases} (1 - c_i / CMI_i)^2 & , c_i < CMI_i \\ 0 & , c_i \geq CMI_i \end{cases}$$

c_i concentration en substance inhibitrice i

CMI_i concentration minimale inhibitrice de la substance i

k_{jl} coefficient correspondant au l -ième niveau du facteur qualitatif j
(pour le niveau 0 de référence, $k_0 = 1$)

K constante

$\varepsilon, \varepsilon'$ erreurs sur les observations

Les conditions de croissance optimales sont :

$$(T_{\text{opt}}, pH_{\text{opt}}, aw_{\text{opt}}, c_{1:n} = 0, k_{1:p} = 1)$$

Les paramètres du modèle sont :

$$(\mu_{\text{opt}}, K, T_{\min}, T_{\text{opt}}, T_{\max}, pH_{\min}, pH_{\text{opt}}, pH_{\max}, aw_{\min}, aw_{\text{opt}}, aw_{\max}, CMI_{1:n}, k_{1:p})$$

I.3.B. ESTIMATION DES PARAMETRES DU MODELE

Les paramètres du modèle secondaire ont été estimés de façon indépendante sur certains jeux de données inclus dans la banque de données. Comme nous l'avons signalé, ces estimations ont été réalisées par ajustement des modèles selon le critère des moindres carrés.

Les jeux de données utilisés pour réaliser ces estimations devaient répondre aux critères suivants : le facteur étudié comportait aux moins trois niveaux et toutes les variables concomitantes variaient de la même façon pour chaque niveau (plans complets équilibrés). Cette dernière contrainte permet de ne pas confondre l'effet principal du facteur étudié avec d'éventuelles interactions liées aux autres facteurs.

Lorsque plusieurs estimations d'un même paramètre étaient disponibles, nous avons utilisé la médiane de ces valeurs dans le modèle secondaire plutôt que la moyenne. Ce choix est motivé par le fait que la médiane est moins sensible que la moyenne aux valeurs extrêmes (Delignette-Muller *et al.*, 1995). Ces valeurs extrêmes issues de quelques études publiées peuvent en effet être aberrantes et ainsi pénaliser le modèle secondaire lors de l'étude de sa cohérence sur l'ensemble de la banque de données.

I.3.B.a. ESTIMATION DES VALEURS CARDINALES DE *L. monocytogenes*

Les températures cardinales ont été estimées (Tableau I.3.1) par ajustement du modèle CTMI (équation [I.1.7b]) aux jeux de données. Lorsque la croissance n'était étudiée qu'à des températures sub-optimales (inférieures à 35°C), nous avons ajusté le modèle racine carrée (équation [I.1.6]) pour estimer $T_{\min}$. Ces modèles ont de toute façon des comportements très voisins dans cette gamme de températures (Rosso, 1995).

Les médianes des estimations de $T_{\min}$ et $T_{\max}$ sont respectivement -2.7°C et 45.5°C. Les valeurs de T_{opt} obtenues sur 3 jeux de données comportant des températures sur l'ensemble de la plage biocinétique (Petran et Zottola, 1989 ; Duh et Schaffner, 1993 ; Bajard *et al.*, 1996) sont supérieures à 30-37°C qui sont les températures classiquement considérées comme optimales pour *L. monocytogenes* (Gray et Killinger, 1966 ; Farber et Peterkin, 1991). Ces aberrations sont vraisemblablement dues à une mauvaise adéquation du modèle CTMI à ces jeux de données (Bajard *et al.*, 1996). En effet, sur les courbes correspondantes représentant l'évolution du taux de croissance avec la température, on peut observer que le taux de croissance optimum est obtenu pour des températures de 35-37°C. La valeur de T_{opt} a donc été fixée à 37°C.

I.3. Modèle secondaire sans interactions

Tableau I.3.1 Estimation des valeurs cardinales de *L. monocytogenes*.

Facteur <i>X</i>	Nb niveaux [gamme]	Nb points	$X_{\min}$	X_{opt}	$X_{\max}$	Variables concomitantes	Références
<i>T</i> (°C)	23 [-2;42]	23	-2.7	38.7	42.3	—	Bajard <i>et al.</i> (1996)
	15 [4;45]	15	-0.7	39.0	45.5	—	Duh et Schaffner (1993)
	9 [4;45]	9	0.5	39.7	47.7	—	Petran et Zottola (1989)
	19 [0;35.0]	32	-2.4	—	—	pH	Grau et Vanderlinde (1993)
	15 [0;30.6]	18	-2.2	—	—	—	Grau et Vanderlinde (1993)
	11 [0;9.3]	18	-3.0	—	—	pH, inoculum	Walker <i>et al.</i> (1990)
	10 [4.0;35.4]	74	-2.7	—	—	souche	données personnelles
	7 [4;35]	14	-2.7	—	—	atmosphère	Katoh (1989)
	7 [5;30]	33	-1.5	—	—	inoculum	McKellar <i>et al.</i> (1997)
	5 [4;35]	56	-1.0	—	—	pH, a_w , souche, substrat	Rosenow et Marth (1987a)
	5 [0;9.3]	10	-4.4	—	—	inoculum	Walker <i>et al.</i> (1990)
	5 [5;25]	15	0.8	—	—	a_w	Robinson <i>et al.</i> (1998)
	4 [4;35]	58	2.6	—	—	pH, benzoate de sodium	El-Shenawy et Marth (1988a)
	4 [4;35]	56	0.6	—	—	pH, sorbate de potassium	El-Shenawy et Marth (1988b)
	4 [7;35]	80	-4.4	—	—	pH, acide, souche	Ahamad et Marth (1989)
	4 [5;28]	8	9.1	—	—	atmosphère	Buchanan et Klawitter (1990)
	4 [4;30]	12	-6.6	—	—	souche	Foegeding et Leasor (1990)
	4 [4.4;10.2]	25	-3.3	—	—	pré-incubation	données personnelles
	3 [4;22]	26	-6.1	—	—	souche, substrat	Donnelly et Briggs (1986)
	3 [5;28]	120	0.1	—	—	pH, a_w , atmosphère, nitrites	Buchanan <i>et al.</i> (1989)
	3 [4;12]	3	-3.9	—	—	—	Kaya et Schmidt (1989)
	3 [3;11]	9	-3.8	—	—	atmosphère	Marshall <i>et al.</i> (1991)
	3 [0;12]	3	-4.8	—	—	—	Dorsa <i>et al.</i> (1993)
	3 [4;10]	36	-0.7	—	—	pH, CO ₂	Farber <i>et al.</i> (1996)
	3 [3;9]	9	-3.1	—	—	pH, a_w , substrat	Murphy <i>et al.</i> (1996)
	[5;35]	—	-2.6	—	—	—	Wijtzes <i>et al.</i> (1993)
<i>pH</i>	15 [4.0;10.0]	24	4.56	7.10	9.40	—	Petran et Zottola (1989)
	39 [5.87;6.89]	53	5.08	—	—	a_w	Duffy <i>et al.</i> (1994b)
	25 [5.46;6.98]	58	4.14	—	—	T	Grau et Vanderlinde (1993)
	7 [4.70;7.30]	7	4.38	—	—	—	Robinson <i>et al.</i> (1998)
	6 [4.45;7.10]	64	4.88	—	—	T, acide, souche	Ahamad et Marth (1989)
	4 [4.7;6.0]	98	4.77	—	—	acide	Young et Foegeding (1993)
	3 [5.6;6.8]	24	4.89	—	—	a_w , souche, <i>Penicillium</i>	Ryser et Marth (1988)
	3 [5.0;7.0]	54	4.84	—	—	T, monolaurine	Oh et Marshall (1993)
	3 [4.4;7.0]	3	4.06	—	—	—	Brocklehurst <i>et al.</i> (1995b)
	3 [5.4;5.8]	45	5.12	—	—	acide, souche	Vasseur <i>et al.</i> (1999)
	[4.6;7.4]	—	3.84	—	9.82	—	Wijtzes <i>et al.</i> (1993)
	—	—	4.62	—	—	T, souche	George <i>et al.</i> (1988)
	—	—	4.3	—	—	—	Farber <i>et al.</i> (1989)
	—	—	4.25	—	—	a_w	McClure <i>et al.</i> (1989)
	—	—	4.5	—	—	T, acide, souche	Sorrells <i>et al.</i> (1989)
	—	—	4.53	—	—	—	Cole <i>et al.</i> (1990)
	—	—	4.5	—	—	acide	Conner <i>et al.</i> (1990)
	—	—	5	—	—	T, a_w , nitrites	McClure <i>et al.</i> (1991)
<i>aw</i>	19 [0.886;0.994]	19	0.951	—	—	soluté, lactate de sodium	Chen et Shelef (1992)
	15 [0.893;0.929]	16	0.916	—	—	soluté	Nolan <i>et al.</i> (1992)
	11 [0.924;0.997]	19	0.902	—	—	soluté	Robinson <i>et al.</i> (1998)
	7 [0.87;0.99]	17	0.90	—	—	soluté	Miller (1992)
	4 [0.960;0.993]	53	0.862	—	—	pH	Duffy <i>et al.</i> (1994b)
	3 [0.977;0.997]	18	0.931	—	—	T	Robinson <i>et al.</i> (1998)
	3 [0.946;0.973]	15	0.864	—	—	souche	Vasseur <i>et al.</i> (1999)
	[0.950;0.997]	—	0.916	—	—	—	Wijtzes <i>et al.</i> (1993)
	—	—	0.90	—	—	—	Petran et Zottola (1989)
	—	—	0.91	—	—	T, soluté, souche, inoculum	Tapia de Daza <i>et al.</i> (1991)
	—	—	0.91	—	—	—	Farber <i>et al.</i> (1992)

Les pH cardinaux ont été estimés par ajustement du modèle CPM (équation [I.1.7c]). Lorsque seuls les pH sub-optimaux étaient étudiés, le modèle a été ajusté en posant $pH_{\max} = 2 \cdot pH_{\text{opt}} - pH_{\min}$ (Rosso, 1995).

Les médianes des estimations de $pH_{\min}$, pH_{opt} et $pH_{\max}$ obtenues (Tableau I.3.1) sont respectivement 4.55, 7.10 et 9.61.

Les activités de l'eau cardinales ont été estimées par ajustement du modèle CAM (équation [I.1.7d]) avec $aw_{\max}$ fixée à 1 (Rosso, 1998b). Comme aucun jeu de données ne nous permettait d'estimer aw_{opt} , nous l'avons également fixée à 0.997 qui correspond à l'activité de l'eau des bouillons de culture (Tapia de Daza, 1991 ; Nolan *et al.*, 1992). La médiane des $aw_{\min}$ estimées (Tableau I.3.1) est de 0.910.

Les paramètres obtenus sont caractérisés par des estimations plus ou moins dispersées. Les coefficients de variation (écart-type/moyenne) pour $T_{\min}$, $pH_{\min}$ et $aw_{\min}$ sont respectivement égaux à 1.66, 0.08 et 0.03 et indiquent une très forte dispersion de $T_{\min}$ par rapport aux deux autres valeurs cardinales minimales. Comme l'écart-type est fortement influencé par les valeurs éventuellement abérantes éloignées de la moyenne, nous avons également calculé un autre indice de dispersion moins influencé par ces valeurs extrêmes en divisant l'intervalle inter-quartiles par la médiane, cet indice sera noté D . On retrouve une très forte dispersion des estimations de $T_{\min}$ avec une valeur de D égale à 1.17 alors que $pH_{\min}$ et $aw_{\min}$ ont respectivement des valeurs égales à 0.13 et 0.02.

I.3.B.b. ESTIMATION DES CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES

Le modèle de type racine carrée proposé (équation [I.3.1]) décrit généralement de façon satisfaisante la décroissance de $\mu_{\max}$ avec l'augmentation de la concentration en substance inhibitrice (Figures I.3.1a à I.3.1e). Ce phénomène a précédemment été observé par Passos *et al.* (1993) avec l'effet des acides lactique et acétique sur *Lactobacillus plantarum* et par Dalgaard (1995) avec l'effet du CO_2 sur *L. monocytogenes*.

Ce modèle semble donc être généralisable à la plupart des substances inhibitrices au vu de nos résultats à une exception près. En effet, sur la Figure I.3.1f, la décroissance ne semble pas linéaire et des modèles comprenant des paramètres de forme tels que ceux proposés par Levenspiel (1980), Luong (1985) ou Houtsma *et al.* (1994) seraient dans ce cas mieux adaptés.

Le modèle de type racine carrée a cependant été utilisé pour l'ensemble des substances inhibitrices car il répond au critère de parcimonie.

I.3. Modèle secondaire sans interactions

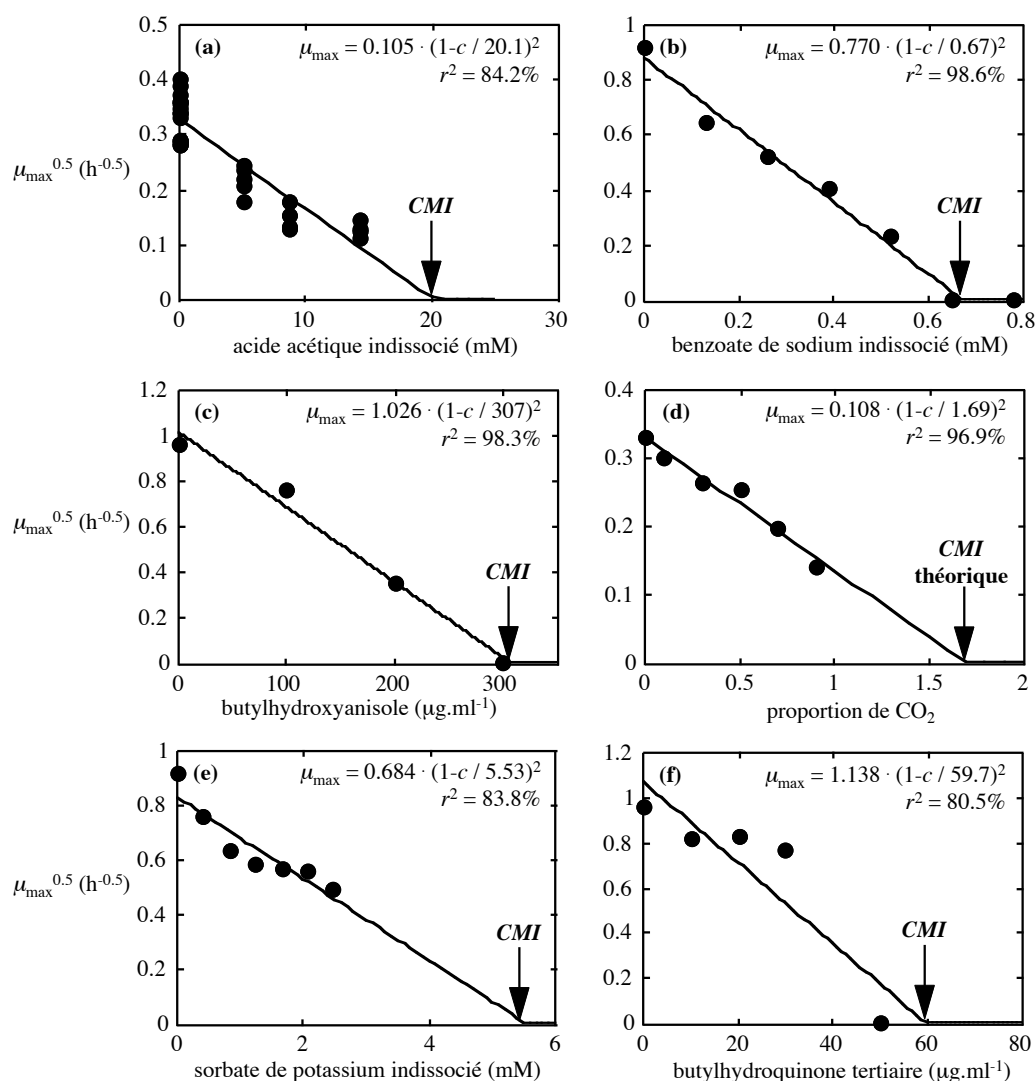


Figure I.3.1 Effet de différentes substances inhibitrices sur le taux de croissance maximum de *L. monocytogenes*. L'équation du modèle racine carrée ajusté aux jeux de données et son coefficient de détermination sont portés sur chaque graphe. La concentration minimale inhibitrice (CMI) du CO_2 est qualifiée de théorique car elle correspond à une proportion supérieure à 1. Les données sont issues de (a) Vasseur *et al.* (1999), (b) El-Shenawy et Marth (1988a), (c) Yousef *et al.* (1991), (d) Farber *et al.* (1996), (e) El-Shenawy et Marth (1988b), (f) Yousef *et al.* (1991).

L'ajustement de ce modèle aux jeux de données a permis d'estimer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de nombreuses substances inhibitrices pour la croissance de *L. monocytogenes* (Tableau I.3.2).

Les acides organiques exercent une action inhibitrice sur les micro-organismes par diminution du pH cellulaire (Booth, 1985) et par une action spécifique sur les activités métaboliques de la cellule (Ita et Hutkins, 1991). Il est classiquement supposé que cette action inhibitrice est essentiellement due à l'effet de leur fraction indissociée.

Tableau I.3.2 Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de différentes substances inhibitrices pour la croissance de *L. monocytogenes*.

Inhibiteur (unité)	Nb niveaux [gamme]	Nb points	CMI	Variables concomitantes	Références
Acide acétique	6 [0;132]	23	25.0	pH	Young et Foegeding (1993)
indissocié (mM)	4 [0;21.3]	32	6.2	T ^a , pH	Ahamad et Marth (1989)
	4 [0;14.3]	30	20.1	pH, souche	Vasseur <i>et al.</i> (1999)
Acide lactique	6 [0;29.7]	23	5.4	pH	Young et Foegeding (1993)
indissocié (mM)	4 [0;1.2]	7	1.1	a _w	Chen et Shelef (1992)
	4 [0;2.4]	30	5.6	pH, souche	Vasseur <i>et al.</i> (1999)
Acide citrique	5 [0;2.6]	19	3.0	pH	Young et Foegeding (1993)
indissocié (mM)	4 [0;0.48]	32	0.1	T, pH	Ahamad et Marth (1989)
Benzoate de sodium	7 [0;2.8]	56	0.7	T, pH	El-Shenawy et Marth (1988a)
indissocié(mM)					
Sorbate de potassium	7 [0;7.2]	56	5.1	T, pH	El-Shenawy et Marth (1988b)
indissocié (mM)					
Nitrite de sodium	5 [0;33.9]	160	14.4	T, pH, atmosphère	Buchanan <i>et al.</i> (1989)
indissocié (μM)	5 [0;322]	378	8.4	T, pH, a _w	McClure <i>et al.</i> (1991)
Monolaurine (μg.ml ⁻¹)	6 [0;9]	54	26.6	T, pH	Oh et Marshall (1993)
	4 [0;5]	14	7.55	T, pH, additifs	Wang et Johnson (1997)
	—	—	8	—	Oh et Marshall (1992)
	—	—	20	—	Wang et Johnson (1992)
	—	—	96	—	Razavi et Griffiths (1994)
	—	—	16	—	Bal'a et Marshall (1996a)
	—	—	18.5	T, souche, substrat, inoculum	Bal'a et Marshall (1996b)
BHA ^b (μg.ml ⁻¹)	4 [0;300]	4	308	—	Yousef <i>et al.</i> (1991)
	2 [0;100]	4	199	monolaurine	Wang et Johnson (1997)
BHT ^c (μg.ml ⁻¹)	4 [0;700]	4	1400	—	Yousef <i>et al.</i> (1991)
TBHQ ^d (μg.ml ⁻¹)	5 [0;50]	5	59.7	—	Yousef <i>et al.</i> (1991)
	2 [0;30]	4	37.7	monolaurine	Wang et Johnson (1997)
CO ₂ (proportion)	6 [0;0.9]	38	1.64	T, pH	Farber <i>et al.</i> (1996)
	4 [0.25;1]	4	1.42	—	Fernández <i>et al.</i> (1997)
	3 [0;0.8]	9	10	T	Marshall <i>et al.</i> (1991)
	3 [0;0.4]	4	1.56	—	Manu-Tawiah <i>et al.</i> (1993)
	2 [0;0.099]	14	5.14	T	Katoh (1989)
Caféine (g.l ⁻¹)	3 [0;10]	12	10.8	substrat	Pearson et Marth (1990c)
Phénol (ppm)	—	—	12.5	T, a _w	Membré <i>et al.</i> (1997)

^atempérature.^bBHA, butylhydroxyanisole.^cBHT, butylhydroxytoluène.^dTBHQ, butylhydroquinone tertiaire.

Les CMI de ces acides calculées en terme de fraction indissociée devraient donc être indépendantes du pH puisque la valeur du pH fixe la concentration en acide indissociée [HA] selon l'équilibre :



Dans ce cas, il est envisageable de confondre l'effet du pH et des acides organiques en calculant uniquement la CMI sur la fraction indissociée d'acide selon l'équation de Henderson-Hasselbalch :

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad \text{avec } pK_a \text{ constante de dissociation de l'acide}$$

Plusieurs études ont montré que la fraction indissociée n'était pas le seul facteur responsable de l'inhibition de la croissance des micro-organismes.

Houtsma *et al.* (1994) ont observé que la CMI de la fraction indissociée de l'acide lactique augmentait lorsque le pH diminuait et Young et Foegeding (1993) ont observé que des concentrations d'acides indissociés identiques étaient plus inhibitrices à bas pH.

Nous envisagerons donc dans le modèle l'effet inhibiteur de la fraction indissociée des acides organiques mais également conjointement l'effet inhibiteur du pH comme cela a été proposé par Presser *et al.* (1997).

Lorsque l'acide lactique était utilisé sous forme de sel de sodium, la CMI de cet acide a été calculée en multipliant la CMI du lactate de sodium par le rapport des masses molaires : 90/112 .

Les médianes des CMI estimées pour les acides acétique, lactique et citrique indissociés sont respectivement de 20.1, 5.4 et 1.6 mM.

Les CMI estimées pour le benzoate de sodium et le sorbate de potassium indissociés sont respectivement de 0.7 et 5.1 mM.

La médiane des CMI estimées pour le nitrite de sodium indissocié est de 11.4 μM .

L'activité inhibitrice du monolaurate de glycérol (monolaurine), un monoester de l'acide laurique a largement été étudiée. La médiane des CMI estimées dans 7 études est de 18.5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

Les médianes des CMI du butylhydroxyanisole (BHA) et du butylhydroquinone tertiaire (BHT) sont respectivement 254 et 48.7 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. La CMI du butylhydroxytoluène (TBHQ) est de 1400 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

La médiane des CMI théoriques obtenues dans 5 études pour le CO_2 est une proportion de 1.64 (théoriques car supérieures à 1).

Les résultats concernant l'effet du conditionnement sous vide sont contradictoires. Certaines études semblent indiquer que le vide entraîne une diminution de μ_{max} (Manu-Tawiah *et al.*, 1993) et qu'un tel conditionnement est équivalent à une atmosphère composée de 30% de CO_2 et de 70% de N_2 (Beumer *et al.*, 1996). A l'inverse, d'autres auteurs ont montré que la croissance de *L. monocytogenes* était similaire sous vide et en aérobiose (Hudson et Mott, 1993a,b). Comme l'effet du conditionnement sous vide n'est pas significatif sur les jeux de données inclus dans la banque de données ($P > 0.51$), ce facteur n'est pas pris en compte dans le modèle.

La CMI de la caféine est de 10.8 g.l⁻¹.

La médiane des CMI du phénol obtenues dans l'étude de Membré *et al.* (1997) est de 12.5 ppm.

Nous avons caractérisé les dispersions des CMI de la monolaurine et du CO₂, substances pour lesquelles nous disposons d'au moins 5 estimations. Ces CMI sont fortement dispersées avec des coefficients de variation pour respectivement la monolaurine et le CO₂ de 1.12 et 0.94 et des indices *D* égaux à 0.81 et 2.95.

I.3.B.c. ESTIMATION DE L'EFFET DES FACTEURS QUALITATIFS

L'agitation des milieux liquides a un effet variable selon la nature du milieu de culture utilisé (Jones *et al.*, 1995) mais généralement elle entraîne une augmentation de $\mu_{\max}$. La valeur médiane obtenue pour le coefficient *k* lorsqu'il y a agitation est de 1.08 (Tableau I.3.3).

Des résultats contradictoires ont été obtenus pour la croissance en anaérobiose. Dans certaines études, il n'y avait aucune influence significative (Buchanan *et al.*, 1989 ; Buchanan et Phillips, 1990 ; Jones *et al.*, 1995), dans d'autres un effet stimulant a été observé (Buchanan et Klawitter, 1990) et enfin certaines ont montré à l'inverse un effet inhibiteur de l'anaérobiose (George et Lund, 1992). Ce facteur n'a donc pas été pris en compte dans la modélisation.

La présence de *Pseudomonas* sp. dans le milieu de culture semble favoriser la croissance de *L. monocytogenes* (Marshall et Schmidt, 1988 ; Farrag et Marth, 1989). La médiane des coefficients *k* estimés pour *Pseudomonas* sp. est de 1.28 (Tableau I.3.3).

La présence de bactéries lactiques semble au contraire réduire la croissance de *L. monocytogenes* (McKellar *et al.*, 1994 ; Schmidt, 1995 ; Beumer *et al.*, 1996). La médiane des coefficients *k* obtenus pour *Lactobacillus curvatus* est de 0.81 (Tableau I.3.3).

La présence de *Penicillium camemberti* dans du petit lait favorise nettement la croissance de *L. monocytogenes*. La valeur *k* pour ce facteur est de 1.74 (Tableau I.3.3).

Le milieu de dénombrement utilisé lors de la construction des cinétiques de croissance ne semble pas avoir d'influence significative (Stillmunkes *et al.*, 1993 ; Palumbo et Williams, 1994).

I.3. Modèle secondaire sans interactions

Tableau I.3.3 Effet de facteurs qualitatifs sur le taux de croissance maximum de *L. monocytogenes*.

Facteurs	$k^{0.5}$	Nb points	Variables concomitantes	Références
Agitation	1.08	12	cacao	Pearson et Marth (1990a)
	0.96	22	cacao	Pearson et Marth (1990b)
	1.04	5	substrat	Jones <i>et al.</i> (1995)
<i>Pseudomonas fragi</i>	1.07	5	substrat	Marshall et Schmidt (1988)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> P26	1.13	3	substrat	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> T25	1.13	3	substrat	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> B52	1.28	3	substrat	
<i>Lactobacillus curvatus</i>	0.95	1	—	Beumer <i>et al.</i> (1996)
<i>Lactobacillus curvatus</i>	0.9	1	—	
<i>Lactobacillus curvatus</i>	0.89	1	—	
<i>Penicillium camemberti</i>	1.32	12	pH, souche	Ryser et Marth (1988)
Lait déshydraté / Lait	0.96	8	température, souche	Donnelly et Briggs (1986)
	0.95	5	<i>Pseudomonas</i> sp.	Marshall et Schmidt (1988)
Crème / Lait	1.04	14	température, souche	Rosenow et Marth (1987a)
	1.26	3	température	Murphy <i>et al.</i> (1996)
Perméat / Lait	0.92	12	température, souche	El-Gazzar <i>et al.</i> (1991)
Rétentat / Lait	1.08	12	température, souche	El-Gazzar <i>et al.</i> (1991)
Lait demi-écrémé / TSBYE	0.95	3	—	Denis et Ramet (1989)

I.3.B.d. ESTIMATION DE L'EFFET DE LA NATURE DU SUBSTRAT

Aucune différence significative ($P > 0.17$) n'est observée entre les taux de croissance maximum obtenus dans du lait écrémé et du lait entier (Donnelly et Briggs, 1986 ; Rosenow et Marth, 1987a ; Marshall et Schmidt, 1988).

Par contre, les taux de croissance obtenus dans du lait reconstitué à partir de lait déshydraté sans matière grasse sont plus faibles que ceux obtenus dans du lait (Donnelly et Briggs, 1986; Marshall et Schmidt, 1988), la valeur médiane de k est de 0.91 (Tableau I.3.3).

Les taux de croissance sont plus élevés dans la crème que dans le lait (Rosenow et Marth, 1987a ; Murphy *et al.*, 1996), la médiane de k pour la crème est de 1.32 (Tableau I.3.3).

El-Gazzar *et al.* (1991) ont obtenus des valeurs de $\mu_{\max}$ significativement plus faibles ($P = 3.5 \times 10^{-2}$) et plus élevées ($P = 5.9 \times 10^{-3}$) dans respectivement le perméat et le rétentat d'ultrafiltration de lait écrémé que dans le lait écrémé. Les coefficients k pour ces deux sous-produits sont respectivement 0.85 et 1.17.

Ces coefficients ont permis de corriger les taux de croissance maximum obtenus dans les produits laitiers et l'on peut considérer que ceux-ci sont alors caractéristiques du substrat lait.

Un effet significatif ($P = 4.1 \times 10^{-6}$) des propriétés nutritionnelles des bouillons de culture a été mis en évidence par George et Lund (1992) qui ont observé des valeurs de $\mu_{\max}$ plus élevées dans du bouillon tryptone soja complémenté en extrait de levure et en glucose que dans du bouillon tryptone phosphate. Ils ont attribué cette différence à la présence dans le premier milieu d'extrait de levure. Les propriétés nutritionnelles des différents substrats semblent donc influencer significativement la croissance de *L. monocytogenes*, malheureusement aucune autre étude ne nous permet d'évaluer ces effets.

Nous avons donc comparé les estimations de μ_{opt} obtenues sur l'ensemble de la banque de données pour chaque substrat. Les valeurs de μ_{opt} ont été estimées à partir des valeurs de $\mu_{\max}$ de la banque de données en ajustant le modèle secondaire de croissance (équation [I.3.1]) avec les paramètres précédemment estimés.

Contrairement à George et Lund (1992), nous n'observons pas d'influence significative de la nature des bouillons de culture sur la valeur de μ_{opt} . La valeur médiane de $\mu_{\text{opt}}^{0.5}$ pour le bouillon tryptone soja (68 valeurs) est 0.960 et celle du bouillon tryptone soja complémenté en extrait de levure (215 valeurs) est 0.950. Nous avons donc considéré que les propriétés nutritionnelles des bouillons de culture n'avaient pas d'effet sur le taux de croissance maximum de *L. monocytogenes*.

Denis et Ramet (1989) ont obtenu des taux de croissance maximum significativement plus faibles ($P = 3.2 \times 10^{-2}$) dans du lait demi-écrémé que dans du bouillon tryptone soja avec extrait de levure. Un résultat similaire est obtenu sur la totalité de la banque de données (Figure I.3.2).

Des différences sont également observées entre les médianes de μ_{opt} obtenues pour les bouillons de culture, les viandes et la coule d'œuf.

Les coefficients k suivants ont donc été adoptés pour prendre en compte l'effet de la nature du substrat : 0.69, 1.30, 0.30 et 1.00 pour respectivement le lait, les viandes, la coule d'œuf et les produits de la mer. Le niveau 0 est attribué aux bouillons de culture.

Etant donné le faible nombre de données pour les produits de la mer (12) et la proximité des médianes obtenues dans ces produits et dans les bouillons de culture, nous avons considéré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les produits de la mer et les bouillons de culture.

I.3. Modèle secondaire sans interactions

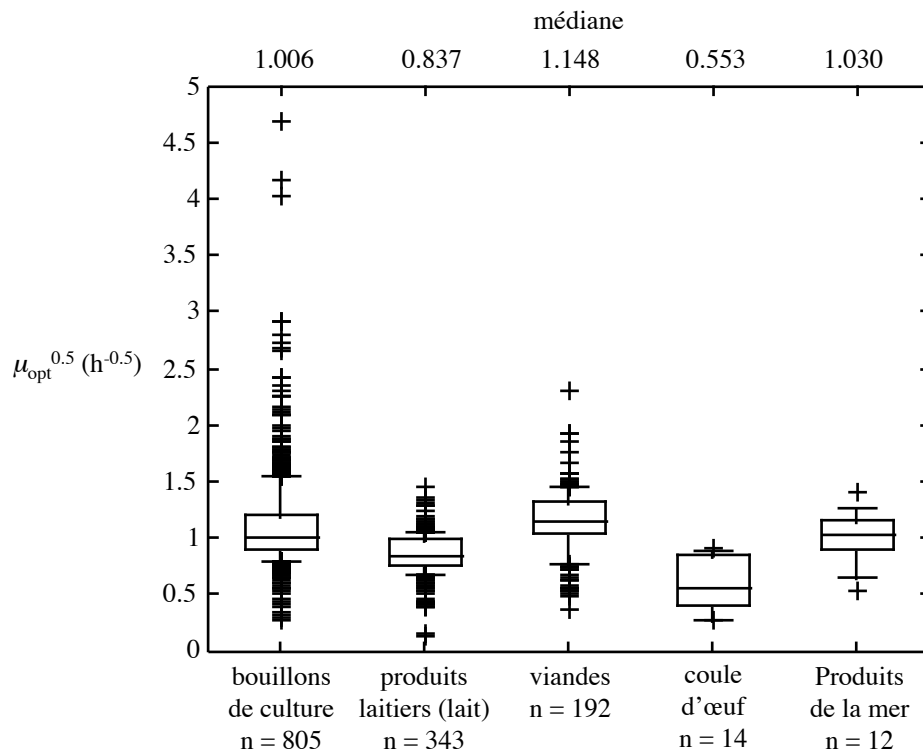


Figure I.3.2 Influence de la nature du substrat sur le taux de croissance optimum de *L. monocytogenes*. Les boîtes de Box représentent les 10ème, 25ème, 50ème, 75ème et 90ème percentiles des distributions.

I.3.B.e. ESTIMATION DU TAUX DE CROISSANCE OPTIMUM μ_{opt} ET DU PRODUIT $\mu_{max}lag$

μ_{opt} a été estimé en ajustant le modèle secondaire (équation [I.3.1]) aux valeurs non nulles de μ_{max} avec le paramétrage estimé auparavant. C'est à dire :

$$T_{min} = -2.7^{\circ}\text{C}, T_{opt} = 37^{\circ}\text{C}, T_{max} = 45.5^{\circ}\text{C},$$

$$pH_{min} = 4.55, pH_{opt} = 7.10, pH_{max} = 9.61,$$

$$aw_{min} = 0.910, aw_{opt} = 0.997, aw_{max} = 1,$$

$$CMI_{acide\ acétique\ indisso} = 20.1\text{ mM}, CMI_{acide\ lactique\ indisso} = 5.4\text{ mM},$$

$$CMI_{acide\ citrique\ indisso} = 1.6\text{ mM}, CMI_{benzoate\ de\ sodium\ indisso} = 0.7\text{ mM},$$

$$CMI_{sorbate\ de\ potassium\ indisso} = 5.1\text{ mM}, CMI_{nitrite\ de\ sodium\ indisso} = 11.4\text{ }\mu\text{M},$$

$$CMI_{monolaurine} = 18.5\text{ }\mu\text{g.ml}^{-1},$$

$$CMI_{BHA} = 254\text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}, CMI_{BHT} = 1400\text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}, CMI_{TBHQ} = 48.7\text{ }\mu\text{g.ml}^{-1},$$

$$CMI_{CO_2} = 1.64, CMI_{caféine} = 10.8\text{ g.l}^{-1}, CMI_{phénol} = 12.5\text{ ppm},$$

$$k_{\text{agitation}} = 1.08,$$

$$k_{\text{Pseudomonas}} = 1.28, k_{\text{Lactobacillus}} = 0.81, k_{\text{Penicillium}} = 1.74,$$

$$k_{\text{lait déshydraté}} = 0.63, k_{\text{crème}} = 0.91, k_{\text{perméat}} = 0.59, k_{\text{rétentat}} = 0.81, k_{\text{lait}} = 0.69,$$

$$k_{\text{viande}} = 1.30, k_{\text{œuf}} = 0.30, k_{\text{mer}} = 1.00.$$

Les valeurs μ_{opt} obtenues correspondent donc au taux de croissance maximum de *L. monocytogenes* dans les conditions de croissance optimales suivantes :

culture pure en bouillon de culture (pH 7.1, a_w 0.997) sans agitation et sans substance inhibitrice à 37°C.

La distribution des estimations de μ_{opt} est présentée par la Figure I.3.3, la valeur médiane de μ_{opt} est 1.015 h⁻¹. Malgré quelques valeurs aberrantes anormalement élevées, on peut observer que cette distribution est d'allure Normale.

Le coefficient de variation de μ_{opt} est très élevé (26.98) du fait des estimations aberrantes mais la valeur de l'indice D est égale à 0.57, ce qui est une valeur moyenne par rapport à celles déjà observées pour les autres paramètres.

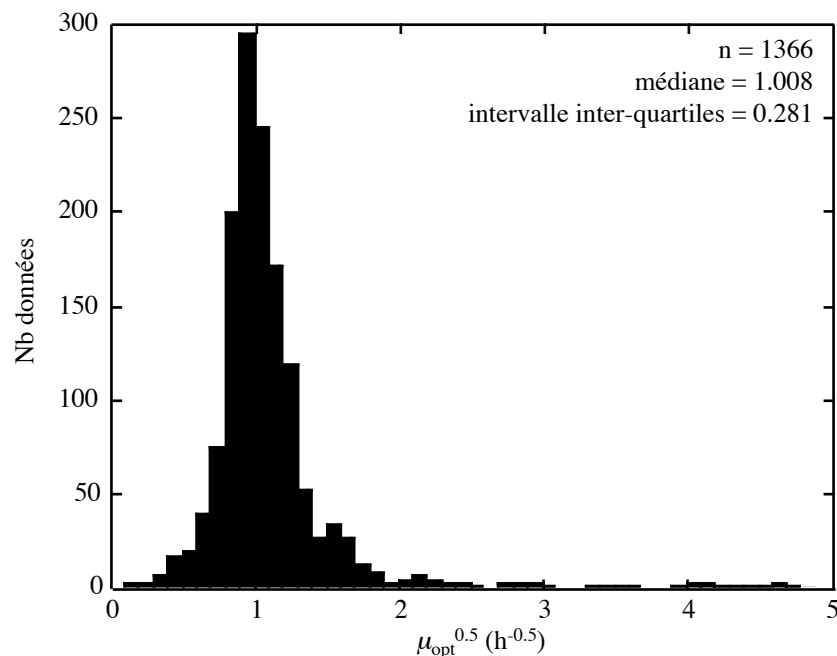


Figure I.3.3 Distribution des racines carrées des estimations du taux de croissance optimum μ_{opt} obtenues pour *L. monocytogenes* par ajustement du modèle secondaire sans interactions. Les caractéristiques de la distribution sont portées sur le graphe. Pour une meilleure lisibilité 5 estimations comprises entre 5.42 et 71.20 ne sont pas incluses dans l'histogramme.

Si le produit $\mu_{\max}lag$ est constant, on doit observer une relation linéaire entre $\ln lag$ et $\ln (1/\mu_{\max})$ ou $\ln Tg$ et la pente de la droite de régression doit être égale à 1. Une assez bonne corrélation linéaire est effectivement observée entre $\ln lag$ et $\ln Tg$ et la pente de la droite de régression orthogonale (critère des moindres rectangles) est proche de 1 (Figure I.3.4).

On peut donc calculer le logarithme du produit $\mu_{\max}lag$ pour chaque couple de paramètres de croissance de la banque de données (Figure I.3.5) et la valeur médiane, 0.761, nous permet d'estimer le paramètre K de l'équation [I.3.1].

On a $K = \exp(0.761) = 2.14$.

Ce paramètre est caractérisé par une forte dispersion de ces estimations puisque l'on obtient un coefficient de variation de 0.99 et un indice D de 1.02.

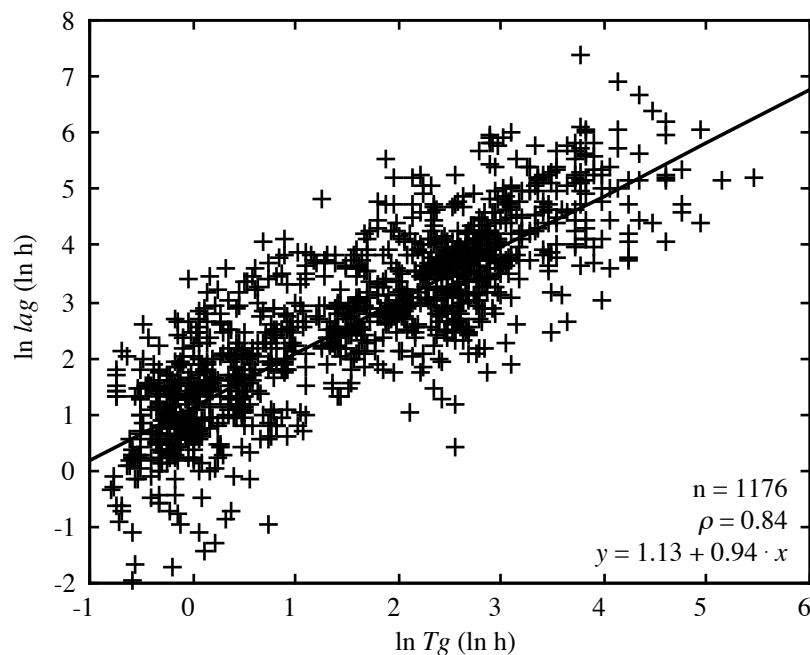


Figure I.3.4 Relation entre le temps de latence et le temps de génération de *L. monocytogenes*. L'équation de la droite de régression et le coefficient de corrélation linéaire sont portés sur le graphique.

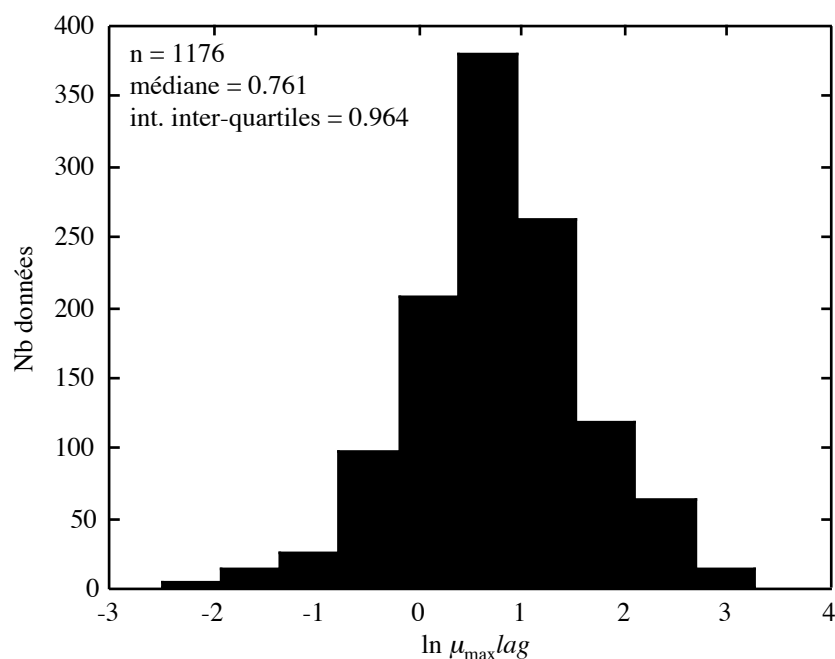


Figure I.3.5 Distribution du logarithme du produit $\mu_{\max} lag$ pour *L. monocytogenes*. Les caractéristiques de la distribution sont portées sur le graphe.

I.3.C. PERFORMANCE DU MODELE SECONDAIRE SANS INTERACTIONS

I.3.C.a. MODELISATION DU TAUX DE CROISSANCE MAXIMUM DE *L. monocytogenes*

Les taux de croissance maximum calculés avec le modèle secondaire sans interactions à 35 paramètres sont présentés par la Figure I.3.6. Ce modèle permet d'expliquer 78.0% de la variabilité de $\mu_{\max}^{0.5}$. Les points semblent uniformément répartis de part et d'autre de la droite d'adéquation parfaite du modèle ce qui indique une absence de corrélation des résidus et des valeurs ajustées.

Des erreurs d'ajustement de modèles ont été publiées pour l'estimation du temps de génération (Baranyi *et al.*, 1996, 1999 ; Fernández *et al.*, 1997), nous allons donc comparer l'erreur d'ajustement de notre modèle à celles-ci. Le fait de travailler sur le temps de génération et non le taux de croissance exclut les données de non croissance ce qui, comme l'ont souligné Buchanan et Phillips (1990), est un facteur limitant pour évaluer la précision réelle de l'ajustement d'un modèle.

I.3. Modèle secondaire sans interactions

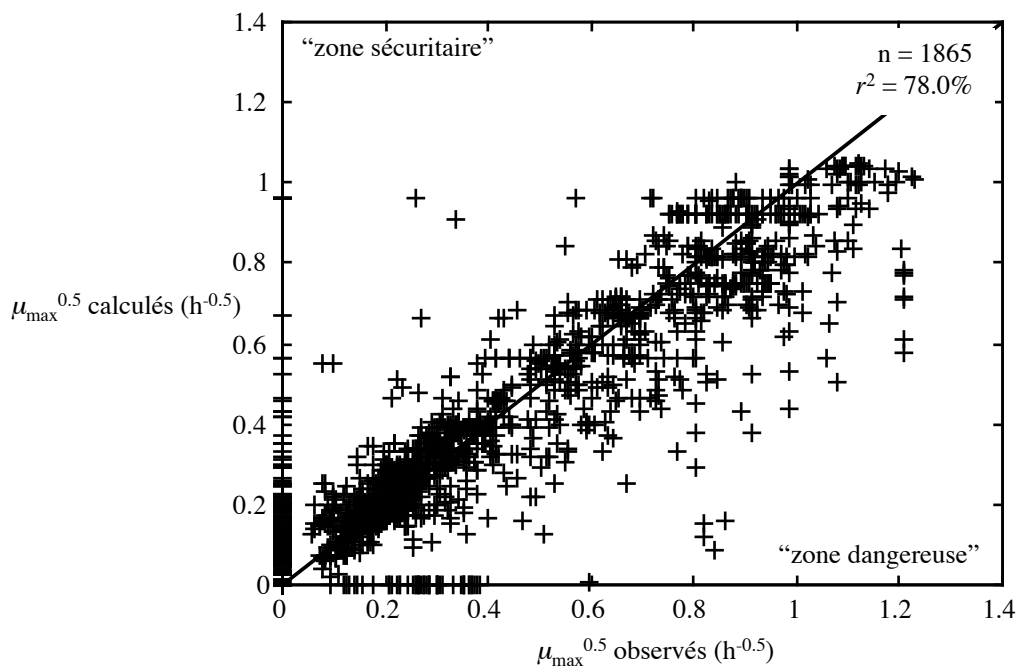


Figure I.3.6 Relation entre les taux de croissance maximum de *L. monocytogenes* observés et ceux calculés avec le modèle secondaire sans interactions. La droite correspond à une adéquation parfaite entre les valeurs calculées et les valeurs observées, la zone supérieure qualifiée de sécuritaire correspond à des valeurs calculées supérieures aux valeurs observées et la zone inférieure qualifiée de dangereuse correspond à des valeurs calculées inférieures aux valeurs observées.

Le facteur de précision, A_f , est habituellement utilisé pour évaluer la précision de l'ajustement d'un modèle (cf. § 1.2.A). Ce facteur A_f correspondant à l'erreur moyenne de l'ajustement est fortement influencé par d'éventuelles erreurs aberrantes très élevées. La banque de données contient des paramètres de croissance parfois estimés avec très peu de points et donc peu fiables, nous avons donc également utilisé pour estimer la précision de l'ajustement, l'erreur médiane définie par la formule suivante :

$$\exp\left(\sqrt{M(X^2)}\right)$$

$M(\cdot)$ médiane de la variable entre parenthèses

$$X = \ln x_{\text{estimée}} - \ln x_{\text{observée}}$$

x temps de génération (ou temps de latence)

La distribution des erreurs sur le logarithme du temps de génération est présentée par la Figure I.3.7. Les précisions moyenne et médiane obtenues pour le temps de génération sont respectivement de 90% et 32%.

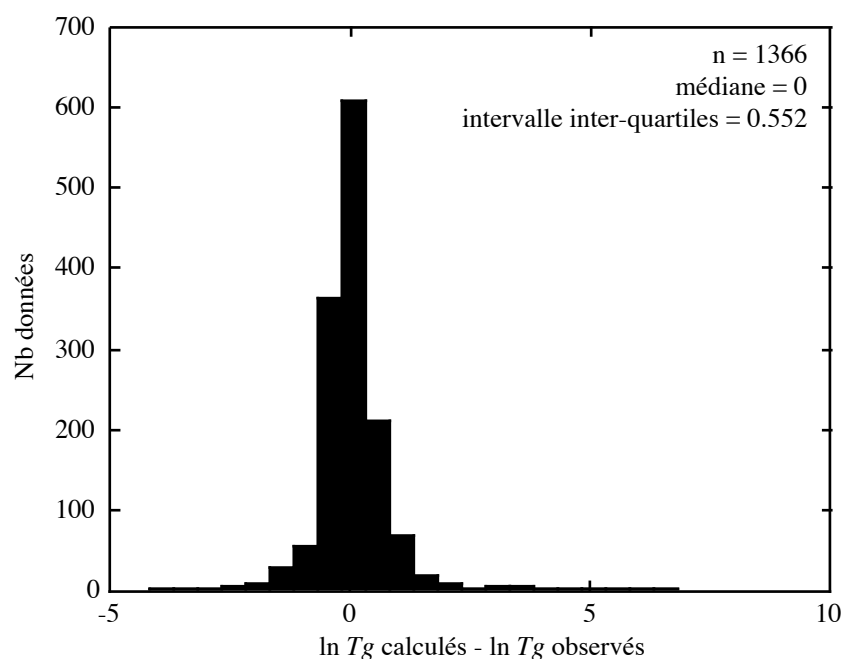


Figure I.3.7 Distribution des erreurs d'ajustement du modèle secondaire sans interactions sur le logarithme du temps de génération de *L. monocytogenes*. Les caractéristiques de la distribution sont portées sur le graphe.

En supposant que les erreurs sont indépendantes et que l'erreur de mesure du temps de génération est d'environ 10% (Baranyi et Roberts, 1995 ; Bégot *et al.*, 1996), et en prenant une erreur due à la correction par rapport au modèle primaire utilisé de 10% (*cf.* § I.2.C), l'erreur médiane d'ajustement du modèle est de 12% (70% pour la moyenne).

Baranyi *et al.* (1996) ont montré que pour un modèle à 3 variables (température, pH et activité de l'eau), la précision des estimations du temps de génération était au mieux d'environ 15%. Fernández *et al.* (1997) ont obtenu avec un modèle à 4 variables (température, pH, taux de NaCl et de CO₂) une erreur d'environ 24%. Baranyi *et al.* (1999) ont enfin obtenu une précision de 2% pour un modèle à 2 variables (température et pH).

La précision de 12%, bien que basée sur une erreur médiane et non moyenne, pour un modèle à 28 variables est donc très satisfaisante.

La qualité de l'ajustement des modèles est également évaluée (Ross, 1996 ; Baranyi *et al.*, 1999) par le facteur de biais, B_f ("bias factor") :

$$B_f = \exp(E(X))$$

$E(.)$ espérance mathématique de la variable entre parenthèses (estimée par la moyenne)

$$X = \ln x_{\text{estimée}} - \ln x_{\text{observée}}$$

x temps de génération (ou temps de latence)

Ce facteur reflète si, en moyenne, les valeurs estimées sont plus élevées ou plus faibles que les valeurs observées. Comme le facteur A_f , ce facteur de biais peut être fortement influencé par d'éventuelles erreurs aberrantes très élevées. Nous avons donc également utilisé un facteur de biais median défini par :

$$\exp(M(X))$$

$M(.)$ médiane de la variable entre parenthèses

$$X = \ln x_{\text{estimée}} - \ln x_{\text{observée}}$$

x temps de génération (ou temps de latence)

Baranyi *et al.* (1999) ont défini le pourcentage de biais ("per cent bias") par :

$$100 \times \text{signe}(\ln B_f) \cdot (\exp|\ln B_f| - 1)$$

Le biais moyen obtenu avec ce modèle est de 3% ce qui indique la présence de quelques valeurs calculées de T_g anormalement élevées (Figure I.3.7) car le biais médian est lui de 0%.

Pour évaluer complètement la performance du modèle, il faut également s'intéresser aux données de non croissance qui ont été écartées des évaluations précédentes.

Parmi les 1579 conditions pour lesquelles le modèle prévoit une croissance, la croissance n'est pas observée dans 213 cas, *i.e.*, 13.5% de croissances prédites à tort, et parmi les 286 conditions restantes pour lesquelles la croissance de *L. monocytogenes* n'est pas prédite par le modèle, on observe en fait une croissance dans 46 cas, *i.e.*, 16.1% de non croissances prédites à tort.

Le fort taux de non croissances prédites à tort peut être dû à une surestimation des valeurs cardinales minimales, mais si des valeurs plus faibles sont utilisées, on observera alors une augmentation du nombre de croissances prédites à tort.

L'ajustement du modèle semble donc satisfaisant dans des conditions permettant la croissance de *L. monocytogenes*, par contre il est insuffisant dans des conditions proches des limites de croissance du pathogène qui sont les conditions qui généralement prévalent dans les aliments.

I.3.C.b. MODELISATION DU TEMPS DE LATENCE DE *L. monocytogenes*

Les temps de latence calculés avec le modèle secondaire sans interactions à 35 paramètres sont présentés par la Figure I.3.8. Ce modèle permet d'expliquer 70.1% de la variabilité de $\ln lag$. Comme pour le taux de croissance maximum, les résidus semblent non corrélés aux valeurs ajustées.

La distribution des erreurs sur le logarithme du temps de latence est présentée par la Figure I.3.9. Les erreurs moyenne et médiane sur le temps de latence sont respectivement de 133% et 61%.

Comme l'erreur de mesure du temps de latence est d'environ 20% (Bégot *et al.*, 1996) et que la correction par rapport au modèle primaire utilisé génère au mieux une erreur d'environ 15% (cf. § I.2.C), l'erreur médiane d'ajustement du modèle est de 26% (98% pour la moyenne).

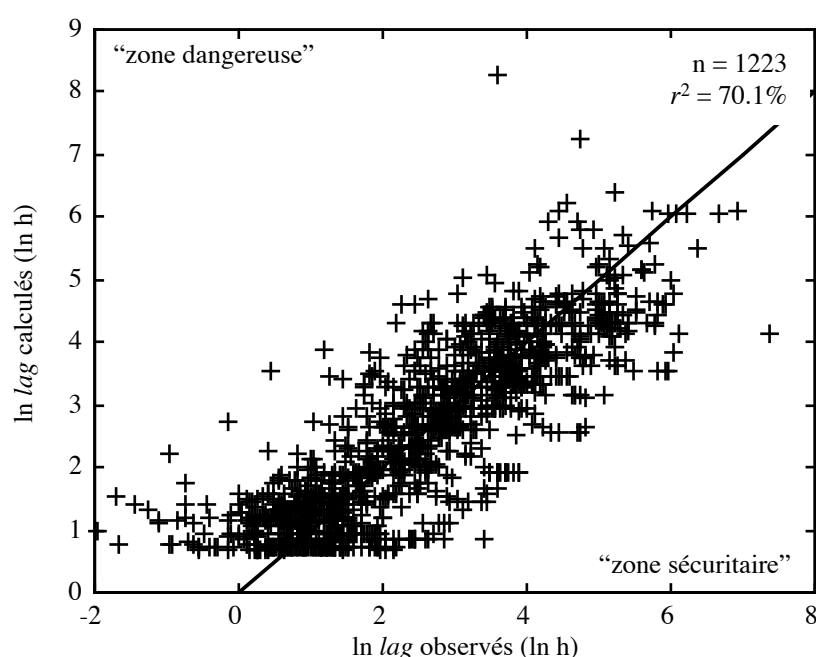


Figure I.3.8 Relation entre les temps de latence de *L. monocytogenes* observés et ceux calculés avec le modèle secondaire sans interactions. La droite correspond à une adéquation parfaite entre les valeurs calculées et les valeurs observées, la zone supérieure qualifiée de dangereuse correspond à des valeurs calculées supérieures aux valeurs observées et la zone inférieure qualifiée de sécuritaire correspond à des valeurs calculées inférieures aux valeurs observées.

I.3. Modèle secondaire sans interactions

Le modèle est donc deux fois moins précis pour l'estimation du temps de latence que pour l'estimation du temps de génération. Il est donc nécessaire d'améliorer ce modèle afin de mieux prévoir la durée de la phase de latence de *L. monocytogenes*.

Il faut de plus noter que ce modèle surestime légèrement le temps de latence car les biais moyen et médian sont égaux à 3%.

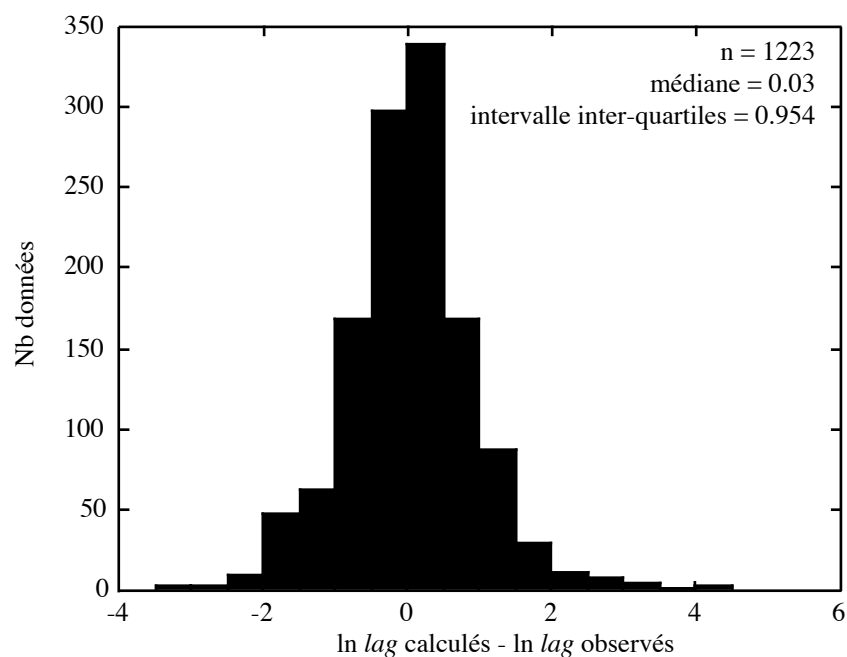


Figure I.3.9 Distribution des erreurs d'ajustement du modèle secondaire sans interactions sur le logarithme du temps de latence de *L. monocytogenes*. Les caractéristiques de la distribution sont portées sur le graphe.

Nous avons donc vu que l'utilisation des modèles aujourd'hui disponibles en microbiologie prévisionnelle permet globalement de décrire de façon satisfaisante l'influence des facteurs environnementaux sur les paramètres de croissance de *L. monocytogenes* et qu'il est donc envisageable de concevoir un modèle secondaire capable de prévoir ces paramètres dans des conditions très variées. Certaines limites à l'utilisation de ce modèle sont cependant apparues.

Tout d'abord, ce modèle estime très mal le comportement de *L. monocytogenes* dans des conditions limites pour la croissance. La non prise en compte des interactions entre facteurs écologiques est vraisemblablement à l'origine de cette lacune. La conséquence de cette hypothèse d'indépendance entre les facteurs environnementaux est illustrée par la Figure I.3.10. Celle-ci montre l'évolution du taux de croissance maximum en fonction de la température et du pH sans interaction. Les combinaisons des deux facteurs pour lesquelles aucune croissance n'est prédite sont représentées par la surface sombre. La frontière entre les zones de croissance et de non croissance (dépendant uniquement des paramètres T_{min} et pH_{min}) semble peu réaliste et de nombreuses études ont montré que les valeurs cardinales de croissance des micro-organismes étaient influencées par le niveau des autres facteurs environnementaux. Cette non prise en compte des interactions pourrait en partie expliquer la forte dispersion des estimations obtenues pour certains paramètres tels que T_{min} ou $CMI_{monolaurine}$.

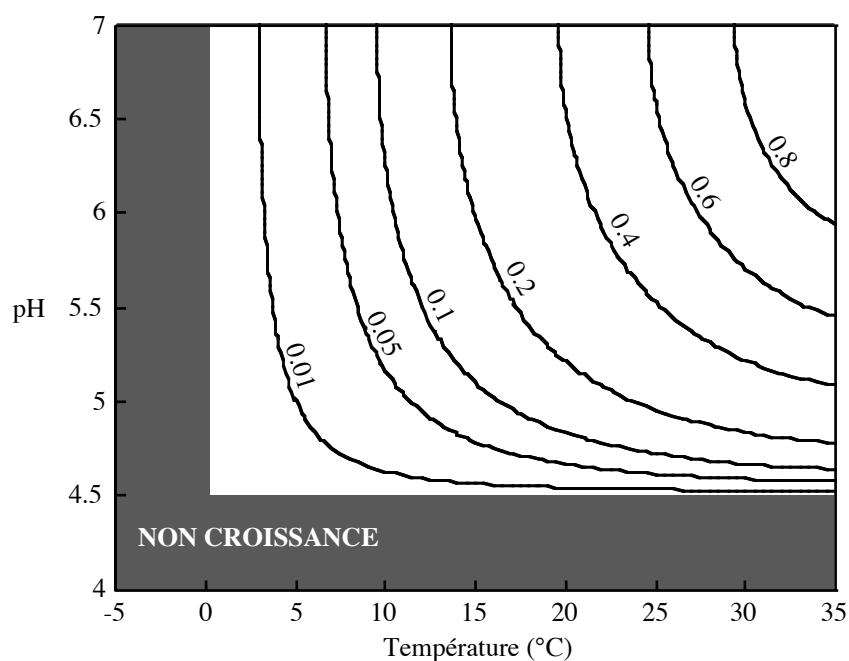


Figure I.3.10 Courbes d'iso-réponse du taux de croissance maximum prédit en fonction de la température et du pH sans interaction (équation [I.3.1]). Les paramètres du modèle sont $\mu_{opt} = 1 \text{ h}^{-1}$; $T_{min} = 0^\circ\text{C}$; $T_{opt} = 35^\circ\text{C}$; $pH_{min} = 4.5$; $pH_{opt} = 7.0$.

*La suite de notre étude va donc, pour partie, consister à améliorer le modèle secondaire en prenant en compte les effets combinés afin de le rendre plus pertinent près des limites de croissance de *L. monocytogenes*.*

*Le deuxième facteur limitant à l'utilisation de ce modèle secondaire est la mauvaise estimation du temps de latence de *L. monocytogenes*. La deuxième modification du modèle consistera donc à améliorer la modélisation du temps de latence en prenant en compte en particulier l'influence des conditions pré-incubatoires que l'on a négligée dans cette partie.*

PARTIE II

CHAPITRE 1

MODELE SECONDAIRE AVEC INTERACTIONS

Contrairement aux modèles polynomiaux, les modèles secondaires utilisés dans l'approche progressive négligent les effets des interactions entre facteurs environnementaux sur le domaine de croissance des micro-organismes. L'objectif de cette partie est donc de proposer un modèle simple permettant de prendre en compte ces interactions tout en conservant l'approche progressive.

II.1.A. MODELISATION DES INTERACTIONS

II.1.A.a. INTERACTIONS ENTRE TEMPERATURE, pH ET ACTIVITE DE L'EAU

L'influence des conditions environnementales sur les valeurs cardinales minimales pour la température, le pH et l'activité de l'eau a fréquemment été signalée pour *L. monocytogenes*.

George *et al.* (1988) ont observé que le pH maximum de non croissance (équivalent à pH_{min}) était d'environ 4.20 à 30°C et 5.03 à 4°C. Cette augmentation de pH_{min} lorsque la température diminue a également été observée par d'autres équipes (Farber *et al.*, 1989 ; McClure *et al.*, 1989 ; Cole *et al.*, 1990 ; Conner *et al.*, 1990).

McClure *et al.* (1989) ont observé une augmentation de pH_{min} lorsque la concentration en NaCl augmente, *i.e.*, l' a_w diminue.

L' aw_{min} de *L. monocytogenes* semble augmenter lorsque la température (McClure *et al.*, 1991 ; Tapia de Daza *et al.*, 1991 ; Farber *et al.*, 1992) ou le pH (McClure *et al.*, 1991) diminuent. La tolérance au NaCl augmente, *i.e.*, aw_{min} diminue, lorsque le pH augmente (Bal'a et Marshall, 1996a).

Des points appartenant à la frontière entre les zones de croissance et de non croissance déterminées par deux facteurs environnementaux sont présentés par la Figure II.1.1.

Nous proposons l'équation suivante pour décrire la courbure observée :

$$\left[\frac{(X_{\text{opt}} - X)}{(X_{\text{opt}} - X_{\text{min}}^{\circ})} \right]^n + \left[\frac{(Y_{\text{opt}} - Y)}{(Y_{\text{opt}} - Y_{\text{min}}^{\circ})} \right]^n = 1 \quad [\text{II.1.1}]$$

$(X; Y)$ couple de valeurs de facteurs environnementaux (T , pH ou a_w) égales aux valeurs minimales de croissance
 X_{min}° et Y_{min}° valeurs minimales absolues pour X et Y lorsque respectivement $Y = Y_{\text{opt}}$ et $X = X_{\text{opt}}$
 n paramètre de forme qui augmente lorsque l'interaction entre les deux facteurs diminue

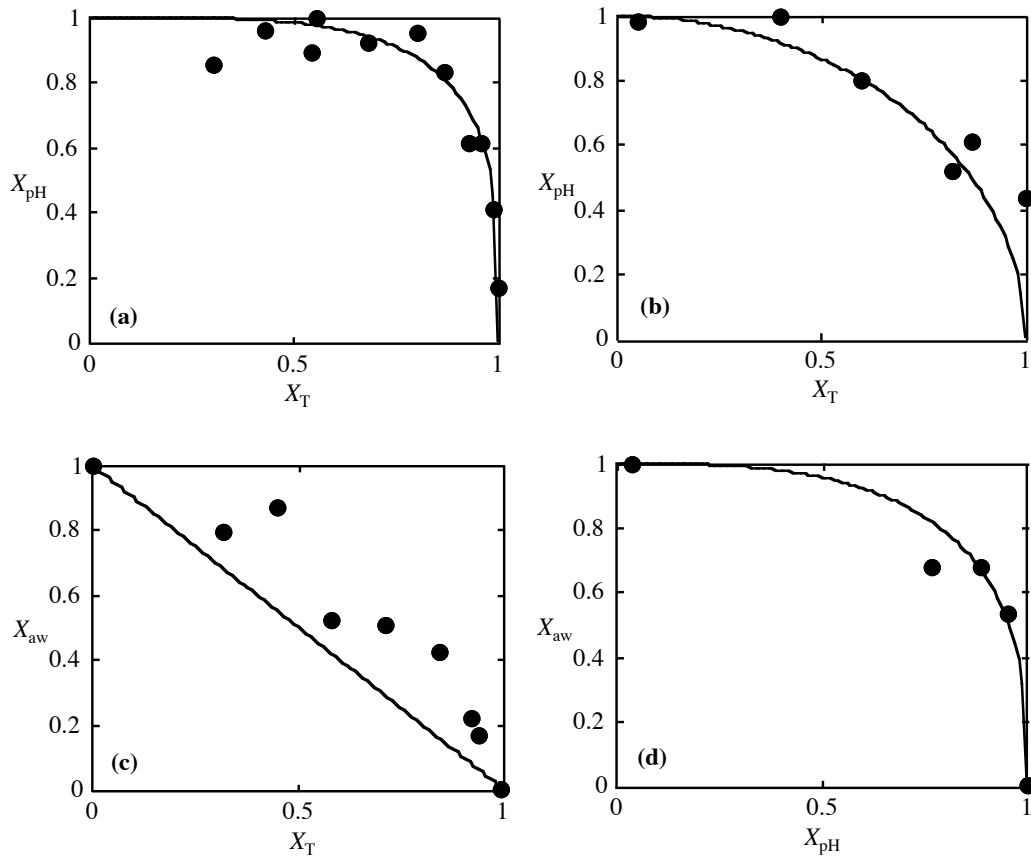


Figure II.1.1 Relation entre les valeurs cardinales minimales de *L. monocytogenes*. X est défini par : $X = \frac{(opt - min)}{(opt - min^{\circ})}$ avec min° choisi comme la plus petite valeur de min observée. Les courbes représentent l'ajustement de l'équation [II.1.1] avec (a) $n = 4$, (b) $n = 2$, (c) $n = 1$, et (d) $n = 3$. Les données sont issues de (a) Grau et Vanderlinde (1993), (b) El-Shenawy et Marth (1988a), (c) Robinson *et al.* (1998), (d) Cole *et al.* (1990).

Tableau II.1.1 Corrélations linéaires entre les valeurs cardinales minimales de *L. monocytogenes* en fonction de la valeur du paramètre de forme, n , de l'équation [II.1.1].

Valeurs cardinales	Coefficients de corrélation linéaire					Nb points	Références
	$n = 1$	$n = 2$	$n = 3$	$n = 4$	$n = 5$		
$T_{\min}$ & $pH_{\min}$	0.714	0.814	0.863	0.881 ^a	0.877	11	Grau et Vanderlinde (1993)
	0.926	0.963	0.917	—	—	6	El-Shenawy et Marth (1988a)
	0.678	0.857	0.913	0.922	0.914	5	Oh et Marshall (1993)
	0.670	0.789	0.851	0.892	0.922	5	El-Shenawy et Marth (1988b)
	0.987	0.931	—	—	—	5	Farber <i>et al.</i> (1996)
	0.915	0.795	—	—	—	5	Buchanan <i>et al.</i> (1989)
	0.838	0.901	0.926	0.924	—	5	George <i>et al.</i> (1988)
$T_{\min}$ & $aw_{\min}$	0.946	0.934	—	—	—	9	Robinson <i>et al.</i> (1998)
$pH_{\min}$ & $aw_{\min}$	0.941	0.951	0.956	0.955	—	11	Duffy <i>et al.</i> (1994b)
	0.756	0.959	0.963	0.897	—	5	Cole <i>et al.</i> (1990)

^acoefficient plus faible.

La valeur du paramètre de forme n a été choisie à partir des résultats obtenus sur 10 jeux de données (Tableau II.1.1). Le coefficient de corrélation linéaire entre les deux termes de l'équation [II.1.1] est optimal dans 3 cas pour $n = 1$, dans 1 cas pour $n = 2$, dans 3 cas pour $n = 3$, dans 2 cas pour $n = 4$ et dans 1 cas pour $n = 5$. La valeur de n a donc été fixée à la valeur médiane 3 quelques soient les facteurs écologiques considérés.

L'équation [II.1.1] généralisée à trois facteurs devient donc :

$$\left[\frac{(T_{\text{opt}} - T)}{(T_{\text{opt}} - T_{\min}^{\circ})} \right]^3 + \left[\frac{(pH_{\text{opt}} - pH)}{(pH_{\text{opt}} - pH_{\min}^{\circ})} \right]^3 + \left[\frac{(aw_{\text{opt}} - aw)}{(aw_{\text{opt}} - aw_{\min}^{\circ})} \right]^3 = 1 \quad [\text{II.1.2}]$$

$(T; pH; aw)$ triplet de valeurs pour la température, le pH et l'activité de l'eau égales aux valeurs minimales de croissance

L'évolution du taux de croissance maximum en fonction de la température et du pH calculé à l'aide du modèle secondaire (équation [I.3.1]) associé à l'équation [II.1.2] pour le calcul de $T_{\min}$ et $pH_{\min}$ est présentée par la Figure II.1.2. Contrairement au résultat obtenu en utilisant uniquement le modèle sans interaction (*cf.* § 1.3, Figure I.3.10), on observe maintenant une frontière entre les zones de croissance et de non croissance réaliste. On peut voir que la valeur de $pH_{\min}$ est de 4.5 lorsque la température est optimale (35°C) et qu'elle augmente à environ 5 lorsque la température diminue à 5°C. Cette observation est cohérente avec les résultats publiés (George *et al.*, 1988 ; Farber *et al.*, 1989 ; McClure *et al.*, 1989 ; Cole *et al.*, 1990 ; Conner *et al.*, 1990).

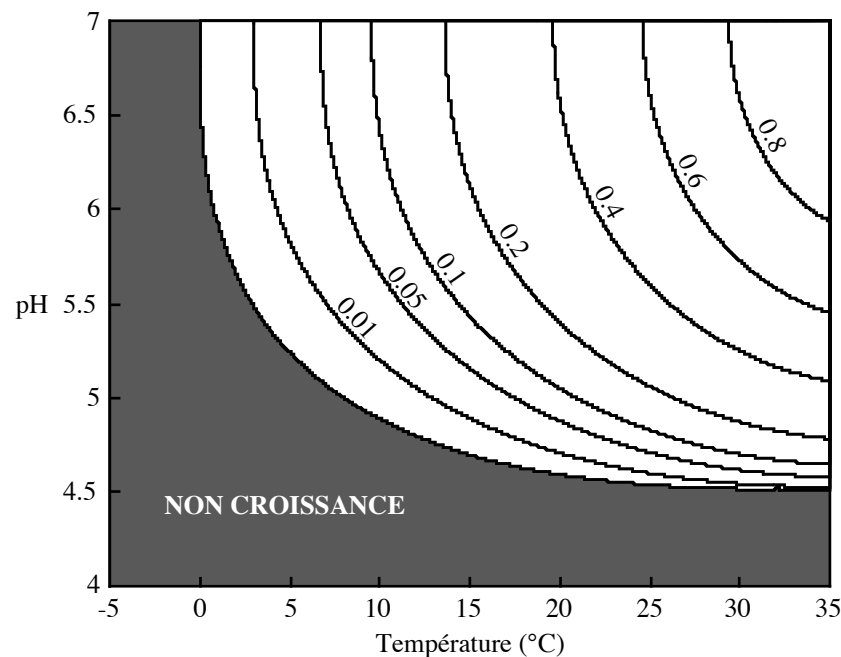


Figure II.1.2 Courbes d'iso-réponse du taux de croissance maximum prédit en fonction de la température et du pH avec interaction. Les paramètres du modèle sont $\mu_{opt} = 1 \text{ h}^{-1}$; $T_{min}^{\circ} = 0^{\circ}\text{C}$; $T_{opt} = 35^{\circ}\text{C}$; $pH_{min}^{\circ} = 4.5$; $pH_{opt} = 7.0$.

II.1.A.b. INTERACTIONS ENTRE TEMPERATURE, pH OU ACTIVITE DE L'EAU ET SUBSTANCES INHIBITRICES

Comme pour les valeurs cardinales minimales, de nombreuses études ont montré que les CMI des substances inhibitrices dépendaient du niveau des autres facteurs écologiques.

Les CMI du lactate de sodium, du benzoate de sodium et du sorbate de potassium diminuent avec la température (El-Shenawy et Marth, 1988a,b ; Houtsma *et al.*, 1994).

La CMI de la monolaurine diminue avec la température (Oh et Marshall, 1993 ; Bal'a et Marshall, 1996b), avec le pH (Oh et Marshall, 1992, 1993) et lorsque la concentration en acides organiques augmente (Oh et Marshall, 1994). Il a également été observé qu'une augmentation de la concentration en monolaurine entraînait une augmentation de aw_{min} et pH_{min} (Bal'a et Marshall, 1996a) et que la CMI de la monolaurine était fortement dépendante de la nature du substrat avec une activité très faible dans certains aliments (Bal'a et Marshall, 1996b ; Wang et Johnson, 1997).

La CMI du nitrite de sodium diminue avec la température et l'activité de l'eau (Buchanan *et al.*, 1989 ; McClure *et al.*, 1991) et la CMI du phénol diminue avec la température et l'activité de l'eau (Membré *et al.*, 1997).

Des points appartenant à la frontière entre les zones de croissance et de non croissance déterminées par une substance inhibitrice et un facteur environnemental tel que la température, le pH ou l'activité de l'eau sont présentés par la Figure II.1.3.

Nous proposons l'équation suivante pour décrire la frontière :

$$\left[\frac{(X_{\text{opt}} - X)}{(X_{\text{opt}} - X_{\text{min}}^{\circ})} \right]^3 = (1 - c/CMI^{\circ})^p \quad [\text{ I I . 1 . 3 }]$$

$(X; c)$ couple de valeurs pour un facteur environnemental (température, pH ou a_w) et une substance inhibitrice respectivement égales à la valeur cardinale minimale et à la CMI

X_{min}° valeur minimale absolue lorsque $c = 0$

CMI° CMI absolue lorsque $X = X_{\text{opt}}$

p paramètre de forme

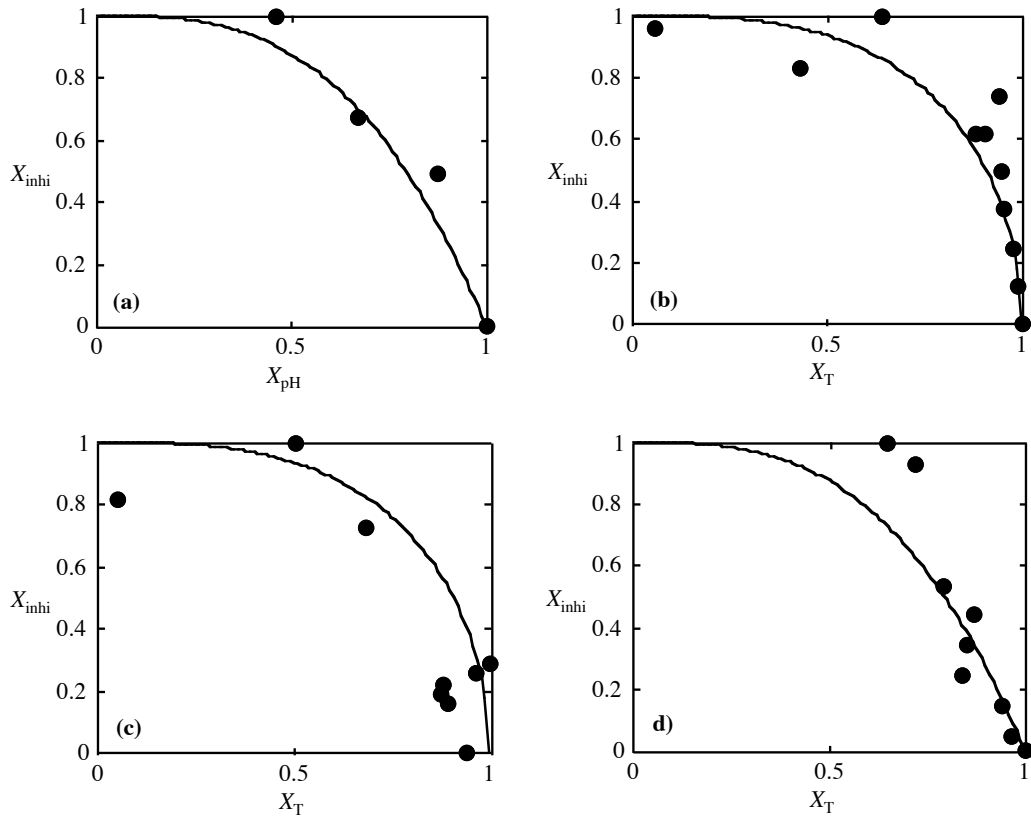


Figure II.1.3 Relation entre (a) pH_{min} et CMI de l'acide acétique, (b) T_{min} et CMI du sorbate de potassium, (c) T_{min} et CMI du benzoate de sodium et (d) T_{min} et CMI du nitrite de sodium. X_{inhi} est défini par : $X_{\text{inhi}} = 1 - c/CMI^{\circ}$ avec CMI° choisie comme la plus petite valeur de CMI observée et X_{pH} et X_T sont définis comme précédemment (cf. Figure II.1.1). Les courbes représentent l'ajustement de l'équation [II.1.3] avec (a) $p = 1$, (b) $p = 2$, (c) $p = 1$ et (d) $p = 1$. Les données sont issues de (a) Young et Foegeding (1993), (b) El-Shenawy et Marth (1988b), (c) El-Shenawy et Marth (1988a), (d) Buchanan *et al.* (1989).

Tableau II.1.2 Corrélations linéaires entre les valeurs cardinales minimales et les CMI de différentes substances inhibitrices pour *L. monocytogenes* en fonction du paramètre de forme p de l'équation [II.1.3].

CMI et valeurs cardinales	Coefficients de corrélation linéaire			Nb points	Références
	$p = 1$	$p = 2$	$p = 3$		
CMI acide acétique & $pH_{\min}$	0.977	0.937	^a —	4	Young et Foegeding (1993)
CMI acide lactique & $pH_{\min}$	0.816	0.778	—	4	Young et Foegeding (1993)
CMI acide citrique & $pH_{\min}$	0.801	0.721	—	4	Young et Foegeding (1993)
CMI lactate de sodium & $T_{\min}$	0.867	0.777	—	4	Houtsma <i>et al.</i> (1994)
CMI lactate de sodium & $pH_{\min}$	0.244	0.280	0.304	4	Houtsma <i>et al.</i> (1994)
CMI benzoate de sodium & $T_{\min}$	0.879	0.831	—	9	El-Shenawy et Marth (1988a)
CMI sorbate de potassium & $T_{\min}$	0.844	0.898	0.897	11	El-Shenawy et Marth (1988b)
CMI nitrite de sodium & $T_{\min}$	0.916	0.913	—	9	Buchanan <i>et al.</i> (1989)
CMI monolaurine & $T_{\min}$	0.882	0.892	0.860	9	Oh et Marshall (1993)
CMI monolaurine & $pH_{\min}$	0.805	0.697	—	9	Oh et Marshall (1993)
CMI CO_2 & $T_{\min}$	0.943	0.854	—	9	Farber <i>et al.</i> (1996)
CMI CO_2 & $pH_{\min}$	0.773	0.622	—	8	Farber <i>et al.</i> (1996)

^acoefficient plus faible.

Le choix de la valeur du paramètre de forme p a comme précédemment été fait en fonction des corrélations linéaires entre les deux termes de l'équation [II.1.3] observées sur 12 jeux de données.

La valeur de p a été fixée à 1 car elle est proche de ce nombre dans 9 cas sur 12 (Tableau II.1.2).

La surface délimitant l'espace de croissance peut donc être définie à partir des équations [II.1.2] et [II.1.3]. L'équation de cette surface est :

$$\left[\frac{(T_{\text{opt}} - T)}{(T_{\text{opt}} - T_{\min}^{\circ})} \right]^3 + \left[\frac{(pH_{\text{opt}} - pH)}{(pH_{\text{opt}} - pH_{\min}^{\circ})} \right]^3 + \left[\frac{(aw_{\text{opt}} - aw)}{(aw_{\text{opt}} - aw_{\min}^{\circ})} \right]^3 = \prod_{i=1}^n (1 - c_i / CMI_i^{\circ}) \quad [\text{II.1.4}]$$

Les effets des n substances inhibitrices sont supposés multiplicatifs.

Il n'y a donc pas de croissance lorsque :

$$\left[\frac{(T_{\text{opt}} - T)}{(T_{\text{opt}} - T_{\min}^{\circ})} \right]^3 + \left[\frac{(pH_{\text{opt}} - pH)}{(pH_{\text{opt}} - pH_{\min}^{\circ})} \right]^3 + \left[\frac{(aw_{\text{opt}} - aw)}{(aw_{\text{opt}} - aw_{\min}^{\circ})} \right]^3 > \prod_{i=1}^n (1 - c_i / CMI_i^{\circ})$$

II.1.A.c. CAS PARTICULIERS DES INTERACTIONS $pH_{\min}$ - ACIDE ET $aw_{\min}$ - SOLUTE

Les variations de $pH_{\min}$ avec la nature de l'acide utilisé sont bien connues. Plusieurs études ont montrés que les $pH_{\min}$ des différents acides pouvaient être classés dans l'ordre suivant pour *L. monocytogenes* : acide propionique > acide acétique > acide lactique > acide citrique > HCl (Farber *et al.*, 1989 ; Sorrells *et al.*, 1989 ; Conner *et al.*, 1990 ; Young et Foegeding, 1993 ; Vasseur *et al.*, 1999).

Comme nous l'avons signalé précédemment (cf. § I.3.B.b), l'action des acides organiques repose sur une diminution du pH et sur une action spécifique sur le métabolisme microbien. On peut donc supposer qu'il existe un $pH_{\min}^{\circ}$ absolu égal au $pH_{\min}$ des acides minéraux et que les valeurs plus élevées de $pH_{\min}$ observées avec les acides organiques sont dues aux interactions entre le pH et les concentrations en acides organiques. Connaissant les valeurs de $pH_{\min}^{\circ}$ et de CMI° , il serait donc possible pour une concentration en acide organique donnée de calculer la valeur de $pH_{\min}$ en utilisant l'équation [II.1.3].

Ceci n'est cependant pas possible avec les jeux de données inclus dans la banque de données. Dans ces études, lorsque le pH est ajusté avec un acide organique, les concentrations d'acide utilisées ne sont pas précisées et la seule information dont on dispose est la valeur du pH.

Nous allons donc inclure dans le modèle de nouveaux paramètres qui sont les $pH_{\min(i)}$ des différents acides organiques et qui permettent de prendre en compte l'effet inhibiteur du à la concentration en acide organique.

Toujours pour les acides organiques, nous avons précédemment envisagé les effets du pH et des acides sous forme indissociée (cf. § I.3.B.b).

Les évolutions des CMI du benzoate de sodium calculées d'une part en concentration totale d'acide et d'autre part en concentration d'acide indissocié en fonction de la température et du pH sont présentées par les Figures II.1.4a et II.1.4b. On observe une évolution atypique de la CMI en fonction du pH lorsque celle-ci est calculée sur la fraction indissociée, en effet les deux évolutions de la CMI en fonction de la température devraient être parallèles. Ceci indique bien que la fraction indissociée n'est pas le seul facteur responsable de l'inhibition de la croissance des micro-organismes.

Il semble donc préférable de calculer les CMI des acides organiques en concentration d'acide total est de prendre conjointement en compte dans le modèle l'effet du pH. On observe alors un effet constant du pH sur la CMI calculée sur la concentration totale d'acide (Figure II.1.4b).

Pour les nitrites, pour qui il semble également que ce soit la forme indissociée qui est responsable de l'effet inhibiteur sur les micro-organismes (Pivnik, 1980), on observe des comportements parallèles de la CMI du nitrite de sodium en fonction du pH uniquement lorsque celle-ci est calculée sur la fraction indissociée (Figures II.1.4c II.1.4d). Les CMI du nitrite de sodium seront donc calculées sur la fraction indissociée.

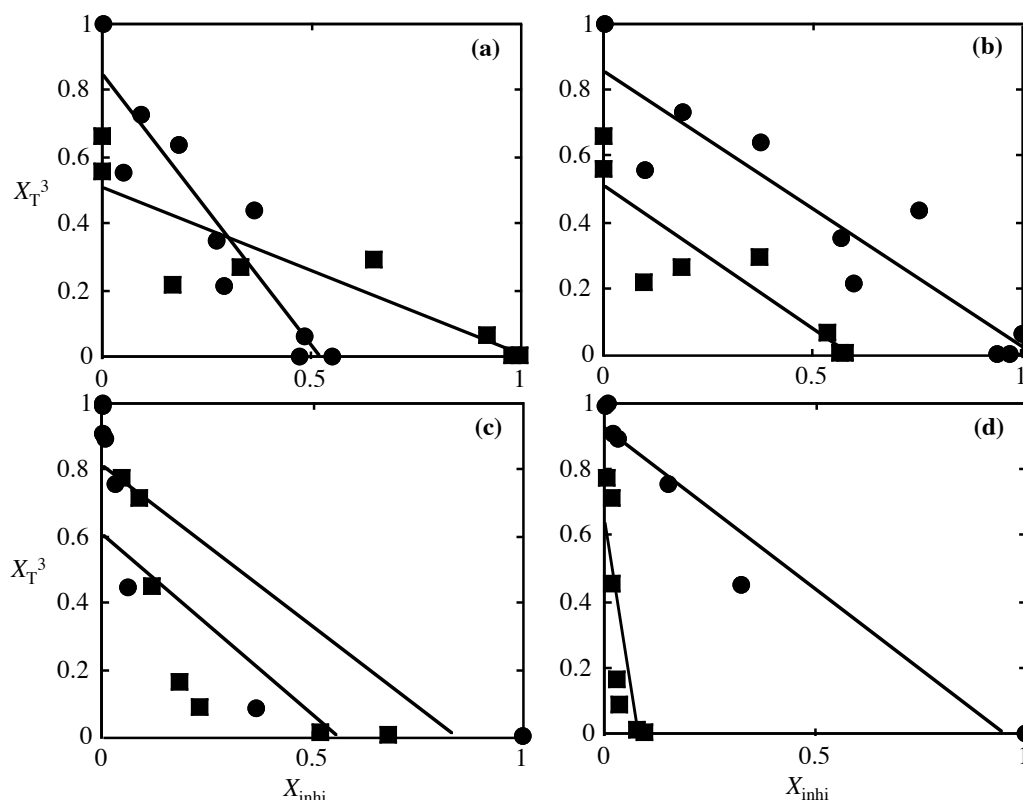


Figure II.1.4 Evolution de la frontière entre les zones de croissance et de non croissance de *L. monocytogenes* définie par la température et (a) la concentration de benzoate de sodium indissocié et (b) la concentration totale de benzoate de sodium à pH 5.6 (●) et pH 5.0 (■) et (c) la concentration de nitrite de sodium indissocié et (d) la concentration totale de nitrite de sodium à pH 7.5 (●) et pH 6.0 (■). X_T et X_{inhi} ont les mêmes significations que précédemment (*cf.* Figures II.1.1 et II.1.3). Les droites de régression sont portées sur chaque graphe. Les données sont issues de (a) et (b) El-Shenawy et Marth (1988a) et (c) et (d) Buchanan *et al.* (1989).

Les variations de aw_{min} en fonction de la nature du soluté utilisé pour ajuster l'activité de l'eau sont également bien connues. Les aw_{min} pour *L. monocytogenes* sont classées dans l'ordre suivant : propylène glycol > sucre $\geq$ NaCl > glycérol (Tapia de Daza *et al.*, 1991 ; Farber *et al.*, 1992 ; Miller, 1992; Nolan *et al.*, 1992 ; Li et Torres, 1993 ; Robinson *et al.*, 1998).

Comme pour les acides organiques on peut supposer une action spécifique du soluté sur le métabolisme microbien interagissant avec le pH mais comme avec les acides organiques nous utiliserons dans le modèle des $aw_{min(i)}$ caractéristiques des solutés employés.

II.1.B. MODELE SECONDAIRE AVEC INTERACTIONS

Nous proposons donc un modèle progressif du même type que celui utilisé dans la partie précédente (équation [I.3.1]) mais dans lequel les interactions entre facteurs environnementaux sont prises en compte en utilisant des valeurs cardinales minimales et des CMI dépendantes du niveau des autres facteurs. Ce modèle est formalisé comme suit :

$$\begin{cases} \sqrt{\mu_{\max}} = \sqrt{\mu_{\text{opt}} \cdot \Omega(T, pH, aw, c_{1:n}, k_{1:p})} + \varepsilon \\ \ln(\mu_{\max} \cdot lag) = \ln K + \varepsilon' \end{cases} \quad [\text{ I I . 1 . 5 }]$$

$$\Omega(T, pH, aw, c_{1:n}, k_{1:p}) = \tau(T) \cdot \rho(pH) \cdot \alpha(aw) \cdot \prod_{i=1}^n \gamma(c_i) \cdot \prod_{j=1}^p k_{jl}$$

$$X_{\min} = X_{\text{opt}} - (X_{\text{opt}} - X_{\min}^{\circ}) \cdot \left(\prod_{i=1}^n (1 - c_i / CMI_i^{\circ}) - \left[\frac{(Y_{\text{opt}} - Y)}{(Y_{\text{opt}} - Y_{\min}^{\circ})} \right]^3 - \left[\frac{(Z_{\text{opt}} - Z)}{(Z_{\text{opt}} - Z_{\min}^{\circ})} \right]^3 \right)^{\frac{1}{3}}$$

X , Y et Z représentent la température, le pH ou l'activité de l'eau.

$$CMI_i = CMI_i^{\circ} \cdot \left(1 - \frac{\left[\frac{(T_{\text{opt}} - T)}{(T_{\text{opt}} - T_{\min}^{\circ})} \right]^3 + \left[\frac{(pH_{\text{opt}} - pH)}{(pH_{\text{opt}} - pH_{\min}^{\circ})} \right]^3 + \left[\frac{(aw_{\text{opt}} - aw)}{(aw_{\text{opt}} - aw_{\min}^{\circ})} \right]^3}{\prod_{j \neq i} (1 - c_j / CMI_j^{\circ})} \right)$$

L'influence des facteurs environnementaux sur les valeurs cardinales optimales et maximales n'est pas envisagée dans ce modèle car aucun jeu de données inclus dans la banque de données de *L. monocytogenes* ne permettait d'étudier ces interactions.

II.1.C. ESTIMATION DES PARAMETRES DU MODELE

II.1.C.a. ESTIMATION DES VALEURS CARDINALES MINIMALES ABSOLUES ET DES CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES ABSOLUES

Les valeurs cardinales minimales et les CMI absolues sont présentées dans le Tableau II.1.3.

Les médianes des valeurs obtenues dans chaque étude ont été calculées. Lorsque plusieurs valeurs étaient disponibles pour une même étude, la moyenne de celles-ci a été utilisée dans le calcul de la médiane.

La médiane de $T_{\min}^{\circ}$ est -3.0°C .

Les médianes de $pH_{\min}^{\circ}$ pour les acides chlorhydrique (ou sulfurique), acétique, lactique, citrique, propionique et malique sont respectivement 4.38, 4.79, 4.54, 4.37, 5.0 et 4.4.

Les médianes de $aw_{\min}^{\circ}$ pour le NaCl, le glycérol, le sucre et le propylène glycol sont respectivement 0.913, 0.888, 0.918 et 0.93. Lors d'une déshydratation, $aw_{\min}^{\circ}$ est égale à 0.949.

Les CMI° pour les acides acétique, lactique et citrique sont respectivement 404, 362 et 996 mM d'acide total. Les CMI° du benzoate de sodium et du sorbate de potassium sont 21.0 et 49.6 mM de sel total.

La CMI° médiane du nitrite de sodium est $54.2\ \mu\text{M}$ de fraction indissociée.

La monolaurine a une CMI° médiane de $12.1\ \mu\text{g.ml}^{-1}$ en bouillon de culture et son effet est non significatif dans les aliments solides.

Les CMI° médianes du BHA, BHT et TBHQ sont respectivement 261, 1400 et $50.0\ \mu\text{g.ml}^{-1}$.

La CMI° médiane du CO_2 est une proportion de 5.08.

Les CMI° médianes de la caféine et du phénol sont respectivement $10.9\ \text{g.l}^{-1}$ et 31.7 ppm.

Le cacao a un effet inhibiteur sur *L. monocytogenes* seulement en bouillon tryptose phosphate modifié lorsqu'il y a agitation, sa CMI° est alors de $32.6\ \text{g.l}^{-1}$.

Les valeurs cardinales optimales et maximales ainsi que les coefficients liés au facteur qualitatifs estimés dans la partie précédente (cf. § I.3.B) restent valables pour ce modèle.

Comme avec le modèle secondaire sans interactions (cf. § I.3.B.a), on observe une plus forte dispersion de $T_{\min}^{\circ}$ par rapport à $pH_{\min}^{\circ}$ et $aw_{\min}^{\circ}$ avec des coefficients de variation et des indices D respectivement égaux à 1.03 et 1.48, 0.06 et 0.09, 0.04. et 0.02.

Tableau II.1.3 Valeurs cardinales minimales absolues et concentrations minimales inhibitrices absolues pour *L. monocytogenes*.

Substrat	T (°C) ^a	pH ^a	Acide	a _w ^a	Soluté	Substances inhibitrices ^b	T _{min} ^c	pH _{min} ^c	aw _{min} ^c	CMF ^c	Références
MH	23 [-2;42]	7.1	—	0.997	—	—	-2.7	—	—	—	Bajard <i>et al.</i> (1996)
TSBYE	10 [4;35.4]	7.1	—	0.997	—	—	-2.7	—	—	—	données personnelles
BHI	9 [4;35]	7.1	—	0.997	—	—	-1.7	—	—	—	Duh et Schaffner (1993)
TSB	7 [4;35]	7.0	—	0.997	—	—	-0.5	—	—	—	Petran et Zottola (1989)
TSBYE	7 [5;30]	7.1	—	0.997	—	—	-1.5	—	—	—	McKellar <i>et al.</i> (1997)
TPB	4 [5;28]	4.5	HCl	0.997	—	—	-18.1	—	—	—	Buchanan et Klawitter (1990)
TSBYE	4 [4.4;10.2]	7.1	—	0.997	—	—	-3.3	—	—	—	données personnelles
Bouillon de poule	6 [0.8;8.7]	6.6	lactique	0.997	—	—	-7.9	—	—	—	Walker <i>et al.</i> (1990)
Lait chocolaté	5 [4;35]	6.6	lactique	0.986	NaCl	—	-1.0	—	—	—	Rosenow et Marth (1987a)
Lait	5 [4;35]	6.6	lactique	0.997	—	—	-1.2	—	—	—	Rosenow et Marth (1987a)
Crème	5 [4;35]	6.4	lactique	0.974	NaCl	—	-1.4	—	—	—	Rosenow et Marth (1987a)
Bouillon de poule	5 [0;9.3]	6.4	lactique	0.997	—	—	-1.6	—	—	—	Walker <i>et al.</i> (1990)
Lait	5 [0;9.3]	6.6	lactique	0.997	—	—	-4.5	—	—	—	Walker <i>et al.</i> (1990)
Coule d'œuf	4 [4;30]	6.56	lactique	0.99	NaCl	—	-6.7	—	—	—	Foegeding et Leasor (1990)
Produits laitiers	3 [4;22]	6.6	lactique	0.997	—	—	-6.2	—	—	—	Donnelly et Briggs (1986)
Bœuf haché	3 [4;12]	5.9	lactique	0.985	NaCl	—	-5.4	—	—	—	Kaya et Schmidt (1989)
Saumon fumé	3 [0;12]	6.1	lactique	0.976	NaCl	—	-5.7	—	—	—	Dorsa <i>et al.</i> (1993)
Lait	3 [3;9]	6.85	lactique	0.997	—	—	-11.2	—	—	—	Murphy <i>et al.</i> (1996)
Lait	3 [3;9]	6.75	lactique	0.997	—	—	-2.9	—	—	—	Murphy <i>et al.</i> (1996)
Crème	3 [3;9]	6.4	lactique	0.997	—	—	-1.0	—	—	—	Murphy <i>et al.</i> (1996)
TSB	30	15 [4.0;10.0]	HCl	0.997	—	—	—	4.56	—	—	Petran et Zottola (1989)
TSB	37	7 [4.70;7.30]	HCl	0.997	—	—	—	4.36	—	—	Robinson <i>et al.</i> (1998)
BHI	37	4 [4.7;6.0]	HCl	0.997	—	—	—	4.68	—	—	Young et Foegeding (1993)
Petit lait	6	3 [5.6;6.8]	HCl	0.997	—	—	—	4.38	—	—	Ryser et Marth (1988)
TSYGB	20	3 [4.4;7.0]	HCl	0.997	—	—	—	3.98	—	—	Brocklehurst <i>et al.</i> (1995b)
MTPB	20	3 [5.4;5.8]	HCl	0.997	—	—	—	4.69	—	—	Vasseur <i>et al.</i> (1999)
BHI	30	—	HCl	0.997	—	—	—	4.45	—	—	Farber <i>et al.</i> (1989)
BHI	4	—	HCl	0.997	—	—	—	4.27	—	—	Farber <i>et al.</i> (1989)
TSB	35	—	HCl	0.997	—	—	—	4.4	—	—	Sorrells <i>et al.</i> (1989)
TSBYE	30	—	HCl	0.997	—	—	—	4.0	—	—	Conner <i>et al.</i> (1990)
NA	25	—	H ₂ SO ₄	0.994	—	—	—	4.0	—	—	McClure <i>et al.</i> (1989)
NA	25	—	H ₂ SO ₄	0.959	—	—	—	4.4	—	—	McClure <i>et al.</i> (1989)

Tableau II.1.3 suite

MTPB	20	3 [5.4;5.8]	acétique	0.997	—	—	—	5.19	—	—	Vasseur <i>et al.</i> (1999)
BHI	4	—	acétique	0.997	—	—	—	5.13	—	—	Farber <i>et al.</i> (1989)
BHI	30	—	acétique	0.997	—	—	—	5.05	—	—	Farber <i>et al.</i> (1989)
TSB	10	—	acétique	0.997	—	—	—	4.5	—	—	Sorrells <i>et al.</i> (1989)
TSB	25	—	acétique	0.997	—	—	—	4.8	—	—	Sorrells <i>et al.</i> (1989)
TSB	35	—	acétique	0.997	—	—	—	4.9	—	—	Sorrells <i>et al.</i> (1989)
TSBYE	30	—	acétique	0.997	—	—	—	4.5	—	—	Conner <i>et al.</i> (1990)
BHI	37	4 [4.7;6.0]	HCl	0.997	—	acide acétique 5 [50;250 mM]	—	4.67	—	404	Young et Foegeding (1993)
MTPB	20	3 [5.4;5.8]	lactique	0.997	—	—	—	5.19	—	—	Vasseur <i>et al.</i> (1999)
BHI	4	—	lactique	0.997	—	—	—	4.34	—	—	Farber <i>et al.</i> (1989)
BHI	30	—	lactique	0.997	—	—	—	4.85	—	—	Farber <i>et al.</i> (1989)
TSB	10	—	lactique	0.997	—	—	—	4.3	—	—	Sorrells <i>et al.</i> (1989)
TSB	25	—	lactique	0.997	—	—	—	4.4	—	—	Sorrells <i>et al.</i> (1989)
TSB	35	—	lactique	0.997	—	—	—	4.6	—	—	Sorrells <i>et al.</i> (1989)
TSBYE	30	—	lactique	0.997	—	—	—	4.5	—	—	Conner <i>et al.</i> (1990)
BHI	37	4 [4.7;6.0]	HCl	0.997	—	acide lactique 5 [50;250 mM]	—	4.70	—	356	Young et Foegeding (1993)
Bœuf	20	6.22	lactique	0.986	—	lactate de Na 4 [0;357 mM]	—	—	—	369	Chen et Shelef (1992)
BHI	4	—	citrique	0.997	—	—	—	4.60	—	—	Farber <i>et al.</i> (1989)
BHI	30	—	citrique	0.997	—	—	—	4.70	—	—	Farber <i>et al.</i> (1989)
TSB	10	—	citrique	0.997	—	—	—	4.1	—	—	Sorrells <i>et al.</i> (1989)
TSB	35	—	citrique	0.997	—	—	—	4.4	—	—	Sorrells <i>et al.</i> (1989)
TSBYE	30	—	citrique	0.997	—	—	—	4.0	—	—	Conner <i>et al.</i> (1990)
BHI	37	4 [4.7;6.0]	HCl	0.997	—	acide citrique 4 [25;100 mM]	—	4.55	—	996	Young et Foegeding (1993)
TSB	35	—	malique	0.997	—	—	—	4.4	—	—	Sorrells <i>et al.</i> (1989)
TSBYE	30	—	propionique	0.997	—	—	—	5.0	—	—	Conner <i>et al.</i> (1990)
TSYGB	5 [4;30]	10 [1.20;5.03]	HCl	0.997	—	—	-1.7	4.18	—	—	George <i>et al.</i> (1988)
TB	4 [7;35]	4 [4.5;7.1]	acétique	0.997	—	—	-7.1	4.79	—	—	Ahamad et Marth (1989)
Maigre de bœuf	34 [0;35]	25 [5.46;6.98]	lactique	0.994	—	—	-1.6	5.54	—	—	Grau et Vanderlinde (1993)
TB	4 [7;35]	4 [4.45;7.10]	citrique	0.997	—	—	-7.7	4.37	—	—	Ahamad et Marth (1989)

Tableau II.1.3 suite

BHI	28	7.4	—	7 [0.87;0.99]	NaCl	—	—	—	0.90	—	Miller (1992)
TSB	37	7.3	—	7 [0.938;0.997]	NaCl	—	—	—	0.912	—	Robinson <i>et al.</i> (1998)
TSBYE	21	7.1	—	6 [0.910;0.929]	NaCl	—	—	—	0.917	—	Nolan <i>et al.</i> (1992)
MTPB	20	7.0	—	3 [0.946;0.973]	NaCl	—	—	—	0.860	—	Vasseur <i>et al.</i> (1999)
TSB	4	7.0	—	—	NaCl	—	—	—	0.91	—	Tapia de Daza <i>et al.</i> (1991)
TSB	30	7.0	—	—	NaCl	—	—	—	0.90	—	Tapia de Daza <i>et al.</i> (1991)
BHI	4	7.1	—	—	NaCl	—	—	—	0.915	—	Farber <i>et al.</i> (1992)
BHI	10	7.1	—	—	NaCl	—	—	—	0.916	—	Farber <i>et al.</i> (1992)
BHI	15	7.1	—	—	NaCl	—	—	—	0.910	—	Farber <i>et al.</i> (1992)
BHI	30	7.1	—	—	NaCl	—	—	—	0.915	—	Farber <i>et al.</i> (1992)
TSBYE	21	7.1	—	6 [0.893;0.920]	glycérol	—	—	—	0.903	—	Nolan <i>et al.</i> (1992)
BHI	28	7.4	—	5 [0.87;0.99]	glycérol	—	—	—	0.88	—	Miller (1992)
TSB	37	7.3	—	5 [0.924;0.997]	glycérol	—	—	—	0.888	—	Robinson <i>et al.</i> (1998)
TSB	4	7.0	—	—	glycérol	—	—	—	0.88	—	Tapia de Daza <i>et al.</i> (1991)
TSB	30	7.0	—	—	glycérol	—	—	—	0.89	—	Tapia de Daza <i>et al.</i> (1991)
BHI	4	7.1	—	—	glycérol	—	—	—	0.929	—	Farber <i>et al.</i> (1992)
BHI	10	7.1	—	—	glycérol	—	—	—	0.916	—	Farber <i>et al.</i> (1992)
BHI	15	7.1	—	—	glycérol	—	—	—	0.899	—	Farber <i>et al.</i> (1992)
BHI	30	7.1	—	—	glycérol	—	—	—	0.895	—	Farber <i>et al.</i> (1992)
TSB	30	7.0	—	12 [0.82;0.99]	sucré	—	—	—	0.90	—	Petran et Zottola (1989)
TSBYE	21	7.1	—	4 [0.915;0.928]	sucré	—	—	—	0.918	—	Nolan <i>et al.</i> (1992)
TSB	4	7.0	—	—	sucré	—	—	—	0.91	—	Tapia de Daza <i>et al.</i> (1991)
TSB	30	7.0	—	—	sucré	—	—	—	0.925	—	Tapia de Daza <i>et al.</i> (1991)
BHI	4	7.1	—	—	sucré	—	—	—	0.915	—	Farber <i>et al.</i> (1992)
BHI	10	7.1	—	—	sucré	—	—	—	0.927	—	Farber <i>et al.</i> (1992)
BHI	15	7.1	—	—	sucré	—	—	—	0.910	—	Farber <i>et al.</i> (1992)
BHI	30	7.1	—	—	sucré	—	—	—	0.935	—	Farber <i>et al.</i> (1992)
BHI	28	7.4	—	5 [0.87;0.99]	p. glycol ^c	—	—	—	0.93	—	Miller (1992)
Bœuf	20	6.3	lactique	7 [0.932;0.994]	séchage	—	—	—	0.949	—	Chen et Shelef (1992)
TSB	6 [5;37]	7.3	—	3 [0.977;0.997]	NaCl	—	2.1	—	0.913	—	Robinson <i>et al.</i> (1998)
Viandes	5	39 [5.87;6.89]	lactique	4 [0.960;0.993]	NaCl	—	—	4.13	0.798	—	Duffy <i>et al.</i> (1994b)
TPB	3 [5;30]	5 [4.53;7.00]	citrique	6 [0.915;0.997]	NaCl	—	-1.5	4.49	0.917	—	Cole <i>et al.</i> (1990)
TSB	—	—	HCl	—	—	—	-2.6	3.84	0.916	—	Wijtzes <i>et al.</i> (1993)

Tableau II.1.3 suite

TB	4 [4;35]	5.0	HCl	0.997	—	benzoate de Na 7 [0;20.8 mM]	-3.7	—	—	19.7	El-Shenawy et Marth (1988a)
TB	4 [4;35]	5.6	HCl	0.997	—	benzoate de Na 7 [0;20.8 mM]	-4.6	—	—	22.3	El-Shenawy et Marth (1988a)
TB	4 [4;35]	5.0	HCl	0.997	—	sorbate de K 7 [0;22.4 mM]	-9.3	—	—	34.2	El-Shenawy et Marth (1988b)
TB	4 [4;35]	5.6	HCl	0.997	—	sorbate de K 7 [0;22.4 mM]	-5.3	—	—	65.1	El-Shenawy et Marth (1988b)
TSBYE	35	7.2	—	0.997	—	monolaurine 7 [0;18.6 µg.ml ⁻¹]	—	—	—	9.3	Oh et Marshall (1994)
TSBYE	3 [7;15]	3 [5.0;7.0]	HCl	0.997	—	monolaurine 6 [0;9 µg.ml ⁻¹]	-6.8	4.47	—	88.8	Oh et Marshall (1993)
TSBYE	35	4 [5.0;7.0]	HCl	0.997	—	monolaurine 4 [3;10 µg.ml ⁻¹]	—	4.73	—	10.0	Oh et Marshall (1992)
BHI	37	6.0	HCl	0.997	—	monolaurine 2 [0;5 µg.ml ⁻¹]	—	—	—	8.14	Wang et Johnson (1997)
TSA	15	7.1	—	0.997	—	monolaurine (µg.ml ⁻¹)	—	—	—	9.96	Bal'a et Marshall (1996b)
TSA	25	7.1	—	0.997	—	monolaurine (µg.ml ⁻¹)	—	—	—	16.4	Bal'a et Marshall (1996b)
TSA	35	7.1	—	0.997	—	monolaurine (µg.ml ⁻¹)	—	—	—	16.0	Bal'a et Marshall (1996b)
TSA	35	7.0	—	0.997	—	monolaurine (µg.ml ⁻¹)	—	—	—	16.0	Bal'a et Marshall (1996a)
Camembert	4	6.2	lactique	0.986	NaCl	monolaurine 2 [0;500 ppm]	—	—	—	Inf ^d	Wang et Johnson (1997)
Beef frank slurries	12	5.5	lactique	0.982	NaCl	monolaurine 2 [0;1000 ppm]	—	—	—	Inf	Wang et Johnson (1997)
TSB	6 [5;30]	7 [4.6;7.4]	HCl	9 [0.953;0.997]	NaCl	NaNO ₂ 17 [0;67.3 µM]	3.5	4.37	0.945	78.8	McClure <i>et al.</i> (1991)
TPB	4 [5;37]	6.0	HCl	0.974	NaCl	NaNO ₂ 9 [0;33.9 µM]	-0.3	—	—	18.0	Buchanan <i>et al.</i> (1989)
TPB	4 [5;37]	7.5	HCl	0.974	NaCl	NaNO ₂ 9 [0;33.9 µM]	-2.2	—	—	24.9	Buchanan <i>et al.</i> (1989)
TPB	4 [5;37]	6.0	HCl	0.997	NaCl	NaNO ₂ 9 [0;33.9 µM]	-1.3	—	—	29.5	Buchanan <i>et al.</i> (1989)
TPB	4 [5;37]	7.5	HCl	0.997	NaCl	NaNO ₂ 9 [0;33.9 µM]	-1.9	—	—	45.7	Buchanan <i>et al.</i> (1989)
TB	35	7.1	—	0.997	—	BHA ^e 4 [0;300 µg.ml ⁻¹]	—	—	—	308	Yousef <i>et al.</i> (1991)
BHI	37	6	HCl	0.997	—	BHA 2 [0;100 µg.ml ⁻¹]	—	—	—	213	Wang et Johnson (1997)
TB	35	7.1	—	0.997	—	BHT ^f 2 [0;700 µg.ml ⁻¹]	—	—	—	1400	Yousef <i>et al.</i> (1991)
TB	35	7.1	—	0.997	—	TBHQ ^g 5 [0;50 µg.ml ⁻¹]	—	—	—	59.7	Yousef <i>et al.</i> (1991)
BHI	37	6.0	HCl	0.997	—	TBHQ 2 [0;30 µg.ml ⁻¹]	—	—	—	40.4	Wang et Johnson (1997)
BHI	3 [4;10]	2 [5.5;6.5]	HCl	0.997	—	CO ₂ ^h 6 [0;0.9]	-5.4	4.5	—	3.40	Farber <i>et al.</i> (1996)
TSYGB	12	6.65	HCl	0.953	—	CO ₂ 4 [0.25;0.8]	—	—	—	2.34	Fernández <i>et al.</i> (1997)
Pépites de poulet	3 [3;11]	5.85	lactique	0.985	NaCl	CO ₂ 3 [0;0.8]	-6.9	—	—	13.4	Marshall <i>et al.</i> (1991)
Pork loins	4	5.8	lactique	0.993	—	CO ₂ 3 [0;0.4]	—	—	—	5.08	Manu-Tawiah <i>et al.</i> (1993)
BHI	7 [4;35]	7.1	—	0.997	—	CO ₂ 2 [0;0.099]	-1.2	—	—	6.11	Katoh (1989)
MTPB	30	7.1	—	0.997	—	caféine 3 [0;10 g.l ⁻¹]	—	—	—	10.9	Pearson et Marth (1990c)
Lait	30	6.6	lactique	0.997	—	caféine 3 [0;10 g.l ⁻¹]	—	—	—	11.0	Pearson et Marth (1990c)
LEB	3 [4;12]	6.2	HCl	0.989	NaCl	phénol 3 [8.75;23.75 ppm]	—	—	—	35.3	Membré <i>et al.</i> (1997)
LEB	3 [4;12]	6.2	HCl	0.977	NaCl	phénol 3 [1.25;16.25 ppm]	—	—	—	28.1	Membré <i>et al.</i> (1997)
MTPB avec agitation	30	7	—	0.997	—	cacao 8 [0;100 g.l ⁻¹]	—	—	—	32.6	Pearson et Marth (1990b)

^aValeur ou Nb de niveaux et gamme.

^bNom, Nb de niveaux et gamme.

^cPropylène glycol.

^dInfini.

^eBHA, butylhydroxyanisole.

^fBHT, butylhydroxytoluène.

^gTBHQ, butylhydroquinone tertiaire.

^hproportion de CO₂.

Ces dispersions sont de plus similaires à celles observées pour les paramètres du modèle sans interactions avec peut-être une légère diminution pour $T_{\min}^{\circ}$ (coefficient de variation et indice D égaux à 1.03 et 1.48 contre 1.66 et 1.17 pour $T_{\min}$ du modèle sans interactions).

Nous observons également une légère diminution de la dispersion des estimations des CMI° de la monolaurine et du CO_2 avec des coefficients de variation et des indices D respectivement égaux à 1.30 et 0.56 (contre 1.12 et 0.81), 0.72 et 0.94 (contre 0.94 et 2.95).

II.1.C.b. ESTIMATION DU TAUX DE CROISSANCE OPTIMUM DE *L. monocytogenes*

μ_{opt} a été estimé en ajustant le modèle secondaire avec interactions (équation [II.1.5]) aux valeurs non nulles de μ_{max} en utilisant les paramètres précédemment estimés :

$$T_{\min}^{\circ} = -3.0^{\circ}\text{C}, T_{\text{opt}} = 37^{\circ}\text{C}, T_{\max} = 45.5^{\circ}\text{C},$$

$$pH_{\min(\text{HCl})}^{\circ} = 4.38, pH_{\min(\text{acétique})}^{\circ} = 4.79, pH_{\min(\text{lactique})}^{\circ} = 4.54,$$

$$pH_{\min(\text{citrique})}^{\circ} = 4.37, pH_{\min(\text{propionique})}^{\circ} = 5.0, pH_{\min(\text{malique})}^{\circ} = 4.4,$$

$$pH_{\text{opt}} = 7.10, pH_{\max} = 9.61,$$

$$aw_{\min(\text{NaCl})}^{\circ} = 0.913, aw_{\min(\text{glycérol})}^{\circ} = 0.888, aw_{\min(\text{sucre})}^{\circ} = 0.918,$$

$$aw_{\min(\text{propylène glycol})}^{\circ} = 0.93, aw_{\min(\text{séchage})}^{\circ} = 0.949, aw_{\text{opt}} = 0.997, aw_{\max} = 1,$$

$$CMI^{\circ}_{\text{acide acétique}} = 404 \text{ mM}, CMI^{\circ}_{\text{acide lactique}} = 362 \text{ mM}, CMI^{\circ}_{\text{acide citrique}} = 996 \text{ mM},$$

$$CMI^{\circ}_{\text{benzoate de sodium}} = 21.0 \text{ mM}, CMI^{\circ}_{\text{sorbate de potassium}} = 49.6 \text{ mM},$$

$$CMI^{\circ}_{\text{nitrite de sodium indisso}} = 54.2 \text{ }\mu\text{M},$$

$$CMI^{\circ}_{\text{monolaurine}} = 12.1 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1} \text{ en bouillon de culture},$$

$$CMI^{\circ}_{\text{BHA}} = 261 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}, CMI^{\circ}_{\text{BHT}} = 1400 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}, CMI^{\circ}_{\text{TBHQ}} = 50.0 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1},$$

$$CMI^{\circ}_{\text{CO}_2} = 5.08, CMI^{\circ}_{\text{caféine}} = 10.9 \text{ g.l}^{-1}, CMI^{\circ}_{\text{phénol}} = 31.7 \text{ ppm},$$

$$CMI^{\circ}_{\text{cacao}} = 32.6 \text{ g.l}^{-1} \text{ en bouillon de culture avec agitation},$$

$$k_{\text{agitation}} = 1.14 \text{ sauf en bouillon de culture contenant du cacao},$$

$$k_{\text{Pseudomonas}} = 1.28, k_{\text{Lactobacillus}} = 0.81, k_{\text{Penicillium}} = 1.74,$$

$$k_{\text{lait déshydraté}} = 0.63, k_{\text{crème}} = 0.91, k_{\text{perméat}} = 0.59, k_{\text{rétentat}} = 0.81, k_{\text{lait}} = 0.69,$$

$$k_{\text{viande}} = 1.30, k_{\text{œuf}} = 0.30, k_{\text{mer}} = 1.00.$$

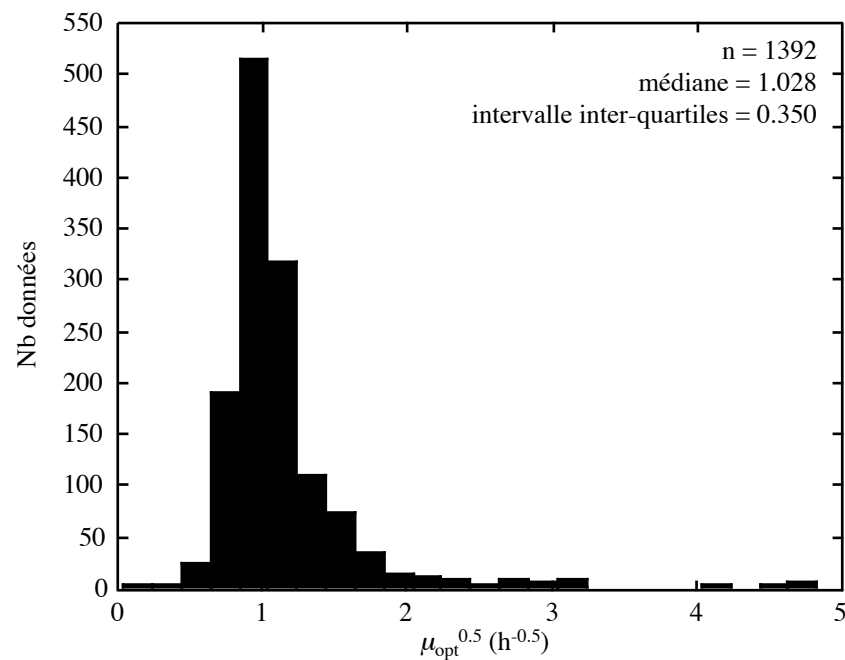


Figure II.1.5 Distribution des racines carrées des estimations du taux de croissance optimum μ_{opt} obtenues pour *L. monocytogenes* par ajustement du modèle secondaire avec interactions à l'ensemble de la banque de données. Les caractéristiques de la distributions sont portées sur le graphe. Pour une meilleure lisibilité, les 58 valeurs comprises entre 5.08 et 5649 ne sont pas incluses dans l'histogramme.

La valeur médiane obtenue pour μ_{opt} est 1.056 h^{-1} (Figure II.1.5).

La distribution des estimations est unimodale et dissymétrique. On observe plus de valeurs sur la droite de la valeur modale (coefficient d'asymétrie positif) ainsi que plusieurs valeurs aberrantes anormalement élevées.

La distribution est également plus dispersée que dans le cas du modèle secondaire sans interactions puisque nous passons d'un intervalle inter-quartiles sur $\mu_{\text{opt}}^{0.5}$ de 0.281 (cf. Figure I.3.3) à 0.350 avec ce modèle. De même le coefficient de variation de μ_{opt} passe de 26.98 à 37.20 et son indice D passe de 0.57 à 0.70.

II.1.D. PERFORMANCE DU MODELE SECONDAIRE AVEC INTERACTIONS

II.1.D.a. MODELISATION DU TAUX DE CROISSANCE MAXIMUM DE *L. monocytogenes*

Les taux de croissance maximum calculés avec le modèle secondaire avec interactions à 47 paramètres sont présentés par la Figure II.1.6. La variabilité expliquée de $\mu_{\max}^{0.5}$ passe de 78.0% pour le modèle sans interactions à 84.2% en prenant en compte les interactions dans le modèle. Mise à part quelques exceptions sur lesquelles nous allons revenir, la répartition des points de part et d'autre de la droite d'adéquation parfaite du modèle semble uniforme indiquant une absence de corrélation des résidus aux valeurs ajustées.

Les quelques points aberrants observés dans la zone "dangereuse" (Figure II.1.6) correspondent à des conditions pour lesquelles les interactions entre facteurs écologiques ont été surestimées. Cette surestimation des interactions explique également les valeurs anormalement élevées observées pour μ_{opt} dans le paragraphe précédent.

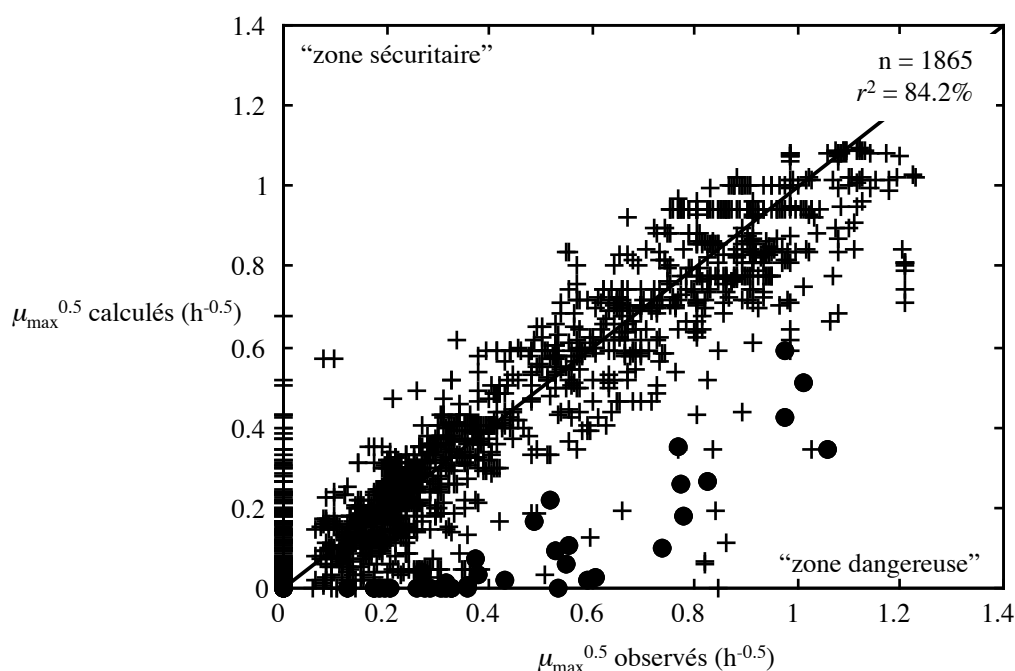


Figure II.1.6 Relation entre les taux de croissance maximum de *L. monocytogenes* observés et ceux calculés avec le modèle secondaire avec interactions. La droite correspond à une adéquation parfaite entre les valeurs calculées et les valeurs observées, la zone supérieure qualifiée de sécuritaire correspond à des valeurs calculées supérieures aux valeurs observées et la zone inférieure qualifiée de dangereuse correspond à des valeurs calculées inférieures aux valeurs observées. Les points (●) correspondent aux données de Oh et Marshall (1993) obtenues avec de la monolaurine.

Ce phénomène est fort bien illustré par les données issues de Oh et Marshall (1993) concernant l'effet inhibiteur de la monolaurine. La sous-estimation des valeurs de $\mu_{\max}$ (Figure II.1.6) dans cette étude pour laquelle on observe une CMI° de $88.8 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (Tableau II.1.3) pour la monolaurine s'explique par le fait que l'on a utilisé pour le calcul de $\mu_{\max}$ la CMI° médiane égale à $12.1 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ce qui conduit à une surestimation de l'effet inhibiteur de cette substance.

La distribution des erreurs sur le logarithme du temps de génération est présentée par la Figure II.1.7. Les erreurs moyenne et médiane sur T_g sont respectivement de 250% et 38%.

Toujours en utilisant une erreur de mesure de T_g de 10% et une erreur liée à la correction par rapport au modèle primaire utilisé de 10% (cf. § I.3.C.a), on obtient une erreur médiane d'ajustement du modèle de 18% (230% pour la moyenne).

La moins bonne précision de ce modèle par rapport à celle obtenue avec le modèle sans interactions (12%, cf. § I.3.C.a) est due aux valeurs aberrantes précédemment signalées.

L'influence de ces valeurs aberrantes se retrouve sur le biais moyen qui est de 30%, alors que le biais médian est égal à 0%.

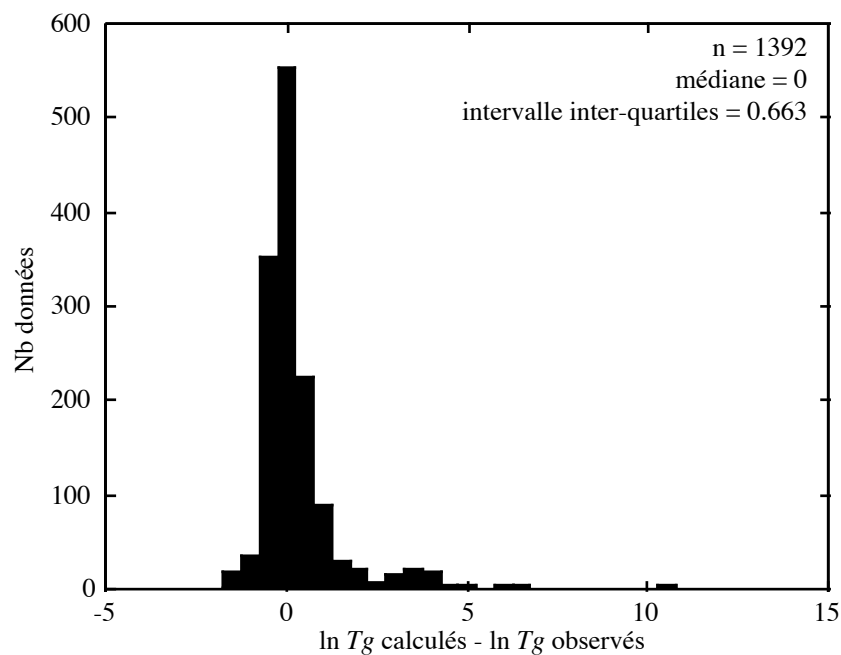


Figure II.1.7 Distribution des erreurs d'ajustement du modèle secondaire avec interactions sur le logarithme du temps de génération de *L. monocytogenes*. Les caractéristiques de la distribution sont portées sur le graphe.

Tableau II.1.4 Proportions de croissances et de non croissances prédites à tort pour *L. monocytogenes*.

Modèle secondaire		Croissances prédites à tort	Non croissances prédites à tort	Total
Sans interactions		213 (13.5) ^a	46 (16.1)	259 (13.9)
Avec interactions	$n^b = 1$	103 (8.1)	249 (41.6)	352 (18.9)
	$n = 2$	186 (11.9)	28 (9.4)	214 (11.5)
	$n = 3$	192 (12.1)	20 (7.1)	212 (11.4)
	$n = 4$	205 (13.0)	44 (15.1)	249 (13.4)
	$n = 5$	201 (12.8)	39 (13.4)	240 (12.9)

^aentre parenthèses : pourcentages sur le nombre de croissances ou non croissances prédites par le modèle.

^b n , paramètre de forme de l'équation [II.1.1].

Si l'on s'intéresse aux données de non croissance exclues de l'analyse précédente, on observe une croissance prédite à tort par le modèle avec interactions dans 192 cas au lieu de 213 avec le modèle sans interactions et les non croissances prédites à tort ne sont cette fois-ci observées que 20 fois au lieu de 46 précédemment (Tableau II.1.4). La prise en compte des interactions permet donc de diminuer les croissances et non croissances prédites à tort. Ce modèle est donc mieux adapté à la prévision de la croissance de *L. monocytogenes* près des limites de croissance du micro-organisme.

II.1.D.b. MODELISATION DU TEMPS DE LATENCE DE *L. monocytogenes*

Dans le modèle secondaire avec interactions, le produit $\mu_{\max}lag$ est toujours supposé constant. Les temps de latence ont donc été calculés en utilisant $K = 2.14$ (cf. § I.3.B.e). Les surestimations de l'effet inhibiteur de l'environnement sur la croissance de *L. monocytogenes* observées sur le taux de croissance se retrouvent ici sur le temps de latence (Figure II.1.8). La variabilité de $\ln lag$ expliquée par le modèle avec interactions chute à 28.3% du fait de ces valeurs aberrantes.

La distribution des erreurs sur $\ln lag$ est présentée par la Figure II.1.9. Les erreurs moyenne et médiane sur lag sont respectivement de 267% et 70%.

En utilisant, comme précédemment, des erreurs de mesure et de correction respectivement de 20% et 15% (cf. § I.3.C.b), l'erreur médiane d'ajustement du modèle avec interactions pour le temps de latence est de 35% (232% pour la moyenne).

Comme le modèle sans interactions, le modèle avec interactions surestime le temps de latence car les biais moyen et médian sont respectivement de 30% et 10%. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que l'évaluation du biais est réalisée sur 1247 estimations de lag alors que la constante K n'a été estimée que sur 1176 produits $\mu_{\max}lag$.

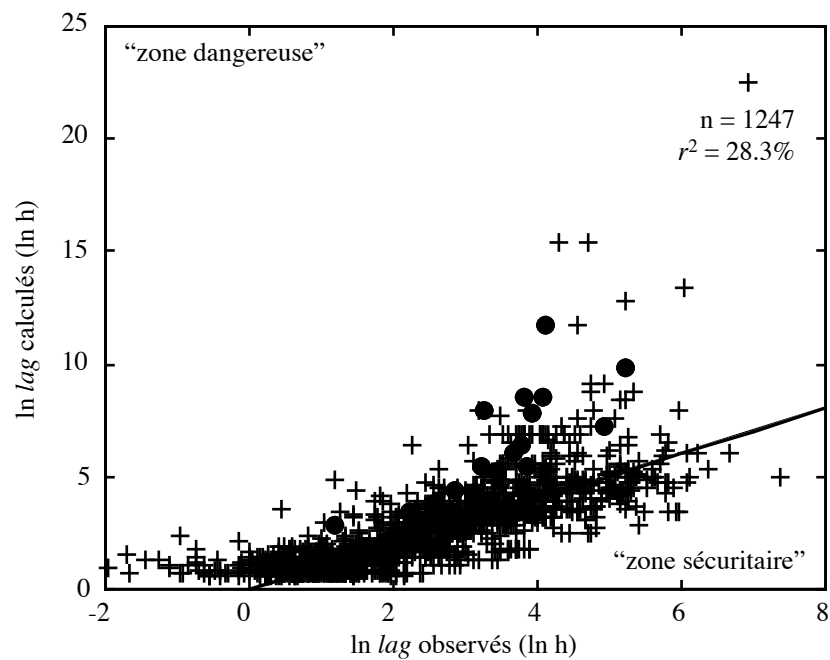


Figure II.1.8 Relation entre les temps de latence de *L. monocytogenes* observés et ceux calculés avec le modèle secondaire avec interactions. La droite correspond à une adéquation parfaite entre les valeurs calculées et les valeurs observées, la zone supérieure qualifiée de dangereuse correspond à des valeurs calculées supérieures aux valeurs observées et la zone inférieure qualifiée de sécuritaire correspond à des valeurs calculées inférieures aux valeurs observées. Les points (●) correspondent aux données de Oh et Marshall (1993) obtenues avec de la monolaurine.

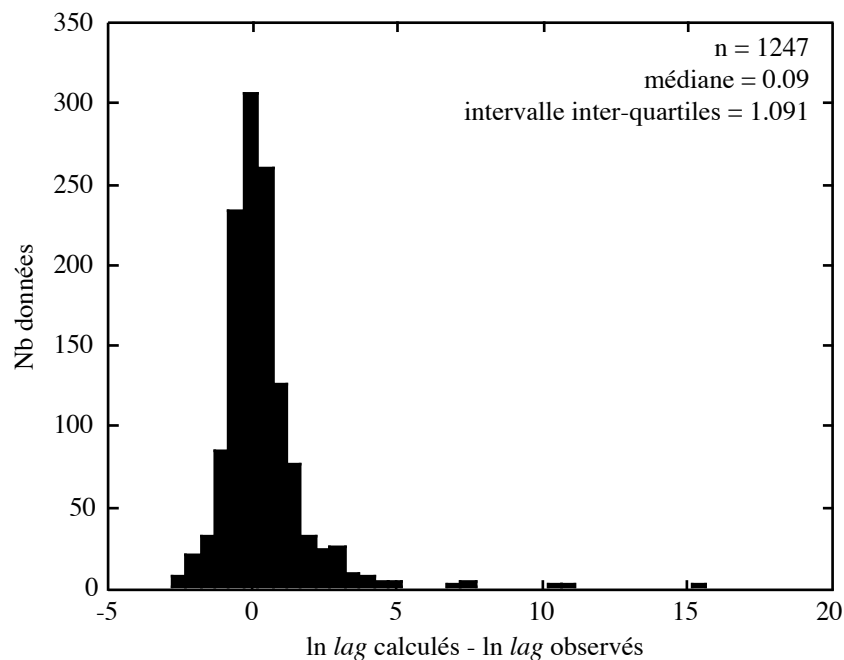


Figure II.1.9 Distribution des erreurs d'ajustement du modèle secondaire avec interactions sur le logarithme du temps de latence de *L. monocytogenes*. Les caractéristiques de la distribution sont portées sur le graphe.

II.1.E. IMPORTANCE DE L'EFFET DE LA SOUCHE

De nombreuses études ont montré que le taux de croissance de *L. monocytogenes* variait de façon significative avec la souche utilisée (Barbosa *et al.*, 1994 ; Bégot *et al.*, 1997). Cet effet de la souche pourrait en partie expliquer les fortes dispersions observées sur des paramètres comme $T_{\min}^{\circ}$ ou μ_{opt} .

Il est donc nécessaire de s'intéresser à cet effet afin de proposer éventuellement des paramètres de croissance représentatifs des souches utilisées.

Juntilla *et al.* (1988) ont observé que pour 78 souches de *L. monocytogenes*, l'écart-type de la température minimale de croissance était égal à 27% de la valeur moyenne. Sur nos résultats, l'écart-type de 6 estimations de la température minimale de croissance absolue obtenues pour la souche Scott A est égal à 93% de la valeur moyenne.

George *et al.* (1988) et Farber *et al.* (1989) ont obtenu à 30°C pour 4 souches des écart-types de $pH_{\min}$ avec de l'HCl égaux à 5 et 3 % des valeurs moyennes. Pour la souche Scott A, nous obtenons un écart-type pour 5 valeurs de $pH_{\min(\text{HCl})}^{\circ}$ égal à 6% de la valeur moyenne.

La variabilité intra-souche sur nos résultats étant plus élevée que les variabilités inter-souche publiées, l'effet de la souche sur ces paramètres peut donc être négligé. Nous généraliserons cette absence d'effet de la souche à la totalité des valeurs cardinales, des concentrations minimales inhibitrices et des effets des facteurs qualitatifs.

Nous avons également étudié l'influence de la nature de la souche sur le taux de croissance optimum μ_{opt} . Les distributions de $\mu_{\text{opt}}^{0.5}$ obtenues pour différentes souches sont présentées par la Figure II.1.10.

Nous n'avons pas pu effectuer de test statistique sur ces données car nous ne connaissons pas la loi statistique de distribution de ce paramètre, les variances ne sont pas stables d'une souche à l'autre et enfin il y a de fortes variations de la taille des échantillons.

Pour construire la Figure II.1.10, nous avons utilisé des souches étudiées au moins par deux équipes différentes afin d'éliminer au maximum des biais liés à l'expérimentation et les valeurs aberrantes ont été éliminées ($\mu_{\text{opt}}^{0.5} \geq 2 \text{ h}^{-1}$).

On observe des distributions relativement proches pour les 6 souches et les médianes des racines des taux de croissance optimum se répartissent entre 0.87 et 1.34 $\text{h}^{-0.5}$.

On peut considérer que l'effet de la souche est négligeable car tous les intervalles inter-quartiles des distributions se chevauchent.

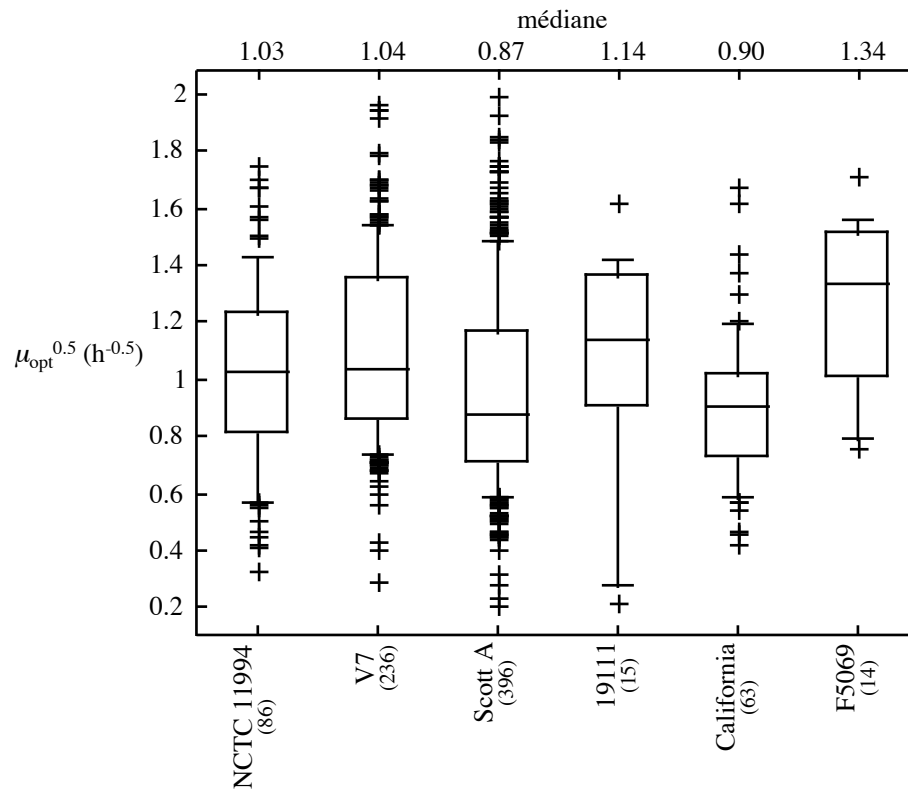


Figure II.1.10 Distributions des racines carrées des taux de croissance optimum obtenus pour différentes souches de *L. monocytogenes*. Les valeurs aberrantes ($\mu_{\text{opt}} \geq 2 \text{ h}^{-0.5}$) ont été éliminées. Les boîtes de Box représentent les 10ème, 25ème, 50ème, 75ème et 90ème percentiles des distributions. Les chiffres entre parenthèses correspondent aux nombres de données utilisées pour chaque souche.

La prise en compte des interactions entre les facteurs environnementaux dans le modèle secondaire permet d'améliorer sensiblement la modélisation du comportement de L. monocytogenes près de ses limites de croissance.

L'équation décrivant les interactions n'est cependant pas optimale car on a pu observer, par exemple, que le paramètre de forme n était très variable d'une étude à l'autre (cf. § II.1.A.a). En fixant ce paramètre à 3, nous avons vu que les interactions entre facteurs environnementaux sont quelquefois largement surestimées.

Des simulations ont été réalisées en prenant des valeurs de n comprises entre 1 et 5 (Tableau II.1.4). On peut observer que les résultats optimaux en terme de croissance / non croissance sont effectivement obtenus pour n égal à 3.

L'équation proposée pour définir la frontière entre les zones de croissance et de non croissance répond donc à un critère de simplicité mais dans l'avenir l'étude de ces interactions pourrait être complétée et généralisée à d'autres micro-organismes. On pourrait alors envisager une équation du type :

$$\left[\frac{(T_{\text{opt}} - T)}{(T_{\text{opt}} - T_{\text{min}}^{\circ})} \right]^{\alpha} + \left[\frac{(pH_{\text{opt}} - pH)}{(pH_{\text{opt}} - pH_{\text{min}}^{\circ})} \right]^{\beta} + \left[\frac{(aw_{\text{opt}} - aw)}{(aw_{\text{opt}} - aw_{\text{min}}^{\circ})} \right]^{\chi} = \prod_{i=1}^n (1 - c_i / CMI_i^{\circ})^{\delta_i}$$

$$(\alpha, \beta, \chi, \delta_i) \in \mathbb{R}^{n+3}$$

PARTIE II

CHAPITRE 2

MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE SIMPLE D'ACQUISITION DES PARAMETRES DE CROISSANCE

L'obtention d'estimations fiables des paramètres de croissance nécessite l'acquisition de nombreux points lors de la construction des cinétiques de croissance (Bratchell et al., 1989). L'objectif de ce travail était donc de mettre au point une technique permettant de connaître le temps de latence et le taux de croissance maximum d'une suspension bactérienne moins coûteuse en temps et en milieu que la technique classique de dénombrement sur boîtes.

Cette technique sera utilisée par la suite pour l'élaboration expérimentale du modèle permettant de décrire l'influence des conditions pré-incubatoires sur le temps de latence.

Dans le cadre de la microbiologie prévisionnelle, plusieurs techniques alternatives ont été proposées pour acquérir rapidement des données permettant le développement des modèles, les deux principales sont la spectrophotométrie (McClure *et al.*, 1993) et l'impédancemétrie (Borch et Wallentin, 1993 ; Deak et Beuchat, 1993). La mesure de la densité optique avec des spectrophotomètres automatiques permet de suivre en temps réel la croissance de la biomasse bactérienne dans les milieux de culture translucides et ceci pour un coût modéré. La spectrophotométrie a donc tout naturellement été utilisée récemment par plusieurs auteurs pour déterminer les paramètres de croissance de cultures bactériennes (McClure *et al.*, 1993 ; Young et Foegeing, 1993 ; Barbosa *et al.*, 1994 ; Jones *et al.*, 1995 ; Bégot *et al.*, 1997 ; Bréand *et al.*, 1997 ; Stephens *et al.*, 1997 ; Arino *et al.*, 1998 ; Cheroutre-Vialette *et al.*, 1998).

Notre choix s'est également porté sur cette technique et nous avons utilisé un spectrophotomètre automatique : le Bioscreen C (Labsystem, Labsystem France SA, Les Ulis, France). Cet appareil piloté par un logiciel d'exploitation sur micro-ordinateur PC permet de suivre en parallèle jusqu'à 200 cinétiques de croissance (2 plaques Honeycomb de 100 puits). Dans toutes les études, nous avons utilisé les réglages suivants : longueur d'ondes, 600 nm ; agitation d'intensité moyenne d'une durée de 30 secondes toutes les minutes. La température d'incubation des plaques et l'intervalle de temps entre deux lectures sont programmables selon les besoins de l'utilisateur (il faut cependant noter qu'en cas de réfrigération, la température d'incubation est au mieux inférieure de 5°C à la température ambiante, cela nécessite l'utilisation d'une chambre froide pour des températures d'incubation faibles).

L'interprétation des courbes de croissance obtenues par spectrophotométrie n'est cependant pas évidente pour deux raisons : la densité optique permet de mesurer la biomasse de la culture et non directement sa concentration en cellules viables et cette densité n'est mesurable que lorsque la concentration de la culture atteint un certain seuil qui varie de 10^5 à 10^7 cellules par ml (ufc.ml⁻¹) en fonction du micro-organisme considéré.

Plusieurs méthodes ont été proposées pour estimer les paramètres de croissance à partir de ces courbes spectrophotométriques mais les estimations obtenues sont généralement différentes de celles obtenues selon la technique de dénombrement sur boîtes (Baranyi *et al.*, 1993a ; Dalgaard *et al.*, 1994 ; Hudson et Mott, 1994). L'objectif de notre travail est donc de valider une méthode simple d'acquisition des paramètres de croissance basée sur la spectrophotométrie permettant d'obtenir des estimations similaires à celles obtenues avec la technique de dénombrement sur boîtes.

II.2.A. RELATION ENTRE LA DENSITE OPTIQUE ET LA CONCENTRATION EN CELLULES VIABLES

Les auteurs recommandent habituellement d'ajuster les modèles primaires de croissance sur les données obtenues par spectrophotométrie. Ceci nécessite de connaître au préalable la relation liant la densité optique (DO) et la concentration en cellules viables (CV).

Il est généralement admis que la biomasse et donc la densité optique est proportionnelle à la concentration bactérienne (Corman *et al.*, 1986 ; Young et Foegeding, 1993 ; Barbosa *et al.*, 1994 ; Dalgaard *et al.*, 1994 ; Bégot *et al.*, 1996 ; Bégot *et al.*, 1997 ; Bréand *et al.*, 1997 ; Arino *et al.*, 1998 ; Cheroutre-Vialette *et al.*, 1998), mais des relations de type quadratique (McClure *et al.*, 1993) et cubique (Stephens *et al.*, 1997) ont également été proposées.

Tableau II.2.1 Références, sérotypes et origines des souches de *L. monocytogenes* utilisées dans la mise au point de la technique spectrophotométrique.

Souche	Sérotipe	Origine
Scott A ^a	4b	humaine
CLIP 22485 ^b	4b	alimentaire
CLIP 22573 ^b	4b	humaine
CLIP 19884 ^c	1/2c	produits à base de viande
27795 ^c	1/2a	viande hachée
925318 ^c	1/2b	pintade
IG 1 ^d	1/2a	environnement industriel
IG 114 ^d	3a	environnement industriel
IG 74 ^d	1/2c	environnement industriel
IG 65 ^d	1/2a	produits à base de viande

Souches données par :

^a Agnès Brouillaud-Delattre (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Paris, France)

^b Jocelyne Rocourt (Institut Pasteur Paris, France)

^c Isabelle & André Lebert (Institut National de la Recherche Agronomique, Theix, France)

^d Inès Giovanacci (Centre Technique de la Salaison, de la Charcuterie et des Conserves de Viande, Maisons-Alfort, France).

Nous avons étudié cette relation pour 10 souches de *L. monocytogenes* (Tableau II.2.1) lors de croissances en bouillon tryptone soja additionné d'extrait de levure à 4.0, 6.0, 7.8, 11.6, 15.4, 24.0 et 35.4°C. Les cinétiques d'évolution de DO et CV ont été suivies en parallèle lors de la croissance de ces suspensions dont la concentration initiale était d'environ 10^6 ufc.ml⁻¹. La relation entre DO et CV est de la forme :

$$DO = p_n(x) \quad [\quad I \quad I \quad . \quad 2 \quad . \quad 1 \quad a \quad]$$

DO densité optique de la suspension

x concentration cellulaire de la suspension

p_n polynôme de degré n

Pour choisir entre une relation de calibration de type cubique, quadratique ou linéaire, nous avons comparé les modèles emboîtés de degré n et $n-1$ selon la statistique de test F qui suit une loi de Fisher (Bates et Watts, 1988).

Les tracés de DO en fonction de CV obtenus avec la souche Scott A sont présentés par la Figure II.2.1. La relation [II.2.1a] a été testée dans la gamme de DO allant de 0 à 0.6 car pour des DO supérieures, on observe des ruptures avec une DO qui reste à son maximum voire même décroît tandis que CV continue à augmenter. La comparaison statistique des modèles emboîtés a montré que le polynôme de degré 3 permettait d'obtenir des ajustements significativement meilleurs ($P < 0.001$). Cependant, les paramètres obtenus aux différentes températures sont significativement différents et ne présentent pas d'évolution en rapport avec la température d'étude (Figure II.2.1). De plus, en utilisant les moyennes des paramètres estimés aux différentes températures, les meilleurs ajustements de la totalité des courbes sont obtenus avec le polynôme de degré 1.

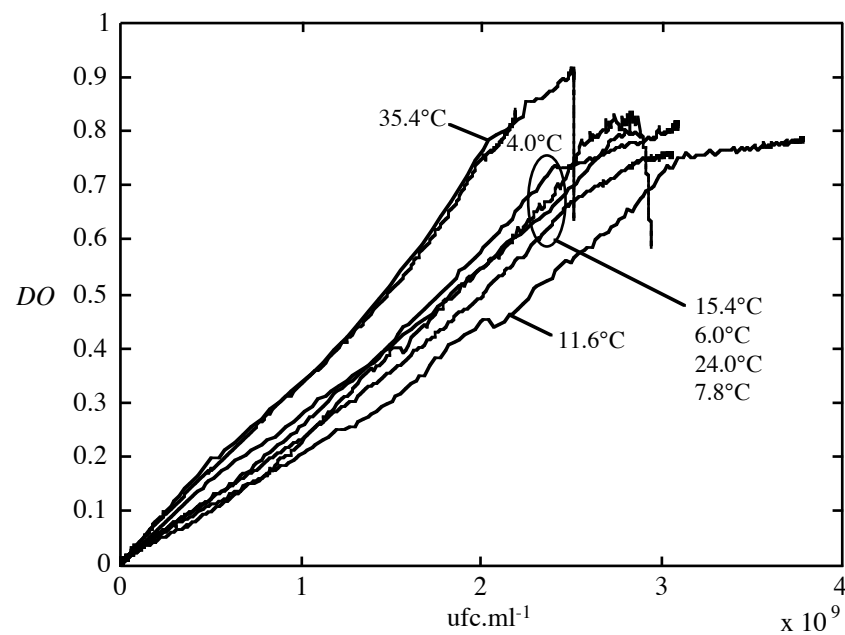


Figure II.2.1 Relation entre la densité optique et la concentration cellulaire lors de la croissance de *L. monocytogenes* Scott A en bouillon tryptone soja additionné d'extrait de levure à différentes températures.

Nous avons donc utilisé comme équation de calibration entre DO et CV, une relation de proportionnalité (le terme constant du polynôme de degré 1 n'était pas significativement différent de 0.0).

La relation [II.2.1a] devient donc :

$$DO = k \cdot x \quad [\quad I \quad I \quad . \quad 2 \quad . \quad 1 \quad b \quad]$$

k coefficient de proportionnalité

Le coefficient de proportionnalité varie de 2.85×10^{-10} à 4.46×10^{-10} pour les 10 souches. Le seuil de détection de la DO pour *L. monocytogenes* correspond donc à des suspensions bactériennes contenant environ 10^7 ufc.ml⁻¹.

II.2.B. METHODES D'ESTIMATION DES PARAMETRES DE CROISSANCE

L'estimation de $\mu_{\max}$ peut se faire selon la technique des dilutions. Dans le cas de dilutions en série au demi, le temps séparant deux courbes de DO successives est égal au temps de génération, T_g (Arino *et al.*, 1998).

Cette technique est valide à condition que la taille de l'inoculum n'ait pas d'effet sur les paramètres de croissance lag et $\mu_{\max}$. Cette hypothèse a été vérifiée en observant un décalage constant entre les cinétiques d'accroissement de la DO de 7 dilutions successives au 1/10ème d'une suspension initiale de *L. monocytogenes* d'environ 10^7 ufc.ml⁻¹ (Figure II.2.1).

$\mu_{\max}$ se déduit de T_g en utilisant la relation : $\mu_{\max} = \ln 2 / T_g$.

Les estimations de $\mu_{\max}$ et lag peuvent également être réalisées en ajustant un modèle de croissance à la totalité de la cinétique d'évolution de DO obtenue avec des suspensions dont la DO initiale est supérieure au seuil de détection (Hudson et Mott, 1994 ; Bégot *et al.*, 1996 ; Bégot *et al.*, 1997 ; Stephens *et al.*, 1997 ; Arino *et al.*, 1998 ; Cheroutre-Vialette *et al.*, 1998).

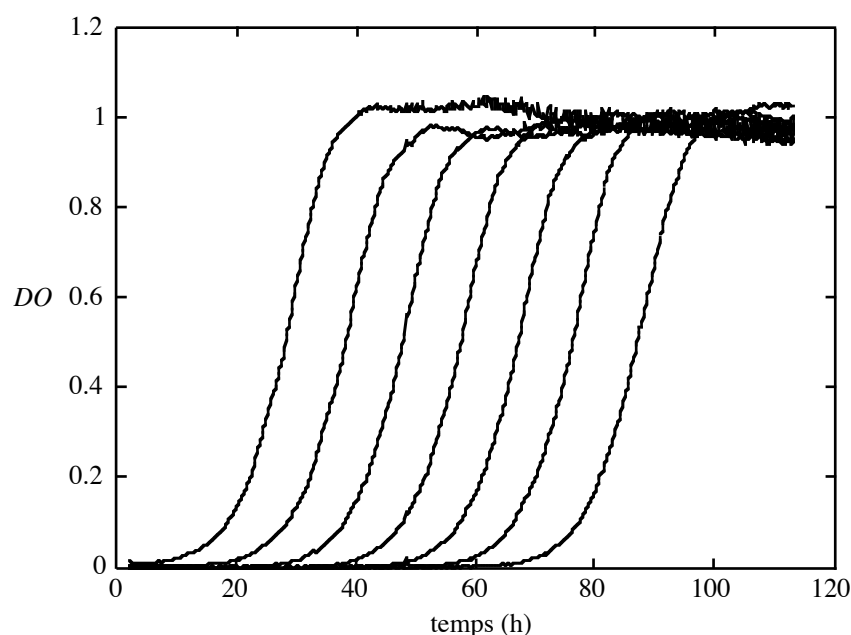


Figure II.2.2 Cinétiques d'accroissement de la densité optique de 7 dilutions successives au 1/10ème d'une suspension de *L. monocytogenes*.

Nous avons ajusté le modèle de Gompertz aux courbes de croissance DO obtenues avec des suspensions dont la concentration initiale était d'environ 10^8 ufc.ml⁻¹. Dans la suite de l'exposé, ce modèle sera noté *GP*.

Son équation est :

$$DO(t) = DO_0 \cdot \exp \left(A \cdot \exp \left(- \exp \left(\frac{\mu_{\max} \cdot e}{A} \cdot (lag - t) + 1 \right) \right) \right) \quad [\text{II} . 2 . 2]$$

$DO(t)$ densité optique à l'instant t
 DO_0 densité optique initiale
 $A = \ln DO_{\max} - \ln DO_0$
 $DO_{\max}$ densité optique maximale
 $e = \exp(1)$

Les estimations de $\mu_{\max}$ et lag peuvent également être réalisées en ajustant un modèle de croissance à la totalité de la cinétique d'évolution de DO obtenue avec des suspensions dont la DO initiale est inférieure au seuil de détection (McClure *et al.*, 1993 ; Dalgaard *et al.*, 1994 ; Arino *et al.* 1998). La valeur initiale du modèle est alors forcée à $k x_0$ connu. Nous avons ajusté la deuxième partie du modèle logistique avec délai et rupture (alias modèle W) en utilisant $k x_{\max}$ au lieu de $DO_{\max}$ (la relation de proportionnalité n'étant plus vérifiée près de $DO_{\max}$) aux courbes de croissance DO obtenues avec des suspensions dont la concentration initiale était d'environ 10^6 ufc.ml⁻¹.

L'équation du modèle W est :

$$DO(t) = \frac{k \cdot x_{\max}}{1 + \left(\frac{x_{\max}}{x_0} - 1 \right) \cdot \exp(-\mu_{\max} \cdot (t - lag))} \quad [\text{II} . 2 . 3]$$

La dernière technique permettant d'estimer $\mu_{\max}$ et lag consiste à ajuster un modèle de croissance seulement sur la partie exponentielle de la courbe de croissance de la DO obtenue avec des suspensions dont la DO initiale est inférieure au seuil de détection (Young et Foegeding, 1993 ; Bréand *et al.*, 1997 ; Stephens *et al.*, 1997). La valeur initiale du modèle est également forcée à $k x_0$. Nous avons ajusté un modèle exponentiel avec délai (alias modèle E) aux courbes de croissance DO obtenues avec des suspensions dont la concentration initiale était d'environ 10^6 ufc.ml⁻¹.

L'équation du modèle E est :

$$DO(t) = k \cdot x_0 \cdot \exp(\mu_{\max} \cdot (t - lag)) \quad [\text{ I I . 2 . 4 }]$$

Le problème lors de l'utilisation de ce modèle est la définition de la phase exponentielle de croissance de la DO. Pour la déterminer, nous avons tracé la vitesse d'accroissement de la DO, dDO/dt (estimés par $\Delta DO/\Delta t$ avec ΔDO , différence de DO entre deux lectures successives et Δt , intervalle de temps entre ces deux lectures) en fonction de DO (Figure II.2.3). Une bonne corrélation linéaire entre les deux quantités est obtenue pour des DO inférieures à 0.1. On peut donc considérer que la zone exponentielle d'accroissement de la DO est comprise entre 0 et 0.1 et le modèle E (équation [II.2.4]) a donc été ajusté dans cette zone.

Nous avons également estimé lag à partir de la connaissance de la concentration bactérienne initiale x_0 , d'une concentration $x(t)$ de la culture pendant la phase exponentielle de croissance à un instant t , de la concentration maximale $x_{\max}$ et du taux de croissance maximum $\mu_{\max}$.

Ce modèle (alias modèle M) s'écrit (Rosso *et al.*, 1996) :

$$lag = t + \frac{1}{\mu_{\max}} \cdot \ln \left(\frac{x_0 \cdot (x_{\max} - x(t))}{x(t) \cdot (x_{\max} - x_0)} \right) \quad [\text{ I I . 2 . 5 }]$$

Les modèles GP , W et E ont été ajustés à des transformations de DO afin de stabiliser la variance des résidus. Pour déterminer la transformation adéquate, nous avons utilisé la méthode de Box et Cox (Box *et al.*, 1978) sur deux jeux de courbes de croissance DO obtenues à 4.0 et 28.7°C. Chaque jeu comportant 90 répliques, des graphiques de l'évolution du logarithme de l'écart-type de ces répliques en fonction du logarithme de la moyenne des répliques ont été tracés (Figure II.2.4). Les pentes des droites de régression étant respectivement égales à 1.01 ± 0.02 et 0.94 ± 0.02 à 4.0 et 28.7°C indiquent que la transformation logarithmique (pente théoriquement égale à 1) est adéquate pour stabiliser la variance de la DO. Les modèles ont donc été ajustés à $\log DO$ ou $\log (DO + 1)$ lorsque des valeurs nulles de la DO étaient observées.

II.2. Mise au point d'une technique simple d'acquisition des paramètres de croissance

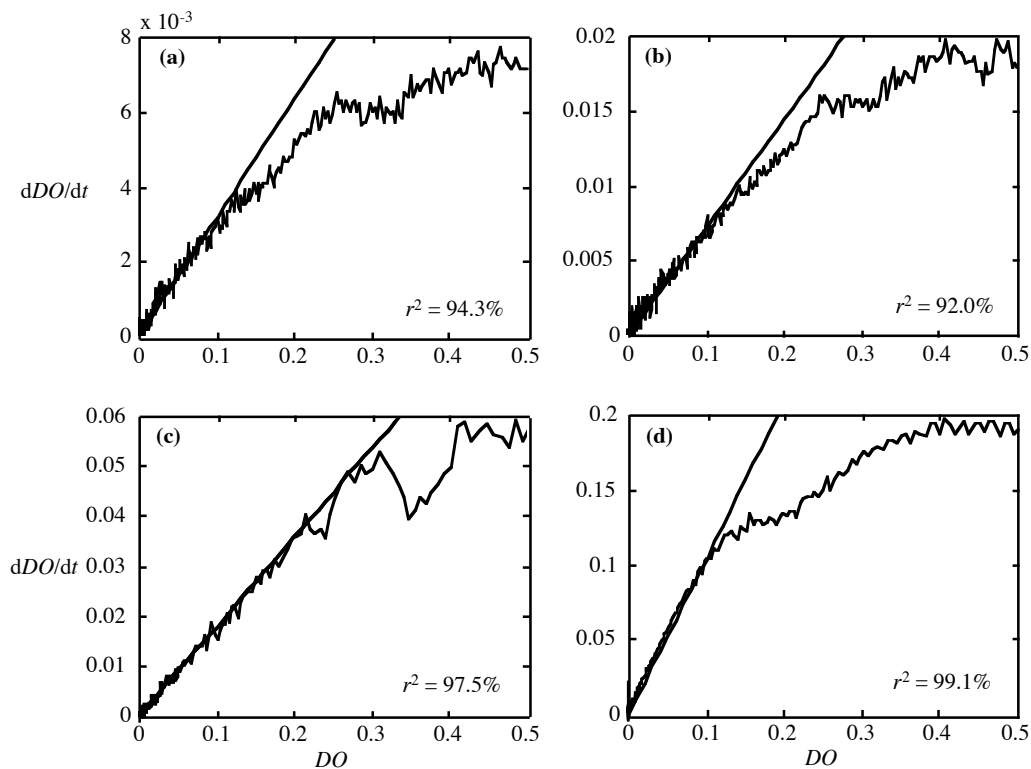


Figure II.2.3 Evolution de la vitesse d'accroissement de la densité optique avec la valeur de la densité optique à (a) 4.0°C , (b) 7.8°C , (c) 13.5°C et (d) 35.4°C . Les droites de régression sur les portions de densité optique inférieure à 0.1 et les coefficients de détermination de ces régressions sont portés sur chaque graphe.

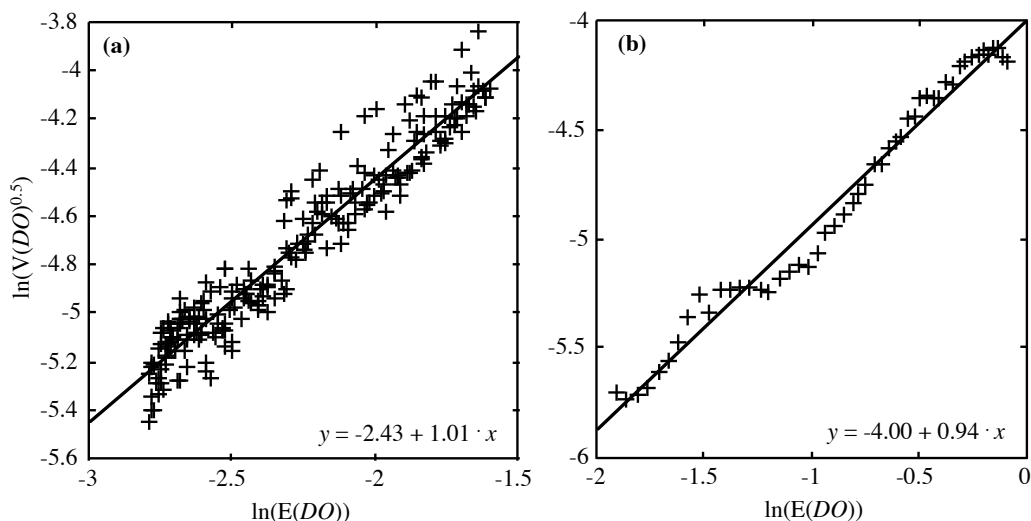


Figure II.2.4 Evolution du logarithme de l'écart type de la densité optique, $V(DO)^{0.5}$, avec le logarithme de la moyenne de celle-ci, $E(DO)$, pour des croissances répliquées 90 fois à (a) 4.0°C et (b) 28.7°C . Les équations des droites de régression sont portées sur chaque graphe.

Les estimations des paramètres de croissance obtenues avec ces différents modèles ajustés à la DO ont été comparées à celles obtenues en ajustant le modèle logistique avec délai et rupture (équation [I.1.5]) aux courbes CV. Cette comparaison a été réalisée pour des cinétiques d'accroissement de DO et CV obtenues en parallèle pour les 10 souches de *L. monocytogenes* lors de croissance en bouillon tryptone soja additionné d'extrait de levure à des températures comprises entre 4.0 et 35.4°C.

II.2.C. APPLICATION AU TAUX DE CROISSANCE MAXIMUM

Le temps de génération a été estimé selon la technique des dilutions au demi comme étant le temps moyen séparant 6 courbes d'accroissement de la DO lorsque celle-ci se trouve dans la gamme 0.010-0.600. Pour toutes les souches, on a pu observer une très bonne corrélation linéaire entre les taux de croissance estimés selon cette technique, μ_D , et ceux estimés sur la courbe de croissance CV, μ_{CV} (Figure II.2.5). Les coefficients de la droite de régression n'étant pas significativement différents de 1.0 et 0.0, on peut admettre que les $\mu_{\max}$ obtenus selon la technique des dilutions sont égaux à ceux estimés selon la méthode sur courbe de croissance CV. Dans la suite de l'exposé les $\mu_{\max}$ obtenus par dilution au demi seront utilisés comme références car ils permettent de réaliser la comparaison avec 11 jeux de données au lieu de 6.

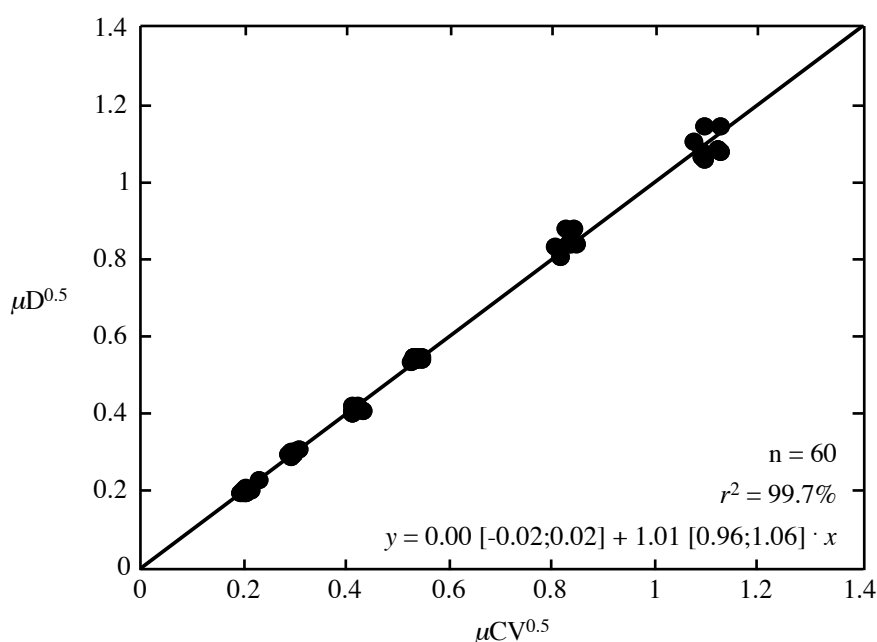


Figure II.2.5 Relation entre les taux de croissance maximum estimés sur la densité optique selon la technique des dilutions au demi, μ_D , et ceux estimés sur les cinétiques de croissance obtenues par dénombrement, μ_{CV} , pour 10 souches de *L. monocytogenes*. L'équation de la droite de régression et son coefficient de détermination sont portés sur le graphe. Les valeurs entre crochets sont les intervalles de confiance des paramètres au niveau 95%.

Les estimations de $\mu_{\max}$ obtenues avec les modèles *GP*, *W* et *E* sont fortement corrélées aux valeurs de référence (Figure II.2.6). Les termes constants des droites de régression n'étant pas significativement différents de 0.0, on peut considérer qu'il existe une relation de proportionnalité entre ces différents taux. La dispersion des rapports des taux de croissance étant la plus faible avec le modèle *E* (Figure II.2.7), nous retiendrons ce modèle pour l'estimation de $\mu_{\max}$ sur les cinétiques d'accroissement de la DO.

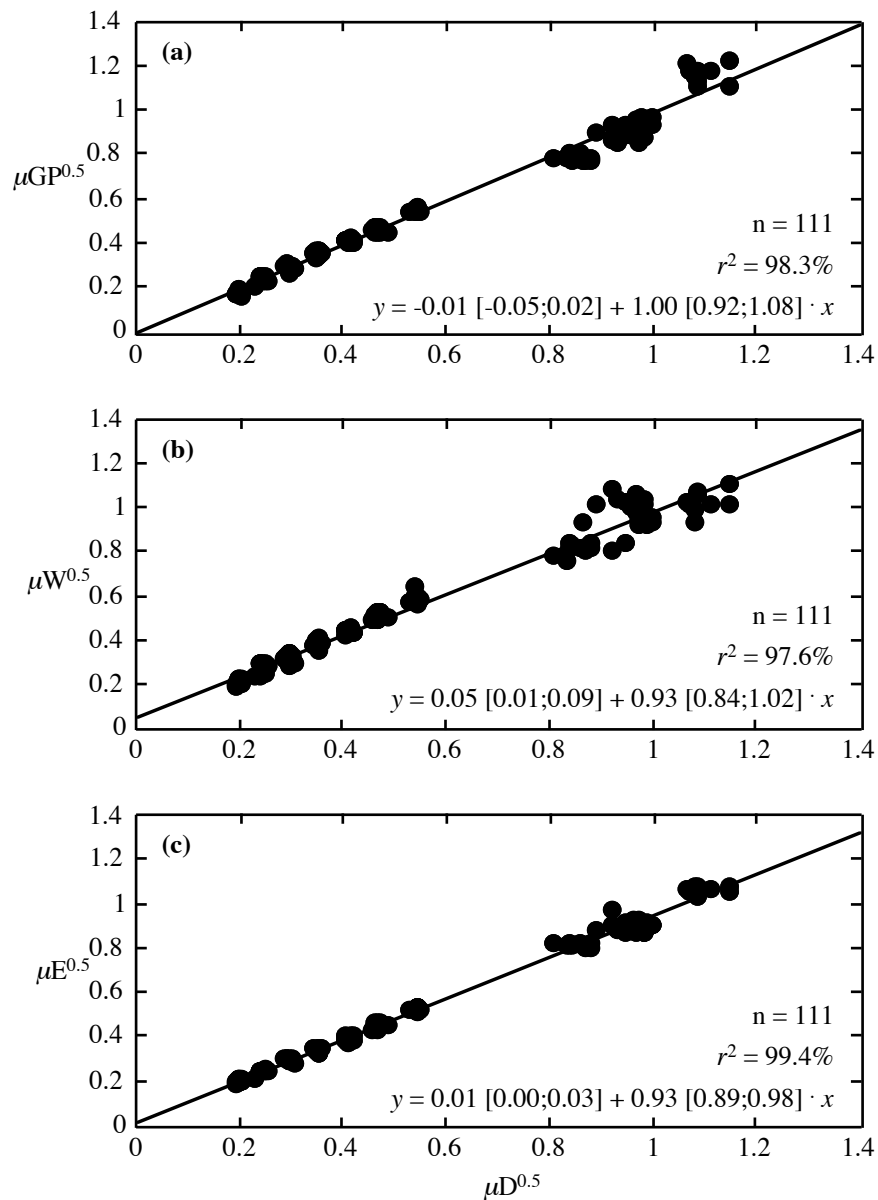


Figure II.2.6 Relations entre les taux de croissance obtenus avec les modèles (a) *GP*, (b) *W* et (c) *E* et les taux de croissance de référence pour 10 souches de *L. monocytogenes*. Les équations et les coefficients de détermination des droites de régression sont portés sur chaque graphe. Les valeurs entre crochets sont les intervalles de confiance des paramètres au niveau 95%.

Le rapport moyen des racines carrées des taux de croissance pour ce modèle E est égal à 0.97 ± 0.04 , les valeurs de $\mu_{\max}$ obtenues avec ce modèle devront donc être corrigées en les divisant par $0.94 (= 0.97^2)$. Comme Dalgaard *et al.* (1994), nous observons donc que cette technique conduit à une sous-estimation de $\mu_{\max}$. Ce résultat n'est pas surprenant car la DO n'est détectée que lorsque la culture atteint une concentration cellulaire élevée, or à cette concentration, le taux de croissance μ est significativement inférieur à $\mu_{\max}$ (phase de ralentissement de la croissance, cf. § I.1.A.a).

Si l'on considère un freinage de type logistique : $\mu = \mu_{\max} \cdot (1 - x/x_{\max})$. En utilisant la moyenne des coefficients de proportionnalité entre DO et CV obtenues avec les 10 souches de *L. monocytogenes*, 3.83×10^{-10} , on obtient $x = 1.3 \times 10^8$ ufc.ml⁻¹ pour $DO = 0.050$. En prenant $x_{\max} = 2.3 \times 10^9$ ufc.ml⁻¹ (moyenne des concentrations maximales obtenues avec les 10 souches, on obtient effectivement $\mu = 0.94 \cdot \mu_{\max}$ pour $DO = 0.050$.

Nous retiendrons donc comme technique d'estimation de $\mu_{\max}$ l'utilisation du modèle E , qui nécessite peu de données spectrophotométriques. En effet, une seule cinétique d'accroissement de la DO dans la gamme 0-0.1 est nécessaire pour déterminer $\mu_{\max}$.

La technique des dilutions nécessite la construction de plusieurs cinétiques d'accroissement de la DO (6 dilutions successives) pour obtenir des estimations fiables de $\mu_{\max}$ et est donc écartée dans le cadre d'une utilisation en routine.

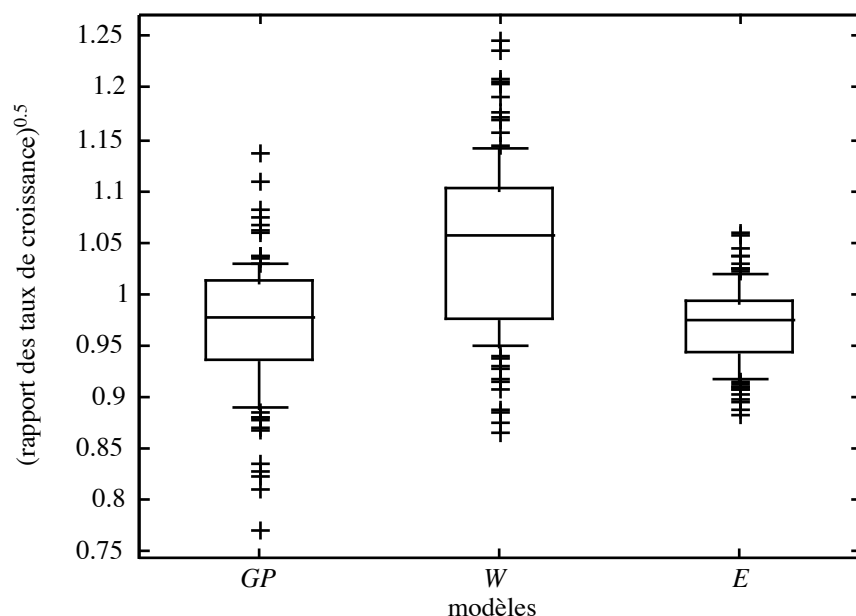


Figure II.2.7 Distributions des rapports entre les taux de croissance obtenus avec les modèles GP , W et E et les taux de croissance de référence de 10 souches de *L. monocytogenes*. Les boîtes de Box représentent les 10ème, 25ème, 50ème, 75ème et 90ème percentiles des distributions.

II.2.D. APPLICATION AU TEMPS DE LATENCE

Les temps de latence ont été estimés avec les modèles *GP*, *W*, *E* et *M*. Pour ce dernier modèle, nous avons utilisé le taux de croissance maximum estimé avec le modèle *E* divisé par le facteur de calibration 0.94. Toujours pour ce modèle *M*, le temps de latence moyen a été calculé à partir de 2 estimations obtenues avec 2 dénombrements bactériens dans la phase exponentielle de croissance.

La corrélation entre les logarithmes des *lag* obtenus avec ces modèles et ceux estimés sur les cinétiques de CV, *lagCV*, est moins bonne que celle observée pour les taux de croissance (Figure II.2.8).

On peut utiliser une relation de proportionnalité entre les temps de latence obtenus avec les modèles *E* et *M* et *lagCV* car les pentes des droites de régression avec ces deux modèles ne sont pas significativement différentes de 1.0. Les distributions des logarithmes des rapports des estimations de *lag* sont présentés par la Figure II.2.9 (ils ont également été calculés pour les modèles *GP* et *W* bien qu'en toute rigueur cela ne soit pas justifié car il n'y a pas de relation de proportionnalité). Le logarithme moyen des rapports entre *lagGP* et *lagCV* est égal à -0.56 ± 0.35 , cette technique conduit donc à une sous-estimation des temps de latence d'environ 50%. Ceci a déjà été signalé par Hudson et Mott (1994) qui ont obtenu avec *Pseudomonas fragi* un logarithme moyen du rapport de -0.54 ± 0.35 . Les modèles *W* et *E* conduisent à des estimations de *lag* en moyenne égales à celles de référence mais ils manquent de fiabilité car de nombreuses valeurs aberrantes sont observées (Figure II.2.9).

Nous préférons donc l'utilisation du modèle *M* qui permet d'obtenir des estimations similaires à celles de référence (logarithme moyen des rapports entre les temps de latence égal à 0.05 ± 0.12) et ceci de façon plus fiable car la distribution des rapports entre *lagM* et *lagCV* montre une dispersion faible (Figure II.2.9).

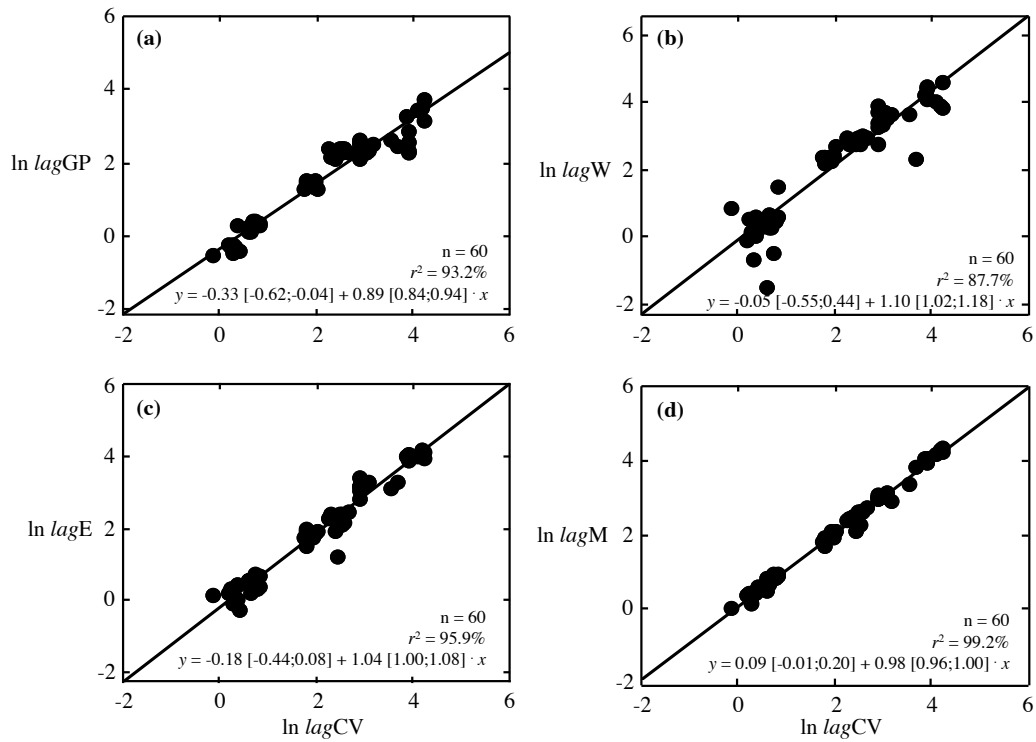


Figure II.2.8 Relations entre les temps de latence obtenus avec les modèles (a) GP, (b) W, (c) E et (d) M et les taux de croissance de référence pour 10 souches de *L. monocytogenes*. Les équations et les coefficients de détermination des droites de régression sont portés sur chaque graphe. Les valeurs entre crochets sont les intervalles de confiance des paramètres au niveau 95%.

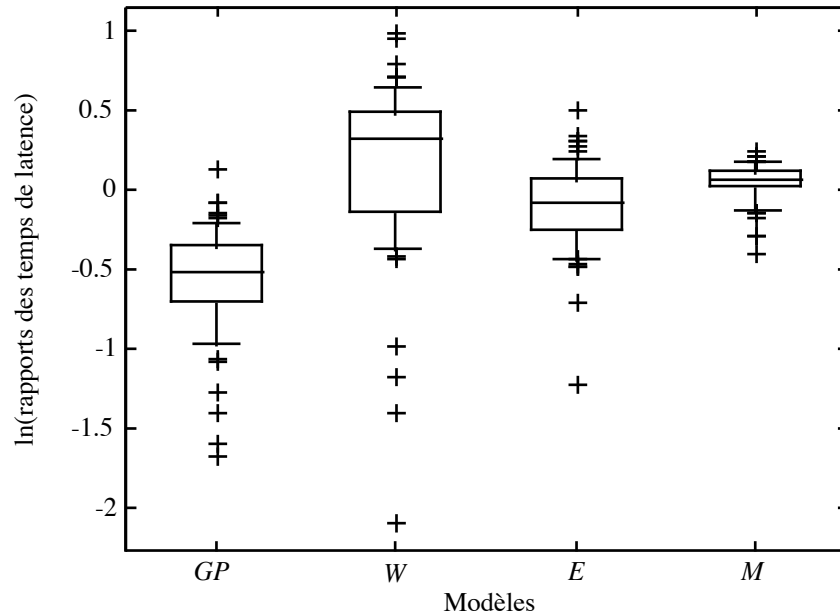


Figure II.2.9 Distributions des rapports entre les temps de latence obtenus avec les modèles GP, W, E et M et les taux de croissance de référence de 10 souches de *L. monocytogenes*. Les boîtes de Box représentent les 10ème, 25ème, 50ème, 75ème et 90ème percentiles des distributions.

La spectrophotométrie représente donc un moyen efficace d'obtenir rapidement des informations quant à la croissance de micro-organismes dans des milieux liquides translucides. On a pu voir cependant que les méthodes utilisées pour déduire les paramètres de croissance des cinétiques d'accroissement de la densité optique peuvent conduire à des estimations différentes de celles classiquement obtenues sur les cinétiques de croissance par dénombrement.

*Nous proposons une technique nécessitant seulement le début d'une cinétique d'accroissement de la DO (≤ 0.1) qui permet d'obtenir des estimations précises de μ_{max} connaissant le facteur de correction à appliquer aux taux de croissance estimés sur la DO. Ce facteur de correction est constant pour 10 souches de *L. monocytogenes* pour des croissances à des températures comprises entre 4.0 et 35.4°C. Il devra cependant être à nouveau estimé lors d'utilisation avec d'autres micro-organismes ou dans d'autres conditions (milieu de culture, pH, activité de l'eau...). Ce facteur peut, par exemple, varier avec le facteur de proportionnalité entre la DO et CV (taille du micro-organisme utilisé) ou avec la concentration cellulaire maximale atteinte.*

L'estimation précise de lag ne peut être réalisée uniquement sur des données spectrophotométriques et nécessite de connaître la concentration bactérienne initiale et le temps permettant d'obtenir une concentration donnée lors de la croissance.

La technique proposée (utilisation du modèle E pour estimer μ_{max} et du modèle M pour estimer lag) a été validée sur des cinétiques de croissance obtenues avec la souche Scott A lors de croissances à 6°C en bouillon tryptone soja additionné d'extrait de levure pour des inoculums préparés dans différentes conditions. On a pu observer une bonne adéquation entre les cinétiques de croissance obtenues par dénombrement et celles calculées selon la méthode préconisée (Figure II.2.10).

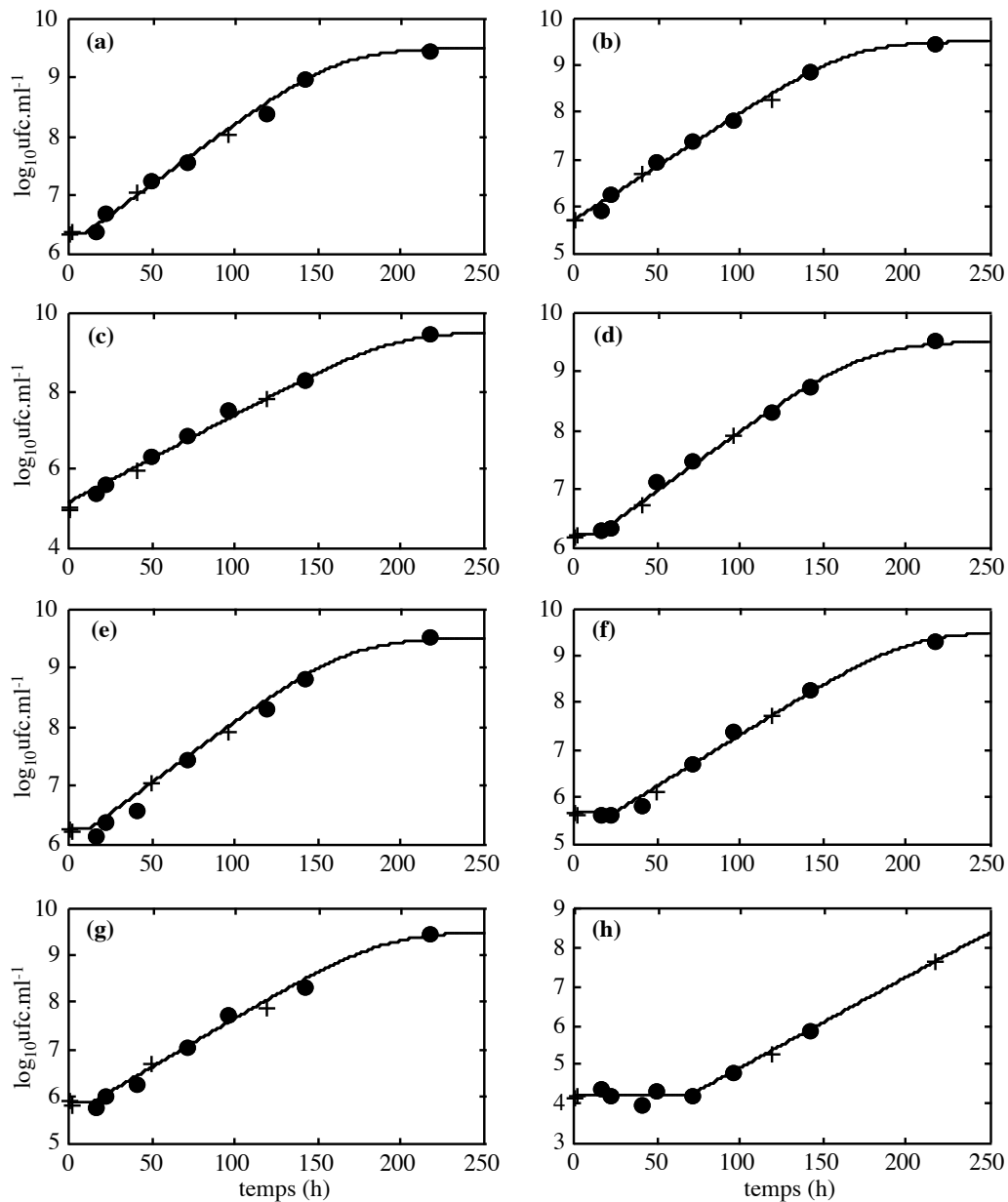


Figure II.2.10 Cinétiques de croissance de *L. monocytogenes* Scott A obtenues à 6°C en bouillon tryptone soja additionné d'extrait de levure avec les conditions pré-incubatoires suivantes : (a) 10 h à 12°C, (b) 22 h à 12°C, (c) 32 h à 12°C, (d) 1 h à 37°C, (e) 3 h à 37°C, (f) 5 h à 37°C, (g) 52 jours à 4°C, (h) 10 mois à 4°C. Les courbes sont les cinétiques calculées à l'aide de la méthode spectrophotométrique, les (●) sont les dénombrements observés, les (+) sont les dénombrements observés utilisés dans la méthode spectrophotométrique. La méthode spectrophotométrique consiste en l'utilisation du modèle *E* pour l'estimation $\mu_{\max}$ conjointement au facteur de correction $1/0.94$ et en l'utilisation du modèle *M* pour l'estimation de *lag* en supposant $x_{\max} = 3.2 \times 10^9 \text{ ufc.ml}^{-1}$.

PARTIE II

CHAPITRE 3

MODELISATION DU TEMPS DE LATENCE

*Nous avons vu que les modèles secondaires estiment moins bien le temps de latence que le taux de croissance de *L. monocytogenes*. La modélisation du temps de latence repose sur l'hypothèse selon laquelle celui-ci est inversement proportionnel au taux de croissance. La forte dispersion des produits $\mu_{\max}lag$ (cf. Figure I.3.5) observée semble cependant indiquer que cette hypothèse est abusive. Nous allons donc étudier dans cette partie les différents facteurs pouvant entraîner une variabilité du produit $\mu_{\max}lag$ (facteurs environnementaux, conditions pré-incubatoires, taille de l'inoculum). Nous proposerons un modèle capable de décrire l'effet de l'histoire thermique de l'inoculum construit à partir de données expérimentales. Nous aborderons enfin l'importance de l'effet de la taille de l'inoculum sur le temps de latence.*

II.3.A. VARIABILITE DU PRODUIT $\mu_{\max}lag$

II.3.A.a. INTERPRETATION PHYSIOLOGIQUE DU PRODUIT $\mu_{\max}lag$

Comme nous l'avons signalé auparavant (cf. § I.1.A.a), la phase de latence correspond à une phase d'adaptation des cellules inoculées à leur nouvel environnement. On peut donc imaginer que la durée de la phase de latence dépend du travail (biosynthèses, adaptations métaboliques) que les cellules doivent accomplir avant d'entrer en division, K , et de la vitesse, v , à laquelle elles sont capables de réaliser ce travail (Robinson *et al.*, 1998). On peut donc poser : $lag = K/v$.

Cette conception rejoint l'hypothèse selon laquelle la croissance des populations bactériennes serait contrôlée par une entité qui doit atteindre une concentration cellulaire critique avant que la division cellulaire ne se produise, entité dont la concentration est supposée corrélée à la biomasse cellulaire (Albertson *et al.*, 1990 ; Cooper, 1991 ; Baranyi *et al.*, 1993b ; Baranyi et Roberts, 1994 ; Hills et Wright, 1994 ; Hills et Mackey, 1995). Cette biomasse est généralement supposée augmenter de façon exponentielle pendant la phase de latence à une vitesse égale au taux de croissance

maximum (Koch, 1987, 1995 ; Hills et Wright, 1994 ; Baranyi et Roberts, 1994 ; Hills et Mackey, 1995).

Cela revient à supposer que la vitesse à laquelle est réalisé le travail nécessaire à l'entrée en croissance dépend uniquement des conditions de croissance et que cette vitesse est égale au taux de croissance maximum. La relation précédente devient donc : $lag = K/\mu_{\max}$.

Le produit $\mu_{\max}lag$ peut donc être interprété d'un point de vue physiologique comme le travail que les cellules doivent accomplir avant d'entrer en division.

II.3.A.b. EFFET DE L'ENVIRONNEMENT SUR LE PRODUIT $\mu_{\max}lag$

Certaines études ont montré que la température d'incubation pouvait parfois influencer de façon significative le produit $\mu_{\max}lag$ (Delignette-Muller, 1998 ; Robinson *et al.*, 1998). Dans ce cas, on observe généralement une diminution du produit lorsque la température augmente pour s'approcher de la température optimale de croissance (Delignette-Muller, 1998). Ceci signifie d'un point de vue physiologique que la quantité de travail nécessaire pour que les cellules entrent en division diminue lorsque l'on se rapproche de la température optimale de croissance. Bien que cette interprétation paraisse tout à fait logique, elle est remise en question par les résultats de Robinson *et al.* (1998) qui ont observé que le produit $\mu_{\max}lag$ décroissait effectivement lorsque la température augmentait de 5 à 37°C mais des valeurs anormalement élevées ont été systématiquement notées à 20 et 25°C.

Pour le pH, il semble également que le produit $\mu_{\max}lag$ soit plus élevé près du pH minimal de croissance et qu'il décroisse lorsque le pH augmente vers sa valeur optimale (Delignette-Muller, 1998 ; Robinson *et al.*, 1998).

Les mêmes observations ont été faites avec l'activité de l'eau mais cet effet semble être largement dépendant du soluté utilisé (Robinson *et al.*, 1998).

L'effet des substances inhibitrices sur le produit $\mu_{\max}lag$ est variable. Généralement on observe une augmentation du produit lorsque la concentration en substance inhibitrice augmente. Un effet fortement significatif ($P = 5.4 \times 10^{-10}$) a pu ainsi être observé avec la monolaurine (Figure II.3.1a) sur les données de Oh et Marshall (1993). Les auteurs ont expliqué cette forte augmentation relative du temps de latence par rapport au taux de croissance par le fait que les cellules doivent éliminer la substance antimicrobienne avant que la croissance ne puisse être observée, ce qui correspond effectivement à une augmentation du travail cellulaire nécessaire à la croissance.

Par contre, avec d'autres substances inhibitrices le phénomène opposé est observé. C'est par exemple le cas avec le benzoate de sodium pour lequel une diminution significative ($P = 1.4 \times 10^{-2}$) du produit $\mu_{\max}lag$ est observée lorsque sa concentration augmente (Figure II.3.1b).

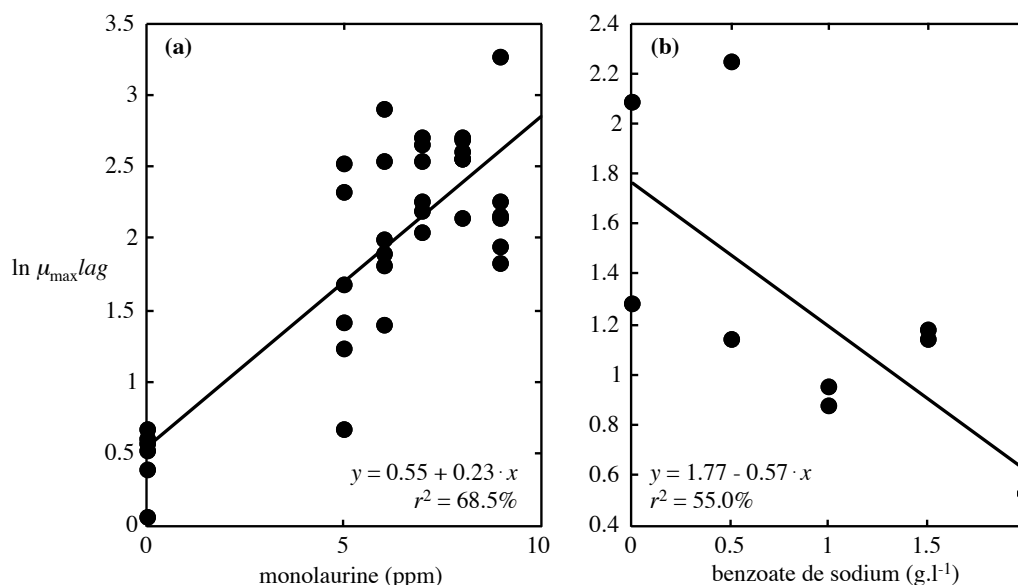


Figure II.3.1 Evolution du produit $\mu_{\max}lag$ avec la concentration (a) de monolaurine et (b) de benzoate de sodium. Les équations et les coefficients de détermination des droites de régression sont portées sur chaque graphe. Les données sont issues de (a) Oh et Marshall (1993) et (b) El-Shenawy et Marth (1988a).

Etant donné le caractère non systématique et souvent non significatif de l'effet de l'environnement sur le produit $\mu_{\max}lag$, nous continuerons par la suite à considérer que ce produit ne dépend pas de la nature de l'environnement de croissance.

II.3.A.c. EFFET DE L'ETAT PHYSIOLOGIQUE DE L'INOCULUM SUR LE PRODUIT $\mu_{\max}lag$

L'augmentation du temps de latence lorsque des stress physiques tels que chaleur ou radiations ionisantes sont appliqués aux cellules avant leur mise en culture a fréquemment été signalée dans la littérature (Kaufman *et al.*, 1959 ; Jackson et Woodbine, 1963 ; Mackey et Derrick, 1982, 1984 ; Grant *et al.*, 1993). Ceci correspond bien à une augmentation du travail qu'une cellule doit accomplir avant d'entrer en division puisqu'elle doit réparer les dommages métaboliques et cellulaires subis. Des modèles ont été récemment proposés pour décrire l'effet du stress thermique sur le temps de latence à la re-croissance de *L. monocytogenes* (Bréand *et al.*, 1997, 1999 ; McKellar *et al.*, 1997).

Même lorsque aucun traitement agressif n'est appliqué, les conditions de pré-incubation peuvent influencer la durée de la phase de latence à la re-croissance. Il a ainsi été observé que l'histoire thermique d'un inoculum avait une influence significative sur la durée de la phase de latence lors de la croissance qui suit (Buchanan et Klawitter, 1991 ; Walker *et al.*, 1990 ; Wang et Shelef, 1992 ; Hudson, 1993 ; Beumer *et al.*, 1996 ; Gay *et al.*, 1996 ; Dufrenne *et al.*, 1997 ; Membré *et al.*, 1999).

Ces résultats montrent que le temps de latence lors d'une croissance à basse température est d'autant plus court que la température de pré-incubation de l'inoculum est basse.

Buchanan et Klawitter (1991) ont observé que l'augmentation de *lag* avec la température de pré-incubation n'était pas continue et qu'il y avait probablement une température de pré-incubation critique au dessus de laquelle le temps de latence à la re-croissance augmentait fortement (Figure II.3.2). Ils ont également observé des différences dans le comportement du temps de latence en aérobiose et en anaérobiose (Figure II.3.2) et en fonction du substrat utilisé.

Gay *et al.* (1996) ont observé une diminution de *lag* à 14°C lorsque l'inoculum était préparé à 14°C au lieu de 30°C seulement lorsque celui-ci subissait un stockage préalable à 4°C et avec une taille d'inoculum faible.

L'augmentation du temps de latence semble dépendre également de la température d'accueil. Ainsi, Hudson (1993) a observé avec *Aeromonas hydrophila* que la durée de la phase de latence était plus courte lorsque la température de pré-incubation correspondait à la température d'incubation. A partir des résultats de Walker *et al.* (1990), on peut observer une diminution du rapport des produits $\mu_{\max}lag$ obtenus à 30 et 4°C lorsque la température d'incubation augmente (Figure II.3.3).

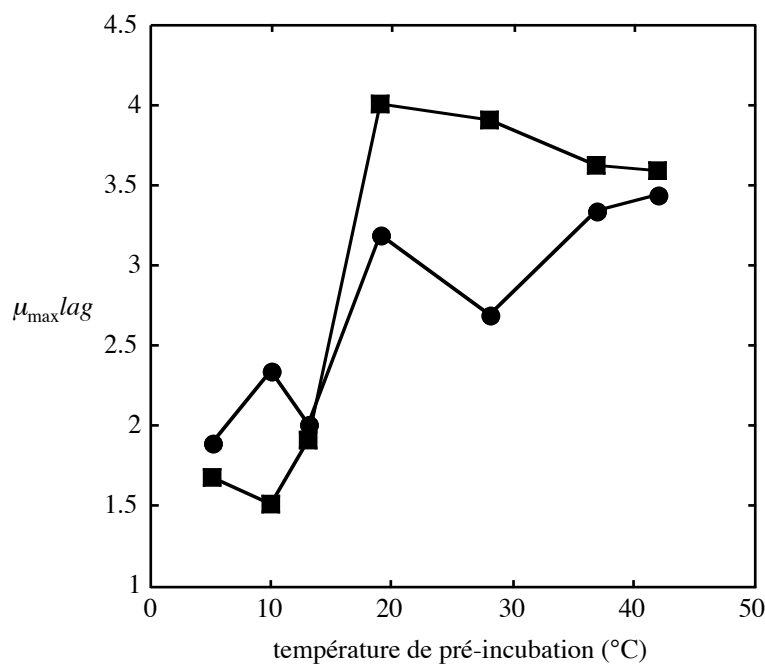


Figure II.3.2 Evolution du produit $\mu_{\max}lag$ avec la température de pré-incubation lors de croissances à 5°C en (●) aérobiose et (■) anaérobiose. Les données sont issues de Buchanan et Klawitter (1991).

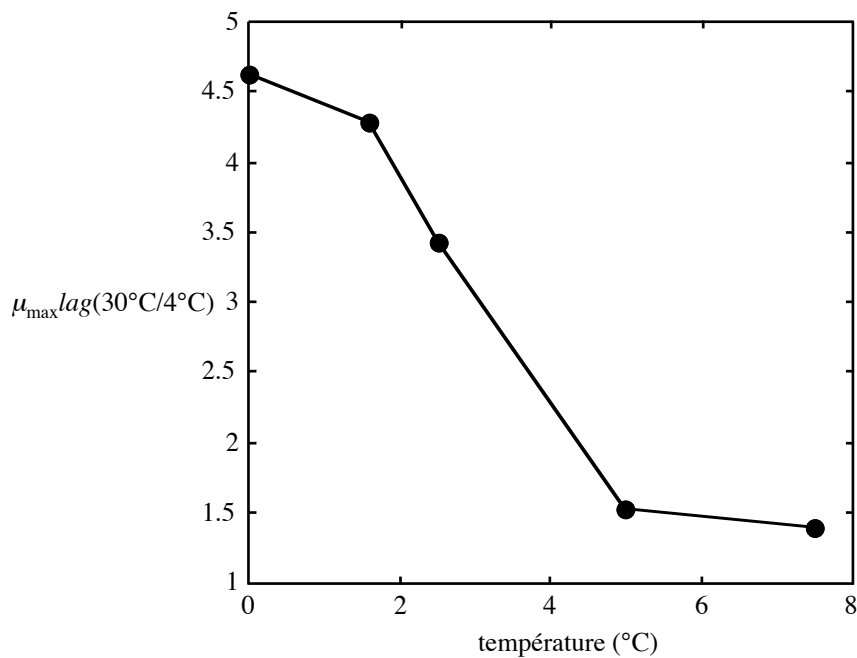


Figure II.3.3 Evolution du rapport des produits $\mu_{\max}lag$ obtenus à 30°C et 4°C avec la température d'incubation à la re-croissance. Les données sont issues de Walker *et al.* (1990).

Le même phénomène adaptatif pourrait exister avec le pH car Johansen *et al.* (1994) ont signalé une élimination de la phase de latence lorsque, avant de cultiver des cellules à pH 5.5, celles-ci étaient pré-incubées au même pH.

La dépendance du temps de latence vis-à-vis de l'histoire de l'inoculum peut enfin être illustrée par un résultat de George et Lund (1992) qui ont observé que des cellules en phase exponentielle de croissance reprenaient immédiatement leur croissance lorsqu'elles étaient transférées dans un milieu de culture frais.

L'histoire de l'inoculum et en particulier son histoire thermique influence donc fortement la durée de la phase de latence lors de la re-croissance. Les résultats obtenus montrent que plus la température de pré-incubation est basse, plus le temps de latence à la re-croissance à basse température est court.

Cette observation peut avoir des conséquences importantes en ce qui concerne la validité des modèles élaborés pour prévoir la croissance des micro-organismes dans les aliments. En effet, les modèles sont généralement construits à partir de cinétiques de croissance obtenues avec des inoculums préparés à des températures proches de la température optimale de croissance, *i.e.*, 30 ou 37°C (Figure II.3.4), alors que sur le terrain lors de contaminations croisées ou environnementales des denrées alimentaires, les cellules contaminantes ont généralement été soumises à des températures basses. Ces cellules seraient donc capables d'entrer en multiplication plus rapidement que ce que prévoient les modèles.

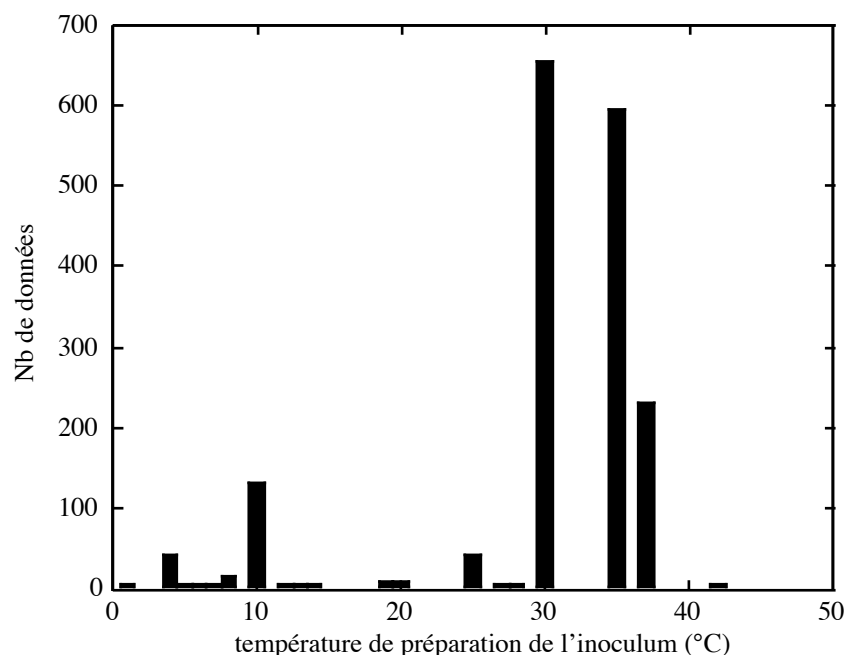


Figure II.3.4 Distribution des températures de pré-incubation observées dans la banque de données sur *L. monocytogenes*. 85% des températures utilisées sont supérieures ou égales à 30°C.

II.3.A.d. EFFET DE LA TAILLE DE L'INOCULUM SUR LE PRODUIT $\mu_{\max}lag$

Bien que certaines études aient montré que la taille de l'inoculum n'avait aucune influence sur les paramètres de croissance et en particulier sur le temps de latence de *L. monocytogenes* (Denis et Ramet, 1989 ; Buchanan et Phillips, 1990 ; Duffy *et al.*, 1994a), les résultats de Gay *et al.* (1996) semblent indiquer le contraire. Ces auteurs ont en effet observé que dans certaines conditions l'utilisation d'une faible concentration cellulaire initiale pouvait entraîner une augmentation considérable du temps de latence.

Ce résultat peut également remettre en cause la validité des modèles utilisés en microbiologie prévisionnelle car ceux-ci sont généralement élaborés avec des inoculums comprenant 10^2 à 10^4 cellules par ml (ou g) alors que les aliments sont contaminés par seulement quelques cellules par ml (ou g) (Lahellec *et al.*, 1996).

II.3.B. MODELISATION DE L'EFFET DE L'HISTOIRE THERMIQUE DE L'INOCULUM SUR LE TEMPS DE LATENCE A LA RE-CROISSANCE

L'objectif de l'étude qui suit est donc de construire un modèle permettant de prendre en compte, lors de l'estimation du temps de latence, l'histoire thermique de l'inoculum caractérisée par le couple [température de pré-incubation / durée de pré-incubation].

II.3.B.a. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Le détail du protocole expérimental est décrit dans : Augustin, J.-C., Rosso, L., Carlier, V. A model describing the effect of temperature history on lag time for *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* (soumis).

L. monocytogenes a été cultivée sur gélose en pente tryptone soja additionnée d'extrait de levure (TSYE) à 37°C pendant 24 h à partir de pentes conservées à 4°C. Deux sub-cultures successives ont ensuite été réalisées en bouillon TSYE à 30°C pendant 24 h afin de standardiser l'état physiologique du micro-organisme.

Les suspensions ainsi obtenues ont été diluées puis cultivées sur gélose ou bouillon TSYE (pH 7.1) à une température T_i pendant une durée t_i (Figure II.3.5).

Les conditions de pré-incubation sont donc définies par les paramètres suivants : x_0 , concentration bactérienne initiale (ufc.ml⁻¹) ; nature du substrat ; T_i (°C), température de pré-incubation ; t_i (h), durée de la pré-incubation.

Après cette pré-incubation, les cellules ont été transférées sur gélose ou bouillon TSYE et incubées à une température T (°C) pour étudier la re-croissance.

Lors de l'étude de la re-croissance en bouillon TSYE, les paramètres $\mu_{\max}$ et *lag* ont été déterminés selon la technique spectrophotométrique décrite dans le chapitre précédent (partie II, chapitre 2). Lors d'une re-croissance sur gélose TSYE, les paramètres ont été estimés par ajustement du modèle logistique avec délai et rupture (équation [I.1.5]) aux cinétiques de croissance obtenues par dénombrement sur boîtes.

Le modèle a été construit à partir de données obtenues avec la souche Scott A de *L. monocytogenes* pour une croissance en bouillon TSYE à 6°C avec un inoculum préparé en bouillon TSYE à des températures comprises entre 4.4 et 35.9°C.

Les études ont été répétées entre 2 et 4 fois à chaque température.

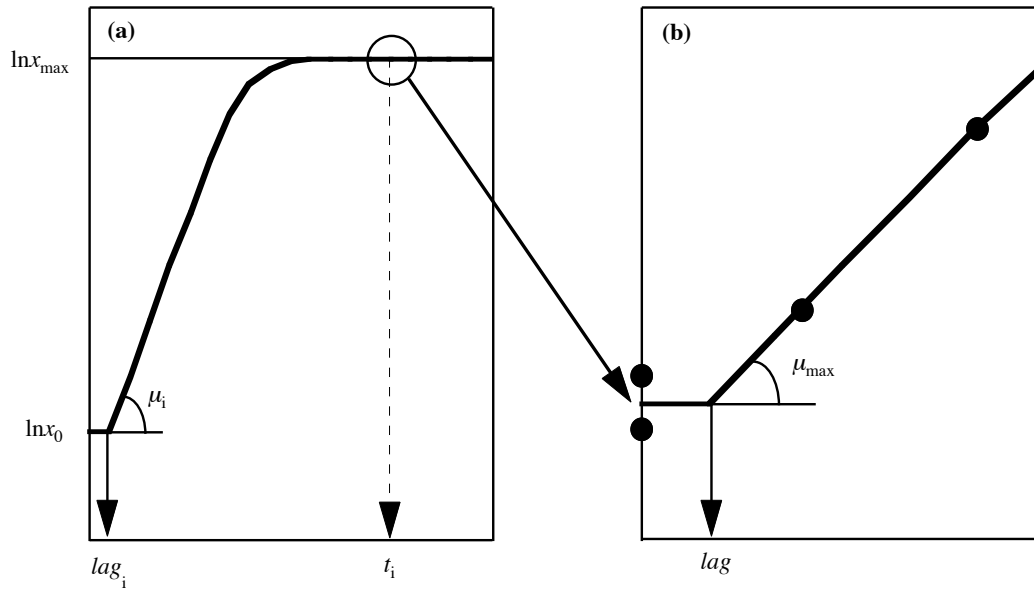


Figure II.3.5 Protocole expérimental utilisé pour étudier l'influence des conditions pré-incubatoires (a) sur les paramètres de croissance lag et $\mu_{\max}$ de *L. monocytogenes* (b). lag_i et μ_i sont le temps de latence et le taux de croissance maximum lors de la pré-incubation à la température T_i , t_i est la durée de pré-incubation.

Comme cela a déjà été signalé, le taux de croissance maximum n'étant pas influencé par les conditions de pré-incubation (Buchanan et Klawitter, 1991 ; Hudson, 1993 ; Dufrenne *et al.*, 1997), nous avons donc développé le modèle pour le produit $\mu_{\max}lag$:

$$\begin{cases} \mu_{\max}lag = f(t_i, \Theta) + \varepsilon_t \\ \theta = g(T_i, \Theta') + \varepsilon_T \end{cases}$$

- f, g fonctions de régression
- Θ vecteur de paramètres primaires apparaissant dans la fonction f
- θ valeur du paramètre primaire à la température T_i
- Θ' vecteur de paramètres secondaires apparaissant dans la fonction g
- ε_t erreur associée à l'observation $\mu_{\max}lag$
- ε_T erreur associée à l'observation θ

La transformation logarithmique du produit $\mu_{\max}lag$ n'a pas été utilisée car des valeurs négatives ont été observées. Nous avons donc ajusté le modèle directement sur $\mu_{\max}lag$ en supposant la stabilité de la variance des erreurs.

II.3.B.b. EVOLUTION DU PRODUIT $\mu_{\max}lag$ AVEC LE TEMPS DE PRE-INCUBATION DE L'INOCULUM

Quelque soit la température de pré-incubation utilisée, une évolution similaire de $\mu_{\max}lag$ est observée (Figure II.3.6) :

$\mu_{\max}lag$ diminue pendant la phase de latence de l'inoculum pour atteindre environ 0, il reste à cette valeur minimale pendant la phase exponentielle et parfois le début de la phase stationnaire pour ensuite augmenter pendant la phase stationnaire et la phase de déclin de l'inoculum.

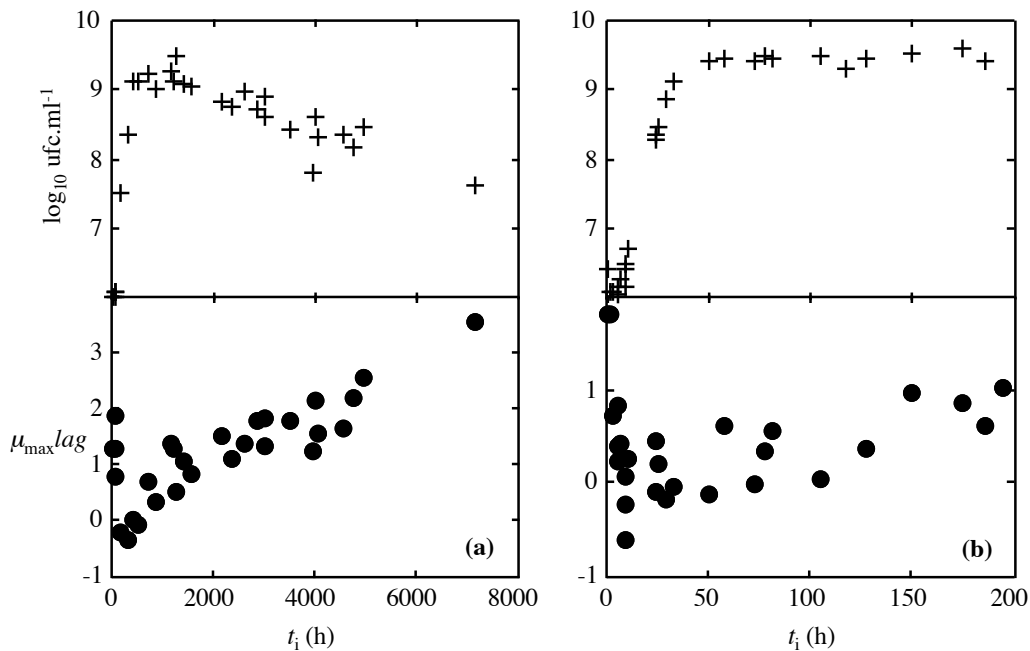


Figure II.3.6 Evolution du produit $\mu_{\max}lag$ lors de la croissance de *L. monocytogenes* en bouillon TSYE à 6°C avec la durée de pré-incubation t_i de l'inoculum à (a) 4.4°C et (b) 15.5°C. Les graphes supérieurs présentent l'évolution de la concentration microbienne (+) de l'inoculum.

Le modèle a été construit à partir des hypothèses suivantes :

(i) Pendant la phase de latence de l'inoculum.

Le produit $\mu_{\max}lag$ correspond au travail cellulaire nécessaire à l'entrée en croissance. Lors d'une pré-incubation à la température T_i , le travail total à fournir pour observer l'entrée en croissance de l'inoculum est $\mu_i lag_i$ (μ_i et lag_i , taux de croissance maximum et temps de latence à la température T_i).

Le travail réalisé pendant une pré-incubation d'une durée t_i (inférieure à lag_i) à la température T_i est $\mu_i t_i$.

Si pendant la phase de latence, la température d'incubation change (passage à la température T), la vitesse à laquelle est réalisé le travail s'adapte instantanément à cette nouvelle température. Le produit $\mu_{\max}lag$ à cette température T correspond alors au travail complémentaire à fournir pour passer de $\mu_i t_i$ à $\mu_i lag_i$. On a donc :

$$f(t_i) = \mu_i \cdot (lag_i - t_i) \quad [\quad I \quad I \quad . \quad 3 \quad . \quad 1 \quad a \quad]$$

(ii) Pendant la phase exponentielle de croissance de l'inoculum, la latence à la re-croissance dans un milieu frais identique au milieu de pré-incubation est nulle. Ce phénomène, mis en évidence pour la première fois par Penfold (1914), peut s'expliquer par le fait que pendant cette phase de croissance, le travail cellulaire nécessaire à la division est pratiquement nul. on a donc :

$$f(t_i) = 0 \quad [\quad I \quad I \quad . \quad 3 \quad . \quad 1 \quad b \quad]$$

La Figure II.3.7 confronte ce modèle d'évolution de $\mu_{\max}lag$ pendant les phases de latence et exponentielle de l'inoculum (équations [II.3.1a] et [II.3.1b]) à des valeurs observées. On constate que le modèle proposé permet de décrire correctement l'évolution observée.

(iii) Lorsque l'inoculum entre en phase stationnaire maximale, la biomasse cellulaire diminue (Cooper, 1991 ; Matin, 1992 ; Siegle et Kolter, 1992 ; Kolter *et al.*, 1993 ; Hills et Wright, 1994 ; Hills et Mackey, 1995 ; Koch, 1995), la multiplication cellulaire cesse et le produit $\mu_{\max}lag$ à la re-croissance augmente. Lorsque la phase stationnaire est prolongée, les cellules sont soumises à un stress de privation nutritionnelle et le produit $\mu_{\max}lag$ augmente indéfiniment (Albertson *et al.*, 1993).

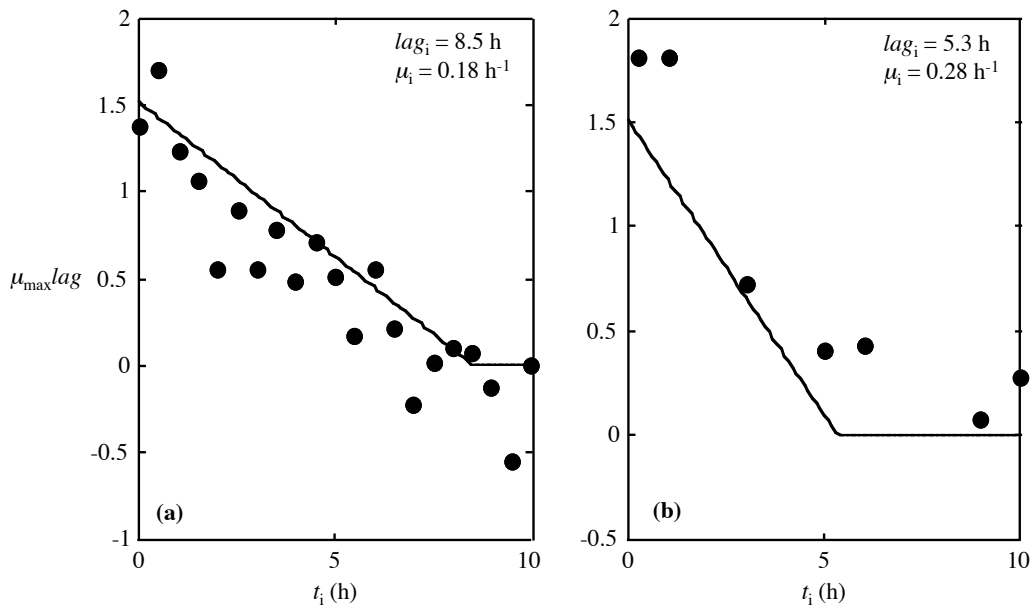


Figure II.3.7 Evolution du produit $\mu_{\max}lag$ avec la durée de pré-incubation t_i de l'inoculum lorsque celui-ci est dans la phase de latence et le début de la phase exponentielle. $\mu_{\max}lag$ est obtenu pour la croissance de *L. monocytogenes* en bouillon TSYE à 6°C pour des pré-incubations à (a) 11.9°C et (b) 15.5°C. Les courbes représentent l'évolution prévue par les équations [II.3.1a] et [II.3.1b], les paramètres utilisés sont portés sur chaque graphe.

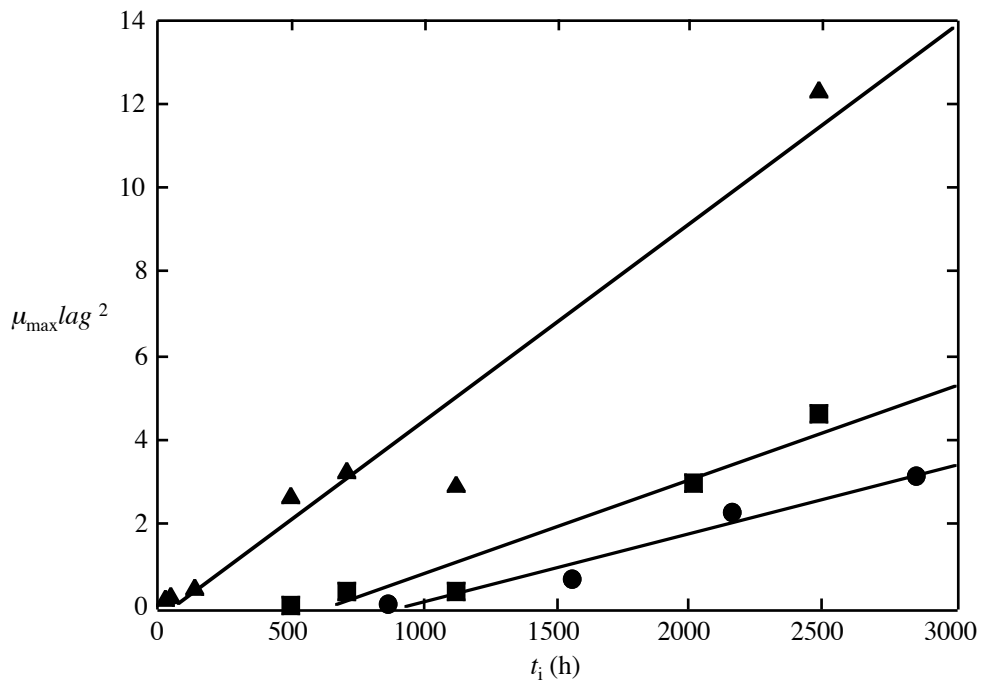


Figure II.3.8 Evolution du produit $\mu_{\max}lag$ avec la durée de pré-incubation t_i de l'inoculum lorsque celui-ci est en phase stationnaire. $\mu_{\max}lag$ est obtenu pour la croissance de *L. monocytogenes* en bouillon TSYE à 6°C pour des pré-incubations à (●) 4.4°C, (■) 6.3°C et (▲) 10.1°C.

La Figure II.3.8 présente l'évolution de $\mu_{\max}lag$ avec la durée de pré-incubation lorsque l'inoculum est en phase stationnaire, une relation de type racine carrée semble adaptée pour décrire l'augmentation de $\mu_{\max}lag$:

$$f(t_i) = \sqrt{v \cdot (t_i - t_s)} \quad [\text{ I } \text{ I } \text{ . } 3 \text{ . } 1 \text{ c }]$$

$v \text{ (h}^{-1}\text{)}$ paramètre relatif à la vitesse d'augmentation de $\mu_{\max}lag$

$t_s \text{ (h)}$ instant à partir duquel l'augmentation de $\mu_{\max}lag$ débute

Etant donné que t_s peut être inférieur à lag_i , le modèle décrivant l'évolution du produit $\mu_{\max}lag$ avec la durée de pré-incubation de l'inoculum s'écrit :

$$f(t_i) = \text{Sup}\left(\mu_i \cdot (lag_i - t_i); 0; \sqrt{v \cdot (t_i - t_s)}\right) \quad [\text{ I } \text{ I } \text{ . } 3 \text{ . } 2]$$

La Figure II.3.9 présente l'évolution des résidus obtenus lors de l'ajustement du modèle [II.3.2] sur un jeu de données. L'hypothèse initiale de constance de la variance des erreurs si le modèle est ajusté sur les valeurs non transformées de $\mu_{\max}lag$ semble acceptable.

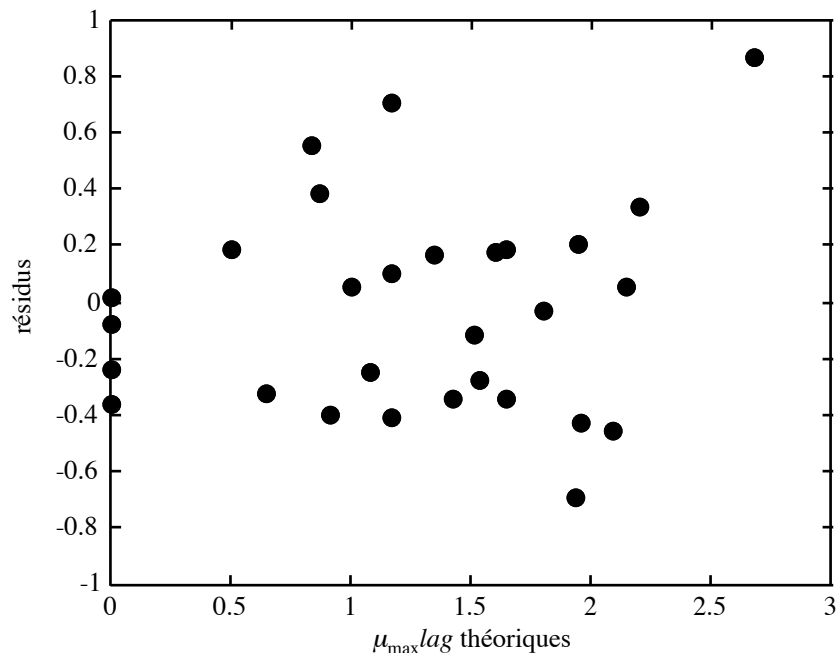


Figure II.3.9 Valeurs des résidus ($\mu_{\max}lag$ observés - $\mu_{\max}lag$ théoriques) en fonction des valeurs théoriques de $\mu_{\max}lag$ obtenues par ajustement du modèle [II.3.2] sur les valeurs observées lors de la croissance de *L. monocytogenes* en bouillon TSYE à 6°C après une pré-incubation en bouillon TSYE à 4.4°C.

Le modèle est donc défini par les paramètres primaires suivants : μ_i , lag_i , ν et t_s . Nous allons donc maintenant nous intéresser à l'évolution de ces paramètres avec la température de pré-incubation.

II.3.B.c. EVOLUTION DES PARAMETRES PRIMAIRES AVEC LA TEMPERATURE DE PRE-INCUBATION DE L'INOCULUM

L'évolution de μ_i et lag_i avec la température est connue et les modèles secondaires classiques peuvent être utilisés (cf. § I.1.B.b).

On observe que ν augmente avec la température de pré-incubation (cf. Figure II.3.8). Nous étudierons donc la relation qui existe entre ν et μ_i . t_s est supposé lié à l'entrée de l'inoculum en phase stationnaire, nous allons donc étudier la relation liant t_s et le moment correspondant à l'entrée en phase stationnaire. Ce moment est arbitrairement défini comme étant l'intersection de la pente de la phase exponentielle et de la droite horizontale correspondant à la concentration maximale (Zwietering *et al.*, 1992a). Nous avons donc :

$$\nu = g_1(\mu_i) \text{ et } t_s = g_2\left(lag_i + \frac{1}{\mu_i} \cdot \ln\left(\frac{x_{\max}}{x_0}\right)\right)$$

g_1 et g_2 modèles secondaires à définir

La Figure II.3.10 présente l'évolution de ν avec μ_i . On observe une bonne corrélation linéaire entre les deux paramètres (coefficient de corrélation linéaire égal à 0.993). Le terme constant de la droite de régression n'étant pas significativement différent de 0, nous considérons que ν est proportionnel à μ_i . On obtient :

$$g_1(\mu_i) = 0.035 \cdot \mu_i$$

La Figure II.3.11 présente l'évolution de t_s avec le moment correspondant à l'entrée en phase stationnaire. On observe également une bonne corrélation linéaire entre les deux paramètres (coefficient de corrélation linéaire égal à 0.970) mais cette fois-ci il n'y a pas proportionnalité entre ces deux temps. En effet, lorsque la température de pré-incubation est élevée, on obtient des valeurs de t_s négatives. Le modèle de régression linéaire suivant est obtenu :

$$g_2\left(lag_i + \frac{1}{\mu_i} \cdot \ln\left(\frac{x_{\max}}{x_0}\right)\right) = -37.4 + 2.70 \cdot \left(lag_i + \frac{1}{\mu_i} \cdot \ln\left(\frac{x_{\max}}{x_0}\right)\right)$$

II.3. Modélisation du temps de latence

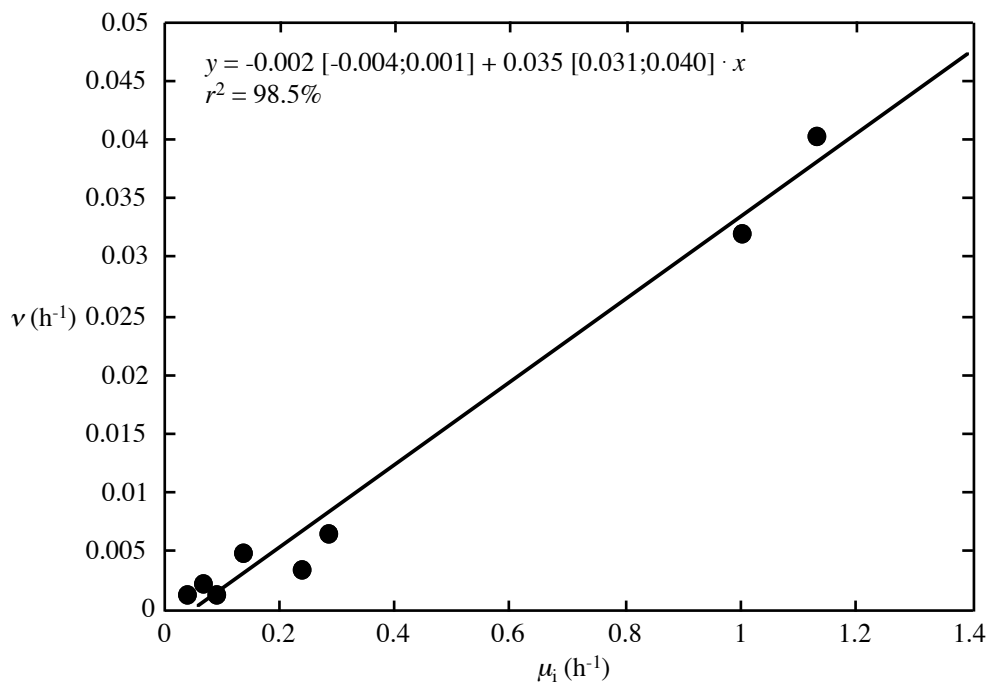


Figure II.3.10 Evolution de ν avec le taux de croissance maximum de l'inoculum μ_i . Les résultats sont obtenus pour la croissance de *L. monocytogenes* en bouillon TSYE à 6°C pour des pré-incubations comprises entre 4.4 et 35.9°C. L'équation et le coefficient de détermination de la droite de régression sont portés sur le graphe. Les valeurs entre crochets correspondent aux intervalles de confiance au niveau 95% pour les estimations des paramètres de la droite de régression.

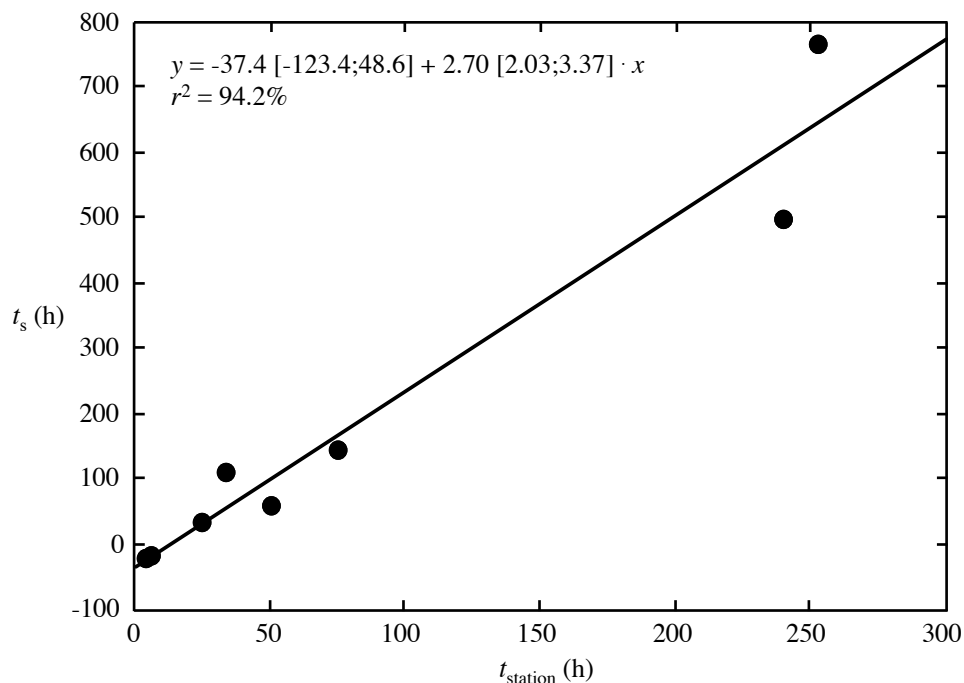


Figure II.3.11 Evolution de t_s avec l'entrée en phase stationnaire de l'inoculum $t_{station}$. Les résultats sont obtenus pour la croissance de *L. monocytogenes* en bouillon TSYE à 6°C pour des pré-incubations comprises entre 4.4 et 35.9°C. L'équation et le coefficient de détermination de la droite de régression sont portés sur le graphe. Les valeurs entre crochets correspondent aux intervalles de confiance au niveau 95% pour les estimations des paramètres de la droite de régression.

L'entité responsable de la division bactérienne ne semble pas corrélée à la biomasse cellulaire pendant la phase stationnaire car bien que la biomasse diminue à sa valeur minimale avant l'entrée en phase stationnaire (Siegele et Kolter, 1992 ; Kolter *et al.*, 1993 ; Hills et Wright, 1994), on observe encore des temps de latence à la re-croissance nuls pour des inoculums en phase stationnaire à basse température. Ceci confirme le fait que le terme "phase stationnaire" est uniquement descriptif et qu'il correspond à une période pendant laquelle la physiologie cellulaire est très hétérogène (Kolter *et al.*, 1993).

II.3.B.d. MODELE GLOBAL D'EVOLUTION DE $\mu_{\max}lag$ AVEC LA DUREE ET LA TEMPERATURE DE PRE-INCUBATION DE L'INOCULUM

Le modèle global permettant de décrire l'effet de l'histoire thermique de l'inoculum sur le produit $\mu_{\max}lag$ lors de la re-croissance s'écrit donc :

$$\begin{cases} \mu_{\max} \cdot lag = \text{Sup}\left(\mu_i \cdot (lag_i - t_i); 0; \sqrt{v \cdot (t_i - t_s)}\right) \\ v = 0.035 \cdot \mu_i \\ t_s = -37.4 + 2.70 \cdot \left(lag_i + \frac{1}{\mu_i} \cdot \ln\left(\frac{x_{\max}}{x_0}\right)\right) \end{cases} \quad [\text{ I I . 3 . 3 }]$$

x_0	concentration bactérienne initiale de l'inoculum
$x_{\max}$	concentration bactérienne maximale de l'inoculum
μ_i et lag_i	taux de croissance maximum et temps de latence de l'inoculum lors d'une pré-incubation à la température T_i
t_i	durée de la pré-incubation

Les ajustements de ce modèle aux jeux de données qui ont permis de le construire sont présentés par la Figure II.3.12. On observe que les courbes théoriques calculées décrivent de façon satisfaisante les valeurs de $\mu_{\max}lag$ observées. Ce modèle permet d'expliquer 50.0% de la variabilité de $\mu_{\max}lag$ et l'erreur moyenne sur le produit $\mu_{\max}lag$ estimé pour les 172 données est de 0.61 (Figure II.3.13). Ceci signifie que les valeurs théoriques sont en moyenne éloignées des valeurs observées de 0.61. Cette valeur semble relativement élevée mais ceci doit être pondéré par le fait que de très fortes erreurs de mesure ont été observées sur les estimations de $\mu_{\max}lag$. Ainsi, l'écart type observé sur 31 estimations de $\mu_{\max}lag$ pour une pré-incubation de 24 h à 30°C est de 0.46.

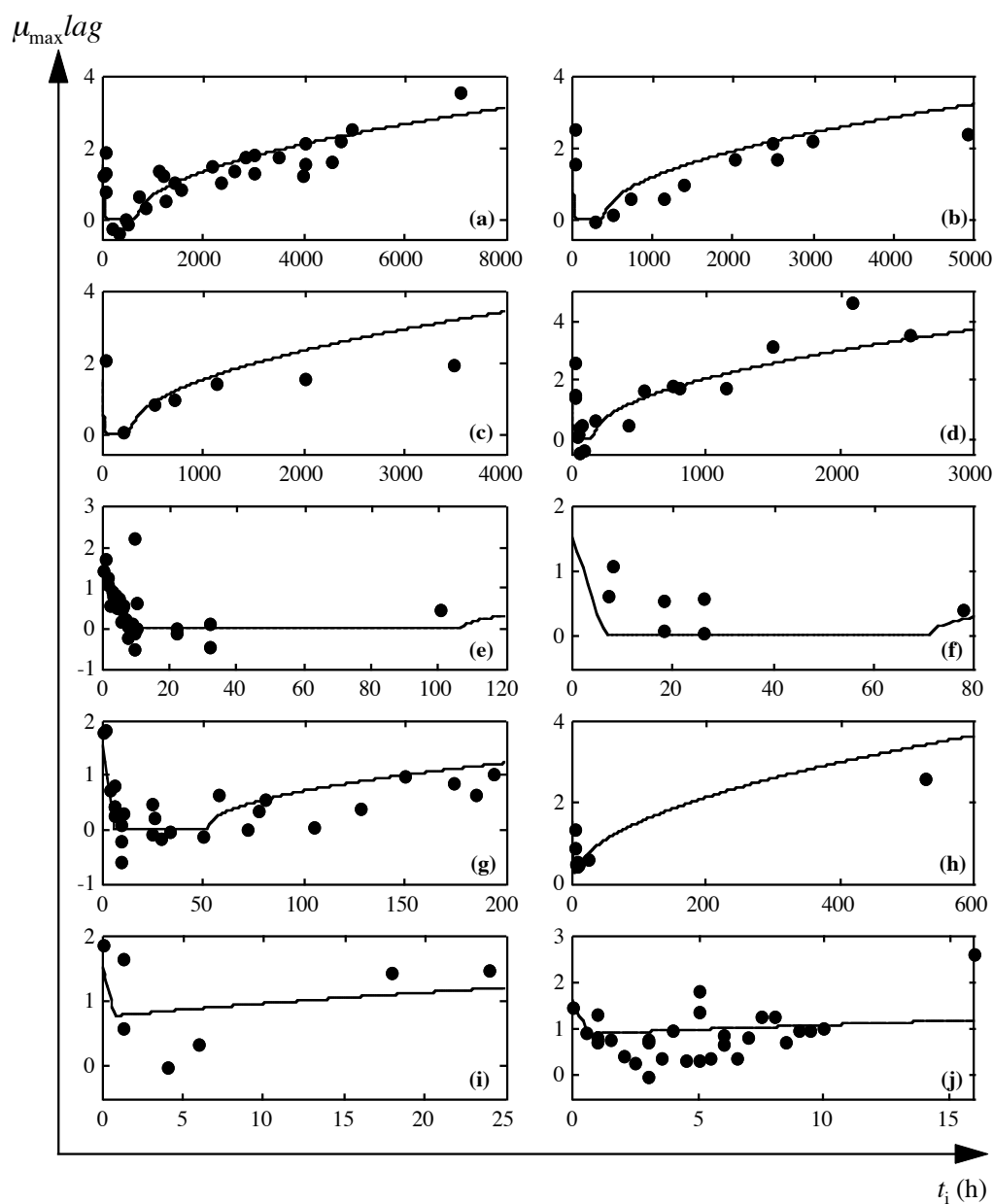


Figure II.3.12 Ajustements du modèle d'évolution du produit $\mu_{\max} \text{lag}$ avec l'histoire thermique de l'inoculum (équation [II.3.3]). les valeurs de $\mu_{\max} \text{lag}$ ont été obtenues lors de la croissance de *L. monocytogenes* en bouillon TSYE à 6°C après des pré-incubations en bouillon TSYE à (a) 4.4°C, (b) 6.3°C, (c) 7.8°C, (d) 10.1°C, (e) 11.9°C, (f) 14.0°C, (g) 15.5°C, (h) 24.0°C, (i) 30.9°C et (j) 35.9°C.

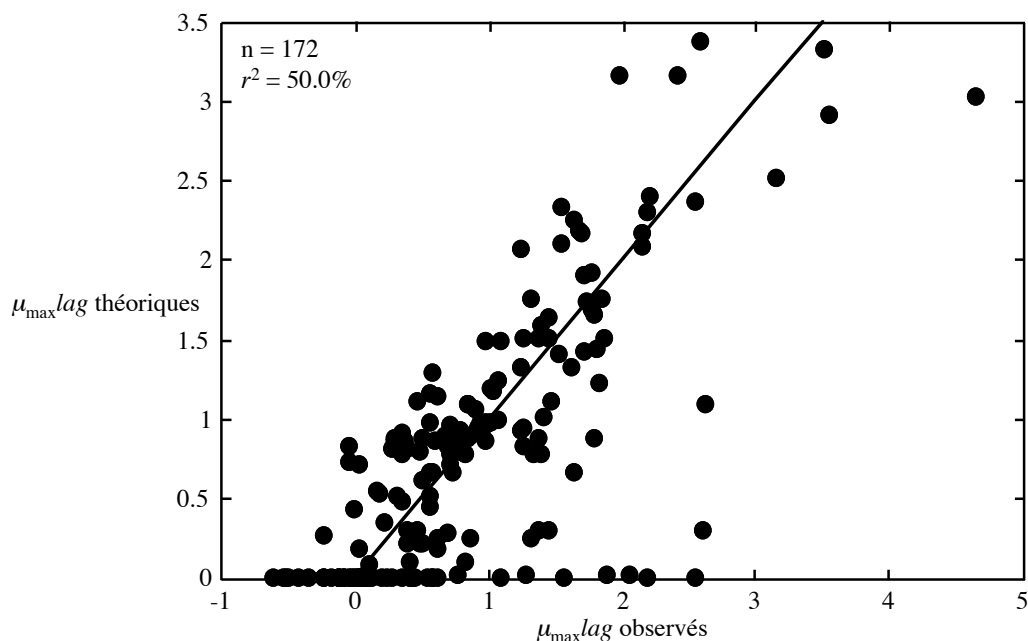


Figure II.3.13 Relation entre les produits $\mu_{\max} \text{lag}$ observés et ceux calculés avec le modèle [II.3.3]. La droite correspond à une adéquation parfaite entre les valeurs calculées et théoriques.

Nous avons ensuite testé la validité de ce modèle pour des conditions différentes : autres souches de *L. monocytogenes*, températures d'incubation plus élevées et milieux de pré-incubation et d'incubation solides.

Les valeurs du produit $\mu_{\max} \text{lag}$ prédites par le modèle pour les souches CLIP 22485, CLIP 19884, 27795 et 925318 lors d'incubations en bouillon TSYE à 6°C sont relativement proches de celles observées (Figure II.3.14). L'erreur moyenne de ces prévisions est de 0.88.

Le modèle prédit également des valeurs de $\mu_{\max} \text{lag}$ proches de celles observées lors d'une incubation en bouillon TSYE à 7.8 et 15.5°C (Figure II.3.14), l'erreur moyenne obtenue est de 0.51.

Par contre, lorsque l'incubation est réalisée sur gélose TSYE, les valeurs de $\mu_{\max} \text{lag}$ prédites par le modèle sont éloignées de celles observées (Figure II.3.14). L'erreur moyenne est alors égale à 1.48.

De même, lorsque la pré-incubation est réalisée sur gélose TSYE, on obtient également des valeurs de $\mu_{\max} \text{lag}$ prédites par le modèle éloignées de celles observées (Figure II.3.14) et l'erreur moyenne est de 1.06.

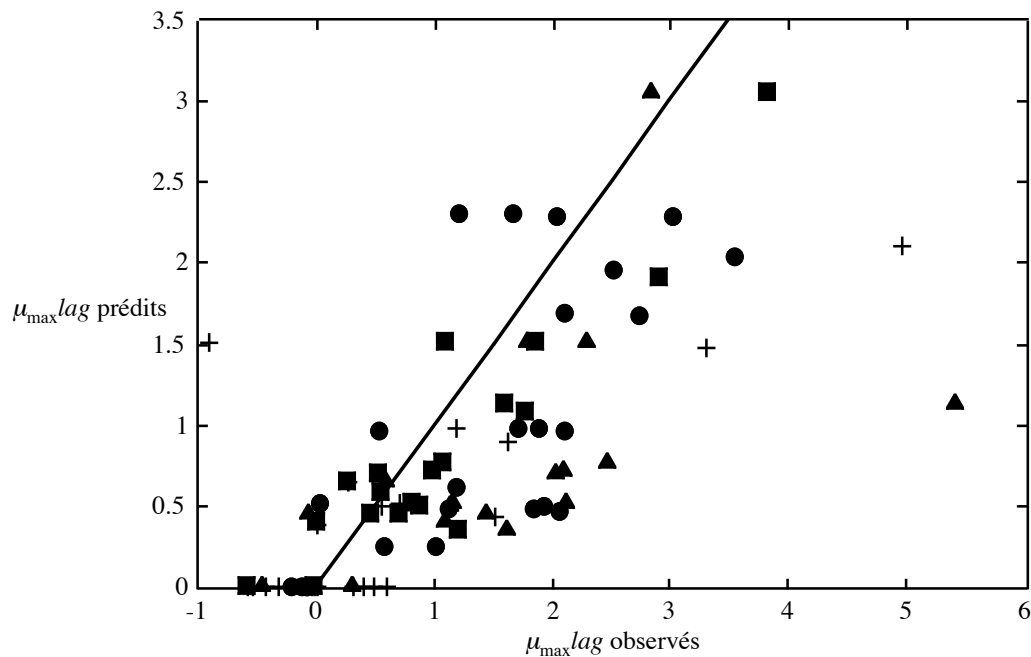


Figure II.3.14 Relation entre les produits $\mu_{\max}lag$ observés et ceux prédits par le modèle [II.3.3]. Les points (●) correspondent à la croissance des souches CLIP 22485, CLIP 19884, 27795 et 925318 de *L. monocytogenes* en bouillon TSYE à 6°C, la pré-incubation étant réalisée en bouillon TSYE à 15.5°C. Les points (■) correspondent à la croissance de la souche Scott A en bouillon TSYE à 7.8 et 15.5°C pour des pré-incubations en bouillon TSYE à respectivement 19.6 et 30.9°C. Les points (▲) correspondent à la croissance de la souche Scott A sur gélose TSYE à 7.8 et 15.5°C pour des pré-incubations en bouillon TSYE à respectivement 19.6 et 30.9°C. Les points (+) correspondent à la croissance de la souche Scott A en bouillon TSYE à 6 et 7.8°C pour des pré-incubations sur gélose TSYE à respectivement 19.6 et 15.5°C. La droite correspond à une adéquation parfaite entre les valeurs calculées et prédites.

Dans les deux derniers cas, le modèle d'évolution du produit $\mu_{\max}lag$ avec la durée de pré-incubation semble adapté mais on observe une augmentation plus rapide que celle prévue par le modèle (Figure II.3.15).

Les résultats obtenus lors d'une pré-incubation sur milieu solide peuvent être expliqués par le fait que l'inoculum croît sous forme de colonies. Or les colonies bactériennes sont caractérisées par une très grande hétérogénéité et l'on sait que les cellules placées au centre de celles-ci se retrouvent très rapidement dans des conditions de stress nutritionnel (McKay *et al.*, 1997).

Les résultats obtenus lors d'une incubation sur milieu solide restent inexplicables.

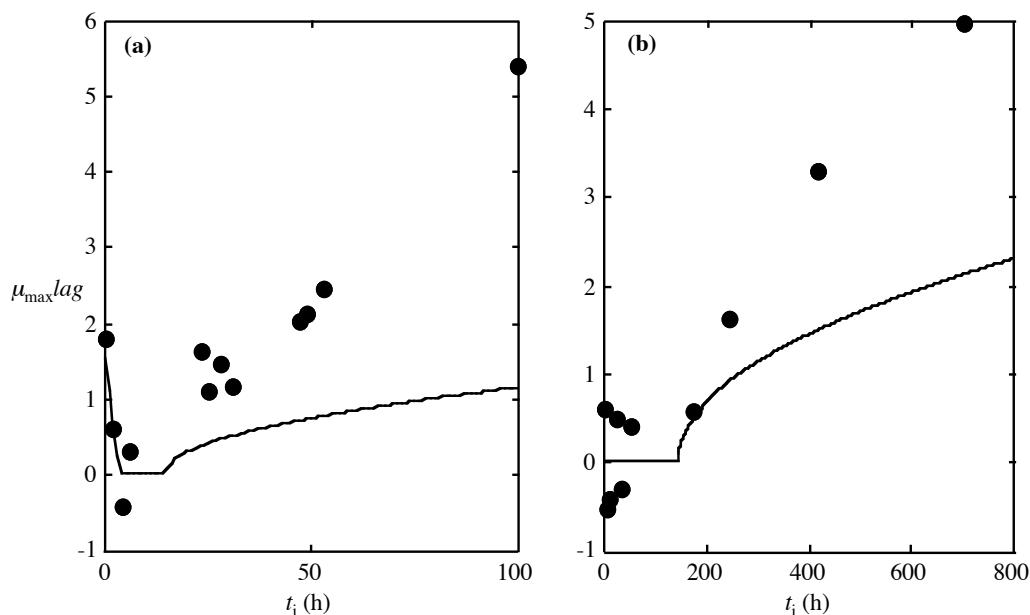


Figure II.3.15 Evolution du produit $\mu_{\max} lag$ lors de la croissance de la souche Scott A de *L. monocytogenes* (a) sur gélose TSYE à 7.8°C en fonction de la durée de pré-incubation en bouillon TSYE à 19.6°C, (b) en bouillon TSYE à 6°C en fonction de la durée de pré-incubation sur gélose TSYE à 15.5°C. Les courbes représentent les évolutions prédites par le modèle [II.3.3].

La validité du modèle proposé a également été testée sur des jeux de données publiés. Lorsque les paramètres permettant d'appliquer le modèle n'étaient pas précisés dans les articles, les valeurs suivantes ont été utilisées :

$x_0 = 10^6$ ufc.ml⁻¹, $x_{\max} = 10^9$ ufc.ml⁻¹, lag_i et μ_i fixés aux valeurs observées ou estimées par ajustement du modèle racine carrée (cf. § I.1.B.b) sur les données obtenues dans nos expérimentations avec la souche Scott A.

Membré *et al.* (1999) n'ont observé aucune latence lorsque des cellules de *L. monocytogenes* sont cultivées à 4 et 7°C pendant respectivement 6 et 4 jours puis transférées dans un milieu frais à 7°C mais un temps de latence de 31 h a pu être observé après une pré-incubation de 20 h à 37°C. Ce temps de latence correspond à $\mu_{\max} lag = 1.86$ en supposant $\mu_{\max} = 0.06$ h⁻¹. Le modèle prédit effectivement aucune latence pour les pré-incubations à 4 et 7°C et il prédit $\mu_{\max} lag = 1.26$ pour la pré-incubation à 37°C.

Le modèle prévoit une évolution du produit $\mu_{\max} lag$ similaire à celle observée par Buchanan et Klawitter (1991) mais les valeurs prédites sont systématiquement inférieures à celles observées (Figure II.3.16). Ce décalage est probablement dû au transfert du milieu de pré-incubation au milieu d'incubation qui induit dans le produit $\mu_{\max} lag$ une composante milieu dépendante. Cette composante est supposée additive.

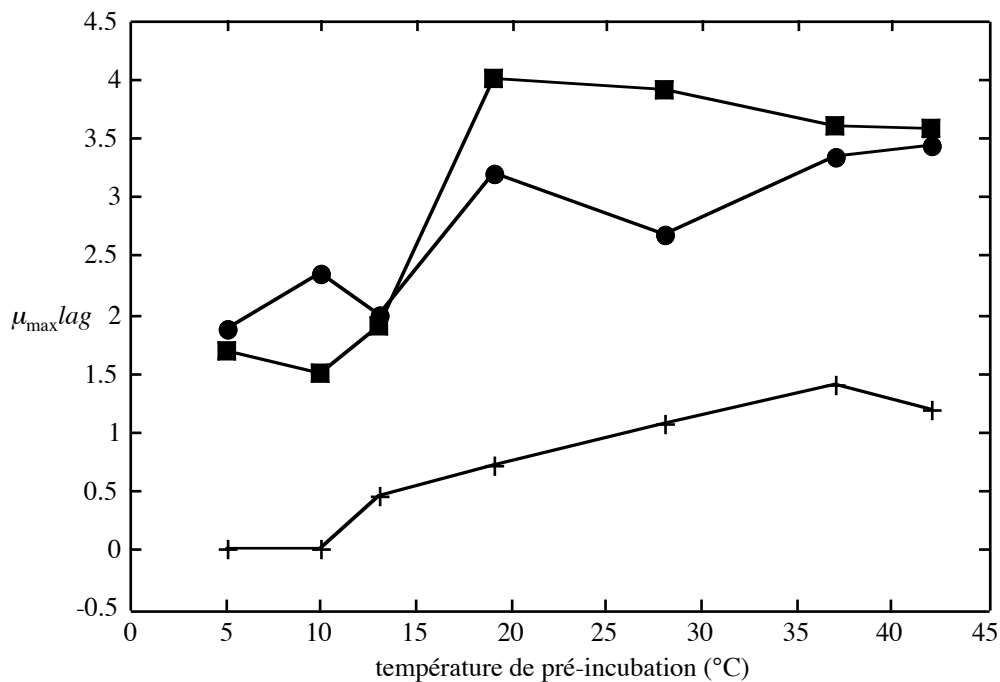


Figure II.3.16 Evolutions observées et prédites de $\mu_{\max} lag$ lors de la croissance de *L. monocytogenes* à 5°C en fonction de la température de pré-incubation. Les points (●) et (■) sont les valeurs obtenues par Buchanan et Klawitter (1991) respectivement en aérobie et anaérobie. Les points (+) sont les valeurs prédites par le modèle [II.3.3]. Les durées de pré-incubation sont 144 h à 5°C, 96 h à 10 et 13°C, 48 h à 19°C et 24 h à 28, 37 et 42°C.

Cette hypothèse est confirmée par les résultats de Walker *et al.* (1990). Le modèle prédit $\mu_{\max} lag = 0$ pour une pré-incubation de 144 h à 4°C alors que les auteurs observent une valeur moyenne pour $\mu_{\max} lag$ de 1.18. Le modèle prédit $\mu_{\max} lag = 1.43$ pour une pré-incubation de 48 h à 30°C, cette augmentation de $\mu_{\max} lag$ de 1.43 entre les deux régimes de pré-incubation est en fait proche de l'augmentation moyenne observée par les auteurs qui est de 1.69. On peut donc supposer que la valeur du produit $\mu_{\max} lag$ observée lors de la pré-incubation à 4°C est uniquement due au changement de milieu.

II.3.B.e. CONSEQUENCES POUR LA PREVISION DES CINETIQUES DE CROISSANCE EN CONDITIONS DE TEMPERATURE VARIABLES

L'évolution du produit $\mu_{\max} lag$ pendant la phase de latence de l'inoculum semble confirmer l'hypothèse selon laquelle lorsque la température d'incubation change pendant la phase de latence, le métabolisme microbien s'adapte de façon instantanée à cette nouvelle température (Li et Torres, 1993 ; Baranyi *et al.*, 1995).

Cette observation justifie la procédure utilisée habituellement pour calculer le temps de latence des cultures bactériennes lorsque la température d'incubation varie. Cette procédure consiste à additionner des fractions du temps de latence pour chaque intervalle temps / température (Smith, 1987 ; Van Impe *et al.*, 1992, 1995 ; Li et Torres, 1993 ; Rosso, 1995 ; Wijtzes *et al.*, 1998). Il faut cependant noter qu'un effet

histoire positif, *i.e.*, temps de latence observés plus faibles que ceux prédits, a pu être observé avec *Pseudomonas fragi* lors de transitions thermiques entre 4 et 16°C (Fu *et al.*, 1991 ; Labuza *et al.*, 1992).

Il est habituellement supposé que le taux de croissance de cultures en phase exponentielle de croissance s'adapte instantanément à un changement de température mais des latences induites par des diminutions brutales de la température ont fréquemment été observées.

Pour des cultures de *Salmonella Typhimurium* en phase exponentielle, Lark et Maaloe (1954) n'ont observé aucune latence lorsque la température passait de 37 à 25°C, par contre, lorsque celle-ci passait de 37 à 13 ou 10°C, une latence était observée. Cette observation a été confirmée avec *Escherichia coli* par Ng *et al.* (1962) et Jones *et al.* (1987) qui ont observé un délai avant la reprise de la croissance lorsque la température d'incubation chutait de 37 à 10°C.

Baranyi *et al.* (1995) n'ont observé aucune latence lorsqu'une culture de *Brochothrix thermosphacta* en phase exponentielle passait brutalement de 17-25°C à 5°C mais ils ont observé une latence significative lorsque la température chutait à 3°C. Li et Torres (1993) n'ont observé aucune latence induite par des fluctuations de température entre 4 et 12°C ou entre 2 et 14°C pour le même germe.

Ces résultats illustrent le fait que l'amplitude de la réponse au choc froid dépend de l'amplitude de la chute de température (Gounot, 1991 ; Berry et Foegeding, 1997). Bien que l'on ait pu observer une réponse au choc froid chez *L. monocytogenes* lors de passages de 37 à 5°C (Bayles *et al.*, 1996) ou encore de 25 à 4°C (Phan-Thanh et Gormon, 1995), l'amplitude induisant une telle réponse chez ce micro-organisme n'est pas connue.

Le modèle proposé permet de décrire la réponse au choc froid puisqu'il prédit des latences non nulles à la re-croissance à 6°C lors de pré-incubations à haute température (*cf.* Figure II.3.11). En effet, lorsque l'entrée en phase stationnaire de l'inoculum est rapide, *i.e.*, températures de pré-incubation élevées, les valeurs de t_s sont négatives et l'augmentation du produit $\mu_{\max}lag$ débute avant la fin de la phase de latence de l'inoculum ce qui fait que l'on n'obtient pas de valeurs nulles pour la phase exponentielle. Cependant, comme l'entrée en phase stationnaire dépend également de la taille initiale de l'inoculum, le modèle peut tout de même théoriquement prédire des latences nulles à la re-croissance pour des concentrations bactériennes initiales de l'inoculum très basses. Le deuxième inconvénient du modèle est qu'il prévoit une latence à la re-croissance lors de pré-incubations à température élevée quelque soit la température de re-croissance, celui-ci permet donc de traduire la réponse au choc froid lors de re-croissances à basse température mais il est inadapté pour la description de la latence à la re-croissance à haute température. Il implique en particulier l'absence de sortie de phase de latence lorsque la température varie dans un domaine proche de 37°C puisque $\mu_{\max}lag$ n'est jamais égal à 0.

Le modèle pourrait donc être amélioré en ajoutant un paramètre permettant de décrire la réponse au choc froid en étudiant la latence à la re-croissance en fonction de deux nouvelles variables : (i) la taille de l'inoculum pour bien dissocier les effets de celle-ci et de la température sur le paramètre t_s ; (ii) la température de re-croissance afin d'évaluer exactement les transitions de températures qui entraînent une réponse

au choc froid. La modélisation de cette réponse au choc froid semble cependant difficile car même lors de pré-incubations à 30.9 et 35.9°C, on a pu observer des temps de latence nuls lors de la re-croissance à 6°C.

Le modèle reste cependant utilisable lorsque la température fluctue dans un domaine proche des températures de réfrigération habituellement utilisées dans l'industrie agro-alimentaire avec des transitions qui n'impliquent pas de choc froid.

II.3.C. IMPORTANCE DE L'EFFET DE LA TAILLE DE L'INOCULUM SUR LE TEMPS DE LATENCE

Nous avons vu que la taille de l'inoculum n'avait pas d'effet sur les paramètres de croissance de *L. monocytogenes* dans les milieux de culture habituellement utilisés pour l'élaboration des modèles (cf. § II.3.A.d) mais que dans des conditions particulières simulant l'affinage de fromage à pâte molle, le temps de latence pouvait être affecté par cette taille d'inoculum (Gay *et al.*, 1996).

Des études avec d'autres germes comme *Bacillus* sp. (Lankford *et al.*, 1966), *Achromobacter delmarvae*, *Micrococcus luteus* (Kaprelyants et Kell, 1996) ou encore *Salmonella* sp. (Stephens *et al.*, 1997) ont montré que la durée de la phase de latence était inversement proportionnelle à la taille de l'inoculum uniquement dans des conditions de croissance très particulières. Cet effet est ainsi observé en milieu pauvre mais non en milieu riche, avec des cellules soumises à un stress nutritionnel (Kaprelyants et Kell, 1996), ou avec des cellules ayant subies un stress thermique (Stephens *et al.*, 1997).

Gay *et al.* (1996) ont également observé une augmentation du temps de latence de *L. monocytogenes* avec un inoculum faible uniquement dans un milieu particulier (bouillon de Richard) dans des conditions de croissance sub-optimales (pH 5.9, 14°C), avec une souche conservée 4 semaines à 4°C et avec un inoculum préparé dans un milieu riche à une température proche de l'optimum (30°C).

II.3.C.a. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Le détail du protocole expérimental est décrit dans : Augustin, J.-C., Brouillaud-Delattre, A., Rosso, L., Carlier, V. Significance of inoculum size on the lag time of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* (accepté).

Nous avons étudié l'influence de la taille de l'inoculum sur la durée de la phase de latence dans des conditions défavorables pour la croissance de *L. monocytogenes* : milieu pauvre, bas pH et basse température. Le milieu utilisé était du tryptone sel TS composé de 1 g.l⁻¹ de bacto-peptone (Difco) et 0.85% de NaCl. Le pH a été ajusté à 6.0 avec du HCl et la température d'incubation était de 6.5°C.

L'inoculum a été cultivé du bouillon TSYE à 30°C pendant des durées variables pour obtenir des cellules dans des états physiologiques différents.

La Figure II.3.17 présente l'évolution de la concentration microbienne d'une culture de *L. monocytogenes* en bouillon TSYE à 30°C. La concentration en cellules viables a été déterminée par dénombrement sur gélose non sélective (TSYE) et sur gélose sélective (Palcam) afin d'évaluer l'état de stress des cellules au cours de la croissance.

Le pourcentage de cellules stressées peut être évalué en utilisant l'équation suivante (Meyer et Donnelly, 1992) :

$$\% \text{ stress} = \left(1 - \frac{\text{dénombrement sur milieu sélectif}}{\text{dénombrement sur milieu non sélectif}} \right) \times 100$$

La phase stationnaire est atteinte après environ 14 h d'incubation. On observe à partir de 50 h d'incubation une perte progressive de la viabilité cellulaire. Cette perte de viabilité est d'environ 99.9% après 840 h d'incubation. A partir de 160 h d'incubation, le pourcentage de cellules stressées varie entre 20 et 75%.

Nous avons utilisé des cultures de (i) 14 h, (ii) 160 h, (iii) 840 h afin d'obtenir des cellules dans les phases suivantes : (i) fin de phase exponentielle ; (ii) phase stationnaire avec légère perte de la viabilité cellulaire ; (iii) phase stationnaire prolongée avec perte de viabilité marquée.

Les cellules ainsi obtenues ont été collectées sur un filtre puis rincées 3 fois afin d'éliminer tout facteur de croissance potentiel. Ces cellules ont ensuite été mises en culture dans du TS à des concentrations initiales comprises entre environ 10⁴ et 10² ufc.ml⁻¹.

II.3. Modélisation du temps de latence

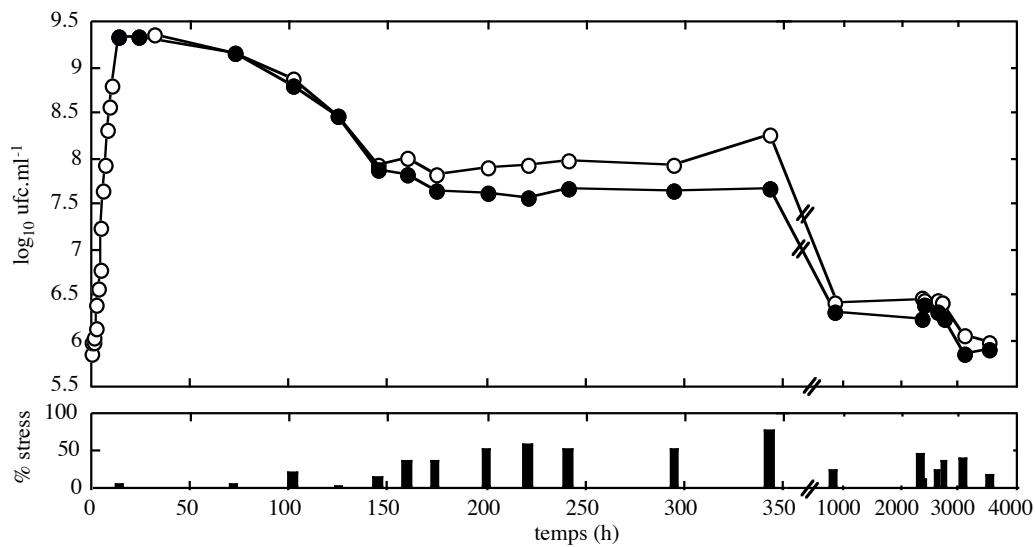


Figure II.3.17 Cinétique d'évolution de la concentration cellulaire et du pourcentage de stress de *L. monocytogenes* lors d'une culture en bouillon TSYE à 30°C. Les points (○) représentent les dénombrements sur gélose non sélective (TSYE) et les points (●) représentent les dénombrements sur gélose sélective (Palcam).

Les paramètres des cinétiques de croissance obtenues ont été estimées par ajustement du modèle logistique avec délai et rupture (équation [I.1.5]).

Les régions de confiance des paramètres ainsi estimés ont été déterminées selon la théorie de Beale (Bates et Watts, 1988 ; Lobry *et al.*, 1991). Les valeurs Θ des paramètres appartenant à la région de confiance de niveau α vérifient l'inéquation de Beale :

$$SCE(\Theta) \leq SCE(\hat{\Theta}) \cdot \left(1 + \frac{p}{n-p} \cdot F_{p, n-p}^{\alpha} \right)$$

- SCE somme des carrés des écarts résiduels (*cf.* § I.2.B)
- Θ vecteur de paramètres appartenant à la région de confiance
- $\hat{\Theta}$ vecteur des paramètres estimés
- p nombre de paramètres
- n nombre de points expérimentaux
- F α -quantile de la distribution de Fisher

Ces valeurs ont été déterminées par tirage aléatoire dans l'espace des paramètres et les intervalles de confiance de niveau 95% des paramètres ont été obtenus en projetant les points obtenus sur les axes des paramètres. Les estimations des paramètres ont été considérées comme significativement différentes lorsque leurs intervalles de confiance ne se chevauchaient pas.

II.3.C.b. EFFET DE LA TAILLE DE L'INOCULUM SUR LA DUREE DE LA PHASE DE LATENCE

Aucune différence significative n'est observée entre les taux de croissance maximum et les temps de latence obtenus avec différentes tailles d'inoculum pour la culture de 14 h à 30°C (Tableau II.3.1).

Etant donné que certaines cinétiques de croissance comportent trop peu de points pour obtenir des estimations fiables des paramètres de croissance, nous avons également comparé les cinétiques obtenues avec les différentes tailles d'inoculum à celles prédites à partir des paramètres estimés sur la cinétique obtenue avec l'inoculum d'environ 10^2 ufc.ml⁻¹ (Figure II.3.18). Les enveloppes de prévision sont compatibles avec les dénombrements observés (Figure II.3.19), la phase de latence n'est pas plus courte lorsque l'inoculum est plus fort, *i.e.*, 10^4 et 10^3 ufc.ml⁻¹, ni elle ne semble plus longue lorsque l'inoculum est plus faible, *i.e.*, 10^1 à 10^{-2} ufc.ml⁻¹.

La fonction logistique avec délai et rupture (équation [I.1.5]) étant monotone en chacun des paramètres, les enveloppes de prévision de niveau 95% ont été construites en cherchant le minimum et le maximum de la fonction lorsque les paramètres vérifient l'inéquation de Beale (Huet *et al.*, 1992).

Des résultats similaires sont obtenus lorsque l'inoculum est pré-incubé 160 h (Tableau II.3.1). Par contre, lorsque la pré-incubation est prolongée pendant 840 h, on observe une augmentation uniforme du temps de latence avec la diminution de la taille de l'inoculum (Tableau II.3.1). Une différence significative entre les temps de latence obtenus avec les inoculums à environ 10^4 ufc.ml⁻¹ et 1 ufc.ml⁻¹ est même observée. On observe également un décalage entre les enveloppes de prévisions obtenues à partir de la cinétique dont la concentration initiale est d'environ 10^4 ufc.ml⁻¹ et les cinétiques réellement observées pour les autres tailles d'inoculum (Figure II.3.20). Le retard à la croissance observé reste cependant très faible.

Tableau II.3.1 Paramètres de croissance obtenus pour des cultures de *L. monocytogenes* en bouillon TS pH 6 à 6.5°C avec différentes tailles d'inoculum et pour des durées de pré-incubation variables.

Durée pré-incubation (h)	$\log_{10} x_0$	<i>lag</i> (h)	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)
14	4.30 [4.22 ; 4.39] ^a	61.6 [28.3 ; 75.8]	0.068 [0.038 ; 0.103]
	3.32 [3.23 ; 3.41]	24.7 [16.9 ; 40.9]	0.040 [0.036 ; 0.048]
	2.38 [2.26 ; 2.47]	32.6 [21.9 ; 43.9]	0.048 [0.045 ; 0.052]
	1.32 [1.20 ; 1.45]	26.6 [8.19 ; 78.7]	0.044 [0.035 ; 0.105]
	0.39 [0.24 ; 0.53]	44.2 [31.6 ; 56.1]	0.057 [0.053 ; 0.062]
	-0.68 [-1.05 ; -0.32]	50.9 [34.0 ; 69.1]	0.055 [0.053 ; 0.057]
	-1.66 [-Inf ^b ; -1.14]	43.6 [-Inf ; 101]	0.046 [0.039 ; 0.055]
160	2.43 [2.32 ; 2.51]	59.3 [50.4 ; 65.9]	0.036 [0.034 ; 0.037]
	1.41 [1.10 ; 1.70]	79.1 [55.6 ; 98.4]	0.037 [0.035 ; 0.040]
	0.54 [0.15 ; 1.00]	93.1 [66.0 ; 126]	0.035 [0.034 ; 0.037]
	-0.41 [-1.08 ; 0.28]	95.1 [47.4 ; 139]	0.037 [0.034 ; 0.039]
	-1.41 [-2.50 ; -0.34]	98.8 [32.9 ; 160]	0.041 [0.038 ; 0.044]
840	4.70 [4.61 ; 4.78]	43.3^c [35.2 ; 51.9]	0.045 [0.041 ; 0.051]
	2.68 [2.64 ; 2.75]	56.8 [50.7 ; 60.7]	0.043 [0.038 ; 0.045]
	0.74 [0.59 ; 0.89]	66.6 [56.7 ; 79.8]	0.046 [0.044 ; 0.049]

^aentre crochets : intervalle de confiance de niveau 95%.^bInf, infini.^cles valeurs en gras sont significativement différentes.

Cet effet de la taille de l'inoculum peut être expliqué par le fait que les cellules présentes initialement entrent plus ou moins rapidement en division (Stephens *et al.*, 1997). On peut imaginer qu'il existe une distribution du temps de latence au sein des cellules de l'inoculum qui fait que lorsque la concentration de l'inoculum est élevée le temps de latence de la culture est dicté par la fraction de cellules présentant le temps de latence le plus court, par contre lorsque l'inoculum est faible, la probabilité pour que l'inoculum contienne des cellules à faible temps de latence diminue et l'on peut donc observer des temps de latence pour la culture plus longs.

Ce phénomène est observé uniquement lorsque les cellules sont fortement stressées. Il n'est pas observé avec les inoculums pré-incubés pendant 14 et 160 h car les populations obtenues dans ces deux cas présentent certainement une plus grande homogénéité physiologique que lorsque la population est soumise à un stress nutritionnel prolongé.

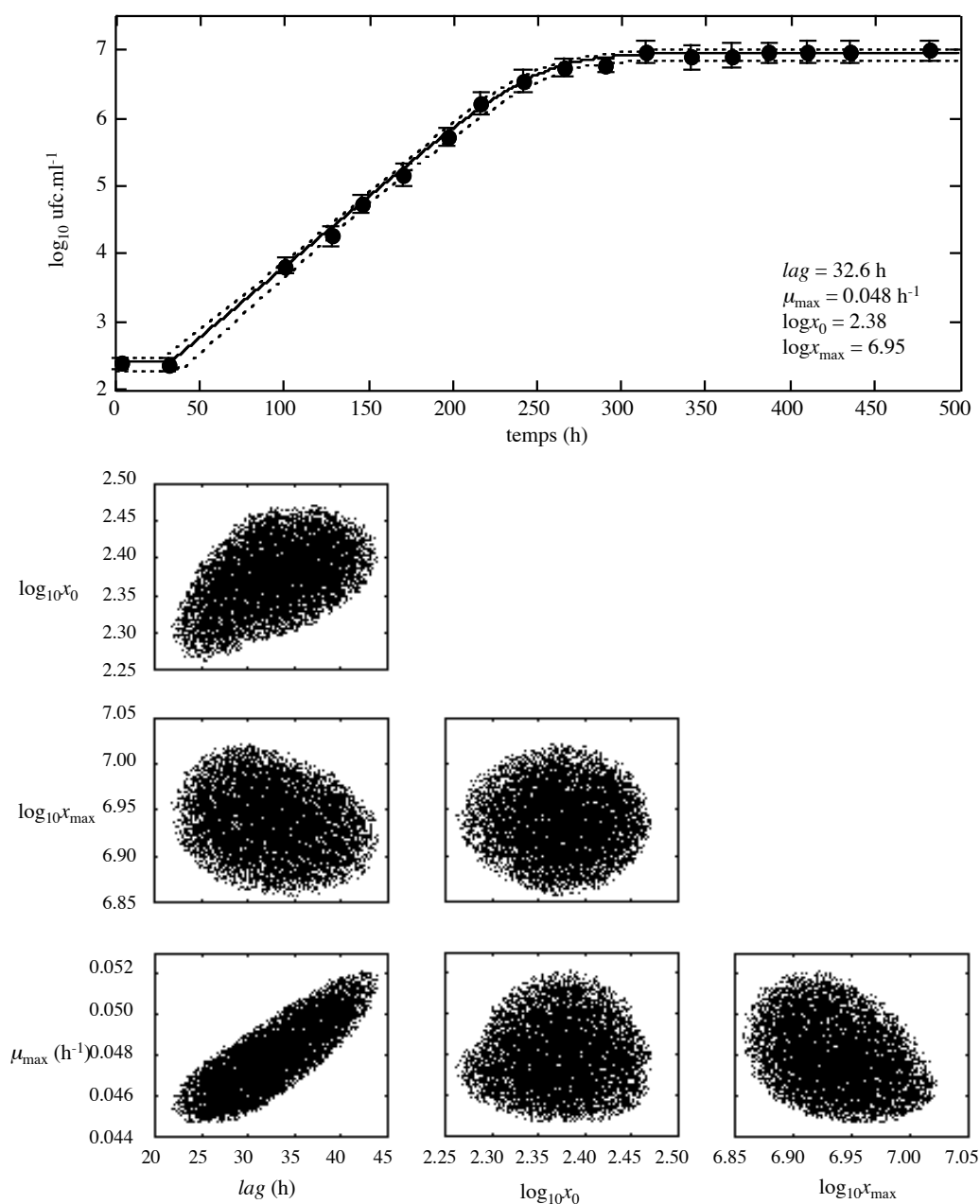


Figure II.3.18 Cinétique de croissance de *L. monocytogenes* cultivée en bouillon TS pH 6 à 6.5°C lorsque l'inoculum est pré-incubé 14 h à 30°C et régions de confiance de niveau 95% des paramètres de croissance estimés. La courbe pleine représente l'ajustement du modèle de croissance et les courbes en pointillés représentent l'enveloppe de confiance de niveau 95% de l'ajustement. Les paramètres de croissance estimés sont portés sur le graphe.

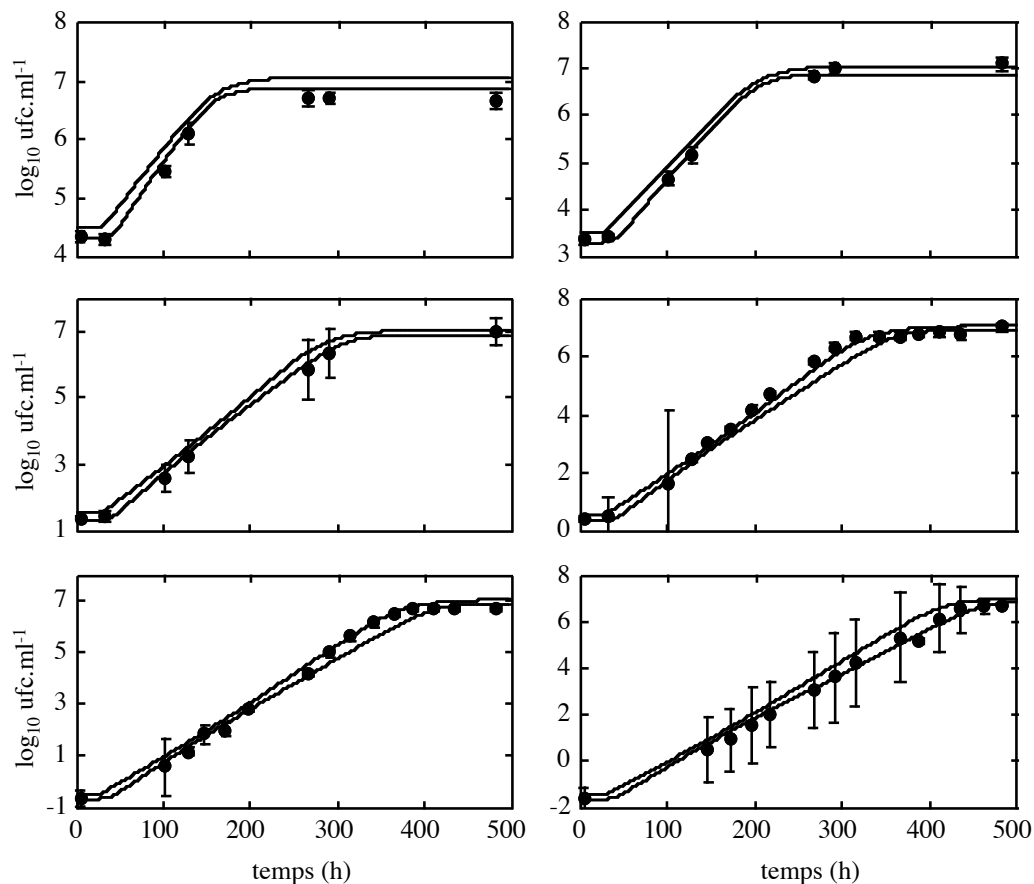


Figure II.3.19 Cinétiques de croissance de *L. monocytogenes* en bouillon TS pH 6 à 6.5°C observées (●) avec différentes tailles d'un inoculum pré-incubé 14 h à 30°C et enveloppes de prévision de niveau 95% (courbes pleines) obtenues à partir de l'ajustement de la cinétique obtenue avec l'inoculum d'environ 10^2 ufc.ml⁻¹.

Prenons, par exemple, le cas d'une distribution discrète avec une population cellulaire composée de trois sous-populations : (i) 99.899% de cellules incapables de se diviser ($lag = \infty$) ; (ii) 0.1% de cellules entrant en division après une latence de 300 h ; (iii) 0.001% de cellules entrant immédiatement en division ($lag = 0$). Des suspensions contenant 10^4 et 10^2 ufc.ml⁻¹ sont préparées en diluant 1 ml de suspensions contenant respectivement 10^6 et 10^4 ufc.ml⁻¹ de la population décrite plus haut dans 99 ml de milieu. La suspension à 10^4 ufc.ml⁻¹ contiendra donc environ 10 cellules dont la latence est nulle, on observera donc un temps de latence d'environ 250 h pour cette suspension (Figure II.3.20). Comme la probabilité d'obtenir au moins 1 cellule de la sous-population minoritaire (iii) dans 1 ml est de 0.095 (en supposant une distribution de Poisson), la plupart du temps, *i.e.*, 9 fois sur 10, le temps de latence de la suspension à 10^2 ufc.ml⁻¹ sera dicté par les 10 cellules ayant une latence de 300 h. Le temps de latence de la culture sera donc dans ce cas là d'environ 450 h (Figure II.3.21).

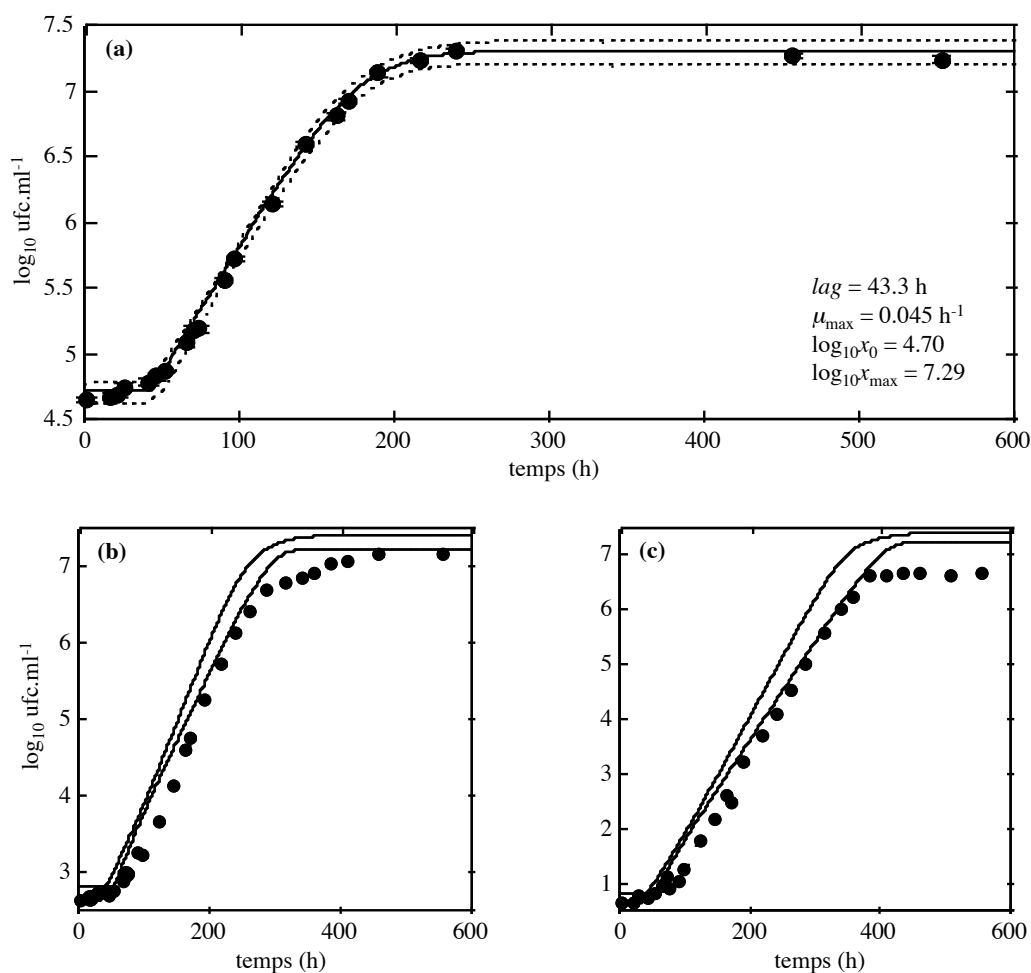


Figure II.3.20 Cinétiques de croissance de *L. monocytogenes* en bouillon TS pH 6 à 6.5°C lors d'une pré-incubation de 840 h à 30°C. Le graphe (a) présente l'ajustement de la cinétique obtenue avec le plus fort inoculum. Les graphes (b) et (c) présentent les cinétiques observées (●) avec des inoculums plus faibles et les enveloppes de prévision de niveau 95% (courbes pleines) obtenues à partir de l'ajustement présenté par le graphe (a).

La taille de l'inoculum ne semble donc pas avoir d'influence significative sur les paramètres de croissance par contre il semble nécessaire de développer des approches stochastiques pour prévoir le comportement de contaminations initiales faibles (Baranyi, 1997, 1998 ; Baranyi et Pin, 1999). Le développement de telles approches nécessite l'étude de la distribution du temps de latence au sein d'une population microbienne et l'étude de l'évolution de cette distribution lorsque les inoculums subissent des stress.

II.3. Modélisation du temps de latence

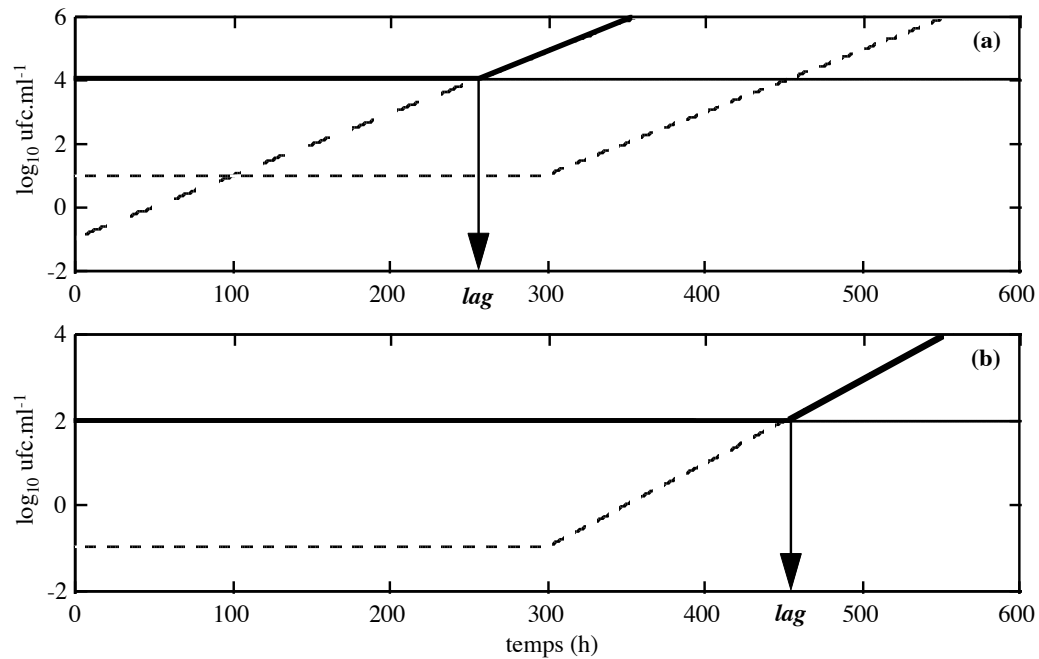


Figure II.3.21 Simulations de cinétiques de croissance (traits pleins en gras) de dilutions au 1/100ème de suspensions bactériennes constituées de 99.899% de cellules au repos (traits pleins), de 0.1% de cellules entrant en division après une latence de 300 h (traits en pointillés serrés) et de 0.001% de cellules qui entrent immédiatement en division (traits en pointillés espacés). Les simulations sont réalisées pour des suspensions contenant (a) 10^6 et (b) 10^4 cellules par ml.

Nous avons appliqué le modèle développé pour décrire l'influence de l'histoire thermique sur le produit $\mu_{\max} \text{lag}$ aux paramètres de la banque de données sur *L. monocytogenes*. Le modèle [II.3.3] a été légèrement modifié pour prendre en compte l'influence du changement de milieu :

$$\begin{cases} \mu_{\max} \text{lag} = K_0 + \text{Sup}\left(\mu_i \cdot (\text{lag}_i - t_i); 0; \sqrt{\nu \cdot (t_i - t_s)}\right) \\ \nu = 0.035 \cdot \mu_i \\ t_s = -37.4 + 2.70 \cdot \left(\text{lag}_i + \frac{1}{\mu_i} \cdot \ln\left(\frac{x_{\max}}{x_0}\right)\right) \end{cases} \quad [\text{II.3.4}]$$

K_0	constante liée au transfert du milieu de pré-incubation au milieu d'incubation
x_0	concentration bactérienne initiale de l'inoculum
$x_{\max}$	concentration bactérienne maximale de l'inoculum
μ_i et lag_i	taux de croissance maximum et temps de latence de l'inoculum lors d'une pré-incubation à la température T_i
t_i	durée de la pré-incubation

Pour estimer μ_i , nous avons supposé que les inoculums ont tous été préparés dans des conditions optimales de croissance et que la seule variable est la température, on a donc : $\mu_i = \mu_{\text{opt}} \cdot \tau(T, T_{\text{card}})$, μ_{opt} et T_{card} étant connus (cf. § II.1.C.b). Pour estimer lag_i , nous avons supposé que les pré-inoculums ont été obtenus par culture à 35°C pendant 24 h (conditions de pré-incubation les plus utilisées avec un pourcentage observé de 27%). Nous avons donc estimé la valeur de $\mu_{\max} \text{lag}$ avec les données de croissance obtenues lorsque l'inoculum est pré-incubé 24 h à 35°C. La valeur médiane obtenue est de 2.67. On a donc $\text{lag}_i = 2.67 / \mu_i$.

Pour x_0 et $x_{\max}$, nous avons arbitrairement pris 10^6 et 10^9 ufc.ml⁻¹.

K_0 a été estimé en appliquant le modèle [II.3.4] avec le paramétrage ci-dessus à l'ensemble de la banque de données. Nous obtenons une valeur médiane de 1.17.

Les temps de latence ont donc été calculés grâce au modèle secondaire avec interactions (équation [II.1.5]) complété du modèle [II.3.4]. La variabilité de $\ln \text{lag}$ expliquée passe alors de 28.3% (cf. § II.1.D.b) à 30.8%.

Ce gain est faible mais il faut bien souligner que les paramètres ont été estimés de façon grossière alors que cette estimation devrait se faire au cas par cas et que de plus, les conditions pré-incubatoires rencontrées pour la banque de données sont très homogènes.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le modèle secondaire proposé (Tableau c.1) permet de décrire l'effet de nombreux facteurs environnementaux et de leurs interactions (équation [II.1.5]) sur le taux de croissance maximum et le temps de latence de *L. monocytogenes* et de plus, il intègre l'effet de la température et de la durée de pré-incubation sur le temps de latence (équation [II.3.4]). L'utilisation du modèle est résumée par la Figure c.1.

L'atout majeur de ce modèle tient au fait que celui-ci n'utilise que des paramètres de signification biologique (sauf pour les facteurs qualitatifs pour lesquels nous utilisons des coefficients multiplicatifs) qui sont les valeurs cardinales du micro-organisme et les concentrations minimales inhibitrices des substances inhibitrices vis-à-vis de ce micro-organisme.

Dans cette étude, nous avons appliqué ce modèle à *L. monocytogenes* mais il est tout à fait envisageable de l'utiliser pour d'autres micro-organismes en employant des paramétrages spécifiques des micro-organismes envisagés.

De plus, ce modèle est évolutif puisque l'on peut enrichir le paramétrage pour, d'une part, avoir une meilleure estimation des paramètres biologiques (compléments bibliographiques ou expérimentaux) et, d'autre part, inclure l'effet de nouvelles substances inhibitrices au travers de leur concentrations minimales inhibitrices.

Ce modèle présente cependant plusieurs carences qui font que dans l'état actuel, il n'est pas applicable à l'ensemble des situations rencontrées en microbiologie des aliments. Il ne prend pas en compte en particulier un éventuel effet souche sur le paramétrage, l'influence des stress physiques et chimiques sur le temps de latence à la croissance ne sont pas inclus (sauf le stress thermique chaud avec le modèle développé par Bréand *et al.* (1999)) et enfin le modèle primaire déterministe utilisé n'est peut-être pas adapté lors de contaminations faibles.

Tableau c.1. Modèle secondaire développé dans l'étude.

Modèle secondaire	$\begin{cases} \sqrt{\mu_{\max}} = g(e, \Theta) + \varepsilon \\ \mu_{\max} \cdot lag = h(t_i, T_i) + \varepsilon' \end{cases}$
éq. [II.1.5]	$g(e, \Theta) = \sqrt{\mu_{\text{opt}} \cdot \tau(T) \cdot \rho(pH) \cdot \alpha(aw) \cdot \prod_{i=1}^n \gamma(c_i) \cdot \prod_{j=1}^p k_{j1}}$
	$\begin{aligned} \tau &= CM_2 \\ \rho &= CM_1 \\ \alpha &= CM_2 \end{aligned}$
	$\gamma(c_i) = \begin{cases} (1 - c_i / CMI_i)^2 & , c_i < CMI_i \\ 0 & , c_i \geq CMI_i \end{cases}$
	$X_{\min} = X_{\text{opt}} - (X_{\text{opt}} - X_{\min}^{\circ}) \cdot \left(\prod_{i=1}^n (1 - c_i / CMI_i^{\circ}) - \left[\frac{(Y_{\text{opt}} - Y)}{(Y_{\text{opt}} - Y_{\min}^{\circ})} \right]^3 - \left[\frac{(Z_{\text{opt}} - Z)}{(Z_{\text{opt}} - Z_{\min}^{\circ})} \right]^3 \right)^{\frac{1}{3}}$
	$CMI_i = CMI_i^{\circ} \cdot \left(1 - \frac{\left[\frac{(T_{\text{opt}} - T)}{(T_{\text{opt}} - T_{\min}^{\circ})} \right]^3 + \left[\frac{(pH_{\text{opt}} - pH)}{(pH_{\text{opt}} - pH_{\min}^{\circ})} \right]^3 + \left[\frac{(aw_{\text{opt}} - aw)}{(aw_{\text{opt}} - aw_{\min}^{\circ})} \right]^3}{\prod_{j \neq i} (1 - c_j / CMI_j^{\circ})} \right)$
éq. [II.3.4]	$h(t_i) = K_0 + \text{Sup} \left(\mu_i \cdot (lag_i - t_i); 0; \sqrt{\nu \cdot (t_i - t_s)} \right)$
	$\begin{aligned} \nu &= 0.035 \cdot \mu_i \\ t_s &= -37.4 + 2.70 \cdot \left(lag_i + \frac{1}{\mu_i} \cdot \ln \left(\frac{x_{\max}}{x_0} \right) \right) \end{aligned}$

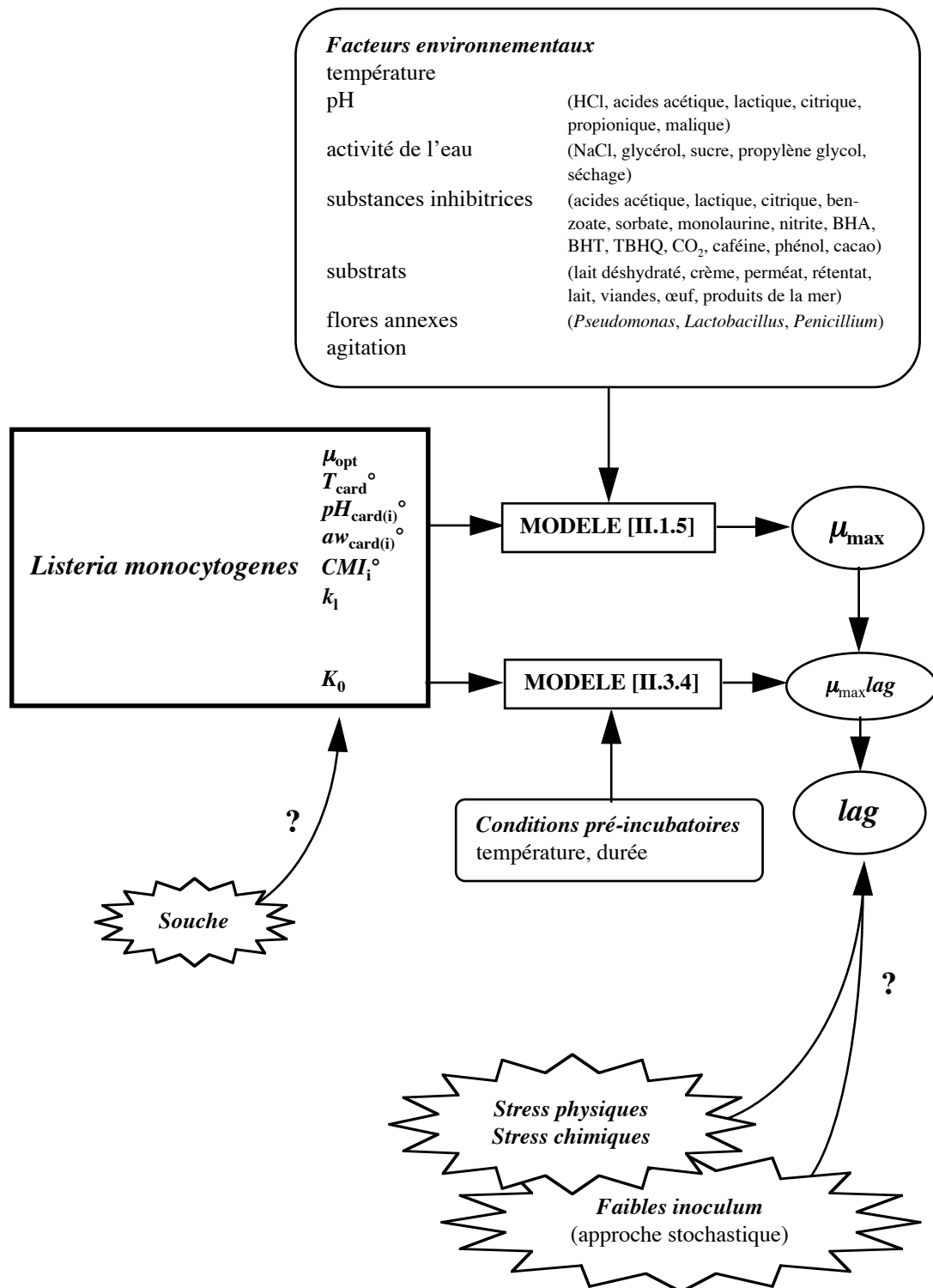


Figure c.1 Utilisation du modèle secondaire proposé pour prévoir le taux de croissance maximum et le temps de latence de *L. monocytogenes* dans les aliments.

Malgré ces lacunes, nous avons évalué les performances du modèle en situation de prévision, c'est à dire en comparant les prévisions obtenues avec le modèle (équations [II.1.5] et [II.3.4]) à des cinétiques de croissance de populations de *L. monocytogenes* observées et non utilisées lors de l'élaboration du modèle (Figure c.2).

Mise à part la concentration bactérienne maximale que nous avons fixée à 10^9 ufc.g⁻¹ (ml⁻¹), les résultats prédits pour les temps de latence et les taux de croissance maximum semblent globalement cohérents avec les cinétiques observées. Le modèle de croissance développé dans cette étude paraît donc adapté à la prévision de la croissance de *L. monocytogenes* dans des conditions très variées.

Malgré cette bonne adéquation globale, quelques déviations importantes sont observées :

- (i) sur la Figure c.2.d, la croissance observée sur du saumon fumé est beaucoup plus rapide que celle prédite, ce phénomène n'est certainement pas à mettre en relation avec le substrat puisque les prévisions dans le saumon fumé de la Figure c.2.c sont compatibles avec les données observées. La croissance "anormalement" rapide (par rapport aux prévisions) observée sur la Figure c.2.d est peut être due à l'utilisation par les auteurs d'un mélange de 6 souches isolées de saumon cru salé et donc parfaitement adaptées au substrat utilisé ;
- (ii) sur la Figure c.2.h, la croissance observée est également plus rapide que celle prédite surtout du fait semble-t-il d'une surestimation dans la prévision du temps de latence ;
- (iii) enfin sur la Figure c.2.k, une assez bonne adéquation est observée entre les prévisions et les observations à 0°C pH 6.1 et 5.3°C pH 5.55, par contre la croissance semble débuter après une phase de latence de 7-8 semaines à 0°C pH 5.6 alors que le modèle ne prévoit pas de croissance. Cette sous-estimation de la croissance est certainement liée à une surestimation de l'interaction entre la température et le pH.

Les limitations du modèle ouvrent plusieurs perspectives d'amélioration qui sont nécessaires pour pouvoir utiliser ce modèle de façon fiable lors de la quantification de la croissance de *L. monocytogenes* dans les aliments.

Les améliorations envisagées doivent être effectuées à quatre niveaux :

- (i) optimiser les capacités descriptives de certains modèles secondaires ;
- (ii) caractériser la variabilité biologique des paramètres du modèle ;
- (iii) compléter le modèle avec une approche stochastique ;
- (iv) inclure les effets des stress physiques et chimiques sur le temps de latence à la croissance.

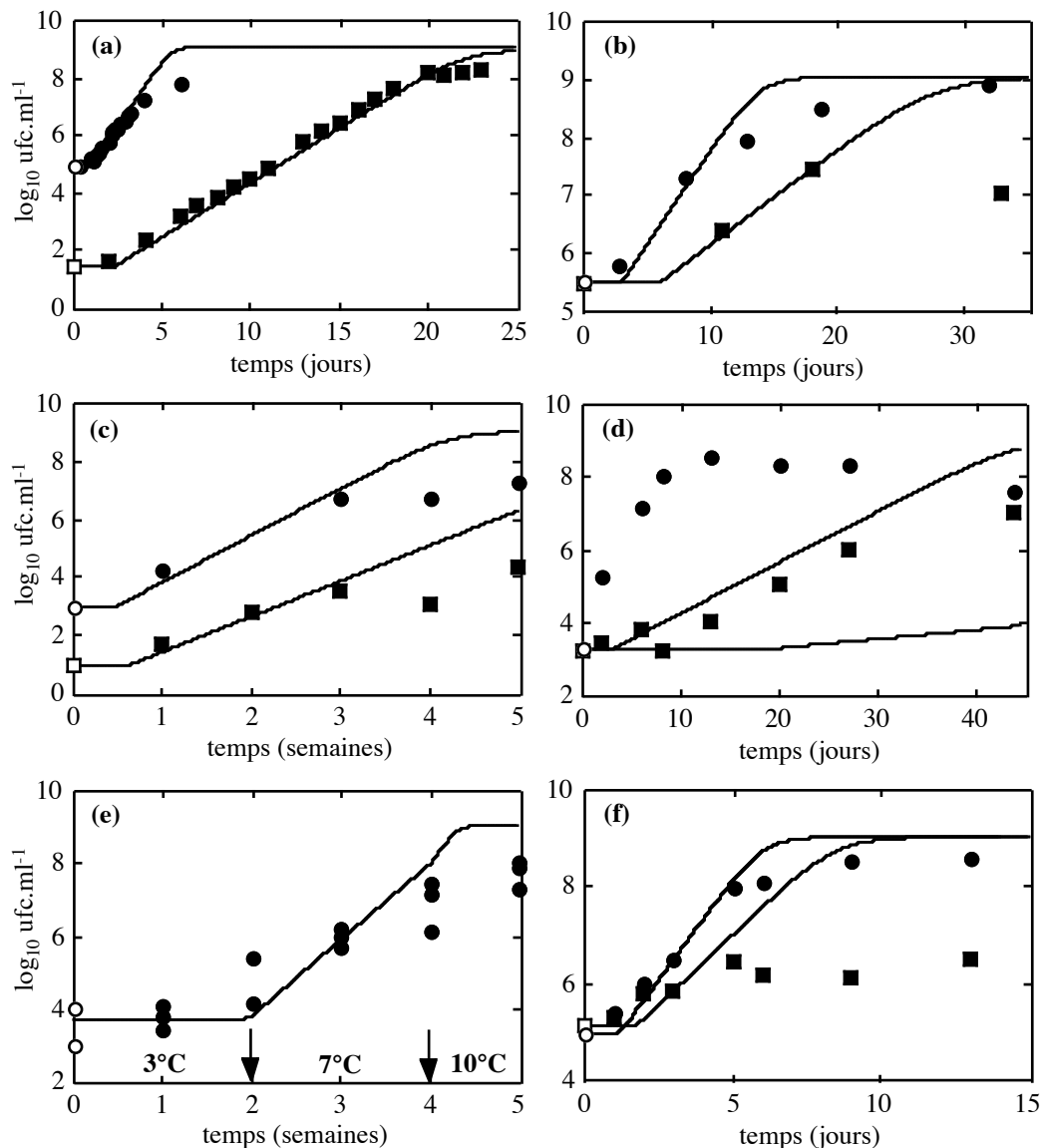


Figure c.2 Cinétiques de croissance observées et prédites pour *L. monocytogenes* dans différentes denrées alimentaires. Les points représentent les concentrations microbiennes observées. Les courbes sont les cinétiques prédites à l'aide des modèles [II.1.5] et [II.3.4] en prenant comme concentrations initiales les concentrations initiales observées (○).

La figure (a) représente la croissance de la souche Scott A dans du lait UHT demi-écrémé à (■) 4°C et (●) 8°C (données fournies par Dr. Agnès Brouillaud-Delattre).

La figure (b) représente la croissance de la souche Scott A à 4°C (■) dans du Camembert et (●) dans du lait écrémé (données issues de Larson *et al.*, 1996).

La figure (c) représente la croissance d'un mélange de 3 souches à 4°C sur du saumon fumé sous vide (■) avec et (●) sans flore lactique (données issues de Rørvik *et al.*, 1991).

La figure (d) représente la croissance d'un mélange de 6 souches à 5°C sur du saumon fumé (■) sous mélange CO₂/N₂ de 70%/30% et (●) sous vide (données issues de Nilsson *et al.*, 1997).

La figure (e) représente la croissance de la souche Scott A sur du rosbif conservé 2 semaines à 2-4°C, 2 semaines à 7°C puis 1 semaine à 10°C (données issues de Stillmunkes *et al.*, 1993).

La figure (f) représente la croissance de la souche 17a à 8°C dans de la viande hachée (■) en présence et (●) en l'absence de *Lactobacillus sake* (données issues de Schillinger *et al.*, 1991).

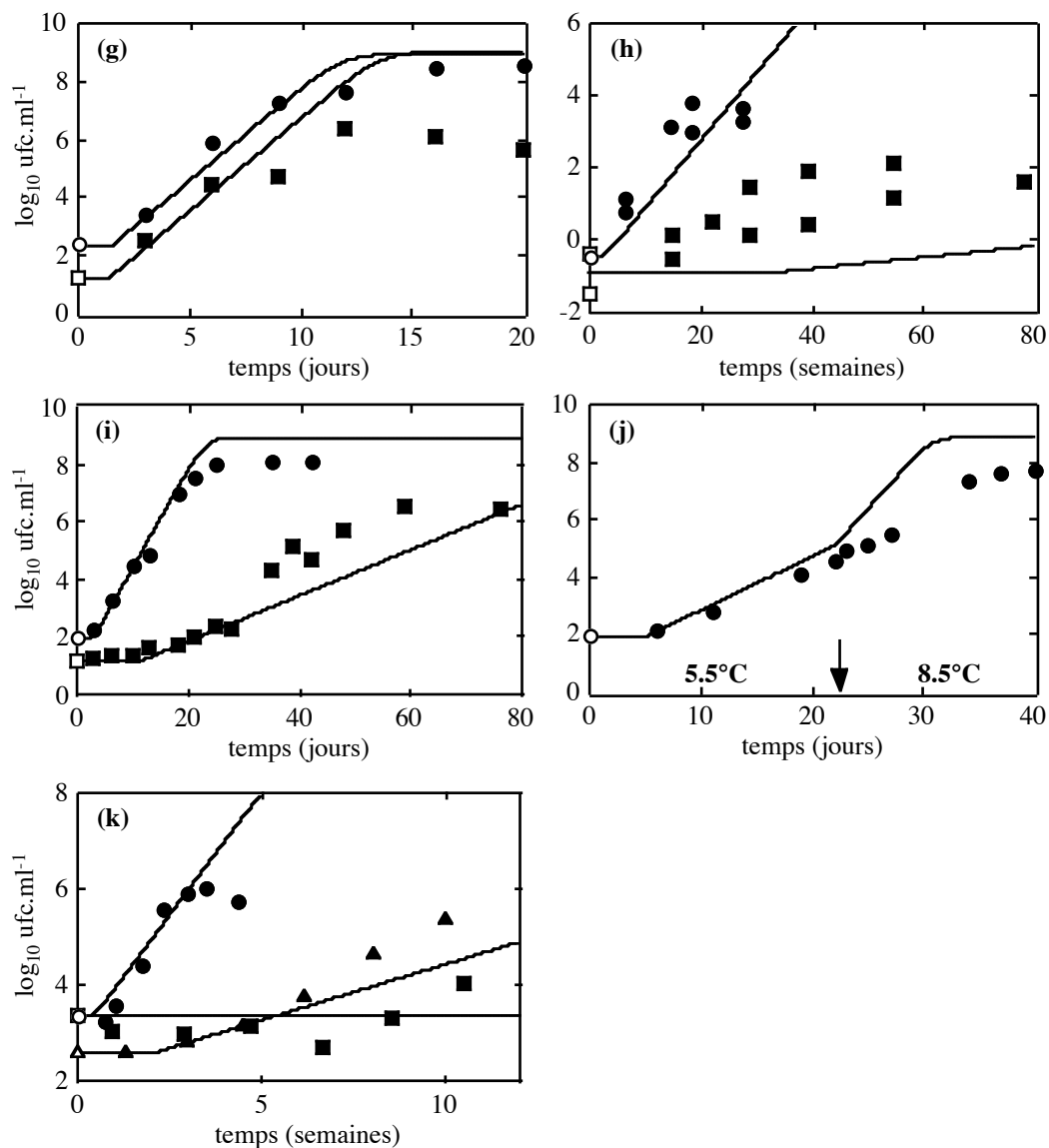


Figure c.2 suite.

La figure (g) représente la croissance de la souche CLIP 22485 à 9°C sur du jambon cuit tranché sous atmosphère modifiée (données personnelles non publiées).

La figure (h) représente la croissance de la souche Murray B sur du corned-beef sous vide à (■) 0.1°C et (●) 4.8°C (données issues de Grau et Vanderlinde, 1992).

La figure (i) représente la croissance d'un mélange de 5 souches sur de la saucisse de Strasbourg sous vide à (■) 3.5°C et (●) 7.5°C (données personnelles non publiées).

La figure (j) représente la croissance d'un mélange de 5 souches sur de la saucisse de Strasbourg sous vide conservée 22 jours à 5.5°C puis 18 jours à 8.5°C (données personnelles non publiées).

La figure (k) représente la croissance de la souche Murray B sur du maigre de boeuf sous vide à (■) 0°C pH 5.6, (▲) 0°C pH 6.1 et (●) 5.3°C pH 5.55 (données issues de Grau et Vanderlinde, 1990).

PERSPECTIVE 1 : OPTIMISATION DES MODELES SECONDAIRES DECRIVANT L'INFLUENCE DES SUBSTANCES INHIBITRICES ET LES INTERACTIONS ENTRE FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX

Le modèle de type racine carrée proposé (équation [I.3.1]) pour décrire l'effet des substances inhibitrices sur le taux de croissance maximum et celui proposé pour décrire les interactions entre facteurs écologiques (équation [II.1.4]) sont globalement satisfaisants. Des optimisations sont cependant envisageables afin d'améliorer les qualités descriptives de ces deux modèles.

Le modèle de description de l'effet des substances inhibitrices suivant pourrait être étudié, il permet d'inclure un paramètre de forme α qui n'est pas forcément égal à 2 comme dans le modèle racine carrée et dont la valeur peut éventuellement varier en fonction de la substance inhibitrice :

$$\mu_{\max} = \mu_{\text{opt}(c)} \cdot \gamma(c)$$

$$\gamma(c) = \begin{cases} (1 - c/CMI)^\alpha & , c < CMI \\ 0 & , c \geq CMI \end{cases}$$

CMI	concentration minimale inhibitrice
α	paramètre de forme dépendant de la substance inhibitrice ($\in \mathfrak{R}$)
$\mu_{\text{opt}(c)}$	valeur optimale de $\mu_{\max}$ lorsque la concentration en substance inhibitrice, c , est égale à 0

De même, pour prendre en compte les interactions entre facteurs environnementaux, des paramètres de forme α , β , χ , et δ_i spécifiques des facteurs environnementaux peuvent être envisagés pour aboutir à l'équation suivante décrivant la frontière entre les zones de croissance et de non croissance :

$$\left[\frac{(T_{\text{opt}} - T)}{(T_{\text{opt}} - T_{\min}^{\circ})} \right]^\alpha + \left[\frac{(pH_{\text{opt}} - pH)}{(pH_{\text{opt}} - pH_{\min}^{\circ})} \right]^\beta + \left[\frac{(aw_{\text{opt}} - aw)}{(aw_{\text{opt}} - aw_{\min}^{\circ})} \right]^\chi = \prod_{i=1}^n (1 - c_i / CMI_i^{\circ})^{\delta_i}$$

$$(\alpha, \beta, \chi, \delta_i) \in \mathfrak{R}^{n+3}$$

PERSPECTIVE 2 : PRISE EN COMPTE DE LA VARIABILITE BIOLOGIQUE DES PARAMETRES DU MODELE

Les prévisions présentées par la Figure c.2 ont été réalisées à partir des valeurs médianes des estimations des paramètres. Une approche plus réaliste consisterait à prévoir non pas une unique cinétique de croissance mais plutôt une bande de prévision pour un niveau de confiance donné et ceci en prenant en compte la variabilité des paramètres du modèle.

Cette prise en compte de la variabilité biologique des paramètres est essentielle en microbiologie prévisionnelle et plus particulièrement pour son utilisation en évaluation quantitative des risques comme cela a été souligné par Delignette-Muller et Rosso (1998, 1999).

Le modèle secondaire proposé se prête parfaitement à une telle approche du fait de la signification biologique de tous les paramètres utilisés et de l'absence de corrélation structurelle entre ces paramètres (Rosso *et al.*, 1993, 1995).

Il est donc nécessaire de caractériser les distributions de probabilité des paramètres. De plus, bien que les résultats obtenus dans l'étude n'indiquent pas d'effet souche significatif, ces distributions doivent être représentatives de la variabilité biologique existant sur le terrain. Par exemple, la banque de données utilisée dans notre étude doit être enrichie car elle est constituée pour moitié de résultats obtenus avec les souches Scott A et V7 qui n'ont pas forcément des comportements similaires à ceux des souches de terrain.

Il pourrait également être envisagé de compléter cette caractérisation par une analyse factorielle pour éventuellement détecter des corrélations entre les paramètres et ensuite classer les souches dans différents groupes en fonction de leurs caractéristiques écologiques comme cela a été réalisé par Bégot *et al.* (1997) à partir du taux de croissance maximum et du temps de latence. Le Tableau c.2 présente les valeurs des paramètres de croissance obtenus pour les différents groupes de *Listeria* identifiés par Bégot *et al.* (1997).

Tableau c.2 Estimation des paramètres de croissance correspondant aux groupes de *Listeria* défini par Bégot *et al.* (1997).

	Nb souches	$\mu_{\text{opt}(T, pH, aw)}^a$	$T_{\text{min}}^{\circ b}$	$pH_{\text{min}}^{\circ c}$	$aw_{\text{min}}^{\circ d}$	$\mu_{\text{max}} \text{ lag}$
réponse moyenne	66	0.99	0.4	4.1	0.85	1.28
groupe 1	10	1.16	-0.3	4.1	0.86	0.84
groupe 2	15	1.16	0.2	4.4	0.88	1.63
groupe 3	28	0.99	0.8	3.8	0.85	1.24
groupe 4	8	0.87	-1.3	4.0	0.87	1.27
groupe 5	5	0.99	-0.3	4.7	0.82	1.00

^a $\mu_{\text{opt}(T, pH, aw)}$, taux de croissance maximum (h^{-1}) dans les conditions optimales (37°C ; 7.1 ; 0.997).

^b T_{min}° , température minimale de croissance absolue ($^{\circ}\text{C}$).

^c pH_{min}° , pH minimum de croissance absolu.

^d aw_{min}° , activité de l'eau minimale de croissance absolue.

PERSPECTIVE 3 : INTEGRATION D'UNE APPROCHE STOCHASTIQUE

Il paraît indispensable d'inclure une approche stochastique en microbiologie prévisionnelle afin de mieux prévoir la croissance des faibles inoculums. Cet aspect a été abordé d'un point de vue théorique par Baranyi (1998) mais sa mise en application nécessite une caractérisation expérimentale des distributions du temps de latence au sein des populations microbiennes.

PERSPECTIVE 4 : MODELISATION DES EFFETS DES STRESS SUR LE TEMPS DE LATENCE A LA RE-CROISSANCE

Le modèle proposé par Bréand *et al.* (1999) et celui proposé dans notre étude permettent d'inclure dans le modèle secondaire l'effet de certaines conditions pré-incubatoires sur le temps de latence à la re-croissance mais ces deux modèles sont insuffisants pour répondre à l'ensemble des situations rencontrées en agro-alimentaire. Il faut donc envisager l'intégration de modèles permettant de décrire l'influence de stress induits par des substances chimiques (acides, désinfectants, conservateurs...) ou par des traitements physiques autres que la chaleur.

Il faudra également évaluer l'influence de ces stress sur la distribution du temps de latence des populations stressées.

BIBLIOGRAPHIE

A

- Adams, M.R., Little, C.L., Easter, M.C. 1991. Modelling the effect of pH, acidulant and temperature on the growth rate of *Yersinia enterocolitica*. *J. Appl. Bacteriol.* **71**, 65-71.
- Ahamad, N., Marth, E.H. 1989. Behavior of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21, and 35°C in tryptose broth acidified with acetic, citric, or lactic acid. *J. Food Prot.* **52**, 688-695.
- Alber, S.A., Schaffner, D.W. 1992. Evaluation of data transformations used with square root and Schoolfield models for predicting bacterial growth rate. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3337-3342.
- Albertson, N.H., Nyström, T., Kjelleberg, S. 1990. Macromolecular synthesis during recovery of the marine *Vibrio* sp. S14 from starvation. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 2201-2207.
- Arino, S., Andolfo, S., Leitz, R., Perrier, L., Rosso, L. 1998. Détermination des températures cardinales de souches de levure par une méthode de gradient thermique dynamique. 5^{ème} Congrès de la Société Française de Microbiologie, 27-28 avril, Lille, France.
- Avery, S.M., Buncic, S. 1997. Differences in pathogenicity for chick embryos and growth kinetics at 37°C between clinical and meat isolates of *Listeria monocytogenes* previously stored at 4°C. *Int. J. Food Microbiol.* **34**, 319-327.

B

- Bajard, S., Rosso, L., Fardel, G., Flandrois, J.P. 1996. The particular behaviour of *Listeria monocytogenes* under sub-optimal conditions. *Int. J. Food Microbiol.* **29**, 201-211.
- Bal'a, M.F.A., Marshall, D.L. 1996a. Use of double-gradient plates to study combined effects of salt, pH, monolaurin, and temperature on *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* **59**, 601-607.
- Bal'a, M.F.A., Marshall, D.L. 1996b. Testing matrix, inoculum size, and incubation temperature affect monolaurin activity against *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.* **13**, 467-473.
- Baranyi, J. 1997. Modelling lag as a function of the physiological state of the cells - A stochastic approach. Colloque La Microbiologie Prévisionnelle appliquée à la Conservation des Aliments Réfrigérés. 16-18 juin, Quimper, France.
- Baranyi, J. 1998. Comparison of stochastic and deterministic concepts of bacterial lag. *J. Theor. Biol.* **192**, 403-408.
- Baranyi, J., Pin, C. 1999. Estimating bacterial growth parameters by means of detection times. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 732-736.
- Baranyi, J., Roberts, T.A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* **23**, 277-294.
- Baranyi, J., Roberts, T.A. 1995. Mathematics of predictive food microbiology. *Int. J. Food Microbiol.* **26**, 199-218.
- Baranyi, J., McClure, P.J., Sutherland, J.P., Roberts, T.A. 1993a. Modeling bacterial growth responses. *J. Ind. Microbiol.* **12**, 190-194.
- Baranyi, J., Pin, C., Ross, T. 1999. Validating and comparing predictive models. *Int. J. Food Microbiol.* **48**, 159-166.
- Baranyi, J., Roberts, T.A., McClure, P. 1993b. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiol.* **10**, 43-59.
- Baranyi, J., Robinson, T.P., Kaloti, A., Mackey, B.M. 1995. Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. *Int. J. Food Microbiol.* **27**, 61-75.

- Baranyi, J., Ross, T., McMeekin, T.A., Roberts, T.A. 1996. Effects of parameterization on the performance of empirical models used in 'predictive microbiology'. *Food Microbiol.* **13**, 83-91.
- Barbosa, W.B., Cabedo, L., Wederquist, H.J., Sofos, J.N., Schmidt, G.R. 1994. Growth variation among species and strains of *Listeria* in culture broth. *J. Food Prot.* **57**, 765-769,775.
- Bates, D.M. and Watts, D.G. 1988. Nonlinear regression analysis and its applications. Wiley, New York.
- Bayles, D.O., Annous, B.A., Wilkinson, B.J. 1996. Cold stress proteins induced in *Listeria monocytogenes* in response to temperature downshock and growth at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1116-1119.
- Bégot, C., Desnier, I., Daudin, J.D., Labadie, J.C., Lebert, A. 1996. Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. *J. Microbiol. Methods* **25**, 225-232.
- Bégot, C., Lebert, I., Lebert, A. 1997. Variability of the response of 66 *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains to different growth conditions. *Food Microbiol.* **14**, 403-412.
- Berry, E.D., Foegeding, P.M. 1997. Cold temperature adaptation and growth of microorganisms. *J. Food Prot.* **60**, 1583-1594.
- Beumer, R.R., te Giffel, M.C., de Boer, E., Rombouts, F.M. 1996. Growth of *Listeria monocytogenes* on sliced cooked meat products. *Food Microbiol.* **13**, 333-340.
- Blom, H., Nerbrink, E., Dainty, R., Hagtvedt, T., Borch, E., Nissen, H., Nesbakken, T. 1997. Addition of 2.5% lactate and 0.25% acetate controls growth of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed, sensory-acceptable servelat sausage and cooked ham stored at 4°C. *Int. J. Food Microbiol.* **38**, 71-76.
- Bolton, L.F., Frank, J.F. 1999. Defining the growth/no growth interface for *Listeria monocytogenes* in Mexican-style cheese based on salt, pH, and moisture content. *J. Food Prot.* **62**, 601-609.
- Booth, I.R. 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol. Rev.* **49**, 359-378.
- Borch, E., Wallentin, C. 1993. Conductance measurements for data generation in predictive modeling. *J. Ind. Microbiol.* **12**, 286-290.
- Box, G.E.P., Hunter, W.G., Hunter, J.S. 1978. Statistics for experimenters. Wiley, New York.
- Bratchell, N., Gibson, A.M., Truman, M., Kelly, T.M., Roberts, T.A. 1989. Predicting microbial growth: the consequences of quantity of data. *Int. J. Food Microbiol.* **8**, 47-58.
- Bréand, S., Fardel, G., Flandrois, J.P., Rosso, L., Tomassone, R. 1997. A model describing the relationship between lag time and mild temperature increase duration. *Int. J. Food Microbiol.* **38**, 157-167.
- Bréand, S., Fardel, G., Flandrois, J.P., Rosso, L., Tomassone, R. 1999. A model describing the relationship between regrowth lag time and mild temperature increase for *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* **46**, 251-261.
- Brocklehurst, T.F., Mitchell, G.A., Pleass, W., Smith, A.C. 1995a. The effect of step changes in sucrose concentration on the growth of *Salmonella typhimurium* LT2. *J. Appl. Bacteriol.* **78**, 495-500.
- Brocklehurst, T.F., Parker, M.L., Gunning, P.A., Coleman, H.P., Robins, M.M. 1995b. Growth of food-borne pathogenic bacteria in oil-in-water emulsions: II-Effect of emulsion structure on growth parameters and form of growth. *J. Appl. Bacteriol.* **78**, 609-615.
- Broughall, J.M., Anslow, P.A., Kilsby, D.C. 1983. Hazard analysis applied to microbial growth in foods: development of mathematical models describing the effect of water activity. *J. Appl. Bacteriol.* **55**, 101-110.
- Buchanan, R.E. 1918. Life phases in a bacterial culture. *J. Infect. Dis.* **98**, 1271-1273.
- Buchanan, R.L., Cygnarowicz, M.L. 1990. A mathematical approach toward defining and calculating on the duration of the lag phase. *Food Microbiol.* **7**, 237-240.
- Buchanan, R.L., Klawitter, L.A. 1990. Effects of temperature and oxygen on the growth of *Listeria monocytogenes* at pH 4.5. *J. Food Sci.* **55**, 1754-1756.
- Buchanan, R.L., Klawitter, L.A. 1991. Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* **12**, 235-246.
- Buchanan, R.L., Phillips, J.G. 1990. Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* **53**, 370-376.

- Buchanan, R.L., Stahl, H.G., Whiting, R.C.** 1989. Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride, and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* **52**, 844-851.
- Buncic, S., Avery, S.M.** 1996. Relationship between variations in pathogenicity and lag phase at 37°C of *Listeria monocytogenes* previously stored at 4°C. *Lett. Appl. Microbiol.* **23**, 18-22.

C

- Chen, N., Shelef, L.A.** 1992. Relationship between water activity, salts of lactic acid, and growth of *Listeria monocytogenes* in a meat model system. *J. Food Prot.* **55**, 574-578.
- Cheroutre-Vialette, M., Lebert, I., Hebraud, M., Labadie, J.C., Lebert, A.** 1998. Effects of pH or aw stress on growth of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* **42**, 71-77.
- Cole, M.B., Jones, M.V., Holyoak, C.** 1990. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.* **69**, 63-72.
- Conner, D.E., Scott, V.N., Bernard, D.T.** 1990. Growth, inhibition, and survival of *Listeria monocytogenes* as affected by acidic conditions. *J. Food Prot.* **53**, 652-655.
- Cooper, S.** 1991. Bacterial Growth and Division. Academic Press, London.
- Corman, A., Carret, G., Pavé, A., Flandrois, J.P., Couix, C.** 1986. Bacterial growth measurement using an automated system: mathematical modelling and analysis of growth kinetics. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* **137B**, 133-143.

D

- Dalgaard, P.** 1995. Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish. *Int. J. Food Microbiol.* **26**, 305-317.
- Dalgaard, P., Ross, T., Kamperman, L., Neumeyer, K., McMeekin, T.A.** 1994. Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. *Int. J. Food Microbiol.* **23**, 391-404.
- Deak, T., Beuchat, L.R.** 1993. Use of indirect conductimetry for predicting growth of food spoilage yeasts under various environmental conditions. *J. Ind. Microbiol.* **12**, 301-308.
- Delignette-Muller, M.L.** 1998. Relation between the generation time and the lag time of bacterial growth kinetics. *Int. J. Food Microbiol.* **43**, 97-104.
- Delignette-Muller, M.L., Rosso, L.** 1998. Microbial risk assessment: applicability and limitations. The annual conference of the Society for Risk Analysis - Europe, 10-14 octobre, Paris, France.
- Delignette-Muller, M.L., Rosso, L.** 1999. Biological variability and exposure assessment. Food Micro'99, september 13-17, Veldhoven, The Netherlands.
- Delignette-Muller, M.L., Rosso, L., Flandrois, J.P.** 1995. Accuracy of microbial growth predictions with square root and polynomial models. *Int. J. Food Microbiol.* **27**, 139-146.
- Denis, F., Ramet, J.-P.** 1989. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* in trypticase soy broth, UHT milk and French soft cheese. *J. Food Prot.* **52**, 706-711.
- Donnelly, C.W., Briggs, E.H.** 1986. Psychrotrophic growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* as a function of milk composition. *J. Food Prot.* **49**, 994-998.
- Dorsa, W.J., Marshall, D.L., Moody, M.W., Hackney, C.R.** 1993. Low temperature growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in precooked crawfish tail meat. *J. Food Prot.* **56**, 106-109.
- Duffy, G., Sheridan, J.J., Buchanan, R.L., McDowell, D.A., Blair, I.S.** 1994a. The effect of aeration, initial inoculum and meat microflora on the growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in selective enrichment broths. *Food Microbiol.* **11**, 429-438.
- Duffy, L.L., Vanderlinde, P.B., Grau, F.H.** 1994b. Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packed cooked meats: effects of pH, aw, nitrite and ascorbate. *Int. J. Food Microbiol.* **23**, 377-390.
- Dufrenne, J., Delfgou, E., Ritmeester, W., Notermans, S.** 1997. The effect of previous growth conditions on the lag phase time of some foodborne pathogenic micro-organisms. *Int. J. Food Microbiol.* **34**, 89-94.
- Duh, Y.-H., Schaffner, D.W.** 1993. Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag time of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* **56**, 205-210.

E

- El-Gazzar, F.E., Bohner, H.F., Marth, E.H. 1991. Growth of *Listeria monocytogenes* at 4, 32, and 40°C in skim milk and in retentate and permeate from ultrafiltered skim milk. *J. Food Prot.* **54**, 338-342.
- El-Shenawy, M.A., Marth, E.H. 1988a. Sodium benzoate inhibits growth of or inactivates *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* **51**, 525-530.
- El-Shenawy, M.A., Marth, E.H. 1988b. Inhibition and inactivation of *Listeria monocytogenes* by sorbic acid. *J. Food Prot.* **51**, 842-847.
- Erickson, J.P., Jenkins, P. 1992. Behavior of psychrotrophic pathogens *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, and *Aeromonas hydrophila* in commercially pasteurized eggs held at 2, 6.7 and 12.8°C. *J. Food Prot.* **55**, 8-12.

F

- Farber, J.M., Peterkin, P.I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* **55**, 476-511.
- Farber, J.M., Cai, Y., Ross, W.H. 1996. Predictive modelling of the growth of *Listeria monocytogenes* in CO₂ environments. *Int. J. Food Microbiol.* **32**, 133-144.
- Farber, J.M., Coates, F., Daley, E. 1992. Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* **15**, 103-105.
- Farber, J.M., Sanders, G.W., Dunfield, S., Prescott, R. 1989. The effect of various acidulants on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* **9**, 181-183.
- Farrag, S.A., Marth, E.H. 1989. Behaviour of *Listeria monocytogenes* when incubated together with *Pseudomonas* species in tryptose broth at 7 and 13°C. *J. Food Prot.* **52**, 536-539.
- Fernández, P.S., George, S.M., Sills, C.C., Peck, M.W. 1997. Predictive model of the effect of CO₂, pH, temperature and NaCl on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* **37**, 37-45.
- Foegeding, P.M., Leasor, S.B. 1990. Heat resistance and growth of *Listeria monocytogenes* in liquid whole egg. *J. Food Prot.* **53**, 9-14.
- Fu, B., Taoukis, P.S., Labuza, T.P. 1991. Predictive microbiology for monitoring spoilage of dairy products with time-temperature integrators. *J. Food Sci.* **56**, 1209-1215.

G

- Garthright, W.E. 1991. Refinements in the prediction of microbial growth curves. *Food Microbiol.* **8**, 239-248.
- Gay, M., Cerf, O., Davey, K.R. 1996. Significance of pre-incubation temperature and inoculum concentration on subsequent growth of *Listeria monocytogenes* at 14°C. *J. Appl. Bacteriol.* **81**, 433-438.
- Gellin, B.G., Broome, C.V. 1989. Listeriosis. *J.A.M.A.* **261**, 1313-1320.
- George, S.M., Lund, B.M. 1992. The effect of culture medium and aeration on growth of *Listeria monocytogenes* at pH 4.5. *Lett. Appl. Microbiol.* **15**, 49-52.
- George, S.M., Lund, B.M., Brocklehurst, T.F. 1988. The effect of pH and temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* **6**, 153-156.
- George, S.M., Richardson, L.C.C., Peck, M.W. 1996. Predictive models of the effect of temperature, pH and acetic and lactic acids on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* **32**, 73-90.
- Gibson, A.M., Bratchell, N., Roberts, T.A. 1987. The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. *J. Appl. Bacteriol.* **62**, 479-490.
- Goulet, V., Lepoutre, A., Rocourt, J., Courtieu A.-L., Dehaumont, P., Veit, P. 1993. Epidémie de listériose en France. Bilan final et résultats de l'enquête épidémiologique. *Bull. Epidemiol. Hebdo.* **4**, 13-14.

- Gounot, A.-M.** 1991. Bacterial life at low temperature: physiological aspects and biotechnological implications. *J. Appl. Bacteriol.* **71**, 386-397.
- Grant, I.R., Nixon, C.R., Patterson, M.F.** 1993. Comparison of the growth of *Listeria monocytogenes* in unirradiated and irradiated cook-chill roast beef and gravy at refrigeration temperatures. *Lett. Appl. Microbiol.* **17**, 55-57.
- Grau, F.H., Vanderlinde, P.B.** 1990. Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged beef. *J. Food Prot.* **53**, 739-741.
- Grau, F.H., Vanderlinde, P.B.** 1992. Occurrence, numbers, and growth of *Listeria monocytogenes* on some vacuum-packaged processed meats. *J. Food Prot.* **55**, 4-7.
- Grau, F.H., Vanderlinde, P.B.** 1993. Aerobic growth of *Listeria monocytogenes* on beef lean and fatty tissue: equations describing the effects of temperature and pH. *J. Food Prot.* **56**, 96-101.
- Gray, M.L., Killinger, A.H.** 1966. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol. Rev.* **30**, 309-382.

H

- Hart, C.D., Mead, G.C., Norris, A.P.** 1991. Effects of gaseous environment and temperature on the storage behaviour of *Listeria monocytogenes* on chicken breast meat. *J. Appl. Bacteriol.* **70**, 40-46.
- Hills, B.P., Mackey, B.M.** 1995. Multi-compartment kinetic models for injury, resuscitation, induced lag and growth in bacterial cell populations. *Food Microbiol.* **12**, 333-346.
- Hills, B.P., Wright, K.M.** 1994. A new model for bacterial growth in heterogeneous systems. *J. Theor. Biol.* **168**, 31-41.
- Houtsma, P.C., Kusters, B.J.M., de Wit, J.C., Rombouts, F.M., Zwietering, M.H.** 1994. Modelling growth rates of *Listeria innocua* as a function of lactate concentration. *Int. J. Food Microbiol.* **24**, 113-123.
- Hudson, J.A.** 1993. Effect of pre-incubation temperature on the lag time of *Aeromonas hydrophila*. *Lett. Appl. Microbiol.* **16**, 274-276.
- Hudson, J.A., Mott, S.J.** 1993a. Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* in pâté and comparison with predictive models. *Int. J. Food Microbiol.* **20**, 1-11.
- Hudson, J.A., Mott, S.J.** 1993b. Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* on cold-smoked salmon under refrigeration and mild temperature abuse. *Food Microbiol.* **10**, 61-68.
- Hudson, J.A., Mott, S.J.** 1993c. Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* on cooked beef under refrigeration and mild temperature abuse. *Food Microbiol.* **10**, 429-437.
- Hudson, J.A., Mott, S.J.** 1994. Comparison of lag times obtained from optical density and viable count data for a strain of *Pseudomonas fragi*. *J. Food Safety* **14**, 329-339.
- Hudson, J.A., Mott, S.J., Penney, N.** 1994. Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, and *Yersinia enterocolitica* on vacuum and saturated carbon dioxide controlled atmosphere-packaged sliced roast beef. *J. Food Prot.* **57**, 204-208.
- Huet, S., Jolivet, E., Messéan, A.** 1992. La régression Non-Linéaire : Méthodes et Applications en Biologie. INRA, Paris.

I

- Ita, P.S., Hutkins, R.W.** 1991. Intracellular pH and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A in tryptic soy broth containing acetic, lactic, citric, and hydrochloric acids. *J. Food Prot.* **54**, 15-19.

J

- Jackson, H., Woodbine, M.** 1963. The effect of sublethal heat treatment on the growth of *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Bacteriol.* **26**, 152-158.
- Jacquet, C., Brouille, F., Saint-Clément, C., Catimel, B., Rocourt, J.** 1999. La listériose humaine en France en 1998. *Bull. Epidemiol. Hebdo.* **37**, 153-154.
- Jacquet, C., Catimel, B., Goulet, V., Lepoutre, P., Veit, P., Dehaumont, P., Rocourt, J.** 1995. Typing of *Listeria monocytogenes* during epidemiological investigations of the French listeriosis outbreaks in 1992, 1993 and 1995. Proceedings of XIIth International Symposium on Problems of Listeriosis, october 2-6, Perth, Western Australia.
- Jacquet, C., Miegerville, A.-F., Catimel, B., Huynh, G., Courtieu, A.L., Rocourt, J.** 1994. La listériose humaine en France en 1991, 1992 et 1993. Bilan à partir des souches adressées aux centres nationaux de référence. *Bull. Epidemiol. Hebdo.* **28**, 123-125.
- Johansen, C., Gram, L., Meyer, A.S.** 1994. The combined inhibitory effect of lysozyme and low pH on growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* **57**, 561-566.
- Jones, C.E., Shama, G., Andrew, P.W., Roberts, I.S., Jones, D.** 1995. Comparative growth of *Listeria monocytogenes* in defined media and demonstration of growth in continuous culture. *J. Appl. Bacteriol.* **78**, 66-70.
- Jones, P.G., VanBogelen, R.A., Neidhardt, F.C.** 1987. Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**, 2092-2095.
- Jones, J.E., Walker, S.J., Sutherland, J.P., Peck, M.W., Little, C.L.** 1994. Mathematical modelling of the growth, survival and death of *Yersinia enterocolitica*. *Int. J. Food Microbiol.* **23**, 433-447.
- Juntilla, J.R., Niemelä, S.I., Hirn, J.** 1988. Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic listeria. *J. Appl. Bacteriol.* **65**, 321-327.

K

- Kaprelyants, A.S., Kell, D.B.** 1996. Do bacteria need to communicate with each other for growth? *Trends Microbiol.* **4**, 237-242.
- Katoh, H.** 1989. "Determination of mean generation time for *Listeria monocytogenes*". *Jap. J. Food Microbiol.* **6**, 135-138 (en japonais, avec résumé en anglais).
- Kaufman, O.W., Harmon, L.G., Pailthorp, O.C., Pflug, I.J.** 1959. Effect of heat treatment on the growth of surviving cells. *J. Bacteriol.* **78**, 834-838.
- Kaya, M., Schmidt, U.** 1989. Verhalten von *Listeria monocytogenes* im Hackfleisch bei Kühl- und Gefrierlagerung. *Fleischwirtsch.* **69**, 617-620.
- Koch, A.L.** 1987. The variability and individuality of the bacterium, In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. Eds. Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M., Umberger, H.E. American Society for Microbiology, Washington D.C., p. 1606-1614.
- Koch, A.L.** 1995. Bacterial Growth and Form. Chapman and Hall, New York.
- Kolter, R., Siegele, D.A., Tormo, A.** 1993. The stationary phase of the bacterial life cycle. *Ann. Rev. Microbiol.* **47**, 855-874.
- Kono, T.** 1968. Kinetics of microbial cell growth. *Biotech. Bioeng.* **10**, 105-131.

L

- Labuza, T.P., Fu, B.** 1993. Growth kinetics for shelf-life prediction: theory and practice. *J. Ind. Microbiol.* **12**, 309-323.
- Labuza, T.P., Fu, B., Taoukis, P.S.** 1992. Prediction for shelf life and safety of minimally processed CAP/MAP chilled foods: a review. *J. Food Prot.* **55**, 741-750.
- Lahellec, C., Salvat, G., Brisabois, A.** 1996. Incidence des *Listeria* dans les denrées alimentaires. *Pathol. Biol.* **44**, 808-815.
- Lanciotti, R., Massa, S., Guerzoni, M.E., Di Fabio, G.** 1992. Light butter: natural microbial population and potential growth of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica*. *Lett. Appl. Microbiol.* **15**, 256-258.

- Lankford, C.E., Walker, J.R., Reeves, J.B., Nabbut, N.H., Byers, B.R., Jones, R.J. 1966. Inoculum-dependent division lag of *Bacillus* cultures and its relation to an endogenous factor(s) ("schizokinen"). *J. Bacteriol.* **91**, 1070-1079.
- Lark, K.G., Maaloe, O. 1954. The induction of cellular and nuclear division in *Salmonella typhimurium* by means of temperature shifts. *Bioch. Bioph. Acta* **15**, 345-355.
- Larson, A.E., Yu, R.R.Y., Lee, O.A., Price, S., Haas, G.J., Johnson, E.A. 1996. Antimicrobial activity of hop extracts against *Listeria monocytogenes* in media and in food. *Int. J. Food Microbiol.* **33**, 195-207.
- Levenspiel, O. 1980. The Monod equation: a revisit and a generalization to product inhibition situations. *Biotech. Bioeng.* **22**, 1671-1687.
- Leistner, L., Rödel, W. 1976. The stability of intermediate moisture foods with respect to micro-organisms. In *Intermediate Moisture Foods*. Eds. Davies, R., Birch, G.G., Parker, J.K. Applied Science Publishers Ltd., London.
- Li, K.-Y., Torres, J.A. 1993. Water activity relationships for selected mesophiles and psychrotrophs at refrigeration temperature. *J. Food Prot.* **56**, 612-615.
- Lobry, J.R., Rosso, L., Flandrois, J.P. 1991. A FORTRAN subroutine for the determination of parameter confidence limits in non-linear models. *Binary* **3**, 86-93.
- Lodge, R.M., Hinshelwood, C.N. 1943. Physiochemical aspects of bacterial growth. Part IX. The lag phase of bact. *Lactis aerogenes*. *J. Chem. Soc.* 213-219.
- Luong, J.H. 1985. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnol.* **27**, 280-285.

M

- Mackey, B.M., Derrick, C.M. 1982. The effect of sublethal injury by heating, freezing, drying and gamma-radiation on the duration of the lag phase of *Salmonella typhimurium*. *J. Appl. Bacteriol.* **53**, 243-251.
- Mackey, B.M., Derrick, C.M. 1984. Conductance measurements of the lag phase of injured *Salmonella typhimurium*. *J. Appl. Bacteriol.* **57**, 299-308.
- Manu-Tawiah, W., Myers, D.J., Olson, D.G., Molins, R.A. 1993. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in pork chops packaged under modified gas atmospheres. *J. Food Sci.* **58**, 475-479.
- Marshall, D.L., Schmidt, R.H. 1988. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in milk preincubated with selected Pseudomonads. *J. Food Prot.* **51**, 277-282.
- Marshall, D.L., Wiese-Lehigh, P.L., Wells, J.H., Farr, A.J. 1991. Comparative growth of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens* on precooked chicken nuggets stored under modified atmospheres. *J. Food Prot.* **54**, 841-843,851.
- Matin, A. 1992. Physiology, molecular biology and applications of the bacterial starvation response. *J. Appl. Bacteriol.* **73**, 495-575.
- McClure, P.J., Beaumont, A.L., Sutherland, J.P., Roberts, T.A. 1997. Predictive modelling of growth of *Listeria monocytogenes*. The effects on growth of NaCl, pH, storage temperature and NaNO₂. *Int. J. Food Microbiol.* **34**, 221-232.
- McClure, P.J., Cole, M.B., Davies, K.W., Anderson, W.A. 1993. The use of automated turbidimetric data for the construction of kinetic models. *J. Ind. Microbiol.* **12**, 277-285.
- McClure, P.J., Kelly, T.M., Roberts, T.A. 1991. The effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* **14**, 77-92.
- McClure, P.J., Roberts, T.A., Otto Oguru, P. 1989. Comparison of the effects of sodium chloride, pH and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on gradient plates and in liquid medium. *Lett. Appl. Microbiol.* **9**, 95-99.
- McKay, A.L., Peters, A.C., Wimpenny, J.W.T. 1997. Determining specific growth rates in different regions of *Salmonella typhimurium* colonies. *Lett. Appl. Microbiol.* **24**, 74-76.
- McKellar, R.C., Butler, G., Stanich, K. 1997. Modelling the influence of temperature on the recovery of *Listeria monocytogenes* from heat injury. *Food Microbiol.* **14**, 617-625.
- McKellar, R.C., Moir, R., Kalab, M. 1994. Factors influencing the survival and growth of *Listeria monocytogenes* on the surface of Canadian retail wieners. *J. Food Prot.* **57**, 387-392.

- McMeekin, T.A., Chandler, R.E., Doe, P.E., Garland, C.D., Olley, J., Putro, S., Ratkowsky, D.A.** 1987. Model for combined effect of temperature and salt concentration/water activity on the growth rate of *Staphylococcus xylosum*. *J. Appl. Bacteriol.* **62**, 543-550.
- McMeekin, T.A., Ross, T., Olley, J.** 1992. Application of predictive microbiology to assure the quality and safety of fish and fish products. *Int. J. Food Microbiol.* **15**, 13-32.
- Membré, J.-M., Ross, T., McMeekin, T.** 1999. Behavior of *Listeria monocytogenes* under combined chilling processes. *Lett. Appl. Microbiol.* **28**, 216-220.
- Membré, J.-M., Thurette, J., Catteau, M.** 1997. Modelling the growth, survival and death of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* **82**, 345-350.
- Meyer, D.H., Donnelly, C.W.** 1992. Effect of incubation temperature on repair of heat-injured *Listeria* in milk. *J. Food Prot.* **55**, 579-582.
- Miller, A.J.** 1992. Combined water activity and solute effects on growth and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Food Prot.* **55**, 414-418.
- Monod, J.** 1958. Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Thèse de 1942, 2^{ème} édition. Hermann, Paris.
- Mossel, D.A.A.** 1983. Essentials and perspectives of the microbial ecology of foods. In Food Microbiology: Advances and Prospects. Eds. Roberts, T.A., Skinner, F.A. Society for Applied Microbiology Symposium Series No. 11. Academic press, London. p. 1-45.
- Mossel, D.A.A., Ingram, M.** 1955. The physiology of the microbial spoilage of foods. *J. Appl. Bacteriol.* **18**, 232-268.
- Murphy, P.M., Rea, M.C., Harrington, D.** 1996. Development of a predictive model for growth of *Listeria monocytogenes* in a skim milk medium and validation studies in a range of dairy products. *J. Appl. Bacteriol.* **80**, 557-564.
- Murray, E.G.D., Webb, R.A., Swann, M.B.R.** 1926. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *J. Pathol. Bacteriol.* **29**, 407-439.

N

- Ng, H., Ingraham, J.L., Marr, A.G.** 1962. Damage and derepression in *Escherichia coli* resulting from growth at low temperatures. *J. Bacteriol.* **84**, 331-339.
- Nilsson, L., Huss, H.H., Gram, L.** 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon by nisin and carbon dioxide atmosphere. *Int. J. Food Microbiol.* **38**, 217-227.
- Nolan, D.A., Chamblin, D.C., Troller, J.A.** 1992. Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Int. J. Food Microbiol.* **16**, 323-335.

O

- Oh, D.-H., Marshall, D.L.** 1992. Effect of pH on the minimum inhibitory concentration of monolaurin against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* **55**, 449-450.
- Oh, D.-H., Marshall, D.L.** 1993. Influence of temperature, pH, and glycerol monolaurate on growth and survival of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* **56**, 744-749.
- Oh, D.-H., Marshall D.L.** 1994. Enhanced inhibition of *Listeria monocytogenes* by glycerol monolaurate with organic acids. *J. Food Sci.* **59**, 1258-1261.

P

- Palumbo, S.A., Williams, A.C.** 1994. Control of *Listeria monocytogenes* on the surface of frankfurters by acid treatments. *Food Microbiol.* **11**, 293-300.
- Palumbo, S.A., Williams, A.C., Buchanan, R.L., Phillips, J.G.** 1991. Model for the aerobic growth of *Aeromonas hydrophila* K144. *J. Food Prot.* **54**, 429-435.
- Papageorgiou, D.K., Marth, E.H.** 1989. Behavior of *Listeria monocytogenes* at 4 and 22°C in whey and skim milk containing 6 or 12% sodium chloride. *J. Food Prot.* **52**, 625-630.
- Passos, F.V., Ollis, D.F., Fleming, H.P., Hassan, H.M., Felder, R.M.** 1993. Modeling the cucumber fermentation: growth of *Lactobacillus plantarum*. *J. Ind. Microbiol.* **12**, 341-345.

- Patchett, R.A., Watson, N., Fernández, P.S., Kroll, R.G. 1996. The effect of temperature and growth rate on the susceptibility of *Listeria monocytogenes* to environmental stress conditions. *Lett. Appl. Microbiol.* **22**, 121-124.
- Pearson, L.J., Marth, E.H. 1990a. Behavior of *Listeria monocytogenes* in the presence of cocoa, carrageenan, and sugar in a milk medium incubated with and without agitation. *J. Food Prot.* **53**, 30-37.
- Pearson, L.J., Marth, E.H. 1990b. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by cocoa in a broth medium and neutralization of this effect by casein. *J. Food Prot.* **53**, 38-46.
- Pearson, L.J., Marth, E.H. 1990c. Behavior of *Listeria monocytogenes* in the presence of methylxanthines-caffeine and theobromine. *J. Food Prot.* **53**, 47-50,55.
- Penfold, W.J. 1914. On the nature of bacterial lag. *J. Hyg.* **14**, 215-241.
- Petran, R.L., Zottola, E.A. 1989. A study of factors affecting growth and recovery of *Listeria monocytogenes* ScottA. *J. Food Sci.* **54**, 458-460.
- Phan-Thanh, L., Gormon, T. 1995. Analysis of heat and cold shock proteins in *Listeria* by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **16**, 444-450.
- Pivnik, H. 1980. Curing salts and related materials. In *Microbial Ecology of Foods*, Vol. 1: Factors Affecting Life and Death of Microorganisms. Ed. The International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Academic Press, New York. p. 136-159.
- Presser, K.A., Ross, T., Ratkowsky, D.A. 1998. Modelling the growth limits (growth/no growth interface) of *Escherichia coli* as a function of temperature, pH, lactic acid concentration, and water activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1773-1779.
- Presser, K.A., Ratkowsky, D.A., Ross, T. 1997. Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2355-2360.

R

- Ratkowsky, D.A., Ross, T. 1995. Modelling the bacterial growth/no growth interface. *Lett. Appl. Microbiol.* **20**, 29-33.
- Ratkowsky, D.A., Lowry, R.K., McMeekin, T.A., Stokes, A.N., Chandler, R.E. 1983. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *J. Bacteriol.* **154**, 1222-1226.
- Ratkowsky, D.A., Olley, J., McMeekin, T.A., Ball, A. 1982. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *J. Bacteriol.* **149**, 1-5.
- Ratkowsky, D.A., Ross, T., Macario, N., Dommett, T.W., Kamperman, L. 1996. Choosing probability distributions for modelling generation time variability. *J. Appl. Bacteriol.* **80**, 131-137.
- Ratkowsky, D.A., Ross, T., McMeekin, T.A., Olley, J. 1991. Comparison of Arrhenius-type and Bełhadek-type models for prediction of bacterial growth in foods. *J. Appl. Bacteriol.* **71**, 452-459.
- Razavi-Rohani, S.M., Griffiths, S.M. 1994. The effect of mono and polyglycerol laurate on spoilage and pathogenic bacteria associated with foods. *J. Food Safety* **14**, 131-151.
- Robinson, T.P., Ocio, M.J., Kaloti, A., Mackey, B.M. 1998. The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* **44**, 83-92.
- Rørvik, L.M., Yndestad, M., Skjerve, E. 1991. Growth of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed, smoked salmon, during storage at 4°C. *Int. J. Food Microbiol.* **14**, 111-118.
- Rosenow, E.M., Marth, E.H. 1987a. Growth of *Listeria monocytogenes* in skim, whole and chocolate milk, and in whipping cream during incubation at 4, 8, 13, 21, and 35°C. *J. Food Prot.* **50**, 452-459.
- Rosenow, E.M., Marth, E.H. 1987b. Addition of cocoa powder, cane sugar, and carrageenan to milk enhances growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* **50**, 726-729.
- Ross, K.D. 1975. Estimation of water activity in intermediate moisture foods. *Food Technol.* **29**(3), 26-34.
- Ross, T. 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *J. Appl. Bacteriol.* **81**, 501-508.
- Ross, T., McMeekin, T.A. 1994. Predictive microbiology. *Int. J. Food Microbiol.* **23**, 241-264.

- Rosso, L.** 1995. Modélisation et Microbiologie Prévisionnelle : Elaboration d'un Nouvel Outil pour l'Agro-alimentaire. Thèse de Doctorat, Université Claude Bernard - Lyon I, n° 95-197.
- Rosso, L.** 1998a. Predictive Microbiology: Validation of the models in the industrial context. COST 914 Workshop. Validation of predictive models in wide range of european foods, december 10-11, Cordoba, Spain.
- Rosso, L.** 1998b. Quantification et prévision du comportement dynamique des populations microbiennes : Applications à la sécurité des aliments. Mémoire d'Habilitation à Diriger les Recherches, Université de Paris-Sud.
- Rosso, L., Bajard, S., Flandrois, J.P., Lahellec, C., Fournaud, J., Veit, P.** 1996. Differential growth of *Listeria monocytogenes* at 4 and 8°C: consequences for the shelf life of chilled products. *J. Food Prot.* **59**, 944-949.
- Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S., Flandrois, J.P.** 1995. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 610-616.
- Rosso, L., Lobry, J.R., Flandrois, J.P.** 1993. An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model. *J. Theor. Biol.* **162**, 447-463.
- Ryser, E.T.** 1999. Foodborne listeriosis. In *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. 2nd edition. Eds. Ryser, E.T. et Marth, E.H. Marcel Dekker, Inc., New York. p. 299-358
- Ryser, E.T., Marth, E.H.** 1988. Growth of *Listeria monocytogenes* at different pH values in uncultured whey or whey cultured with *Penicillium camemberti*. *Can. J. Food Microbiol.* **34**, 730-734.

S

- Schaack, M.M., Marth, E.H.** 1988a. Behavior of *Listeria monocytogenes* in skim milk during fermentation with mesophilic lactic starter cultures. *J. Food Prot.* **51**, 600-606.
- Schaack, M.M., Marth, E.H.** 1988b. Behavior of *Listeria monocytogenes* in skim milk and in yogurt mix during fermentation by thermophilic lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* **51**, 607-614.
- Schaffner, D.W.** 1994. Application of a statistical bootstrapping technique to calculate growth rate variance for modelling psychotropic pathogen growth. *Int. J. Food Microbiol.* **24**, 309-314.
- Schillinger, U., Kaya, M., Lücke, F.-K.** 1991. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. *J. Appl. Bacteriol.* **70**, 473-478.
- Schlech, W.F., Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, E.V., Wort, A.J., Hightower, A.W., Johnson, S.E., King, S.H., Nicholls, E.S., Broome, C.V.** 1983. Epidemic listeriosis: Evidence for transmission by food. *N. Engl. J. Med.* **308**, 203-206.
- Schmidt, U.** 1995. Sliced, vacuum-packed frankfurter-type sausage - technological measures to inhibit the growth of listeriae. *Fleischwirtsch.* **75**, 804-807.
- Siegele, D.A., Kolter, R.** 1992. Life after log. *J. Bacteriol.* **174**, 345-348.
- Skinner, G.E., Larkin, J.W., Rhodehamel, E.J.** 1994. Mathematical modeling of microbial growth: a review. *J. Food Safety* **14**, 175-217.
- Smith, M.G.** 1987. Calculation of the expected increase of coliform organisms, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, in raw blended mutton tissue. *Epidemiol. Infect.* **99**, 323-331.
- Sorrells, K.M., Enigl, D.C., Hatfield, J.R.** 1989. Effect of pH, acidulant, time, and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* **52**, 571-573.
- Stephens, P.J., Joynson, J.A., Davies, K.W., Holbrook, R., Lappin-Scott, H.M., Humphrey, T.J.** 1997. The use of an automated growth analyser to measure recovery times of single heat-injured *Salmonella* cells. *J. Appl. Microbiol.* **83**, 445-455.
- Stillmunkes, A.A., Prabhu, G.A., Sebranek, J.G., Molins, R.A.** 1993. Microbiological safety of cooked beef roasts treated with lactate, monolaurin or gluconate. *J. Food Sci.* **58**, 953-958.

T

- Tapia de Daza, M.S., Villegas, Y., Martinez, A.** 1991. Minimal water activity for growth of *Listeria monocytogenes* as affected by solute and temperature. *Int. J. Food Microbiol.* **14**, 333-337.

V

- Van Impe, J.F., Nicolai, B.M., Martens, T., De Baerdemaeker, J., Vandewalle, J.** 1992. Dynamic mathematical model to predict microbial growth and inactivation during food processing. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2901-2909.
- Van Impe, J.F., Nicolai, B.M., Schellekens, M., Martens, T., De Baerdemaeker, J.** 1995. Predictive microbiology in a dynamic environment: a system theory approach. *Int. J. Food Microbiol.* **25**, 227-249.
- Vasseur, C., Baverel, L., Hébraud, M., Labadie, J.** 1999. Effect of osmotic, alkaline, acid or thermal stresses on the growth and inhibition of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* **86**, 469-476.

W

- Walker, S.J., Archer, P., Banks, J.G.** 1990. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *J. Appl. Bacteriol.* **68**, 157-162.
- Wang, L.-L., Johnson, E.A.** 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 624-629.
- Wang, L.-L., Johnson, E.A.** 1997. Control of *Listeria monocytogenes* by monoglycerides in foods. *J. Food Prot.* **60**, 131-138.
- Wang, C., Shelef, L.A.** 1992. Behavior of *Listeria monocytogenes* and the spoilage microflora in fresh cod fish treated with lysozyme and EDTA. *Food Microbiol.* **9**, 207-213.
- Whiting, R.C., Buchanan, R.L.** 1993. Letter to the editor. A classification of models in predictive microbiology - a reply to K.R. Davey. *Food Microbiol.* **10**, 175-177.
- Whiting, R.C., Cygnarowicz-Provost, M.** 1992. A quantitative model for bacterial growth and decline. *Food Microbiol.* **9**, 269-277.
- Wijtses, T., McClure, P.J., Zwietering, M.H., Roberts, T.A.** 1993. Modelling bacterial growth of *Listeria monocytogenes* as a function of water activity, pH and temperature. *Int. J. Food Microbiol.* **18**, 139-149.
- Wijtses, T., van't Riet, K., Huis in't Veld, J.H.J., Zwietering, M.H.** 1998. A decision support system for the prediction of microbial food safety and food quality. *Int. J. Food Microbiol.* **42**, 79-90.
- Winslow, C.-E.A., Wilson, H.H.** 1939. The earlier phases of the bacterial culture cycle. *Bacteriol. Rev.* **3**, 147-186.

Y

- Young, K.M., Foegeding, P.M.** 1993. Acetic, lactic and citric acids and pH inhibition of *Listeria monocytogenes* Scott A and the effect on intracellular pH. *J. Appl. Bacteriol.* **74**, 515-520.
- Yousef, A.E., Gajewski II, R.J., Marth, E.H.** 1991. Kinetics of growth and inhibition of *Listeria monocytogenes* in the presence of antioxidant food additives. *J. Food Sci.* **56**, 10-13.

Z

- Zaika, L.L., Moulden, E., Weimer, L., Phillips, J.G., Buchanan, R.L.** 1994. Model for the combined effects of temperature, initial pH, sodium chloride and sodium nitrite concentrations on anaerobic growth of *Shigella flexneri*. *Int. J. Food Microbiol.* **23**, 345-358.
- Zwietering, M.H., Cuppers, H.G.A.M., de Wit, J.C., van't Riet, K.** 1994. Evaluation of data transformations and validation of a model for the effect of temperature on bacterial growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 195-203.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., van't Riet, K.** 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1875-1881.
- Zwietering, M.H., de Koos, J.T., Hasenack, B.E., de Wit, J.C., van't Riet, K.** 1991. Modeling of bacterial growth as a function of temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1094-1101.

- Zwietering, M.H., Rombouts, F.M., van't Riet, K.** 1992a. Comparison of definitions of the lag phase and the exponential phase in bacterial growth. *J. Appl. Bacteriol.* **72**, 139-145.
- Zwietering, M.H., Wijtzes, T., de Wit, J.C., van't Riet, K.** 1992b. A decision support system for prediction of the microbial spoilage in foods. *J. Food Prot.* **55**, 973-979.
- Zwietering, M.H., Wijtzes, T., Rombouts, F.M., van't Riet, K.** 1993. A decision support system for prediction of the microbial spoilage in foods. *J. Ind. Microbiol.* **12**, 324-329.

RESUME

Les nombreux modèles mathématiques décrivant l'influence des facteurs environnementaux sur le taux de croissance et le temps de latence des micro-organismes développés ces dernières années dans le domaine de la microbiologie prévisionnelle ont permis d'élaborer un modèle secondaire à effets multiplicatifs basé sur des paramètres biologiques (valeurs cardinales, concentrations minimales inhibitrices...). Les taux de croissance et les temps de latence calculés à l'aide de ce modèle ont été comparés à environ 1900 taux de croissance et 1300 temps de latence publiés pour *Listeria monocytogenes* dans différents environnements. Bien que la qualité descriptive globale du modèle soit satisfaisante, des limites à son utilisation sont apparues sur deux points : (i) mauvaise adéquation près des limites de croissance du micro-organisme, (ii) mauvaise estimation du temps de latence.

Deux améliorations du modèle ont donc été proposées :

- (i) prise en compte des interactions entre facteurs environnementaux tout en gardant une structure de modèle similaire. Cette prise en compte des interactions a permis d'améliorer la précision près des limites de croissance de *L. monocytogenes* ;
- (ii) modélisation de l'influence de la température (chauffage exclu) et de la durée de pré-incubation sur le temps latence à la re-croissance. Le modèle obtenu a permis de justifier les approches habituellement utilisées en conditions de température variables. L'amélioration de la qualité descriptive du modèle pour le temps de latence de *L. monocytogenes* reste cependant modeste car les conditions pré-incubatoires utilisées sur les données publiées présentent une forte homogénéité.

Le modèle proposé montre une bonne adéquation entre la prévision et l'observation dans différents produits. Cependant, sa pertinence pour certaines utilisations opérationnelles industrielles ou dans le cadre de l'appréciation quantitative des risques, devra être améliorée en prenant en compte la variabilité biologique des paramètres. Une étude succincte de l'effet de la taille de l'inoculum a de plus montré qu'une approche stochastique doit être développée pour améliorer les prévisions dans les denrées alimentaires qui généralement sont contaminées à faible concentration.

TITLE

Mathematical modelling of *Listeria monocytogenes* growth in foods

ABSTRACT

The numerous mathematical models describing the effect of environmental factors on growth rate and lag time of microorganisms developed these last years in predictive microbiology allowed to build a secondary multiplicative model based on biological parameters (cardinal values, minimal inhibitory concentrations...). The growth rates and lag times calculated with the model were compared with approximately 1900 growth rates and 1300 lag times published for *Listeria monocytogenes* in different environments. Although, on the whole, a good fit of the model was observed, limitations were noted on two points: (i) poor fit near the limits of growth of the micro-organism, (ii) poor estimation of the lag time.

Two improvements of the model were then proposed:

- (i) interactions between environmental factors were taken into account into the multiplicative model. By taking into account these interactions, the model fit was improved near the limits of growth of *L. monocytogenes*;
- (ii) the effect of the temperature (except heating) and the duration of the pre-incubation on the re-growth lag time was modeled. The model built was consistent with the methods usually used for dynamic conditions of temperature. The improvement of the general model fit for the lag time of *L. monocytogenes* was however poor because of the great homogeneity of pre-incubation conditions used in the published data.

The model proposed exhibits a good agreement between prevision and observation in various foods. However, more relevant previsions for industrial use or for quantitative risk assessment will be obtained by taking into account the biological variability of parameters. A short study of the significance of the inoculum size on lag time furthermore shown that a stochastic approach should be developed to improve previsions in foods which generally are contaminated with only a few cells.

DISCIPLINE

Ecologie Microbienne

MOTS-CLES

Listeria monocytogenes, microbiologie prévisionnelle, modélisation, latence, taux de croissance

LABORATOIRE

Laboratoire d'Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale - Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort - 7, avenue du Général de Gaulle - F-94704 MAISONS-ALFORT CEDEX