THÈSE

présentée devant

L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA MATIÈRE DE L'INFORMATION ET DU VIVANT

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR Mention Microbiologie

par

Stéphane GAILLARD

Modélisation de la thermorésistance, de la viabilité et du comportement à la recroissance de *Bacillus cereus*, en fonction de la température, du pH et de l'activité aqueuse.

Soutenue le : 19 décembre 2003

Devant la commission d'examen formée de :

Dr. J.M. MEMBRÉ	Directeur de Recherche, INRA	Rapporteur
Pr. J. VAN IMPE	Université Catholique de Louvain	Rapporteur
Dr. I. LEGUÉRINEL	Maître de conférences, UBO	Examinateur
Dr. L. PERRIER	Ingénieur de Recherche, DANONE	Examinateur
Dr. N. SAVY	PRAG, UBO	Examinateur
Pr. P. MAFART	UBO	Directeur de Thèse

Remerciements

Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au sein du Laboratoire Universitaire de Microbiologie Appliquée de Quimper (LUMAQ) dirigé par le Professeur Adrien BINET, en collaboration avec le pôle de compétences en sécurité alimentaire du groupe DANONE.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au Professeur Pierre MAFART, mon Directeur de thèse, qui tout au long de ces années, m'a suivi et encouragé. Je tiens à le remercier pour son infinie patience et pour la très grande liberté qu'il m'a accordée dans la conduite de ce travail. Les discussions que nous avons eues et les conseils qu'il m'a prodigués se sont toujours révélés fructueux et formateurs. Pour tout cela, je tiens à lui témoigner toute ma gratitude et mon profond respect.

J'adresse également toute ma gratitude au Professeur Jan VAN IMPE de l'Université Catholique de Louvain et au Docteur Jeanne-Marie MEMBRÉ de l'INRA de Lille qui me font l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse. Je les remercie vivement d'avoir accepté de juger ce travail.

L'ensemble des travaux a été financé par le groupe DANONE dans le cadre d'une convention CIFRE. Je tiens tout particulièrement à remercier le Docteur Stéphan ARINO, mon co-directeur de thèse, sans qui cette étude n'aurait pas été possible. Je tenais à ce qu'il fasse partie de ce jury en gage de l'expression de ma reconnaissance. Cependant, malgré la meilleure volonté du monde, il ne pourra pas m'honorer de sa présence. Je lui exprime mes profonds regrets. Je souhaite donc adresser de vifs remerciements au Docteur Louise PERRIER de DANONE VITAPOLE qui a accepté d'examiner ce travail en prenant place au sein du jury.

Je remercie sincèrement le Docteur Ivan LEGUÉRINEL de m'avoir permis de mener cette thèse dans une ambiance très conviviale. Je lui suis très reconnaissant de m'avoir fait confiance en me laissant l'entière liberté de concilier ma recherche et mon enseignement. Son soutien et ses encouragements pour les travaux pratiques et dirigés de Génie Industriel Alimentaire m'ont beaucoup touché. C'est pour moi l'occasion de lui exprimer toute ma gratitude.

Je tiens à adresser mes profonds remerciements au Docteur Nicolas SAVY pour sa disponibilité et ses précieux conseils au niveau des statistiques et des mathématiques. Je lui suis également très reconnaissant de m'avoir fait découvrir LATEX.

C'est un très grand plaisir de le voir prendre place dans le jury pour examiner cette thèse.

J'adresse également mes remerciements à Christian DARÉ, notre gourou de l'informatique, qui m'a initié et converti au système Debian GNU/Linux. Merci d'avoir toujours été fidèle au poste en cas de problèmes. Je lui souhaite une très bonne continuation dans ses nouvelles fonctions à Brest.

Je souhaite également remercier chaleureusement tous les membres du laboratoire qui m'ont, chacun à leur manière, soutenu, aidé et encouragé dans ce travail, en particulier Olivier COUVERT, Louis COROLLER, Yannick FLEURY et Stéphanie SAVY.

Enfin, je tiens à remercier ma famille qui, jusqu'au bout, m'a soutenu et aidé, ainsi que tous les « fragueurs », « fragueuses » et plongeurs qui ont fréquenté le laboratoire y créant cette ambiance si attachante. Cette thèse leur est dédiée.

Table des matières

Ré	Résumé vi				vii
Liste des tableaux ix					ix
Ta	able o	les figu	es		xi
In	trodı	iction			1
1	Etu	de Bibl	ographique		5
	1.1	La spor	bactérienne		5
		1.1.1	lénéralités		5
		1.1.2	Iorphologie de la spore bao	ctérienne	6
		1.1.3	Origine de la résistance the	$\operatorname{rmique} \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots$	8
	1.2	Etude o	1 traitement thermique .	-	12
		1.2.1	es modèles cinétiques ou n	nodèles primaires	12
		1.2.2	es modèles environnements	aux ou modèles secondaires	15
			.2.2.1 Influence de la ten	npérature	15
	1.2.2.2 Influence du pH				
1.2.2.3 Influence de l'activité de l'eau					20
	1.2.3 Quantification des traitements thermiques				22
	1.3	« La récupération »			24
	1.3.1 La modélisation primaire			24	
1.3.2 La modélisation secondaire			27		
			.3.2.1 Influence de la ten	npérature d'incubation	27
			.3.2.2 Influence du pH de	e récupération	29
			.3.2.3 Influence de l'activ	vité de l'eau	30
		1.3.3	a récupération et le calcul	des barèmes	31
	1.4	Etude o	i comportement à la recroi	ssance	32
		1.4.1	a modélisation primaire .		32
		1.4.2	a modélisation secondaire	du taux de croissance	34
			.4.2.1 Les modèles polyn	ômiaux	34
			.4.2.2 Les modèles « raci	ne carrée »	34
			.4.2.3 Le « Gamma Cone	cept » de Zwietering	35
			.4.2.4 Les modèles cardin	naux	35
		1.4.3	a modélisation du temps d	le latence	36
	1.5 Bacillus cereus				39

	1.6	Microbiologie prévisionnelle, le contexte	1
2	Ma	tériel et méthodes 4	3
	2.1	Matériel biologique	3
	2.2	Etude du traitement thermique	4
		2.2.1 Les milieux	4
		2.2.1.1 Etude du pH	4
		2.2.1.2 Etude de $\hat{l'a_W}$	4
		2.2.2 Cinétique de survie	4
		2.2.3 Plans expérimentaux	6
	2.3	La récupération	6
		2.3.1 Les milieux	6
		2.3.2 Cinétique de récupération	7
		2.3.3 Plans expérimentaux	7
	2.4	Etude de la latence et de la croissance	7
		2.4.1 Les milieux	7
		2.4.2 Méthode de dénombrement en milieu liquide (NPP) 4	8
		2.4.3 Calibration du spectrophotomètre	8
		2.4.4 La manipulation $\ldots \ldots 4$	9
		2.4.5 Organisation des manipulations	9
		2.4.6 Influence de la taille de l'inoculum	9
	2.5	Traitement des données expérimentales	1
		2.5.1 Estimation des paramètres des modèles	1
		2.5.1.1 L'estimateur des moindres carrés $\ldots \ldots \ldots \ldots 5$	1
		2.5.1.2 Régions de confiance des paramètres 5	1
		$2.5.1.3 \text{Eustachage} \dots \dots \dots \dots \dots \dots \dots \dots 5$	2
		2.5.2 Evaluation de la qualité d'un modèle	3
		2.5.2.1 Critère quantitatif : le $R^2_{ajust\acute{e}}$	3
		2.5.2.2 Critère qualitatif : l'analyse des résidus 5	4
3	La	modélisation primaire de la survie	7
U	31	Bésultats 5	• 7
	0.1	3 1 1 Allure des courbes de survie	7
		3.1.2 Choix du modèle primaire	8
		3121 Caractéristiques de la distribution de Weibull 5	8
		3122 Signification des paramètres β et n	0
		3123 « Reparamétration » 6	$\frac{1}{2}$
		3.1.3 Evaluation du modèle sur une cinétique	3
		3.1.3.1 Estimation des paramètres	3
		3.1.3.2 Evaluation de la qualité d'aiustement	4
		3.1.4 Application à l'ensemble des cinétiques	6
		3.1.4.1 Calcul des paramètres	6
		$3.1.4.2$ Qualité de l'ajustement \ldots 6	6
	3.2	Discussion	7
		3.2.1 Observation du comportement de p	7
		3.2.2 Evaluation du modèle avec une valeur de p fixe	0

iv

			3.2.2.1	Estimation des paramètres	70
			3.2.2.2	ot de leurs intervalles de confignee	71
			2992	Evaluation de la qualité d'ajustement	74
		<u></u>	0.2.2.0 Conclus	Evaluation de la quante d'ajustement	14 76
		3.2.3	Conclus	1011	70
4	La	modéli	sation s	econdaire de la survie	79
	4.1	Résult	tats relati	fs au traitement thermique	79
		4.1.1	Influenc	e de la température	79
		4.1.2	Influenc	e de l'activité de l'eau	81
			4.1.2.1	Choix du modèle	81
			4.1.2.2	Ajustement et qualité du modèle	81
			4.1.2.3	Bilan et interprétations	84
		4.1.3	Influenc	e du pH	84
			4.1.3.1	Choix du modèle à utiliser	84
			4.1.3.2	Estimation des paramètres et qualité du modèle	86
			4.1.3.3	Bilan et interprétations	88
		4.1.4	La mod	élisation multifactorielle	88
			4.1.4.1	Le modèle global : ajustement et qualité	88
			4.1.4.2	Bilan et interprétations	88
	4.2	Résult	tats relati	fs à la récupération	92
		4.2.1	Influenc	e de l'activité de l'eau	92
			4.2.1.1	Choix du modèle	92
			4.2.1.2	Aiustement et qualité du modèle	92
			4213	Bilan et interprétations	94
		422	Influenc	e du pH	94
		1.2.2	4 2 2 1	Choix du modèle	94
			4.2.2.1	Ajustement et qualité du modèle	06
			4.2.2.2	Bilan at interprétations	06
		193	4.2.2.3 Effet al	bal du pH	90
		4.2.0		Influence du tupe de milieu de récupération	90
			4.2.3.1	Chair d'un madèle richal	90
			4.2.3.2		90
			4.2.3.3	Ajustement et quante du modele	100
	4.9	D'	4.2.3.4	Bhan et interpretations	100
	4.3	Discus	ssion .	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	103
		4.3.1	Method	es de denombrement	103
		4.3.2	Calcul o	les baremes	104
		4.3.3	Conclus	1011	105
5	\mathbf{Etu}	de de	la recroi	issance	107
	5.1	Manip	oulations	préliminaires	107
		5.1.1	La calib	ration	107
		5.1.2	Influenc	e de la taille de l'inoculum	107
		5.1.3	Test du	protocole complet	110
	5.2	Résult	tats	-	111

	5.2.1	Modélisation du temps de latence en fonction du temps de	
		traitement thermique	111
	5.2.2	Modélisation « secondaire » de λ en fonction de la tempéra-	
		ture de chauffage et du pH du milieu	115
		5.2.2.1 Modélisation des variations du paramètre m	115
		5.2.2.2 Etude des variations du paramètre $\lambda_0 \ldots \ldots \ldots$	118
5.3	Discus	sion	119
	5.3.1	Influence des conditions environnementales	119
	5.3.2	La variabilité dans les mesures	120
Conclu	ision e	t perspectives	123
Bibliog	Bibliographie 12		

Résumé

La sécurité microbiologique des produits alimentaires a longtemps été garantie grâce aux seuls traitements thermiques. La contrepartie de cette sécurité était une forte dénaturation des qualités nutritionnelles et organoleptiques. Or, avec les progrès de la réfrigération, les consommateurs sont devenus plus exigeants et souhaitent dorénavant des produits le plus proche possible de l'état frais. Le changement du mode de vie associé à ces nouvelles exigences ont induit l'émergence de produits subissant des traitements beaucoup plus faibles, produits devant alors être conservés au froid avant leur consommation. Ce sont les REPFEDs ou « Refrigerated Processed Foods of Extended Durability ». Les enjeux de la microbiologie prévisionnelle sont donc de fournir aux industriels des outils fiables permettant de décrire l'évolution microbiologique de ces produits afin d'analyser et de gérer les risques sanitaires.

Pendant de nombreuses décennies, seule la température était prise en compte dans le calcul des barèmes de pasteurisation et de stérilisation. La tendance actuelle est l'intégration de nouveaux facteurs environnementaux jouant également un rôle prépondérant tels que le pH et l'activité de l'eau. Avec ces nouveaux facteurs, les barèmes peuvent être estimés en intégrant une dimension stress bactérien. Enfin, les traitements étant modérés, il n'y a pas destruction totale des populations microbiennes, il faut alors estimer la date limite après laquelle le produit sera impropre à la consommation.

C'est dans ce contexte que s'inscrit la thèse, avec le choix de *Bacillus cereus* comme modèle d'étude. Nous avons dans un premier temps proposé un modèle primaire basé sur la distribution de Weibull, afin de décrire les cinétiques de survie non linéaires. Puis les effets de la température, du pH et de l'a_W sur les paramètres de ce nouveau modèle ont été modélisés. Dans la dernière partie de l'étude nous avons tenté de quantifier l'impact des différents stress thermiques sur le temps de latence à la recroissance des survivants.

Liste des tableaux

1.1	Valeurs de $F_{121,1^{\circ}C}$ en fonction du pH \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots	24
3.1	Les différents plans d'étude du traitement et de la récupération	57
4.1	Valeurs des paramètres du modèle de Gaillard <i>et al.</i> (1998a)	82
4.2	Choix du modèle décrivant l'influence du pH de traitement	85
4.3	Valeurs des paramètres du modèle au premier degré pour le pH de	
	traitement	86
4.4	Valeurs des paramètres du modèle global	89
4.5	Résultat de l'analyse de variance	89
4.6	Valeurs des paramètres du modèle de Coroller <i>et al.</i> (2001)	92
4.7	Choix du modèle décrivant l'influence du pH de récupération	95
4.8	Valeurs des paramètres du modèle au premier degré pour le pH de	
	récupération	96
4.9	Analyse de variance pour le modèle diagonal pH	103
5.1	Analyse de variance pour la pente m	115
5.2	Analyse de variance pour l'ordonnée à l'origine λ_0	119
5.3	Valeur des paramètres du modèle appliqué à λ_0	119
5.4	Tableau récapitulatif des différents paramètres	124

Table des figures

1.1	Morphologie de la spore bactérienne	7
1.2	Influence de la déshydratation du protoplaste	9
1.3	L'acide dipicolinique (DPA)	10
1.4	Acquisition de le résistance thermique	10
1.5	Les différents types de courbes de survie	14
1.6	Influence du pH sur le « Thermal Death Point »	17
1.7	Influence de l' a_W sur la thermorésistance $\ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots$	21
1.8	Schéma récapitulatif décrivant traitement et récupération	26
1.9	Influence du NaCl sur la thermorésistance apparente	28
1.10	Influence de la température d'incubation sur la thermorésistance	28
1.11	Influence de l'activité de l'eau sur la résistance apparente	31
1.12	La cinétique de croissance	33
1.13	Définition du temps de latence	33
1.14	Evolution de λ avec la durée de stress thermique	38
2.1	Protocole de traitement thermique	45
2.2	Protocole d'étude de la recroissance	50
3.1	Exemple de cinétique non linéaire	58
3.2	Influence des paramètres β et η de la distribution de Weibull	61
3.3	Ajustement du modèle primaire sur une cinétique	63
3.4	Projection des régions de confiance des paramètres	64
3.5	Analyse de la qualité d'ajustement (analyse des résidus)	65
3.6	Valeurs prédites en fonction des valeurs observées	67
3.7	Observation des variations de p (partie 1)	68
3.8	Observation des variations de p (partie 2)	69
3.9	Observation des variations de p (fin)	70
3.10	Résultats issus du jackknife classique	72
3.11	Résultats du jackknife par bloc variable couplé à la pondération	75
3.12	Valeurs prédites en fonction des valeurs observées avec p fixe	76
4.1	Modélisation de l'influence de la température	80
4.2	Influence de l' a_W de traitement	82
4.3	Modélisation de l'influence de l' a_W de traitement	83
4.4	Influence du pH de traitement	85
4.5	Modélisation de l'influence du pH de traitement	87
4.6	Modèle global T - pH - a_W (plan NaCl - Citrique)	90

4.7	Modèle global pH - a_W (plan Saccharose - Citrique)	91
4.8	Modélisation de l'influence de l' a_W de récupération $\ldots \ldots \ldots$	93
4.9	Influence du pH de récupération	95
4.10	Modélisation de l'influence du pH de récupération	97
4.11	Influence globale du pH	99
4.12	Effet global du pH	101
4.13	Effet global du pH avec $pH_{opt} = 7$	102
5.1	Courbe de calibration	108
5.2	Influence de la taille de l'inoculum sur λ	109
5.3	λ obtenus à pH=6,5	110
5.4	Exemple complet d'une manipulation à $pH=7$	112
5.5	Bilan d'une série de manipulations à 90°C	113
5.6	Variabilité des valeurs de λ	114
5.7	Variations de la pente m en fonction de la température et du pH	116
5.8	Ajustement du modèle Température-p H appliqué à m	117
5.9	Variations de λ_0 en fonction de la température et du pH \ldots	118
5.10	Schéma récapitulatif pour l'étude de la latence et de la recroissance	125
5.11	Exemple de simulation globale	125

Introduction

Du temps des premiers pas de l'humanité, le problème de la conservation des denrées alimentaires se posait en terme de survie durant les longues périodes hivernales. Au cours de son histoire, l'homme mit au point des techniques pour faire face à cette pénurie saisonnière, citons par exemple le séchage, la salaison, le saumurage voire le confisage. Toutes ces techniques, relativement lourdes à mettre en œuvre, induisent une forte altération des qualités nutritives et gustatives des produits traités. De plus, elles ne pouvaient que difficilement dépasser le stade artisanal pour atteindre la production de masse. Ainsi, pendant le directoire, Napoléon fut confronté au problème d'approvisionnement de ses armées dont la population était sans cesse grandissante. En 1795, il propose une récompense à qui mettra au point une technique empêchant les aliments de se gâter. En 1809, Nicholas Appert révolutionne la conservation en proposant son procédé fondé sur le traitement thermique des aliments enfermés dans des bouteilles en verre hermétiquement scellées. Il publiera « L'art de conserver toutes sortes de substances animales et végétales » et remporta le fameux prix. Mais les bouteilles en verre restent fragiles et trop fréquemment brisées sur les champs de batailles. Ce sont les britanniques qui vont récupérer cette technique et l'adapter en remplaçant les bouteilles par des boîtes métalliques que l'on appelle conserves. Ces dernières sont chères et seule la Marine Royale possède les moyens de s'en offrir. A cette époque, l'exploration des territoires vierges tels que l'arctique est une compétition mondiale. Les navires emportent généralement à leur bord pour toutes sources de nourriture, de la bière, des biscuits et de la viande saumurée. L'arrivée des conserves va considérablement repousser les limites en autorisant des séjours en mer toujours plus longs. Mais ces premières boîtes n'étaient pas exemptes de défaut. L'expédition de John Franklin en fit la triste démonstration. Pendant cette expédition, trois hommes d'équipage périrent de saturnisme, une intoxication liée au plomb utilisé pour souder les boîtes. Ce problème fut rapidement résolu grâce à l'utilisation de fer blanc et du sertissage mécanique. Avec l'industrialisation, les conserves sont produites en quantité et se démocratisent.

Toutefois une seconde révolution dans le domaine de la conservation est en marche avec l'apparition du procédé de congélation, procédé qui se répandra avec le froid mécanique. Des bateaux frigorifiques sont construits et permettent l'importation massive vers l'Europe de bœuf en provenance d'Argentine. Avec cette dernière technique, les qualités organoleptiques des produits progressent significativement. Néanmoins, un inconvénient subsiste, sous la forme de cristaux de glace qui altèrent la texture des aliments. Avec l'association des conserves et de la congélation, une grande étape de l'histoire de l'alimentation est franchie. En effet, chacun peut espérer manger à sa faim et a accès à une alimentation équilibrée. C'est à cette époque que le scorbut disparaît progressivement des pays européens.

Les progrès et améliorations apportés par la réfrigération ont rendu les consommateurs beaucoup plus exigeants en ce qui concerne les qualités organoleptiques. Ils désirent désormais des produits le plus proche possible de l'état frais. Ceci contraint les industriels à tout entreprendre afin d'abaisser les coûts de production tout en améliorant la qualité. De nouvelles techniques voient le jour comme la surgélation ou la lyophilisation. Ces industriels vont innover et réduire fortement les traitements drastiques afin de répondre à ces nouvelles attentes. En conjonction, le mode de vie de nos sociétés modernes évolue rapidement. Ainsi, alors qu'au début du XX^e siècle les consommateurs fréquentaient les marchés quotidiennement, ce taux de fréquentation est aujourd'hui réduit à une ou deux visites hebdomadaires. Ces exigences contradictoires ont amené l'émergence de produits faiblement traités devant être conservés au froid jusqu'à leur consommation, ce sont les REPFEDs pour « Refrigerated Processed Foods of Extended Durability ».

Au cours de l'histoire de l'alimentation, les coûts des produits ainsi que leur qualité ont toujours guidé les industriels. Cependant, un point qui n'a pas encore été abordé, était, est et sera toujours prioritaire sur toute autre considération, c'est celui de la sécurité sanitaire. En effet, les aliments doivent être irréprochables du point de vue microbiologique. Avec la médiatisation des intoxications alimentaires, même minimes, nous pouvons imaginer l'impact que pourrait avoir un scandale de ce type sur la réputation d'une entreprise. C'est pourquoi, dès le début du XX^e siècle, les conserveurs ont financé des recherches ayant pour objectif le développement d'outils mathématiques permettant de mieux appréhender le risque microbien, la microbiologie prédictive était née. Cette discipline qui ne cesse de se développer, vit l'apparition dès les années 1920 d'un des modèles qui fait, aujourd'hui encore, office de référence : le modèle de Bigelow. Avec le temps, l'influence des facteurs température, pH et activité de l'eau commence à être connue dans les domaines de la destruction et de la croissance des micro-organismes.

A l'heure actuelle, les produits comme les REPFEDs essayent de concilier faible traitement et durée de conservation importante. Avec de telles ambitions, jamais les industriels n'auront tant fait appel à la microbiologie prédictive. Malgré cela, les modèles qu'ils utilisent datent parfois des années 1920 et n'ont pas été actualisés avec les nouvelles avancées dans ce domaine. C'est dans ce contexte de réduction des traitements que s'inscrit ce travail de thèse, avec *Bacillus cereus* comme modèle d'étude. L'objectif de ce travail est de tester s'il est aujourd'hui possible de modéliser le comportement bactérien depuis le processus de fabrication jusqu'au réfrigérateur du consommateur.

Le premier chapitre de ce manuscrit dresse un état des lieux de cette disci-

pline qu'est la microbiologie prédictive. Au travers de cette étude bibliographique, l'évolution des principaux modèles de traitement thermique, de récupération et de croissance est exposée. Puis, après la présentation des différents matériels et méthodes utilisés pendant ces travaux, les principaux résultats seront examinés dans les trois chapitres suivants. Dans le premier d'entre-eux, un nouveau modèle cinétique est proposé afin de décrire les courbes de survie s'écartant du comportement log-linéaire. Dans le second, l'applicabilité des modèles secondaires classiques aux paramètres du nouveau modèle primaire est examinée. Enfin, dans le dernier de ces chapitres, c'est la quantification des effets du stress thermique sur le temps de latence à la recroissance qui retiendra notre attention.

Chapitre 1

Etude Bibliographique

1.1 La spore bactérienne

1.1.1 Généralités

C'est en 1676 que Van Leeuwenhoek (1632–1723) découvrit les micro-organismes qu'il appela à l'époque « animalcules » (Prescott *et al.*, 1995). Suite à ses travaux se développa alors une très importante controverse à propos de la génération spontanée de la vie. En effet, Lazzaro Spallanzani (1729–1799), plaçant de l'eau et des germes dans des flacons hermétiquement scellés qu'il fit séjourner trois quarts d'heure dans de l'eau bouillante, démontra qu'il n'y avait pas de croissance tant que les flacons restaient fermés. Il faudra attendre 1861 et les travaux de Louis Pasteur (1822–1895) pour admettre que l'air contient des germes qui contaminent les solutions qui y sont exposées. C'est au cours de recherches sur ce sujet que John Tyndall (1820–1893) mit en évidence l'existence de formes bactériennes exceptionnellement résistantes à la chaleur, et c'est enfin Ferdinand Cohn (1828–1898) qui découvrit l'endospore bactérienne. L'importance de ces spores fut démontrée par Robert Koch (1843–1910) qui remarqua leur implication dans la maladie du charbon provoquée par *Bacillus anthracis*.

Certaines bactéries possèdent donc la capacité de se transformer en petites unités ovoïdales ou sphériques douées d'une extraordinaire résistance. Preuve en est l'expérience de l'Institut Pasteur qui réussit à obtenir d'abondantes cultures après avoir incubé des spores âgées de plusieurs millénaires prélevées à l'intérieur de momies embaumées (Leclerc *et al.*, 1995).

Ces spores issues de bactéries gram positives existent chez quatre genres bactériens, les genres *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporosarcina* et *Sporolactobacillus*. Chez ces bactéries, le cycle sporal caractérise les transformations où alternent les phases végétatives de croissance, la sporulation, la dormance et la germination. Le processus de sporulation qui induit de profonds et radicaux changements morphologiques survient en fin de phase de croissance lorsque le milieu s'appauvrit en nutriments. Mais son initiation est beaucoup plus complexe qu'il n'y paraît. En effet, il existe bien d'autres alternatives à la sporulation. L'activation de la mobilité flagellaire pour rechercher d'autres sources de nourriture par chimiotaxie en est un exemple. Ou, dans le cas de compétition avec d'autres micro-organismes, la production et la libération de molécules type antibiotiques peut être une autre solution. Ces bactéries disposent donc d'un éventail de réponses où la sporulation intervient en ultime recours lorsque toutes les autres voies ont échoué. Comme le montre Stephens (1998) ce processus est régulé par un très grand nombre de facteurs et de gènes, et une fois initié, il est toujours mené à son terme.

Lorsque la spore est achevée, celle-ci reste en phase de dormance dans l'attente de conditions plus propices à la croissance. La dormance est un état dans lequel la spore se trouve fortement déshydratée et totalement inactive, il n'y a pas d'activité métabolique, ce qui lui permet de survivre pendant de très longues périodes. Dans ces conditions, elle est particulièrement résistante à la chaleur, à la dessiccation, aux radiations ainsi qu'aux agents chimiques.

Enfin, lorsque l'environnement devient à nouveau favorable au niveau physicochimique, la spore germe pour redevenir une cellule végétative. Le processus de germination est aussi complexe que celui de la sporulation et serait induit par de petites molécules comme certains acides aminés par exemple (O'Connor et Halvorson, 1961). La germination peut également être déclenchée par certains stress dont la chaleur ou les pH acides, on parle alors d'activation (Finley et Fields, 1962; Berg et Sandine, 1970).

1.1.2 Morphologie de la spore bactérienne

La spore possède une structure propre qui diffère très fortement de celle de la cellule végétative qui lui donne naissance, elle est formée à l'intérieur de cette cellule d'où son nom d'endospore. Ces différences apparaissent sur la photographie (a) de la figure 1.1 où les spores de *Bacillus cereus* sont bien visibles, de par leur importante réfringence, à l'intérieur des cellules végétatives. Ainsi, en phase stationnaire de croissance, le *nucleus* compact se transforme en un filament chromatique qui s'étend sur toute la longueur cellulaire. Un filament nucléaire se condense ensuite à l'une des extrémités de la cellule où il s'autonomise. La membrane cytoplasmique forme alors un *septum* transversal divisant ainsi la cellule en deux parties, la préspore et la cellule végétative alors appelée sporange, enfin la préspore est enkystée dans le sporange. A ce stade, la préspore qui contient le même matériel génétique que la cellule mère, ainsi que l'ensemble du matériel biochimique nécessaire aux différentes synthèses, se trouve séparée de cette dernière par deux doubles couches membranaires, la membrane interne (IM, IFM) et la membrane externe (OFM).

Cette préspore entre alors en phase de maturation, phase pendant laquelle les deux membranes sont très actives en terme de synthèse. Dans l'espace délimité par celles-ci, il y a apparition de la paroi sporale (PCW,PGCW) et du cortex (ctx, Cx), puis à l'extérieur, il y a création de la tunique (c, UC, Ic, Oc) et de l'exosporium (EX, SL). Ces différentes enveloppes apparaissent sur la photographie (b) et sont décrites sur le schéma (c) de la figure 1.1.



Figure 1.1 – (a) photographie en microscopie de *Bacillus cereus* en phase stationnaire de croissance ; (b) photographie en microscopie électronique d'une spore de *Bacillus cereus* (Gould et Hurst, 1969) ; (c) schéma d'une coupe de spore de *Bacillus subtilis* (Henriques et Moran, 2000). (N) Nucléoîdes ; (Cr) cœur ou corps sporal, « core » ; (IM, IFM) membrane interne, « Inner Forespore Membrane » ; (PCW, PGCW) paroi sporale, « Primordial Germ Cell Wall » ; (ctx, Cx) Cortex ; (OFM) membrane externe, « Outer Forespore Membrane » ; (c) tunique, « coat » ; (UC) sous-tunique, « Under Coat » ; (Ic) tunique interne, « Inner coat » ; (Oc) tunique externe, « Outer coat » ; (EX, SL) exosporium, « Surface Layer ».

Comme nous venons de le voir, la spore se distingue donc de la cellule végétative par ces nouvelles structures que sont ses enveloppes. Il existe de plus une différence très importante au niveau de la composition chimique puisque la spore contient des composés totalement absents de la forme végétative. Voyons donc, de l'intérieur vers l'extérieur, une description des structures de cette spore :

- le cœur ou corps sporal (« core », Cr) :
 - le cœur de la spore contient le matériel nucléaire (N), les ribosomes et le nécessaire pour les synthèses; il est très fortement déshydraté, en effet, sa teneur en eau n'excède pas 15 à 20 % au lieu des 80 % rencontrés dans une cellule végétative. Il n'y a pas d'activité métabolique au sein de cette structure pendant la phase de dormance;

- la membrane interne (« Inner Forespore Membrane », IM, IFM) :
 c'est une membrane en double couche classique qui deviendra la membrane cellulaire de la forme végétative;
- la paroi sporale (« Primordial Germ Cell Wall », PCW, PGCW) : cette paroi contient du peptidoglycane normal qui deviendra, après la germination, la paroi de la cellule végétative;
- le cortex (ctx, Cx) :

il représente 10 à 20 % de l'ensemble, c'est une couche épaisse d'aspect monomorphe, très transparente aux électrons; il est formé d'un peptidoglycane inhabituel avec beaucoup moins de liaisons internes et très sensible au lysozyme; il contient une forte proportion de dipicolinate de calcium; son autolyse constitue une étape déterminante de la germination;

- les tuniques (« coats », c, UC, Ic, Oc) : elles représentent 20 à 35 % de l'ensemble ; elles sont composées d'une protéine type kératine riche en liaisons disulfures ; imperméables, elles sont responsables de la résistance aux agents chimiques ;
- l'exosporium (EX, SL) :

c'est la couche la plus externe, une membrane lipoproté inique contenant 20 % de sucres, elle n'est pas essentielle à la survie de la spore.

1.1.3 Origine de la résistance thermique

La spore est donc une entité de structure et de composition complexes douée d'une résistance thermique exceptionnelle. Mais, il ne faut pas perdre de vue que la spore est dormante et qu'elle possède tous les mécanismes lui permettant de détecter l'état de l'environnement où elle se trouve et ceux lui permettant de sortir de cette dormance. Il y a donc un subtil équilibre entre résistance, maintien de la dormance et l'activation/germination, équilibre dans lequel les différentes enveloppes ont un rôle à jouer.

D'après Cazemier *et al.* (2001), la résistance aux fortes températures serait due à trois facteurs principaux, la déshydratation du protoplaste, la minéralisation et l'adaptation thermique. Les deux derniers facteurs induisant une augmentation de la déshydratation, c'est celle-ci qui serait à l'origine de la thermorésistance des spores (Sugiyama, 1951). En effet, Beaman et Gerhardt (1986) ont observé que le fait d'élever la température de sporulation accentuait la déshydratation du protoplaste (figure 1.2(a)), ce qui avait pour conséquence une très nette augmentation de la thermorésistance (figure 1.2(b)). Ce phénomène serait à l'origine de la différence de comportement qui existe entre les psychrophiles peu résistants, les mésophiles de résistance moyenne et les thermophiles très résistants (Gombas, 1983), d'après Warth (1978), la résistance des spores dépendrait donc de la température maximale de croissance de la forme végétative. Ainsi Beaman *et al.* (1982), après avoir estimé



Figure 1.2 – (a) Influence de la température de sporulation sur la teneur en eau du protoplaste; (b) Influence de la température de sporulation sur la thermorésistance, (Gould et Hurst, 1969).

que le protoplaste de *Bacillus cereus T* (mésophile) contenait cinq fois plus d'eau que celui de *Bacillus stearothermophilus* (thermophile), constataient que le thermophile était quasiment 600 fois plus résistant. Il est bien évident que la plus grande stabilité des protéines et du matériel génétique des thermophiles participe également à cet écart.

L'acquisition de la thermorésistance est réalisée via l'accumulation de plusieurs composés en quantités très importantes dans le cortex (figure 1.4), les principaux étant l'acide dipicolinique (DPA, figure 1.3(a)) et des cations divalents, essentiellement du calcium Ca²⁺. En 1960, Hashimoto *et al.* remarquent déjà que la résistance est fortement liée à la quantité d'acide dipicolinique présent, il en va de même pour la réfringence. La teneur en acide dipicolinique est telle, jusqu'à 15 % de la masse de la spore, qu'elle dépasse le seuil de solubilité, le composé se trouve alors sous forme cristalline (Leuschner et Lillford, 2001).

Mais l'acide dipicolinique n'explique pas à lui seul la résistance, en effet des mutants qui en sont dépourvus peuvent résister aux fortes températures sous la condition qu'ils soient traités dans un milieu contenant une forte concentration de sucres (Bhothipaksa et Busta, 1978). Ces sucres maintiendraient la même pression



Figure 1.3 – (a) Acide dipicolinique (DPA); (b) Dipicolinate de calcium.



Figure 1.4 – Acquisition de le résistance thermique par accumulation d'acide dipicolinique et de calcium. (Gould et Hurst, 1969)

osmotique que dans la spore normale, ce qui conforte l'hypothèse que c'est bien la déshydratation qui est le facteur primordial.

En fait, c'est l'association en quantité équimolaire de l'acide dipicolinique avec les ions calcium (1.4), pour former des chelates DPA-Ca($3H_2O$) et des complexes DPA-Ca-peptides (figure 1.3(b)), qui explique la faible teneur en eau du protoplaste (Grecz *et al.*, 1972). Ces complexes et chélates sont maintenus au sein du cortex par les mailles du peptidoglycane à faibles liaisons ce qui assure une bonne déshydratation. Ce peptidoglycane inhabituel joue un rôle essentiel en participant au maintien de la dormance et son faible taux de liaisons joue également un rôle primordial lors de la germination. En effet, Meador-Parton et Popham (2000) ont montré que des mutants possédant un taux de liaisons plus important pouvaient former des spores mais celles-ci étaient incapables de germer. Le peptidoglycane inhabituel, sensible au lysozyme et enzymes lytiques, permet donc, lors de sa dégradation, la libération de l'acide dipicolinique et du calcium dans le milieu favorisant ainsi la réhydratation du protoplaste nécessaire pour la germination.

Les ions calcium induisent également une stabilisation des acides nucléiques et des protéines en créant des liaisons ioniques avec les groupements carboxyliques chargés négativement. Ces cations provoquent une forte diminution de la mobilité des solutés dans la spore ce qui favorise une nouvelle fois la dormance.

Enfin, la tunique contient une quantité élevée de protéines riches en cystéine qui forment des ponts disulfures très stables, rigidifient la structure et la rendent imperméable (Berg et Sandine, 1970).

Tous les éléments évoqués sont mis en place lors de la sporulation, il est donc naturel de constater que les conditions dans lesquelles elle a lieu peuvent avoir une influence sur la résistance des spores. De nombreux auteurs ont d'ailleurs décrit l'influence de la composition du milieu (Mazas *et al.*, 1995), de la température (Condon *et al.*, 1992; Raso *et al.*, 1995; Palop *et al.*, 1999), du pH (El Bisi et Ordal, 1956; Pang *et al.*, 1983; Craven, 1990), de l'activité de l'eau (Jakobsen et Murrell, 1977) ou de la teneur en cations (Amaha et Ordal, 1957). Ceci est source d'une très grande variabilité qui s'ajoute aux variabilités inter et intra espèces.

La microbiologie prévisionnelle, ou prédictive, est une discipline actuellement en plein essor. Elle s'attache à mesurer le comportement microbien dans des conditions variées ayant pour but de créer des modèles mathématiques. Ces modèles peuvent ensuite être appliqués pour simuler le devenir d'une population bactérienne dans des conditions différentes de celles utilisées pour les créer. Ceci permet donc un gain de temps et d'argent puisqu'il n'est plus nécessaire de refaire les manipulations à chaque changement de conditions. Ces modèles sont très employés dans le domaine des traitements thermiques et celui de la croissance, mais ils sont encore perfectibles en y incluant l'influence de nouveaux facteurs jusqu'alors ignorés. Tout ceci participe à la démarche d'analyse des risques sanitaires qui comprend quatre étapes (Sanaa *et al.*, 2000), l'identification du danger, l'appréciation de l'exposition, l'appréciation de la relation dose-réponse et enfin l'analyse du risque. La microbiologie prévisionnelle, avec ses modèles, s'inscrit dans la seconde étape où elle permet d'estimer le nombre de survivants après un traitement thermique par exemple et le devenir de ces survivants en terme de croissance.

1.2 Etude du traitement thermique

1.2.1 Les modèles cinétiques ou modèles primaires

Les traitements thermiques sont de nos jours très communément employés afin de garantir la sécurité microbiologique des produits alimentaires. Leur base fut découverte au début du XX^e siècle par Nicolas Appert qui réussit pour la première fois à conserver des aliments pendant une longue période en les enfermant dans des bouteilles en verre qu'il chauffait ensuite à 100 °C. A partir de cette découverte, les progrès furent rapides et très vite, l'industrie de la conserve fit son apparition. Cette dernière, soucieuse des risques et des coûts de production, fut à l'origine de l'étude approfondie de la résistance thermique des micro-organismes. En effet, celleci souhaitait pouvoir estimer le temps de chauffage nécessaire pour détruire la flore microbienne et plus particulièrement les spores de *Clostridium botulinum*.

La première technique utilisée fut celle du « Thermal Death Point ». Elle consiste à enfermer une suspension de bactéries ou de spores de concentration connue dans de petits tubes ou ampoules scellés qui étaient ensuite exposés à la chaleur. Ces tubes étaient alors tour à tour retirés à différents temps puis leur contenu était incubé dans un bouillon nutritif pendant une semaine. Le temps le plus court permettant la destruction complète des micro-organismes correspondait au « Thermal Death Point » (Bigelow et Esty, 1920; Weiss, 1921; Esty et Williams, 1924).

La microbiologie prédictive telle que nous la connaissons aujourd'hui est sans doute née des travaux de Chick (1908). Son étude sur les procédés de désinfection par les agents chimiques et l'eau chaude, l'a en effet conduite à remarquer que la destruction des micro-organismes se faisait suivant une relation exponentielle décroissante qu'elle écrivit :

$$N = N_0 \cdot e^{-kt} \tag{1.1}$$

avec :

-t, le temps de traitement;

- -k, le taux de destruction;
- $-N_0$, la population bactérienne initiale;
- -N, le nombre de bactéries survivantes au temps t.

Selon cette équation, l'ensemble des individus d'une population possède donc la même thermorésistance. Cette théorie fut confirmée au cours des années qui suivirent par les travaux de Bigelow (1921) et ceux de Esty et Meyer (1922). Enfin, Katzin *et al.* (1943) préfèrent exprimer la cinétique en base décimale et introduisent alors la durée de réduction décimale ou « Decimal Reduction Time DRT» qu'ils calculent avec :

$$DRT = \frac{Ln10}{k} = \frac{(t_2 - t_1)}{\log_{10}\left(\frac{C_1}{C_2}\right)}$$
(1.2)

avec :

 $-t_1$ et t_2 , deux temps de traitement;

 $-C_1$ et C_2 , les concentrations respectives en survivants;

-k, la constante de la cinétique d'ordre un (équation 1.1).

Cette durée de réduction décimale correspond au temps de traitement nécessaire pour diviser la population survivante d'un facteur 10, elle est exprimée en minutes. Ce sont Ball et Olson (1957) qui lui attribuent définitivement la lettre D. La cinétique de destruction thermique des micro-organismes est dorénavant décrite par :

$$N = N_0 \cdot 10^{-\frac{t}{D}} \quad ou \quad logN = logN_0 - \frac{t}{D}$$
 (1.3)

avec :

-t, le temps de traitement thermique;

 $-N_0$, la population initiale;

-N, la population survivante au temps t;

-D, la durée de réduction décimale.

La forme logarithmique de l'équation 1.3 est la plus répandue car c'est l'équation d'une simple droite dont l'inverse de la pente, en valeur absolue, fournit la valeur de D.

Mais très rapidement, quelques auteurs font part de cinétiques qui s'écartent du comportement logarithmique (Frank et Campbell, 1957; Rahn, 1943) avec des courbes qui ne sont plus linéaires. Au fil des années, une multitude d'allures différentes sont signalées, Cerf (1977) les a regroupées dans une revue et représentées sur un même schéma (figure 1.5). Sur cette figure, la droite D correspond à la cinétique classique d'ordre un qui suppose une population homogène du point de vue de la résistance. Cerf qualifie le retard à la destruction des courbes A et B d'« épaulement ». Il correspondrait à une sorte de temps de latence au cours duquel le taux de destruction croît avant de se stabiliser. A l'inverse, une « trainée » ou queue, correspondrait à la diminution du taux de destruction au cours du temps (courbe E). Enfin certaines cinétiques de survie (C) présentent à la fois un épaulement et une queue, il en résulte une courbe d'allure sigmoïdale.

Bon nombre d'auteurs se sont alors attelés à la tâche afin de fournir, avec plus ou moins de succès, des explications et des modèles succeptibles de décrire ces cinétiques « atypiques ». La courbe A serait due à la conjonction de deux phénomènes simultanés, l'activation thermique des spores et la destruction. Le modèle le plus simple est celui de Shull *et al.* (1963) qui suppose que les spores dormantes doivent



Figure 1.5 – Les différents types de courbes de survie. A et B, épaulement; C, sigmoïde; D, courbe logaritmique; E, courbe concave; F, courbe biphasique avec queue. (Cerf, 1977)

être activées avant de pouvoir être détruites. Rodrigez *et al.* (1988), de leur côté, pensent que les spores dormantes sont à la fois activées et détruites avec le même taux de destruction pour les deux formes. Enfin, Sapru *et al.* (1992) proposent un modèle plus général, dans lequel les spores dormantes et actives peuvent avoir des taux de destruction différents, il s'écrit :

$$N = X_0 \cdot e^{-k_1 t} + Y_0 \frac{h}{k_2 - k_1 + h} \left(e^{-k_1 t} - e^{-(k_2 + h)t} \right)$$
(1.4)

avec :

- -t, le temps de traitement;
- $-X_0$, le nombre initial de spores actives;
- $-Y_0$, le nombre initial de spores dormantes;
- $-k_1$, le taux de destruction des spores actives;
- $-k_2$, le taux de destruction des spores dormantes;
- -h, le taux d'activation des spores dormantes.

La courbe F trouverait son origine dans la présence de deux types de spores au sein de la population, chacun des types ayant sa propre résistance. Cette cinétique avec rupture de pente serait donc la somme de deux cinétiques d'ordre un.

Les cinétiques B pourraient, quant à elles, être expliquées par la présence d'aggrégats ou « flocs » dans la suspension, certaines spores se trouvant alors protégées, d'où le retard à la destruction. Mais cette hypothèse est contredite par certains auteurs qui observent des courbes B ou E en l'absence d'artefacts de ce type (Han, 1975; Anderson *et al.*, 1996). Pour eux, l'allure de ces courbes serait liée à une distribution de la résistance au sein de la population. C'est dans cet esprit que Fernandez et al. (1999) proposent le modèle suivant, inspiré de la densité de la distribution statistique de Weibull :

$$N = N_0 \cdot e^{-\left(\frac{t}{a}\right)^n} \tag{1.5}$$

Peleg et Cole (2000), à partir des mêmes suppositions, le proposent sous la forme :

$$N = N_0 \cdot 10^{-bt^n} \tag{1.6}$$

Ces modèles sont très intéressants puisqu'ils ne possèdent que trois paramètres et permettent de décrire les courbes B, D et E. Il faut également citer le modèle de Geeraerd *et al.* (2000), modèle à quatre paramètres qui décrit les courbes B, C,Det E. Signalons enfin que de nombreux autres modèles existent, ces derniers ont été listés par Geeraerd *et al.* dans le cadre de leur revue.

Pour conclure avec tous ces nouveaux modèles primaires de destruction, force est de constater que leur utilisation est limitée voire confidentielle. En effet, depuis toujours, c'est la cinétique d'ordre un qui fait figure de référence et c'est d'ailleurs la seule utilisée pour les calculs de barèmes de pasteurisation/stérilisation en industrie. A partir de là, la thermorésistance des micro-organismes peut donc être estimée par la valeur de D, la durée de réduction décimale, ou par la valeur de k, le taux de destruction. Ces deux valeurs qui sont liées par la relation :

$$D = \frac{Ln10}{k} \tag{1.7}$$

subissent des changements avec les conditions environnementales et ces variations sont décrites par les modèles secondaires.

1.2.2 Les modèles environnementaux ou modèles secondaires

1.2.2.1 Influence de la température

La modélisation secondaire s'est longtemps limitée à la prise en compte de la température comme seul facteur influençant la thermorésistance des micro-organismes. Son impact est décrit par deux modèles monofactoriels d'égales performances :

le modèle d'Arrhenius (1889) :

$$k = B.e^{-\frac{Ea}{RT}} \tag{1.8}$$

avec :

- -k, le taux de destruction;
- -T, la température absolue;
- -B, une constante empirique;
- Ea, l'énergie d'activation;
- -R, la constante des gaz parfaits.

décrit l'influence de la température de traitement sur la valeur k du taux de destruction. Malgré sa très bonne qualité d'ajustement, ce modèle présente le paramètre B, dénué de sens physique, ayant un ordre de grandeur difficilement appréhendable. C'est pourquoi il est plutôt présenté sous sa forme reparamétrée :

$$k = k^{\star} \cdot e^{-\frac{Ea}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T^{\star}}\right)} \tag{1.9}$$

où k^* représente la valeur du taux de destruction à la température de référence T^* , généralement 121,1 °C.

le modèle de Bigelow (1921) :

$$D = D^* . 10^{-\frac{T - T^*}{z}} \tag{1.10}$$

 avec :

-D, la durée de réduction décimale à la température T;

 $-D^{\star}$, la durée de réduction décimale à la température de référence T^{\star} (121,1 °C);

-z, l'écart de température induisant la variation de D d'un facteur 10.

qui décrit l'influence de la température sur la durée de réduction décimale.

Ces modèles possèdent la même qualité d'ajustement mais, dans les milieux industriels alimentaires, l'avantage est donné au modèle de Bigelow, car ses paramètres ont tous un sens physique simple et facilement interprétable.

On peut donc caractériser la thermorésistance d'un micro-organisme par les valeurs de D^* et z qui lui sont associées. D^* représente sa résistance à la température de référence et z sa sensibilité aux variations de températures. La valeur de z est généralement comprise entre 7 et 11 °C pour les spores et entre 3 et 7 °C pour les formes végétatives.

1.2.2.2 Influence du pH

Le pH est connu pour avoir une forte influence sur la résistance thermique des micro-organismes. Il est d'ailleurs intéressant de constater que l'acidification des aliments est utilisée couramment pour limiter le développement microbien mais l'effet de cette acidification n'est répercuté sur la durée des traitements thermiques que de manière empirique et approximative.

Très tôt donc, l'industrie de la conserve s'est intéressée à l'acidification afin de réduire la résistance et par la même, les barèmes. Ainsi, Weiss (1921) remarque que le « Thermal Death Point » à 100 °C de *Bacillus botulinus (Clostridium botulinum)* passe de 180 minutes pour pH = 6 à 10 minutes pour pH = 2,1 (figure 1.6).

Xezones et Hutching (1965) remarquent également cette action du pH au travers de la valeur de $D_{230 \circ F}$ qui passe de 2,43 minutes pour pH = 7 à 0,483 minute pour pH = 4. D'après Weiss (1921), cette diminution de résistance est liée à la concentration en protons. Comme le laisse penser la figure 1.6, la diminution de résistance

	TAE	ULAR DIAGRA	AM 5	HOWING THE EFFECT OF THE
	RES	DISTANCE OF	THE :	SPORES OF B.BOTULINUS
	No. Food		pH-	THE SPORES OF B.BOTULINUS AT 100°C 10 20 30 40 50 60 30 120 150 180
ł	29	Egg Plums	2.10	where the second se
1	28	Gooseberries	3.00	
	25	Raspberries	3.16	
	17	Strawberries	3.22	
L.	14	Apples	3.24	Contraction of the second second
a	34	Saverkraut	326	
\geq	27	Cherries	3.30	18 1 4 1982
Ň	18	Cider	3.30	
ΰ	19	Blueberries	3.40	
\uparrow	15	Blackberries	3.55	and the second se
	36	Apricots	3.62	12 (14) - 342 (14)
t	16	Peaches	3.70	verifies av en en
1	26	Bartlett Pears	3.85	
Ŧ	38	Turnips	4.10	provide an an an and an an
	11	Pumpkin	4.22	interest of the second second second second second
1-	20	Tomatoes	4.40	
	37	Carrots	5.05	
+	3	Beets	513	
	3	Asparaque	5.16	
1-	32	Wax Beans	522	
1	4	Sweet Wrinkled Peas	530	
+	30	Sauash	530	141 - 1 Standard Contractor Andrews
	33	Sweet Potatoes	5.36	
Ħ	6	String Beans	5.40	
à	13	Pork & Beans, Tom 5	5.40	
0	I	Spinach	5.40	
2	35	Brussels Sprouts	5.46	
ų.	2	Pork&Beans-Plain 5.	5.69	
	12	Red Kidney Beans	5.70	
+	10	Lima Beans	5.77	
	9	Chile Con Carne	5.82	
t	31	Succotash	6.00	
	7	Sweet Corn	6.21	
+	8	Clam Chowder	6.26	en e
	22	Sprimp	7.00	
1	21	Hominy	7.40	

Figure 1.6 – Influence du pH sur le « Thermal Death Point » de *Clostridium botulinum* (Weiss, 1921).

ne serait pas brutale mais plutôt progressive. Grecz *et al.* (1972) expliquent l'action des pH acides par leur effet sur la constitution chimique de la spore. Ils observent en effet que la diminution du pH induit une libération des chélates DPA-Ca dans le milieu, ceci ayant pour conséquence une réhydratation précoce de la spore et donc sa fragilisation.Cette libération serait due à la neutralisation des groupements carboxyliques du peptidoglycane du cortex au fur et à mesure que le pH décroît (Behringer et Kessler, 1992).

L'effet des faibles valeurs de pH semble avoir des conséquences variables sur la valeur du paramètre z. Certains observent une augmentation de z quand le pH diminue, les spores seraient donc moins sensibles à la température pour les bas niveaux de pH (Santos *et al.*, 1992). Fernandez *et al.* (1994) ont quant à eux constaté

l'effet inverse, à savoir une diminution de z conjointement à celle du pH, les spores seraient donc sensibilisées à la température par les pH acides. Enfin Xezones et Hutching (1965) n'ont pas noté de variation de la valeur de z avec le pH. Les trois cas existent donc en ce qui concerne la sensibilité à la température, pour ce qui est de l'acidorésistance, l'effet le plus fréquemment rencontré est une acidorésistance accrue à haute température (Lopez *et al.*, 1996).

Comme nous venons de le voir, la mise en jeu du facteur pH est très intéressante pour les industriels. Mais ces derniers ne peuvent pas, et ne veulent pas, l'utiliser à l'aveuglette. C'est ici que la microbiologie prévisionnelle intervient avec, pour la première fois, la création de modèles multifactoriels prenant en compte la température mais aussi le pH. Très vite, l'addition de nouveaux facteurs accroît la complexité des équations et de nombreux auteurs suggèrent le respect de quelques règles. Rosso *et al.* (1995) dressent une liste de ces critères qualitatifs, avec pour les principaux :

- la parcimonie, à savoir un faible nombre de paramètres;
- une signification physique ou biologique des paramètres les rendant accessibles à tous;
- la facilité et la qualité de l'ajustement;
- l'applicabilité;
- une faible proportion de corrélations structurelles;
- une bonne robustesse.

Davey *et al.* (1978; 1993) sont les premiers à proposer un modèle comprenant le facteur pH. Leur modèle, répondant en partie aux critères précédemment cités, s'inspire de l'équation d'Arrhénius (1.8) :

$$Lnk = C_0 + \frac{C_1}{T} + C_2.pH + C_3.pH^2$$
 (1.11)
où $C_0 = LnB$ et $C_1 = \frac{Ea}{R}$

Puis vinrent les modèles polynomiaux, généralement quadratiques, de la forme :

$$log D = a + b.T + c.pH + d.T^{2} + e.pH^{2} + f.T.pH$$
(1.12)

Juneja *et al.* (1995), travaillant sur *Clostridium botulinum*, ont ajusté un tel modèle avec pour résultat :

$$LnD = -9,9161 + 0,6159.(temp) - 2,86.pH - 0,2190.(sel) + 2,7124.(Phos) + 0,024.(temp)(pH) + 0,2937.(pH).(Phos) - 0,2705.(sel).(Phos) - 0,0053.(temp)^2 + 0,1074.(pH)^2 + 0,0564.(sel)^2 - 2,7678.(Phos)^2$$

$$(1.13)$$

Il existe bien d'autres exemples de ce type, citons entre autres les modèles du premier et du second degré de Fernandez *et al.* (1996). Ce type de modèle s'ajuste généralement bien à un jeu de valeurs expérimentales mais, lorsque l'on change les conditions, leurs paramètres varient énormément, allant même jusqu'à changer de signe (Fernandez *et al.*, 1996). De même, si l'espèce étudiée diffère, leur ajustement n'est plus d'aussi bonne qualité. Ces observations nous amènent à dire que ces modèles ne sont pas robustes, d'infimes variations de facteurs non pris en compte peuvent avoir des répercutions importantes sur leurs paramètres.

Mafart et Leguérinel (1998), de leur côté, s'inspirent de l'équation de Bigelow (1.10) en y ajoutant un terme relatif au pH :

$$log D = log D^{\star} - \left(\frac{T - T^{\star}}{z_T}\right) - \left(\frac{pH - pH^{\star}}{z_{pH}}\right)^2$$
(1.14)

avec :

- $-pH^{\star}$, le pH optimal de résistance, pH considéré égal à 7;
- $-z_T$, l'écart de température par rapport à la température de référence qui induit une variation de D d'un facteur 10;
- $-z_{pH}$, l'écart de pH par rapport à l'optimum induisant la division de D d'un facteur 10, il est généralement compris entre 3 et 4;
- $-D^*$, la durée de réduction décimale à la température de référence T^* et au pH optimal pH^* .

Ce modèle démontre sa bonne qualité d'ajustement lorsqu'il est testé sur *Bacillus* cereus par Gaillard *et al.* (1998b) qui obtiennent alors un z_{pH} de 3,7. Etudiant les données bibliographiques à leur disposition, ainsi que de nouveaux résultats, Mafart *et al.* (2001) remarquent que pour obtenir un meilleur ajustement pour différentes souches, le modèle pourrait s'écrire :

$$log D = log D^{\star} - \left(\frac{T - T^{\star}}{z_T}\right) - \left|\frac{pH - pH^{\star}}{z_{pH}}\right|^n$$
(1.15)

où n varie avec des valeurs le plus souvent proches de 1 ou 2. Ils conseillent donc de le fixer à l'une de ces deux valeurs suivant le cas afin de conserver la parcimonie du modèle et son caractère « linéaire ».

Les auteurs qui ont étudié l'influence du pH sur la thermorésistance des spores l'ont tout d'abord fait dans des milieux acidifiés par des acides forts, puis ils se sont ensuite intéressés aux acides qui étaient utilisés dans l'industrie. C'est ainsi que Mc-Cormick (1983) présente ces différents acides organiques avec pour but de permettre un choix simple en fonction de l'action désirée. En effet, l'acidification et le type d'acide peuvent avoir plusieurs fonctions comme la modification du goût (acides phosphorique et tartrique), le contrôle du pH par le pouvoir tampon (acides adipique et lactique), l'inhibition de la croissance des micro-organismes (acides acétique et citrique), le maintien de la coloration (acides citrique et Glucono- δ -Lactone), le contrôle de la viscosité (acide tartrique), le maintien des vitamines de par leur rôle antioxydant ou enfin le rôle de chélatant. Mais ce n'est pas tout puisque ces acides possèdent également une action d'amplitude variable sur la thermorésistance des spores, l'acide citrique aurait par exemple plus d'effet à basse température alors que la Glucono- δ -Lactone serait plus efficace à haute température (Santos *et al.*, 1992).

Ceci pousse Leguérinel et Mafart (2001) à comparer l'effet de neuf de ces acides organiques sur la thermorésistance de *Bacillus cereus*. A l'issue de leur étude, ils concluent que le principal effet des acides est lié aux protons qu'ils libèrent dans le milieu mais ils mettent également en avant que la forme dissociée de ces acides aurait un effet protecteur sur les spores. En effet à pH = 7 les acides se trouvent majoritairement sous forme dissociée d'où la plus forte résistance des spores. Aux pH acides en revanche, c'est la forme non dissociée qui est majoritaire, il y a donc diminution de l'effet protecteur avec pour conséquence la diminution de la résistance. Le ratio des formes dissociée/non dissociée joue donc un rôle important, ratio qui est lié à la valeur du pK_a de l'acide étudié. Les auteurs, sur cette base, remarquent alors l'existence d'une relation linéaire entre la valeur du z_{pH} et celle du pK_a minimal de l'acide, relation qu'ils intègrent dans leur modèle qui peut alors s'écrire :

$$log D = log D^{\star} - \frac{|pH - pH^{\star}|}{a.pK_a + b}$$

$$(1.16)$$

Dès lors, un industriel qui choisit un acide pour l'une des fonctions citées précédemment, peut également connaître l'influence de son choix sur la thermorésistance des micro-organismes.

1.2.2.3 Influence de l'activité de l'eau

Après le pH, l'activité de l'eau, ou a_W, est sans doute le facteur le plus important en terme d'impact sur la thermorésistance des micro-organismes. A l'inverse d'un pH bas, qui favorise la destruction thermique, une a_W basse possède des propriétés protectrices. Bhothipaksa et Busta (1978) pensent que les a_W réduites pourraient provoquer une déshydratation plus poussée de la spore ou au moins favoriseraient le maintien des chélates DPA-Ca dans la spore, ce qui aurait pour conséquence une augmentation de la thermorésistance. Cette hypothèse est étayée par des études réalisées en parallèle avec le pH et qui ont montré que l'a_W avait une action protectrice plus importante aux pH acides (Smelt et al., 1976), pH que l'on sait responsables du relargage du dipicolinate de calcium. Ainsi de nombreux auteurs constatent cette augmentation de la résistance dans des milieux riches en lipides (Molin et Snygg, 1967; Senhaji, 1973; Ababouch et al., 1995) ou en sucres (Braun et al., 1941; Anderson et al., 1949; Hersom et Hulland, 1980). Par exemple Härnulv et Snygg (1972), qui travaillent sur *Bacillus subtilis*, mesurent une valeur de $D_{95^{\circ}C}$ de 3,5 min. pour une a_W de 0,96 (glucose) qui passe à 5,6 min. lorsque l' a_W descend à 0,82, ou encore un $D_{95^{\circ}C}$ de 9,8 min. pour une a_W de 0,96 (glycérol) qui passe à 640 min. pour une a_W de 0,32. Murrel et Scott (1966) confirment cet impact de l'activité de l'eau et mettent en évidence la présence d'un optimum de résistance situé entre $a_W = 0, 2$ et $a_W = 0, 4$. Angelotti *et al.* (1968) observent également ce maximum lorsqu'ils étudient la résistance de Bacillus subtilis var. niger en milieux secs. Sur la figure



Figure 1.7 – Influence de l'a_W du milieu de traitement sur la valeur de la durée de réduction décimale $D_{135^{\circ}C}$ de Bacillus subtilis var. niger (Angelotti et al., 1968).

1.7 nous voyons bien l'optimum de résistance situé à $a_W = 0, 4$ avec une valeur de D environ dix fois supérieure à celle enregistrée à $a_W = 0, 9$.

L'influence de ce facteur, bien connue qualitativement, n'a pourtant pas été beaucoup modélisée malgré son importance au point de vue de la sécurité alimentaire. Reichart (1994) est le premier à proposer un modèle combinant le pH et l'a_W qui s'applique au taux de destruction k:

$$\frac{k}{T} = A.e^{-\frac{b}{T}}.a_W^n.\left(\left[H^+\right]^p + \left[OH^-\right]^q\right)$$
(1.17)

avec A, b, n, p et q des constantes empiriques. Dans la pratique, ce modèle reste très difficile à appliquer car il nécessite de connaître précisément les concentrations en protons et en hydroxyles.

En 1996, Cerf $et\ al.$ étendent le modèle de Davey (équation 1.11) en y incluant un terme a_W :

$$Lnk = C_0 + \frac{C_1}{T} + C_2 \cdot pH + C_3 \cdot pH^2 + C_4 \cdot a_W^2$$
(1.18)

A leur tour, Gaillard *et al.* (1998a) étendent le modèle de Mafart (équation 1.14) en y incluant un bloc relatif à l'a_W :

$$log D = log D^{\star} - \left(\frac{T - T^{\star}}{z_T}\right) - \left(\frac{pH - pH^{\star}}{z_{pH}}\right)^2 - \left(\frac{a_W - 1}{z_{a_W}}\right)$$
(1.19)

où z_{a_W} représente l'écart d'a_W par rapport à 1 qui entraîne une multiplication de D d'un facteur 10. Ce modèle, ajusté sur *Bacillus cereus*, fournit une valeur de z_{a_W} de 0,164 avec le glucose utilisé comme dépresseur de l'activité de l'eau.

Gaillard *et al.* (1998a) signalent qu'il existe des interactions entre la température, le pH et l'a_W, avec des répercutions sur les valeurs des différents z. Ces interactions seraient toutefois relativement faibles puisqu'elles expliquent moins de 2,4 % des variations totales, ce qui permet aux auteurs de ne pas en tenir compte. En négligeant les interactions entre facteurs, il est possible de construire des modèles de type modulaire où l'influence de chaque facteur est décrite par un module indépendant. Les modèles de Mafart et Leguérinel (1998) et de Gaillard *et al.* (1998a) sont de ce type.

1.2.3 Quantification des traitements thermiques

Lorsque l'on travaille sur un micro-organisme donné, le moyen le plus rapide pour estimer l'efficacité léthale d'un traitement thermique est de calculer le nombre de réductions décimales que ce dernier a provoquées :

$$n = \log\left(\frac{N_0}{N}\right) \tag{1.20}$$

avec :

- n, le nombre de réductions décimales;
- $-N_0$ et N, respectivement le nombre initial de micro-organismes et le nombre final de survivants.

Ce calcul très simple n'est pourtant pas très pratique compte-tenu de la variété de micro-organismes et de traitements qui existent. Très tôt l'industrie a donc décidé d'établir des barèmes de référence auxquels pourront être comparés les différents traitements et ceci quel que soit le micro-organisme cible. Les unités standard correspondent à une minute à 121,1 °C et une minute à 60 ou 70 °C, elles représentent respectivement l'unité stérilisatrice et l'unité pasteurisatrice. On peut alors introduire la valeur stérilisatrice :

$$F_{121,1} \circ_C = t_{121,1} \circ_C \tag{1.21}$$

qui correspond au temps de traitement $t_{121,1^{\circ}C}$ à la température de référence. En combinant les équations 1.3, 1.20 et 1.21, elle peut également être écrite sous la forme :

$$F_{121,1} \circ_C = n.D_{121,1} \circ_C \tag{1.22}$$

Depuis les années 1930, le micro-organisme standard cible visé par les conserveurs est *Clostridium botulinum*. Un barème de stérilisation doit être capable d'induire au
minimum 12 réductions décimales pour ce pathogène. Sa valeur de $D_{121,1^{\circ}C}$ étant de 0,21 minute, la valeur stérilisatrice à respecter est de :

$$F_{121,1\circ C} = 12 \times 0, 21 = 2,52 \text{ minutes}$$
 (1.23)

c'est pourquoi le barème standard de stérilisation, toujours en vigueur de nos jours, correspond à $F_{121,1^{\circ}C} = 3$ minutes.

Pour calculer cette valeur stérilisatrice à une température de traitement différente de la température de référence, il nous faut introduire la notion de valeur de destruction biologique. Sa définition est la suivante : un traitement d'une minute à une température T équivant, d'un point de vue efficacité léthale, à un traitement d'une durée L(T) à 121,1 °C, soit :

$$L(T) = \frac{D^{\star}}{D} = 10^{\left(\frac{T-T^{\star}}{z_T}\right)} \tag{1.24}$$

avec $z_T = 10$ °C, valeur estimée pour les spores de *Clostridium botulinum*. A partir de cette valeur de destruction biologique, nous accédons à la valeur stérilisatrice par :

$$F_{121,1^{\circ}C} = L(T).t \tag{1.25}$$

avec t, le temps de traitement à la température constante T.

La température au cœur des boîtes variant au cours d'un traitement thermique, la valeur stérilisatrice se calcule au final par :

$$F_{121,1^{\circ}C} = \int_{0}^{t} L(T).dt$$
(1.26)

C'est Ball (1923) qui propose le modèle permettant de décrire la cinétique des variations de température au cours du traitement thermique, cinétique qui est utilisée dans l'intégrale pour le calcul de $F_{121,1\circ C}$.

Comme nous venons de le voir, seule l'influence de la température est prise en compte pour le calcul des barèmes de stérilisation. Pourtant Pflug et Odlaug (1978), dans une revue discutant du choix des valeurs de D^* et de z_T pour *Clostridium botulinum*, évoquent déjà la possibilité d'inclure d'autres facteurs. En 1985, Pflug *et al.* vont plus loin en introduisant la prise en compte de l'influence du pH sur la thermorésistance dans le calcul des barèmes. S'inspirant des valeurs de Xezones et Hutching (1965), ils proposent alors de nouvelles normes pour les conserves (tableau 1.1). A pH = 7 la valeur stérilisatrice à respecter serait toujours de $F_{121,1^\circ C} = 3$ minutes alors qu'à pH = 4,6 celle-ci ne serait plus que de 1,2 minute.

L'influence de nouveaux facteurs peut être aisément introduite *via* l'utilisation de la valeur de destruction biologique étendue qui prend alors tout son sens :

$$L(T, pH, a_W, ...) = \lambda(T) \cdot \lambda(pH) \cdot \lambda(a_W)...$$
(1.27)

avec, selon le modèle 1.19 :

pН	$F_{121,1^{\circ}C}$ (min.)
7.0	3.0
6.0	3.0
5.9	2.9
5.8	2.7
5.7	2.6
5.6	2.4
5.5	2.3
5.4	2.1
5.3	2.0
5.2	1.9
5.1	1.8
5.0	1.6
4.9	1.5
4.8	1.4
4.7	1.3
4.6	1.2

Tableau 1.1 – Prise en compte du pH du milieu de traitement pour définir la valeur stérilisatrice $F_{121,1^{\circ}C}$ (Pflug *et al.*, 1985).

$$\begin{cases} \lambda(T) = 10^{\left(\frac{T-T^{\star}}{z_{T}}\right)} \\ \lambda(pH) = 10^{\left(\frac{pH-pH^{\star}}{z_{pH}}\right)^{2}} \\ \lambda(a_{W}) = 10^{\left(\frac{a_{W}-1}{z_{a_{W}}}\right)} \end{cases}$$
(1.28)

1.3 « La récupération »

Après avoir subi un traitement thermique, les spores survivantes sont placées dans un milieu où, endommagées, elles font l'objet de mécanismes de réparation. Cette étape qui suit le traitement thermique est donc appelée phase de récupération ou de recouvrement. Il se trouve que les conditions environnementales appliquées au cours de cette phase peuvent avoir une très forte influence sur la survie des spores traitées.

1.3.1 La modélisation primaire

Les dommages subis par les spores lors des traitements thermiques ont très vite été reconnus et décrits (Nelson, 1943; Adams, 1978). Ces spores endommagées ou « blessées », seraient alors beaucoup plus exigeantes du point de vue de la composition du milieu et des conditions de recroissance, elles seraient également très sensibles à la présence d'inhibiteurs (Mallidis et Scholefield, 1986). Les conditions environnementales lors de la récupération après le traitement thermique seraient à l'origine d'un stress supplémentaire qui pourrait agir à plusieurs niveaux. Les mécanismes de germination, d'émergence (« outgrowth »), de réparation ou de prolifération pourraient être touchés rendant les spores incapables de donner naissance à des cellules végétatives viables. Faille *et al.* (1997; 1999) mettent par exemple en évidence l'impact sur la thermorésistance :

- du milieu de dilution pour les dénombrements;
- de la présence ou non de glucose ou de chlorure de sodium dans le mileu de récupération;
- de la température d'incubation.

Au niveau industriel, Braithwaite et Perigo (1971) testent la survie de 151 souches réparties en 18 espèces du genre *Bacillus*. Ils constatent que pour des conserves dont le pH est compris entre 6,5 et 9, et dont l'a_W est supérieure à 0,985, le traitement thermique doit être très important afin d'inactiver toutes les spores, alors qu'hors de ces régions de pH et d'a_W des traitements modérés suffisent. Braithwaite et Perigo (1971) remarquent que déjà bien des industriels ne respectent pas la valeur minimale de $F_{121,1^{\circ}C}$ recommandée de 2,5 minutes, pourtant ce non respect ne semble pas engendrer de risque sanitaire majeur. La possibilité offerte aux industriels de réduire leurs barèmes ne doit pourtant se faire qu'à partir d'une meilleure compréhension des phénomènes complexes et des interactions intervenant au cours de la récupération.

Spiegelberg (1940) montre par exemple que la sévérité du traitement thermique (durée et/ou température plus importante(s)) a un effet sur le pH minimal de croissance. Ainsi plus le traitement serait drastique, plus le pH minimal serait élevé, c'est ce phénomène qui pourrait être à l'origine de la stabilité des conserves acides subissant des traitements modérés, les spores survivantes seraient inhibées. Baird-Parker et Freame (1967) montrent que des valeurs de pH ou d'a_W réduites entraînent également une augmentation de la température minimale de croissance induisant une inhibition de cette croissance aux températures de stockage. De leur côté, Stringer et Peck (1996), étudiant l'effet de jus de végétaux sur la thermorésistance des spores, voient apparaître une résistance accrue. La présence d'activité de type lysozyme dans certains jus en serait la cause. En effet, l'activité de type lysozyme reconnue pour favoriser et initier la germination, pourrait remplacer le système touché pendant le traitement thermique augmentant par la même la résistance. Cette activité entraînerait la lyse du peptidoglycane inhabituel avec pour conséquence la libération des chélates DPA-Ca et la réhydratation des spores.

Au niveau de la modélisation, les conditions de récupération jouent donc un rôle très important sur la résistance que l'on appelle alors « résistance apparente ». Le modèle primaire utilisé est le même que celui décrivant la cinétique de survie lors du traitement thermique classique, mais la nomenclature veut que l'on ajoute un « prime » à tout paramètre ou facteur lié à la récupération. Le modèle s'écrit alors :

$$N' = N_0 \cdot 10^{-\frac{t}{D'}}$$
 ou $log N' = log N_0 - \frac{t}{D'}$ (1.29)

avec D', la durée de réduction décimale apparente. On peut consulter la figure 1.8 afin de bien faire la distinction entre traitement et récupération.



Figure 1.8 – Schéma représentant les différentes étapes d'un traitement thermique, à savoir, le traitement à proprement parler puis la récupération. D^{*} : le temps de réduction décimale en conditions optimales de traitement et de récupération; D : le temps de réduction décimale pour des conditions de traitement variables et une récupération en conditions optimales; D' : le temps de réduction décimale apparent en conditions de récupérations variables.

Par exemple, Feeherry *et al.* (1987, figure 1.9) relèvent des valeurs de $D_{115,6^{\circ}C}$ de 18 minutes et $D_{121,1^{\circ}C}$ de 3,33 minutes alors que celles de $D'_{115,6^{\circ}C}$ et $D'_{121,1^{\circ}C}$ chutent respectivement à 12,39 minutes et 2,34 minutes en présence de 0,9 % de chlorure de sodium dans le milieu de récupération.

Mafart et Leguérinel (1997) montrent que les valeurs de D et D' peuvent être reliées au taux de récupération α :

$$\alpha = \frac{N'}{N} \tag{1.30}$$

par la relation :

$$log(\alpha) = -\left(\frac{D}{D'} - 1\right) \times \frac{F}{D_{121,1^{\circ}C}} - log(\alpha_0)$$
(1.31)

avec :

- $-\alpha$, le taux de récupération;
- $-\alpha_0$, le taux de récupération sans traitement thermique;
- -D, D' et $D_{121,1^{\circ}C}$, respectivement les durées de réduction décimale optimale, apparente et optimale à 121,1°C;
- -F, la valeur stérilisatrice du traitement.

1.3.2 La modélisation secondaire

1.3.2.1 Influence de la température d'incubation

Bien qu'énormément de travaux aient été consacrés à l'étude de la récupération, il existe très peu de modèles décrivant l'impact des facteurs environnementaux sur la valeur de D'. La température d'incubation post-traitement aurait un rôle majeur et influencerait très fortement la résistance apparente. Condon *et al.* (1996) ne remarquent pas de différence de dénombrement lorsque des spores de *Bacillus subtilis* non traitées sont incubées à des températures variant de 30 à 51°C. En revanche, à l'issue d'un traitement thermique à 108°C, de très forts écarts sont enregistrés, comme nous pouvons le constater sur la figure 1.10. Ceci démontre très bien le fait que les spores endommagées sont sensibles à la température d'incubation.

Cook et Gilbert (1968) observent le même phénomène avec *Bacillus stearothermophilus* et signalent qu'il y a un décalage entre la température optimale de croissance et la température optimale de récupération. *Bacillus stearothermophilus*, dont la croissance est maximale entre 50 et 65°C, récupère mieux pour des températures situées entre 45 et 50°C. Ce constat semble général puisque le même décalage est enregistré pour les mésophiles (Williams et Reed, 1942; Sugiyama, 1951). Cette capacité des spores de *Clostridium* mésophiles à mieux récupérer pour des températures suboptimales, c'est-à-dire inférieures à 37°C, fut prise en compte relativement tôt. Les normes décrivant les tests de stabilité microbiologique réalisés sur les conserves



Figure 1.9 – Cinétiques de survie de Bacillus stearothermophilus ATCC 12980 à 115,6 et 121,1°C en présence (\circ) ou absence (\bullet) de 0,9 % de NaCl dans le milieu de récupération. L'incubation est réalisée à 55°C. Les valeurs de D et D' sont calculées à partir de la portion linéaire des courbes qui suit l'épaulement (Feeherry et al., 1987).



Figure 1.10 – Courbes de survie de *Bacillus subtilis* ayant subi un traitement thermique à 108°C puis incubé à 30°C (\triangle), 37°C (\bullet), 44°C (\Diamond) et 51°C (\blacklozenge) (Condon *et al.*, 1996).

conseillent d'ailleurs d'incuber celles-ci à 30-32°C au lieu de 37°C.

Couvert *et al.* (2000) proposent le modèle suivant pour décrire l'influence de la température de récupération :

$$logD' = logD - \left(\frac{T' - T'_{opt}}{z'_T}\right)^2 \tag{1.32}$$

avec :

- -D', la durée de réduction décimale pour une température d'incubation T';
- D, la durée de réduction décimale à la température optimale $T_{opt}^{\prime}\,;$
- $-z'_T$, l'écart de température par rapport à T'_{opt} induisant la division de D' d'un facteur 10.

Les auteurs estiment la valeur de T'_{opt} à 23,5°C pour *Bacillus cereus*, ce qui est proche de celle de 25°C obtenue par Faille *et al.* (1999) avec *Bacillus thuringiensis*. Notons que la valeur de z'_T de 34°C révèle que la température de récupération possède beaucoup moins d'effet que celle de traitement pour lequel le z_T est d'environ 10°C (Couvert *et al.*, 1999).

1.3.2.2 Influence du pH de récupération

Le pH du milieu de récupération semble également avoir un rôle considérable sur la thermorésistance apparente des spores. En effet, pour un traitement thermique à pH neutre, le nombre de spores survivantes dénombrées diminue lorsque le pH de récupération décroît. Ceci est vérifié par Olson et Scott (1950) avec *Clostridium botulinum* et par Cook et Brown (1965) avec *Bacillus stearothermophilus*. Feeherry *et al.* (1987) constatent des taux de récupération pour *Bacillus stearothermophilus* de 62, 38, 20 et 1 % pour des pH respectivement de 6,4, 6,2, 6,0 et 5,8.

Les mécanismes d'action du pH lors de la récupération sont mal connus. Blocher et Busta (1983), dans leur revue, décrivent brièvement les modes d'action et cibles potentiels. Le passage de la spore dormante à la cellule végétative se fait en trois étapes : l'activation, la germination et l'émergence/croissance. Les pH acides auraient un rôle d'activateurs et pourraient dès lors restaurer la fonction éventuellement atteinte pendant le traitement thermique, ce qui aurait tendance à augmenter la résistance apparente.

D'un autre côté, ces bas niveaux de pH seraient des inhibiteurs de la germination d'où une résistance apparente réduite. De plus, Gonzalez *et al.* (1996) montrent qu'il existe une très forte interaction entre le pH et le type de milieu utilisé. Cela nous confirme que plusieurs systèmes de germination existent et que le pH ne les inhibe pas tous. Gonzalez *et al.* (1996) démontrent également un effet souche avec *Bacillus cereus*, ce qui expliquerait son apparition lors de toxi-infections alimentaires liées à la consommation d'aliments acides. L'acidification ne suffirait donc pas pour garantir la sécurité microbiologique de ces aliments acides. La modélisation de ce phénomène est très récente. Couvert *et al.* en 1999 proposent le modèle suivant :

$$logD' = logD - \left(\frac{pH' - pH'_{opt}}{z'_{pH}}\right)^2$$
(1.33)

avec :

- -D', la durée de réduction décimale à pH';
- D, la durée de réduction décimale à $pH_{opt}^{\prime},$ pH pour lequel la thermorésistance est maximale ;
- -
 $z_{pH}^{\prime},$ l'écart de pH par rapport au pH_{opt}^{\prime}
induisant la division de D^{\prime} d'un facteur 10.

Les auteurs estiment la valeur de pH'_{opt} à 6,78 pour *Bacillus cereus*, ce qui est en accord avec ce que l'on rencontre généralement, à savoir une résistance apparente plus élevée aux pH proches de la neutralité. Couvert *et al.* (1999) obtiennent une valeur de z'_{pH} de 1,81 qui est inférieure à celle du z_{pH} de 2,81. Le pH de récupération semble avoir un effet plus marqué que celui de traitement, ce qui est confirmé grâce à des données bibliographiques relatives à *Bacillus stearothermophilus*. Il faut signaler que les effets des pH de traitement et de récupération sont comparables, ils diminuent tous deux la thermorésistance apparente des spores.

1.3.2.3 Influence de l'activité de l'eau

Ce dernier facteur est de loin le moins étudié, seule l'influence qualitative du chlorure de sodium ayant été relatée. La diminution d'a_W obtenue par addition de NaCl entraînerait une réduction de la thermorésistance apparente (Roberts *et al.*, 1966; Briggs et Yazdany, 1970; Juneja *et al.*, 1995), la figure 1.9 en est un exemple.

Les travaux récents de Coroller *et al.* (2001) nous apportent des informations supplémentaires. Les auteurs rapportent cette diminution de résistance avec plusieurs dépresseurs de l'a_W, le glycérol, le glucose et le saccharose. Leur étude quantitative leur permet de modéliser l'effet de l'a_W du milieu de récupération au travers de l'équation suivante :

$$logD' = logD - \left(\frac{a'_W - a'_{W_{opt}}}{z'_{a_W}}\right)^2$$
(1.34)

avec :

- -D', la durée de réduction décimale pour a'_W ;
- D, la durée de réduction décimale pour $a'_{W_{opt}}$, l' a_W pour laquelle la résistance est maximale;
- z'_{a_W} , l'écart d' a_W par rapport à $a'_{W_{out}}$ induisant la division de D' d'un facteur 10.

L' $a'_{W_{opt}}$ obtenue avec *Bacillus cereus* et les différents dépresseurs est proche de 0,98-0,99 (figure 1.11(a)), ce qui correspond à la valeur d'a_W optimale de croissance pour la plupart des micro-organismes (Christian, 1980). Sur la figure 1.11(b) nous



Figure 1.11 – (a) Valeurs de $D'_{95^{\circ}C}$ en fonction de l' a_W du milieu de récupération pour *Bacillus cereus*.; (b) Valeurs de $D_{95^{\circ}C}$ en fonction de l' a_W des milieux de traitement et de récupération . Le dépresseur utilisé est le saccharose (Coroller *et al.*, 2001).

pouvons observer l'effet combiné des a_W de traitement et de récupération. A l'opposé du pH, ici les effets sont antagonistes. L' a_W de traitement protégeant et l' a_W de récupération inhibant les spores endommagées, leurs effets se compensent et se neutralisent avec une résistance apparente semblant constante.

1.3.3 La récupération et le calcul des barèmes

A l'heure actuelle, les différents facteurs et leurs actions sur la récupération ne sont pas pris en compte dans les calculs des barèmes de pasteurisation/stérilisation. Comme pour le traitement thermique, ces diverses influences pourraient être retranscrites au travers de la valeur de destruction biologique secondaire L':

$$L'(...,T',pH',a'_W,...) = ...\lambda'(T') \cdot \lambda'(pH') \cdot \lambda'(a'_W)...$$
(1.35)

avec par exemple :

$$\begin{cases} \lambda'(T') = 10^{\left(\frac{T'-T'_{opt}}{z'_{T}}\right)^{2}} \\ \lambda'(pH') = 10^{\left(\frac{pH'-pH'_{opt}}{z'_{pH}}\right)^{2}} \\ \lambda'(a'_{W}) = 10^{\left(\frac{a'_{W}-a'_{opt}}{z'_{a_{W}}}\right)^{2}} \end{cases}$$
(1.36)

Une nouvelle fois, ceci démontre l'intérêt et le potentiel de la valeur de destruction biologique lorsqu'elle est associée à des modèles de type modulaire. Il faudra toutefois de nombreuses études complémentaires avant de pouvoir mettre ces méthodes en œuvre. En particulier, l'acquisition des nouveaux paramètres pour les souches d'intérêt industriel semble un préalable incontournable.

1.4 Etude du comportement à la recroissance

Dans le cadre de notre étude, nous étudions l'impact du traitement thermique sur la recroissance, en mettant plus particulièrement l'accent sur le temps de latence. Dans cette seconde partie, les modèles utilisés sont ceux de la croissance qui est sans doute le domaine le plus riche de la microbiologie prévisionnelle. Par conséquent, seuls les principaux modèles sont présentés dans cette étude bibliographique qui ne se veut pas exhaustive. Pour plus de détails, il est par exemple possible de consulter la revue de Skinner *et al.* (1994).

1.4.1 La modélisation primaire

Tout comme la destruction, la croissance bactérienne se déroule suivant une loi exponentielle. Pour cette raison, l'évolution d'une population bactérienne est classiquement représentée sous la forme du logarithme népérien du nombre de cellules en fonction du temps. La courbe de croissance fut décrite de façon détaillée par Buchanan en 1918. L'auteur divise la cinétique en sept phases distinctes représentées sur la figure 1.12. Cette description est généralement réduite à trois phases, la phase stationnaire initiale alors appelée phase de latence, la phase exponentielle de croissance et la phase stationnaire finale comme représentées sur la figure 1.13. La phase exponentielle est caractérisée par le taux de croissance μ_{max} , pente de la tangente à la courbe au point d'inflection. Le temps de latence λ correspond quand à lui à l'intersection de cette tangente avec l'horizontale passant par l'ordonnée à l'origine de la courbe (Zwietering *et al.*, 1990).

Les modèles primaires pour décrire cette cinétique sigmoïdale sont nombreux. L'un des premiers modèles massivement appliqué fut celui de Gompertz reparamétré par Zwietering *et al.* (1990) avec :

$$\begin{cases} lnN(t) = lnN_0 + A.e^{-e^{\frac{\mu_{max}\cdot e}{A}\cdot(\lambda-t)+1}} \\ A = ln\left(\frac{N_{max}}{N_0}\right) \end{cases}$$
(1.37)

Ce modèle n'est plus utilisé de nos jours, en effet, pour t = 0 nous n'obtenons pas lnN_0 ce qui n'est pas très élégant.

Le modèle de Baranyi *et al.* (1993) publié quelques années plus tard rencontre également un grand succès, il s'écrit :

$$\begin{cases} \frac{dN}{dt} = \mu_{max}.\alpha_n(t).\left(1 - \frac{N}{N_{max}}\right)\\ \alpha_n(t) = \frac{t^n}{\lambda + t^n} \end{cases}$$
(1.38)

Il en existe bien d'autres mais tous ces modèles sont relativement complexes. Ceci pousse Buchanan *et al.* (1997) à envisager une simplification extrême, à savoir



Figure 1.12 – La cinétique de croissance décrite par Buchanan (1918) pour qui la courbe est divisée en 7 phases : (1) Phase initiale stationnaire, (2) Phase d'accélération, (3) Phase de croissance exponentielle, (4) Phase de décélération, (5) Phase plateau, (6) Phase d'accélération de la mortalité, (7) Phase de décroissance exponentielle.



Figure 1.13 – Les trois grandes phases de la croissane : (1) phase stationnaire, (2) phase exponentielle, (3) phase stationnaire finale, (λ) temps de latence, (μ_{max}) taux de croissance maximal.

la décomposition de la courbe de croissance en trois portions de droites. Les auteurs proposent alors le modèle trilinéaire :

$$\begin{cases} t \leq \lambda, & lnN(t) = lnN_0\\ \lambda < t < t_{max}, & lnN(t) = lnN_0 + \mu_{max}.(t - \lambda)\\ t_{max} \leq t, & lnN(t) = lnN_{max} \end{cases}$$
(1.39)

Ce modèle suscite immédiatement la polémique, il a en effet ses adeptes comme Garthright (1997) et ses opposants comme Baranyi (1997) qui lui reprochent notamment sa discontinuité. Il n'en reste que ce modèle très simple est particulièrement robuste et facile à mettre en œuvre. De plus, il mit en partie fin à la course aux modèles primaires toujours plus complexes, et permit aux microbiologistes de se concentrer sur la modélisation secondaire.

1.4.2 La modélisation secondaire du taux de croissance

Tout comme pour la destruction thermique, les modèles secondaires décrivant l'influence des facteurs environnementaux sur μ_{max} sont nombreux. Dans une démarche identique, ces derniers ont progressivement incorporé les principaux facteurs.

1.4.2.1 Les modèles polynômiaux

La première approche fut celle des modèles polynômiaux, modèles qui permettent de rapidement prendre en compte de nombreux facteurs. C'est ainsi que Baker et Griffiths (1993) proposent un modèle qui décrit l'évolution du taux de croissance de *Bacillus cereus* qui s'écrit sous la forme :

$$LnGrowth = 2109, 01 + 3, 08.temp - 3, 13.pH - 4214, 32.a_W - 30, 40.starch + 20, 82.glu + 0, 0078.temp2 - 0, 37.pH2 + 2102, 87.a_W + 1, 65.starch2 - 0, 57.glu2 + 0, 028.(temp.pH) + 3, 78.(temp.a_W) + 0, 025.(temp.starch) + 0, 0017.(temp.glu) + 7, 21.(pH.a_W) + 0, 75.(pH.starch) + 0, 26.(pH.glu) + 24, 54.(a_W.starch) - 21, 27.(a_W.glu) - 1, 29.(starch.glu) (1.40)$$

Sutherland *et al.* (1996) proposent également ce type de modèle, mais tout comme pour la destruction, de plus en plus de microbiologistes doutent de l'applicabilité de telles équations.

1.4.2.2 Les modèles « racine carrée »

Dans une seconde démarche, de nombreux auteurs vont s'orienter vers la recherche de modèles plus robustes et parcimonieux. Les premiers qui vont retenir l'attention sont ceux dits « de la racine carrée ». Ratkowsky *et al.* (1982) proposent le premier d'entre eux qui décrit l'influence de la température dans la zone suboptimale sur le taux de croissance :

$$\sqrt{\mu_{max}} = b.(T - T_{min}), \quad \text{pour } T > T_{min} \tag{1.41}$$

avec :

 $-\mu_{max}$, le taux de croissance à la température de croissance T;

 $-T_{min}$, la température minimale de croissance;

-b, une constante dénuée de sens biologique.

Ce modèle sera rapidement revu pour couvrir toute la gamme de températures autorisant la croissance (Ratkowsky *et al.*, 1983). Dans l'esprit modulaire, ce modèle est complété par Adams *et al.* (1991) afin de prendre en compte l'effet du pH :

$$\sqrt{\mu_{max}} = b.(T - T_{min}).\sqrt{(pH - pH_{min})}$$
(1.42)

Enfin, McMeekin *et al.* (1987) y ajoutent un terme décrivant l'influence de l' a_W , ce qui permet à Wijtzes *et al.* (1993) de publier le modèle à trois facteurs :

$$\sqrt{\mu_{max}} = b.(T - T_{min}).\sqrt{(pH - pH_{min})}.\sqrt{(a_W - a_{W_{min}})}$$
 (1.43)

1.4.2.3 Le « Gamma Concept » de Zwietering

Toujours dans une démarche modulaire, Zwietering *et al.* (1996) décident de décrire l'évolution de μ_{max} en prenant comme référence sa valeur optimale μ_{opt} obtenue dans les conditions optimales de croissance (T_{opt}, pH_{opt}, a_{Wopt}). Le modèle se présente sous la forme :

$$\begin{cases} \gamma &= \frac{\mu_{max}}{\mu_{opt}} = \gamma(T) . \gamma(pH) . \gamma(a_W) \\ \gamma(T) &= \left(\frac{T - T_{min}}{T_{opt} - T_{min}}\right)^2 \\ \gamma(pH) &= \frac{(pH - pH_{min}) . (pH_{max} - pH)}{(pH_{opt} - pH_{min}) . (pH_{max} - pH_{opt})} \\ \gamma(a_W) &= \frac{(a_W - a_{W_{min}})}{1 - a_{W_{min}}} \end{cases}$$
(1.44)

Non seulement ce modèle est de type modulaire, mais de plus il est parcimonieux et ses paramètres sont aisément interprétables puisqu'ayant un sens biologique.

1.4.2.4 Les modèles cardinaux

S'inspirant des travaux de Zwietering et al., Rosso et al. (1993) présentent le modèle des températures cardinales. Les paramètres de ce modèle ne sont ni plus

ni moins que les températures minimale, optimale et maximale permettant la croissance. Rosso *et al.* (1995) lui ajoutent ensuite un module qui décrit l'influence du pH, en gardant comme objectif l'interprétabilité des paramètres. Enfin, ces mêmes auteurs le complètent en lui incluant un terme relatif à l'a_W (Rosso, 1998). Au final, le modèle cardinal peut être présenté dans sa version complète comme suit :

$$\begin{cases} \gamma &= \frac{\mu_{max}}{\mu_{opt}} = \gamma(T) \cdot \gamma(pH) \cdot \gamma(a_W) \\ \gamma(T) &= \begin{cases} T < T_{min}, & 0 \\ T_{min} < T < T_{max}, & \frac{(T - T_{max}) \cdot (T - T_{min})^2}{(T_{opt} - T_{min}) \cdot [(T_{opt} - T_{min}) \cdot (T - T_{opt}) - (T_{opt} - T_{max}) \cdot (T_{opt} + T_{min} - 2T)] \\ T > T_{max}, & 0 \end{cases}$$
$$\begin{cases} \gamma(pH) &= \begin{cases} pH < pH_{min}, & 0 \\ ph_{min} < pH < pH_{max}, & \frac{(pH - pH_{min}) \cdot (pH - pH_{max})}{(pH - pH_{min}) \cdot (pH - pH_{max}) - (pH - pH_{opt})^2} \\ pH > pH_{max}, & 0 \end{cases}$$
$$\gamma(a_W) &= \begin{cases} a_W < a_{W_{min}}, & 0 \\ a_{W_{min}} < a_W, & \frac{(a_W - a_{W_{min}}) \cdot (a_{W_{opt}} - a_{W_{min}}) \cdot (a_{W_{opt}$$

Bajard *et al.* (1996), testant ce modèle sur *Listeria monocytogenes*, observent un comportement atypique de cette bactérie aux basses températures. Ce comportement particulier rend le modèle très imprécis pour décrire le comportement à la limite de croissance. Ceci peut poser un problème tant ce pathogène intéresse les industriels ayant recours à la chaîne du froid pour assurer la sécurité de leurs produits. Citons enfin les travaux de Le Marc (2001) qui complètent ce modèle avec un module reflétant l'influence de la concentration d'acide ainsi qu'un module rendant compte des interactions pouvant survenir entre les différents facteurs.

1.4.3 La modélisation du temps de latence

Très tôt, différents auteurs se sont intéressés à la modélisation du temps de latence. Penfold, dès 1914, se posait déjà les questions relatives aux effets de facteurs tels que la température, la composition du milieu voire la taille de l'inoculum. Toutes ces questions sont toujours d'actualité car il semble en effet que les origines de la latence soient fort complexes.

Les microbiologistes s'accordent pour dire que cette durée de latence correspondrait au temps nécessaire pour qu'une bactérie s'adapte à son environnement. Cette adaptation se ferait au travers de processus biochimiques, de biosynthèses ou encore l'activation de gènes (Robinson *et al.*, 1998).

D'après Delignette-Muller (1998), le temps de latence λ serait inversement proportionnel au taux de croissance μ lorsque les conditions de pré-incubation sont constantes. Ceci permet d'introduire le produit $\mu.\lambda$ avec :

$$\mu.\lambda = constante \tag{1.46}$$

Cependant, ce produit varie avec les conditions de croissance, avec la température ou le pH par exemple (Delignette-Muller, 1998; Robinson *et al.*, 1998).

Un autre point qui suscite beaucoup d'interrogations, est de savoir si oui ou non la taille de l'inoculum a une quelconque influence. A cette question, Buchanan et Phillips (1990) diraient plutôt non alors que Gav et al. (1996) répondraient oui. Ce problème est fondamental, Zhao et al. (2000) montrent en effet que cette taille influence fortement le temps nécessaire pour détecter *Clostridium botulinum*. C'est ce genre de rapport qui amène Shimoni et Labuza (2000) à s'interroger sur la validité des différents modèles utilisés actuellement, modèles pour la plupart mis au point à partir de concentrations importantes. Ces modèles peuvent être ceux de la croissance, comme les modèles de Ratkowsky ou Schoolfield (Duh et Schaffner, 1993), en prenant soin de prendre certaines précautions (Zwietering et al., 1991). Dans cette démarche, la population est considérée comme homogène du point de vue du temps de latence. Mais les variations observées avec les échantillons de petite taille conduisent certains auteurs à envisager d'autres voies (Augustin *et al.*, 2000). Pour certains, la latence serait distribuée dans une population hétérogène, ce qui pourrait expliquer les variations liées à l'inoculum (McKellar et Knight, 2000). Cette hypothèse pourrait dès lors être retranscrite au travers de modèles de type stochastique comme celui de Baranyi (1998).

L'historique de l'inoculum est également un point primordial. Ainsi le passé thermique de cet inoculum jouerait un rôle fondamental. Kaufmann *et al.* (1959) démontrent sur la souche de *Micrococcus MS102* qu'une température de stress plus élevée, 82 °C au lieu de 76 °C, induit une phase de latence allongée, 25 heures au lieu de 19 heures. Ce constat n'a pourtant donné naissance qu'à un très faible nombre de modèles. Bréand *et al.* 1997; 1999 observent l'impact du stress thermique sur une population de *Listeria monocytogenes*. Leurs travaux révèlent un comportement biphasique dans l'évolution de ce temps de latence en fonction de la durée d'exposition. La phase de latence augmenterait régulièrement avec la durée de stress jusqu'à un optimum avant de diminuer pour atteindre un plateau (Figure 1.14). Bréand *et al.* (1997) proposent alors le modèle suivant pour décrire ce comportement :



Figure 1.14 – Evolution du temps de latence (Lag) en fonction de la durée de stress thermique (d_s). Comportement de *Listeria monocytogenes* observé par Bréand *et al.* (1997).

$$\begin{cases} f(d_s) = L_{min} + \frac{A(d_s)}{\left[1 + e^{(B(d_s) - 1.12)}\right]} \\ A(d_s) = \left[\frac{(1.33 \times L_{opt} - 0.33 \times L_{min} - L_0)}{d_{opt}} \times d_s + (L_0 - L_{min})\right] \\ B(d_s) = \left[3.81 \times \frac{(1.33 \times L_{opt} - 0.33 \times L_{min} - L_0) \times (d_s - d_{opt})}{d_{opt} \times (L_{opt} - L_{min})}\right] \end{cases}$$
(1.47)

avec :

- $-L_{min}$, le temps de latence minimal;
- $-L_{opt}$, le temps de latence optimal ou encore maximal;
- $-L_0$, le temps de latence sans traitement thermique;
- $-d_s$, la durée du stress thermique;
- $-\ d_{opt},$ la durée de traitement optimale pour la quelle le temps de la tence est maximal.

D'autres études sur *Listeria monocytogenes* ont été menées au cours de ces dernières années et ont conduit à la création de modèles, citons par exemple les travaux d'Augustin et Carlier (2000). Mais tous ces travaux ont trait aux cellules végétatives, il n'existe que très peu d'études concernant le « temps de latence global » des spores bactériennes. Nombreuses sont les publications relatives à l'activation ou à la germination de ces spores et certains auteurs proposent, avec plus ou moins de succès, quelques modèles (Mafart, 1995; McCormick, 1965). Chea et al. (2000) iront jusqu'à la prise en compte de facteurs comme la température, le pH et la concentration en chlorure de sodium. L'étude de Laurent et al. (1999) sur Bacillus cereus est l'une des rares à modéliser le « temps de latence global » pour les spores. Par temps de latence global, il faut comprendre le temps qui s'écoule entre l'instant du stress thermique par exemple, jusqu'au début de la croissance exponentielle. Cette latence inclut l'activation de la spore, sa germination, son émergence et le doublement jusqu'à la première division. Certains de ces phénomènes ont été modélisés indépendamment mais rarement l'ensemble qui, au final, est ce qui intéresse les industriels. Au cours de leur étude, sur Bacillus cereus, Laurent et al. (1999) enregistrent le même type de comportement qu'avaient observé Bréand et al. (1997) avec Listeria monocytogenes. Le temps de latence augmente avec la durée de stress thermique jusqu'à un maximum avant de décroître. En revanche, cette étude n'a pas mis en évidence la présence d'un plateau pour les durées de stress importantes, leur temps de traitement maximal étant insuffisant.

1.5 Bacillus cereus

Bacillus cereus est une bactérie gram positive mobile, aéro-anaérobie facultative dont la cellule végétative mesure 3 à 5 μm de long pour un diamètre de 1 à 2 μm . Certaines souches sont psychrotrophes et peuvent se développer lors du stockage en froid positif, à savoir entre 0 et 4 °C, mais celles-ci sont rares. Sa gamme de températures de croissance s'échelonne plutôt entre 5 et 50 °C (Reed, 1994). Carlin *et al.* (2000) mettent en évidence la présence de souches psychrotrophes de *Bacillus cereus* (croissance à partir de 4 °C) et indiquent qu'une augmentation de température de stockage de 4 °C à 10 °C lui permet de se développer. Il faut donc prendre soin de vérifier la température au long de la chaîne du froid jusqu'au réfrigérateur du consommateur. Christiansson *et al.* (1989) signalent sa croissance rapide dans le lait et la crème ainsi que la production de toxine dès 8 °C.

Bacillus cereus peut se développer à des pH variant de 4,3 (Reed, 1994) à 9,3 (Fluer et Ezepchuk, 1970) et pour des a_W supérieures à 0,912 (Kramer et Gilbert, 1989). Enfin, sa tolérance au sel est relativement élevée puisqu'il peut croître à des teneurs en NaCl atteignant 18 % (Prendhan *et al.*, 1985).

C'est une bactérie d'origine tellurique qui est ubiquitaire. Les aliments dans lesquels on peut la rencontrer sont par conséquent très variés : lait, légumes, sauces, riz, épices, œufs, ingrédients, etc. (Kramer et Gilbert, 1989; Dilasser et De Buyser, 1989; Reed, 1994).

Bacillus cereus fait partie des pathogènes puisqu'elle produit deux toxines pouvant être à l'origine de Toxi Infections Alimentaires Collectives (Granum, 1994; Johnson, 1984). La toxine émétique entraîne des nausées et des vomissements 1 à 5 heures après consommation de l'aliment contaminé (Masson, 1983; Granum, 1994). Thermostable, elle est préformée dans l'aliment. Elle peut également produire des crampes abdominales et/ou des diarrhées. Les symptômes durent généralement moins de 24 heures et ressemblent à ceux provoqués par *Staphylococcus aureus* (Mosso *et al.*, 1989; Johnson, 1984). Cette toxine est difficile à rechercher ce qui peut entraîner une sous-estimation du nombre de foyers d'intoxication. La toxine diarrhéique, dont les symptômes ressemblent à ceux de *Clostridium perfringens*, est surtout produite pendant la phase exponentielle de croissance, elle est thermolabile. Cette toxine est responsable des diarrhées, de crampes et de douleurs abdominales, 6 à 15 heures après qu'un aliment souillé ait été ingéré. Des nausées peuvent accompagner la diarrhée mais rarement des vomissements. Dans la plupart des cas, les symptômes persistent pendant 24 heures (Johnson, 1984; Mosso *et al.*, 1989). La dose qui est succeptible d'induire l'intoxication est de l'ordre de $10^5 - 10^6$ spores par gramme (Granum et Lund, 1997).

Cette bactérie fait également partie de la flore d'altération des produits laitiers. En effet, elle possède une lécithinase qui agit sur la phase lipidique du lait et de la crème, dégradant fortement la qualité de ces produits (Jean Stone, 1952).

Les spores de *Bacillus cereus*, bien que de résistance moyenne, sont capables de survivre aux températures utilisées lors de pasteurisations basses. Ainsi, dans leurs revues bibliographiques, Bergère et Cerf (1992) ou Picoche *et al.* (1993) rapportent une valeur de $D_{85^{\circ}C}$ comprise entre 5 et 108 minutes, un $D_{100^{\circ}C}$ de 0,3 à 27 minutes avec un z_T situé entre 6,7 et 13,9 °C. Que ce soit pour D ou z_T , ces revues mettent en évidence une très forte variabilité de leurs valeurs.

Dernière caractéristique de Bacillus cereus qui amène les industriels à s'y intéresser : sa capacité à se fixer sur différentes surfaces. Ceci serait en partie dû au fait que les spores possèdent une forte hydrophobicité (Rönner et al., 1990), une surface très peu chargée et une morphologie particulière (Anderson et al., 1995). Husmark et Rönner (1990) montrent en effet que les interactions hydrophobes jouent le rôle prepondérant dans ce phénomène d'adhésion. Ils démontrent également l'importance des répulsions électrostatiques qui dépendent du pH, l'adhésion maximale étant obtenue à pH = 3 où se situe le point isoélectrique. Stalheim et Granum (2001) relient également ces propriétés avec la morphologie originale de ces spores qui possèdent des appendices alors que la majorité des autres espèces de Bacillus en sont dépourvus (Hachisuka et al., 1984). Stalheim et Granum (2001) suggèrent que ces appendices pourraient notamment servir aux spores pour se fixer dans les tubulures où circule un flux continu. Par exemple, Eneroth et al. (1998) observent que dans une chaîne de pasteurisation du lait, il peut y avoir recontamination du produit par Bacillus cereus après traitement, du fait de la mauvaise désinfection des conduits menant au remplissage. Toutes ces propriétés ont conduit de Jong et al. (2002) à se pencher sur ce problème et ces auteurs proposent même un modèle pour prédire ces adhésions et le nombre de micro-organismes qui recontaminent le produit.

L'intérêt grandissant pour cette bactérie a conduit les scientifiques à développer de nouveaux tests afin de déceler sa présence et de déterminer à quelle dose, Masson (1983) évoque leur devenir dans sa publication. Plus récemment, Radhika *et al.* (2002) ont même développé des sondes d'hybridation pour mettre au point un test de détection par PCR. L'intérêt des microbiologistes s'est également porté sur les moyens pour décontaminer les installations industrielles, à l'aide de produits antiseptiques par exemple (Peng *et al.*, 2002).

Toutes les raisons évoquées ainsi que le cadre de nos travaux, la pasteurisation basse, nous ont conduit tout naturellement à choisir *Bacillus cereus* comme modèle d'étude.

1.6 Microbiologie prévisionnelle, le contexte

Aujourd'hui les industriels, souhaitant répondre aux attentes des consommateurs, développent leurs gammes de plats préparés (REPFEDs) avec pour objectif l'amélioration des qualités organoleptiques. Les scientifiques, face à cette nouvelle production, s'interrogent sur les risques que font courir de tels produits notamment vis à vis des bactéries sporulées comme Clostridium botulinum (Nortermans et al., 1990; Peck, 1997). En effet, ces produits très élaborés sont fondés sur les technologies barrières. Ainsi, l'addition de plusieurs facteurs défavorables pour les micro-organismes, rend le produit plus stable par destruction ou inhibition des flores d'altération et pathogène (Leistner, 1978; Stringer et Peck, 1997; Elliott et Schaffner, 2001). Les principaux facteurs qui agissent sur ces micro-organismes sont la température, le pH et l'a_W. Les industriels ont d'ailleurs accès à un certain nombre d'outils d'aide à la décision pour prendre en compte ces différents facteurs. Lund (1977; 1982a; 1982b) par exemple, mesure les valeurs de D et z associées à plusieurs constituants sensibles des aliments comme les vitamines. Ses travaux permettent de se faire une idée de l'impact qu'aurait un changement de température de traitement sur les qualités nutritives d'un produit. L'industriel peut alors adapter son procédé afin de maximiser la rétention des composés les plus fragiles. Ohlsson (1980), quant à lui, utilise le concept de « C-value » (Cook value) également associé au système de valeurs de D et z pour estimer l'effet de la température de traitement sur la qualité gustative finale du produit. D'autres auteurs comme Okabe (1979) ont décrit l'impact de la températue de traitement sur la texture ou l'influence de l' a_W sur la cinétique de détérioration des produits (Labuza, 1980). Toutes ces avancées n'en font pas pour autant oublier l'objectif premier qui est la sécurité. Cette forte poussée contraint les industriels à se tourner vers la microbiologie prédictive pour lui demander des modèles globaux tenant à la fois compte du traitement, de la récupération et de la croissance (Hills et Mackey, 1995).

Il existe deux approches au sein de la communauté de la microbiologie prédictive qui se reflètent au travers des logiciels qui sont développés par les microbiologistes. La première, adoptée par les anglo-saxons, est fondée sur l'utilisation des modèles polynomiaux associés à une base de données. Les logiciels qui en découlent sont le « Pathogen Modeling Program » (USA) et le « Food Micromodel » (GB) (McClure *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1992; Rosso, 1997). La seconde, utilisée en France par exemple, est quant à elle basée sur les modèles modulaires en prenant soin de répondre aux critères de parcimonie, d'interprétabilité des paramètres et de robustesse. Les logiciels associés à cette seconde démarche sont « ASK_ME » pour Analysis and Simulation of Kinetics of the Micro-organisms in their Environments (CNRS) et « Dyn@card » (DANONE) avec pour différence la prise en compte ou non des interactions entre facteurs (Rosso, 1997). La qualité des ces logiciels dépend donc des modèles de base qui ont été choisis au départ. Masana et Baranyi (2000) signalent à cet égard l'inconvénient des modèles polynomiaux qui sont surparamètrés. L'ajout de facteurs devient alors périlleux en terme de robustesse. La conclusion de ces auteurs est qu'il vaut mieux bien modéliser l'influence des principaux facteurs plutôt que d'essayer tout modéliser.

L'outil qu'est la microbiologie prédictive a néanmoins ses limites liées par exemple à la variabilité biologique (Delignette-Muller et Rosso, 2000) ou au choix des valeurs et méthodes d'estimation des paramètres (Casolari, 1994). Gay et Cerf (1994) dressent une liste des principales limites à leurs yeux : les valeurs sont déterminées pour des intervalles donnés de température, pH et a_W; la taille importante des inocula de départ qui sont utilisés; les milieux employés sont le plus souvent des milieux de laboratoire ; les interactions entre flores sont généralement négligées ; il n'v a que rarement les marges d'erreur sur les valeurs fournies. Malgré ces contraintes, qui petit à petit reculent, les microbiologistes sont optimistes pour l'avenir de la discipline. Certains entrevoient le futur avec la création de bases de données internationales sur internet où les chercheurs et industriels partageraient leurs acquis au profit de tous (Buchanan, 1993; Schaffner et Labuza, 1997). Il restera encore à s'affranchir des problèmes techniques comme ceux liés à l'informatique et aux différents systèmes qui existent, DOS, Windows, Macintosh, etc. (Schaffner et Labuza, 1997). C'est dans ce contexte et cette optique que sont nés différents programmes nationaux dont le projet Sym'Previus en France auquel participent activement le LUMAQ et le groupe DANONE.

Chapitre 2

Matériel et méthodes

2.1 Matériel biologique

Le stock de spores de *Bacillus cereus* Bce1 (souche DANONE) utilisé pour les travaux de thèse a été réalisé à partir d'un isolement sur boîte de Pétri. Une colonie est inoculée dans un flacon de 250 ml de bouillon cœur-cervelle qui est incubé 24 heures à 37°C.

Des boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive complémentée en sels (MnSO₄ à 40 mg/l et CaCl₂ à 100 mg/l) sont ensemencées en surface avec 1 ml de la préculture. Ces boîtes sont incubées un mois à 37°C puis leur surface est raclée avec une anse de platine. Les spores ainsi récupérées sont remises en suspension dans des tubes à centrifuger contenant chacun 20 ml de tampon Phosphate stérile M/15 à pH = 7 (pour la suite des opérations les agitations seront les plus douces possibles pour éviter au maximum la floculation des spores). Les tubes sont alors centrifugés 15 minutes à 10000g, puis le surnageant est éliminé. Le culot est remis en suspension dans 20 ml de tampon Phosphate M/15 à pH = 7 à l'aide d'une pipette Pasteur stérile pour subir un second lavage. De nouveau, les tubes sont centrifugés dans les mêmes conditions. Le culot est cette fois-ci remis en suspension dans une solution 50 % eau / 50 % éthanol et placé 12 heures à 4°C afin d'éliminer les cellules végétatives. Les tubes subissent une nouvelle fois trois cycles de centrifugation / lavage et pour finir, le stock de spores contenu dans du tampon Phosphate M/15 à pH = 7 est réparti en tubes Eppendorfs stériles puis conservé en chambre froide à 4°C.

Ce stock de spores est nommé Bce1S1. Il est homogène et ne contient plus de « flocs ». Après une période de 15 jours à 4°C, des dosages ont permis d'estimer sa concentration à environ 10¹⁰ spores/ml. Il faut toutefois signaler que l'agitation au vortex provoque la floculation des spores induisant une grande variabilité dans les résultats. C'est pourquoi, au cours de ces travaux, les agitations se feront par retournement des tubes, technique donnant de bons résultats et dont la bonne répétabilité a été vérifiée.

2.2 Etude du traitement thermique

2.2.1 Les milieux

Les milieux sont constitués d'une base, du bouillon nutritif Biokar de même composition que la gélose nutritive excepté l'agar. Ceci évite les changements de composition en nutriments dans les différentes parties de l'étude. Le milieu peut ainsi être identique du traitement, en passant par les dilutions, jusqu'aux milieux d'incubation qu'ils soient solides ou liquides. Les milieux de traitement contiennent tous la même concentration en bouillon nutritif c'est-à-dire 20 g/l de solution.

2.2.1.1 Etude du pH

L'étude de l'influence du pH sur la thermorésistance des spores s'effectue via l'ajout d'acide organique dans les solutions de traitement. Les acides étudiés sont très fréquemment rencontrés dans l'industrie agro-alimentaire, il s'agit des acides citrique, lactique et acétique. Ils sont utilisés à 5 Molaire pour acidifier les différents milieux dans une gamme de pH s'étendant de pH = 4 à pH = 7.

$\textbf{2.2.1.2} \quad \textbf{Etude de l'} a_W$

Les milieux sont également ajustés au niveau de leur a_W avec des dépresseurs tels que le NaCl ou le saccharose. Les concentrations sont déterminées à partir des modèles UNIFAC-LARSEN (Achard *et al.*, 1992), avec une gamme d'étude comprise entre $a_W = 0.9$ et $a_W = 1$. Toutes les a_W sont mesurées par la suite avec un a_W -mètre de la société GBX France Scientific Instruments, le FA-st/1.

Une fois le pH et l'a_W ajustés, les milieux sont stérilisés par filtration sur membrane de 0,22 μ m de diamètre de pores et stockés en tubes à 4°C.

2.2.2 Cinétique de survie

Le protocole utilisé pour cette étude est décrit au travers des cinq étapes de la figure 2.1. Dans une première étape, une solution de spores diluée au 1/100^{eme} est préparée dans du milieu de traitement (30 μ l de stock dans 3 ml). On introduit 100 μ l de cette solution au centre de capillaires en verre calibrés à 100 et 200 μ l, capillaires préalablement stérilisés au four Pasteur, leurs extrémités sont ensuite soudées à la flamme (étape 2). Les capillaires sont alors placés sur des portoirs et plongés dans un bain de glycérol thermostaté (étape 3). Ils sont retirés à différents temps et refroidis instantanément dans un bain d'eau glacée. Lavés par une solution de détergent puis rincés, leurs extrémités sont flambées puis cassées. Au cours de l'étape 4, leur contenu est chassé par 0,9 ml de bouillon nutritif vers un tube de 9 ml de ce même bouillon, puis des dilutions au 1/10^{eme} en cascade sont réalisées. La dernière étape consiste en l'ensemencement des survivants. La technique utilisée est celle du dénombrement en milieu solide dans de la gélose nutrive à pH=7 en utilisant 1 ml de chacune des dilutions, les boîtes sont alors incubées 72 heures à 25°C.



Figure 2.1 – Schéma décrivant les cinq étapes du protocole de traitement thermique des spores de Bacillus cereus.

Les survivants sont dénombrés, seules les boîtes comportant entre 30 et 300 colonies sont prises en compte, puis la cinétique de destruction est tracée. La courbe représentant le logarithme du nombre de survivants en fonction du temps de traitement donne théoriquement une droite dont l'inverse de la pente correspond à la valeur de D, le temps de réduction décimale.

2.2.3 Plans expérimentaux

Nous avons choisi de prendre l'acide citrique comme référence pour les acides et le saccharose comme référence pour les dépresseurs de l'a_W. L'influence des différents acides sera étudiée dans des milieux dont l'a_W est ajustée par le saccharose, l'influence des dépresseurs sera quant à elle étudiée dans des milieux acidifiés par l'acide citrique.

Les plans de manipulation sont une combinaison de plans monofactoriels pour la Température, le pH et l'a_W. Ils sont centrés sur le point correspondant à $T = 90^{\circ}C$, pH = 5,5 et a_W = 0,96.

Tous ces plans permettent de déterminer les valeurs des différents paramètres des modèles secondaires, c'est-à-dire D^* , z_T , z_{pH} , z_{a_W} , pour les différents acides et dépresseurs d'activité de l'eau étudiés. Il faut signaler que ces plans ne permettent pas d'évaluer les interactions entre les différents facteurs.

2.3 La récupération

2.3.1 Les milieux

Ne pouvant stériliser par autoclavage les milieux du fait des réactions de Maillard, une partie des milieux est stérilisée par filtration selon le protocole suivant. Les milieux utilisés pour la récupération sont préparés sous la forme de deux solutions stérilisées l'une par autoclavage, la seconde par filtration sur membrane.

Solution A : La solution A contient l'agar qui fera gélifier le milieu final. Celleci est préparée en mélangeant dans un flacon d'un litre, 15 g d'agar bactériologique de type E (Biokar) à 250 ml d'eau déminéralisée. Cette solution est portée à ébullition puis autoclavée 20 minutes à 121°C.

Solution B : Cette seconde solution contient les autres solutés dont les concentrations sont ajustées pour un volume final de 2 litres, en tenant compte du facteur de dilution dû au mélange ultérieur des deux solutions. Tout d'abord, 53,33 g de bouillon nutritif ainsi que la masse de dépresseur d'a_W souhaitée sont pesés dans un flacon de 2 litres. Le volume d'eau déminéralisée calculé est ensuite additionné. Le mélange est placé sous agitation jusqu'à solubilisation totale. A ce stade, il est possible d'ajuster le pH de la solution avec l'un des acides étudiés ou avec de la soude (solutions à 5 M). Pour finir, les deux litres sont stérilisés sur des filtres Millipore Millex SLGP50 à membrane express de 0,22 μ m de diamètre de pores. La filtration permet d'éviter la caramélisation du saccharose qui se produirait par autoclavage.

Le jour de la manipulation, la solution d'agar A est maintenue en surfusion à 70°C dans un bain-marie. La solution B est, quant à elle, maintenue à 55°C dans un second bain-marie. Pour finir, il faut additionner la masse calculée de solution B (correspondant à 750 ml de solution) dans le flacon A pour reconstituer 1 litre de gélose aux caractéristiques ajustées. Lors des manipulations, deux boîtes de Pétri non ensemencées seront conservées afin de mesurer les pH et a_W exacts.

2.3.2 Cinétique de récupération

Le protocole d'étude de la récupération est très proche de celui du traitement présenté figure 2.1. Ici, l'étape 1 du traitement thermique est toujours réalisée dans des conditions de référence, c'est-à-dire, à 90°C, dans un milieu de pH = 5,5 acidifié par de l'acide citrique et d'a_W = 0,96 obtenue par l'ajout de saccharose. Les dilutions au $1/10^{\text{eme}}$ sont cette fois-ci incluses en double couche dans les différents milieux de récupération (étape 5). Les boîtes sont incubées à 25°C pour des durées variables selon les caractéristiques du milieu. Le dénombrement des survivants capables de former des colonies permet de tracer des courbes fournissant les valeurs de D', temps de réduction décimaux observés dans des milieux de récupération défavorables.

2.3.3 Plans expérimentaux

Ici chaque facteur sera étudié indépendamment des autres. Ainsi l'influence d'un acide sera mise en évidence dans un milieu sans dépresseur d'a_W et sur 7 niveaux de pH : 7 - 6,5 - 6,25 - 6 - 5,5 - 5,25 - 5. Quelques cinétiques seront également réalisées à pH basiques entre 7 et 9.

L'effet d'un dépresseur sera quant à lui observé en l'absence d'acide dans le milieu de récupération et sur 10 niveaux d'a_W : 1 - 0,99 - 0,98 - 0,97 - 0,96 - 0,95 - 0,94 - 0,93 - 0,92 - 0,91.

2.4 Etude de la latence et de la croissance

2.4.1 Les milieux

Au cours de cette dernière partie de notre travail, c'est l'influence globale du pH qui est mesurée ainsi que l'impact de la température de traitement. Ainsi, les spores sont traitées dans un milieu de pH donné, diluées puis enfin incubées pour leur croissance et leur dénombrement toujours dans ce même milieu. Ce protocole essaie de calquer au maximum ce qui peut se passer dans un produit industriel où les bactéries subissent le traitement puis récupèrent.

Par conséquent, tous les milieux utilisés dans cette partie sont des milieux liquides dont le pH est ajusté par de l'acide citrique, milieux ne subissant pas de modification de leur a_W . Leur stérilisation est effectuée par filtration sur membrane 0, 22 μ m.

2.4.2 Méthode de dénombrement en milieu liquide (NPP)

Cette technique, autrement nommée technique du nombre le plus probable (NPP), permet d'estimer le nombre de bactéries présentes dans une solution. L'avantage de cette méthode est que l'ensemencement en milieu liquide est généralement considéré comme une méthode plus douce que l'inclusion dans un milieu gélosé. Ceci permet d'éliminer un stress supplémentaire lors du dénombrement, stress qui pourrait affecter la récupération des bactéries ou des spores les plus fragiles.

La technique, dont le principe est la répétition des ensemencements, est fondée sur la loi de Poisson. Dans notre cas, cette méthode est mise en œuvre par utilisation de microplaques à 96 puits à fonds ronds. Les dilutions au $1/10^{\text{eme}}$ en cascade de l'échantillon sont réalisées jusqu'à la dilution 10^{-7} . 100 μl du milieu de culture sont placés dans chacun des 96 puits de la microplaque. Enfin, 100 μl de chaque dilution entre 10^{-2} et 10^{-7} sont dilués dans les différents puits pour obtenir au final 6 dilutions ensemencées dans 16 puits chacune. Cette microplaque est ensuite couverte avec de l'adhésif stérile et incubée à 25°C pendant une durée variable d'au moins 48 heures.

Les puits positifs où il y a croissance sont alors dénombrés ce qui permet d'accéder au nombre de bactéries ou spores présentent dans l'échantillon. Pour cela on résoud l'équation suivante (de Man, 1975, 1977; Prost et Hugues, 1982) :

$$\sum_{i=1}^{k} \frac{p_i \cdot q_i}{1 - e^{-q_i \cdot d}} = \sum_{i=1}^{k} n_i \cdot q_i$$
(2.1)

avec :

- -d, la densité bactérienne dans l'échantillon initial;
- -k, le nombre de dilutions ensemencées;
- -i, le rang de la dilution;
- $-n_i$, le nombre de répétitions pour la dilution de rang i;
- $-q_i$, le volume d'échantillon initial correspondant à la dilution de rang i;
- $-p_i$, le nombre de puits positifs pour la dilution de rang *i*.

2.4.3 Calibration du spectrophotomètre

L'étude de la recroissance est effectuée par suivi de la densité optique (D.O.) à 600 nm au cours de l'incubation. Il est donc nécessaire dans un premier temps d'étalonner la courbe de croissance afin d'obtenir la correspondance entre DO et nombre de cellules. Une manipulation est réalisée dans ce sens à pH=7, elle comprend une activation des spores par un traitement thermique d'une minute à 90°C puis un suivi de croissance par DO auquel s'ajoute des dénombrements réguliers par inclusion et NPP effectués sur des prélèvements de la solution de croissance.

2.4.4 La manipulation

Le protocole de la manipulation est schématisé et présenté figure 2.2. Les spores sont diluées et traitées thermiquement suivant le même processus que celui de la figure 2.1 (étapes 1 à 3). Leur contenu est ensuite chassé vers des fioles de croissance par 0,9 ml de milieu de culture. Les fioles sont munies d'une tubulure supérieure qui permet la mesure de la DO lors de leur retournement. Elles permettent d'avoir un suivi de DO sur un volume relativement important sans avoir de variations des conditions au cours de la cinétique telles que des variations de volume dues à des prélèvements. La croissance est réalisée à 25°C sous une agitation de 150 rotations par minute. A l'issue de la manipulation, les courbes de croissance sont tracées et le taux de croissance est déterminé.

Le nombre de survivants issus du traitement thermique est déterminé par la technique du NPP en microplaques 96 puits réalisée sur un aliquot d'1 ml prélevé immédiatement après ensemencement des fioles. Les microplaques sont incubées à 25°C pendant des durées variables s'échelonnant de 2 à 5 jours suivant le pH du milieu de culture. La cinétique de survie est tracée et les paramètres du modèle primaire associé au traitement sont estimés.

Au début de la croissance, la DO des spores chute rapidement, cette chute étant due à la baisse de leur réfringence et non pas à une diminution de leur nombre. Cette chute entraîne une DO qui est inférieure au seuil de détection du spectrophotomètre. De plus, il n'est pas possible pendant cette phase de différencier des spores non germées ou en cours de germination de cellules végétatives. C'est donc l'association des courbes de survie, de croissance et de calibration qui permet l'extrapolation du temps de latence en utilisant le principe présenté figure 1.13 page 33.

2.4.5 Organisation des manipulations

L'impact de la température de traitement sur la latence est étudié sur 3 niveaux, 85, 90 et 95°C. L'influence du pH est observée dans une gamme qui s'étend de pH=7 à pH=5,5. A 85 et 95°C, seuls trois niveaux de pH sont testés : 7, 6,5 et 6. Pour la température de 90°C, 5 niveaux de pH sont réalisés : 7 - 6,5 - 6 - 5,75 et 5,5, et toutes les manipulations sont doublées.

2.4.6 Influence de la taille de l'inoculum

Nous souhaitons étudier, entre autres, l'influence du temps de traitement thermique sur le temps de latence à la recroissance. Pour ce faire, nous faisons subir un stress thermique aux spores dont certaines meurent. Les fioles de culture sont alors ensemencées avec des niveaux différents de survivants. Il faut donc vérifier que la taille de cet inoculum n'influe pas sur le calcul du temps de latence. Nous avons donc traité une suspension de spores pendant une minute à 90°C. Cette solution a ensuite été diluée au $1/10^{\text{eme}} 1/100^{\text{eme}}$ et $1/1000^{\text{eme}}$. Huit fioles de culture sont alors ensemencées avec ces différentes dilutions et la croissance suivie par DO. Le temps de latence est alors déterminé suivant le protocole présenté précédemment.



Figure 2.2 – Schéma décrivant le protocole utilisé pour caractériser le comportement à la recroissance des spores de *Bacillus cereus*. Les étapes 1 à 3 sont identiques à celles de la figure 2.1. (4) le contenu des capillaires est chassé par 0,9 ml de mileu de culture vers une fiole contenant 9 ml de ce même milieu; (5) dilutions au 1/10^{eme} en cascade; (6) dénombrement des survivants par la technique du NPP; (7) on trace la courbe de survie; (8) les fioles de culture placées à 25°C sont agitées à 150 rpm; (9) régulièrement la DO est mesurée à 600 nm par retournement des fioles; (10) on trace la courbe de croissance.

2.5 Traitement des données expérimentales

2.5.1 Estimation des paramètres des modèles

2.5.1.1 L'estimateur des moindres carrés

Qu'il soit linéaire ou non, le modèle à ajuster peut s'écrire sous la forme :

$$Y = f(X,\theta) + \epsilon \tag{2.2}$$

avec :

-X, la variable explicative;

-Y, la variable expliquée;

 $-\theta$, le vecteur de paramètres;

 $-\epsilon$, l'erreur ou partie non expliquée par le modèle.

où $f(X,\theta)$ représente la partie déterministe du modèle alors que ϵ correspond à la partie aléatoire. A l'issue des manipulations, nous disposons de jeux de données expérimentales de n valeurs formés de réalisations ponctuelles de Y, notées y_i , correspondant à des valeurs de X, les x_i . Nous pouvons donc écrire :

$$y_i = f(x_i, \theta) + \epsilon_i, \quad i = 1, ..., n$$
 (2.3)

Si les variables aléatoires ϵ_i sont indépendantes, normalement distribuées et de variance homogène, le modèle est dit homoscédastique gaussien. Dans ce cas, il est possible d'utiliser l'estimateur des moindres carrés afin d'estimer les paramètres du modèle, cet estimateur étant alors équivalent au maximum de vraisemblance (Huet *et al.*, 1992; Tomassone *et al.*, 1992). Le modèle peut enfin s'écrire sous la forme :

$$y_i = f(x_i, \theta) + e_i, \quad i = 1, ..., n$$
 (2.4)

avec e_i , les résidus.

L'ajustement du modèle théorique aux données expérimentales se fait donc par minimisation de la somme des carrés des écarts :

$$SCE = \sum_{i=1}^{n} \left(y_i - f\left(x_i, \theta\right) \right)^2$$
(2.5)

avec :

$$\hat{\theta} = \arg\min_{\theta \in \Theta} \sum_{i=1}^{n} \left(Y_i - f\left(X_i, \theta\right) \right)^2$$
(2.6)

l'estimateur des moindres carrés, le vecteur de paramètres pour lequel la somme des carrés des écarts est minimale. Celui-ci sera déterminé par algorithmes numériques, algorithmes programmés dans les différentes fonctions Matlab.

2.5.1.2 Régions de confiance des paramètres

Cette technique permet d'évaluer les intervalles de confiance conditionnels des paramètres dans le cadre d'un ajustement simultané. Elle donne également une idée

des éventuelles corrélations structurelles entre ces différents paramètres. La théorie énoncée par Beale (1960) décrit un hypervolume H tel que :

$$H = \left\{ \theta : SCE(\theta) \le SCE(\hat{\theta}) \left(1 + \frac{p}{n-p} F_{p;n-p}^{\alpha} \right) \right\}$$
(2.7)

avec :

- $-\theta$, un vecteur de paramètres;
- $-\hat{\theta}$, l'estimateur des moindres carrés;
- -p, le nombre de paramètres du modèle;
- -n, le nombre de points expérimentaux;
- $-F_{p;n-p}^{\alpha}$, la valeur de Fisher-Snedecor à p et n-p degrés de liberté pour un risque $\alpha = 5$ %.

Cette région de confiance est déterminée par une méthode proche des techniques de Monte-Carlo inspirée de Lobry *et al.* (1991). Des points, correspondant à des vecteurs de paramètres, sont tirés aléatoirement autour de l'optimum $\hat{\theta}$ et la somme des carrés des écarts est testée suivant le critère 2.7. Si celle-ci répond à ce critère, le point est sauvegardé dans la matrice de résultats. Enfin, qu'il soit ou non dans la région de confiance, le point va migrer vers la surface de l'hypervolume par dichotomie en prenant l'optimum comme référence. Une fois à la surface, le point est sauvegardé, ainsi chaque tirage aléatoire dans l'espace des paramètres fournit un point à la surface de l'hypervolume. Ceci permet d'obtenir un très bon contour de la région de confiance. Le nombre de tirages nécessaires dépend du nombre de paramètres du modèle, plus il est important, plus il faut de tirages.

Une fois l'hypervolume déterminé, les intervalles de confiance des paramètres sont déduits des valeurs minimales et maximales qu'ils prennent dans H.

La dernière étape de cette technique consiste à projeter les points de l'hypervolume sur les différents plans des paramètres pris deux à deux. Les projections des régions de confiance permettent alors, suivant leurs formes, de visualiser la présence ou l'absence de corrélations structurelles entre les différents paramètres. Ainsi, une région circulaire révèle l'absence de corrélation. Une région elliptique horizontale ou verticale traduit également une absence de corrélation mais elle met en évidence une mauvaise qualité de l'estimation d'un paramètre. Enfin, une région elliptique inclinée fait apparaître une corrélation entre deux paramètres, corrélation d'autant plus forte que cette région est allongée.

2.5.1.3 Eustachage

L'eustachage, ou « jackknife » en anglais, est une technique numérique proposée par Quenouille (1956) et Tukey (1958) permettant l'estimation des paramètres d'un modèle ainsi que leurs intervalles de confiance. Ses principaux avantages sont qu'elle ne nécessite aucune connaissance *a priori* quant aux lois des différents paramètres et qu'elle permet une diminution du biais. Le principe, décrit par Tomassone *et al.* (1993) et Manly (1997), est le suivant. $\hat{\theta}$, l'estimateur des moindres carrés, est déterminé à partir du jeu de données complet :

$$\{x_1, \dots, x_{\ell-1}, x_\ell, x_{\ell+1}, \dots, x_k\} \to \theta$$
(2.8)

puis ce jeu de données est tronqué d'une valeur, et $\hat{\theta}$, alors noté $\hat{\theta}_{\ell}$, est à nouveau estimé. L'opération est répétée k fois, avec k le nombre de points du jeu de données.

$$\{x_1, \dots, x_{\ell-1}, x_{\ell+1}, \dots, x_k\} \to \hat{\theta}_{\ell}, \quad \ell = 1, \dots, k$$
(2.9)

Ces nouvelles valeurs $\hat{\theta}_{\ell}$, ne pouvant pas être considérées comme indépendantes, sont transformées en pseudo-valeurs v_{ℓ} avec :

$$v_{\ell} = k\hat{\theta} - (k-1)\hat{\theta}_{\ell} \tag{2.10}$$

Ces pseudo-valeurs sont indépendantes et normalement distribuées (conjecture de Tukey (1958)).

$$\tilde{p} = \frac{1}{k} \sum_{\ell=1}^{k} v_{\ell} \tag{2.11}$$

fournit une estimation de θ de variance :

$$\tilde{s}^2 = \frac{1}{k(k-1)} \sum_{\ell=1}^k \left(\tilde{p} - v_\ell \right)^2$$
(2.12)

On en déduit l'intervalle de confiance de θ au niveau de confiance 95%:

$$\theta \in \left[\tilde{p} - t_{\frac{\alpha}{2}}^{(k-1)} \tilde{s} \quad ; \quad \tilde{p} + t_{\frac{\alpha}{2}}^{(k-1)} \tilde{s} \right]$$
(2.13)

2.5.2 Evaluation de la qualité d'un modèle

2.5.2.1 Critère quantitatif : le $R^2_{ajust\acute{e}}$

La qualité globale de l'ajustement peut être estimée via le coefficient de détermination ajusté (Tomassone *et al.*, 1993) :

$$R_{ajust\acute{e}}^{2} = 1 - \frac{n-1}{n-p} \times \frac{\sum_{i=1}^{n} (y_{i} - \hat{y}_{i})^{2}}{\sum_{i=1}^{n} (y_{i} - \bar{y})^{2}}$$
(2.14)

avec :

- -n, le nombre de points expérimentaux;
- -p, le nombre des paramètres du modèle;
- $-y_i$, les valeurs observées;
- $-\hat{y}_i$, les valeurs estimées;
- $-\bar{y}$, la moyenne des y_i .

Ce coefficient tient compte du nombre de paramètres des modèles en avantageant ceux qui en ont le moins. Il prend également en compte le nombre de points expérimentaux ce qui est très intéressant dans le cadre de petits jeux de données. Enfin, son interprétation est simple puisque plus sa valeur est proche de 1, meilleure est l'ajustement.

2.5.2.2 Critère qualitatif : l'analyse des résidus

Les modèles de cette étude sont, pour la plupart, des modèles exponentiels de base décimale. Ils subissent donc naturellement une transformation logarithmique afin de stabiliser la variance, ils sont alors supposés homoscédastiques gaussiens. Après leur ajustement, il faut donc s'assurer avec soins que les hypothèses émises quant au modèle d'erreur sont bien vérifiées. Ceci peut être réalisé grâce à l'analyse détaillée des résidus réduits (Huet *et al.*, 1992) :

$$e_{r_i} = \frac{e_i}{\hat{\sigma}_e} = \frac{y_i - \hat{y}_i}{\hat{\sigma}_e} \tag{2.15}$$

avec :

 $-e_i$, les résidus; $-\hat{\sigma}_e$, l'écart type des e_i .

Homoscédasticité des résidus

Il est possible de déceler une éventuelle hétéroscédasticité, hétérogénéité de la variance, grâce à différentes représentations des résidus réduits. Les graphiques des résidus réduits en fonction de la variable explicative, ou des valeurs estimées, permettent de détecter une tendance dans leur répartition. Si tel est le cas, l'hypothèse de variance homogène n'est plus valide et le modèle d'erreur doit être rejeté. Il faut dans ce cas revoir la fonction de régression c'est-à-dire le modèle proposé.

Normalité des résidus

Le caractère gaussien du modèle d'erreur peut également être validé visuellement grâce à la représentation des résidus réduits en fonction des quantiles de la loi normale centrée réduite. Si les erreurs sont distribuées normalement, les points s'ajustent à une droite (droite de Henry). Dans la pratique, dans le cas de petits jeux de données, il est parfois difficile de conclure à partir de cette représentation, c'est pourquoi le recours à un test statistique est souvent nécessaire. Le test classique pour évaluer la normalité est celui de Kolmogorov-Smirnov mais il requiert un jeu de données relativement conséquent. Dans le cas de petits échantillons (n < 50), il est plutôt conseillé d'utiliser le test de Shapiro-Wilk.

Dans un premier temps, les résidus sont classés par ordre croissant puis la valeur de la fonction discriminante est calculée par :

$$W_{c} = \frac{\left(\sum_{j=1}^{k} a_{j} d_{j}\right)^{2}}{\sum_{i=1}^{n} (x_{i} - \bar{x})^{2}}$$
(2.16)

où :

$$k = \frac{n}{2}$$
, si *n* est pair
 $k = \frac{n-1}{2}$, si *n* est impair

Les coefficients a_j sont les scores de la loi normale qui sont tabulés, et les coefficients d_j sont définis par :

$$d_j = x_{n+1-j} - x_j, \quad j = 1, ..., k$$

La prise de décision se fait à partir des deux valeurs seuils W_1 et W_2 au risque $\alpha = 5 \%$ fournies par la table. Si $W_1 < W_c < W_2$ alors les résidus sont distribués normalement et le modèle d'erreur est bien gaussien.

Autocorrélation des résidus

Lorsque la variable explicative est une variable ordonnée, comme le sont : le temps, la température, le pH et l'a_W, il faut vérifier que les résidus réduits ne sont pas liés à cet ordre, en effet ils doivent être indépendants. Une nouvelle fois, c'est avec l'examen d'une représentation graphique des résidus réduits que l'on peut tester cette hypothèse. Lorsque les résidus réduits e_{r_i} sont tracés en fonction des $e_{r_{i-1}}$, les points doivent se répartir uniformément dans un disque centré sur l'origine des axes. Si une tendance dans ce nuage de points est remarquable, c'est qu'il existe une corrélation entre les résidus et l'hypothèse d'indépendance doit alors être rejetée. Cette étude visuelle peut être complétée par un test statistique fondé sur le même principe lorsque $n \geq 15$.

Le test de Durbin-Watson, dont la fonction discriminante est donnée par :

$$d_{c} = \frac{\sum_{i=2}^{n} (e_{i} - e_{i-1})^{2}}{\sum_{i=2}^{n} e_{i}^{2}}$$
(2.17)

permet de tester l'hypothèse H_0 d'indépendance. A partir de la table, la valeur d_c est comparée aux deux valeurs seuils d_1 et d_2 et la prise de décision est la suivante :

 $\begin{cases} \text{si } d_c < d_1, & \text{l'hypothèse } H_0 \text{ est rejetée au risque } \alpha = 5 \% \\ \text{si } d_1 < d_c < d_2, & \text{il n'est pas possible de conclure} \\ \text{si } d_2 < d_c, & \text{l'hypothèse } H_0 \text{ est acceptée au risque } \alpha = 5 \% \end{cases}$

Chapitre 3

La modélisation primaire de la survie

Dans ce premier chapitre consacré aux résultats, nous détaillons la modélisation primaire de la survie. Celle-ci consiste en la description du nombre de survivants au cours du temps lors d'un traitement thermique par un modèle cinétique dit « primaire ». Le choix de ce modèle se fait à partir des critères précédemment mentionnés comme l'interprétabilité de ses paramètres ou sa parcimonie.

3.1 Résultats

3.1.1 Allure des courbes de survie

Dans un premier temps, toutes les manipulations regroupées en différents plans (tableau 3.1) ont été réalisées. Nous observons alors que le comportement de survie de *Bacillus cereus* Bce1 s'écarte de la cinétique log-linéaire classique. En effet, les 129 cinétiques sont de forme convexe, à savoir une concavité tournée vers le bas, comme le montre la figure 3.1.

Cette convexité des courbes nous contraint à rejeter le modèle classique basé sur le temps de réduction décimal D (D' pour la récupération). Il nous faut donc choisir un autre modèle ou en proposer un nouveau.

Plan	Nbre de courbes	Nbre de points moyen par courbe
Trait ^t NaCl-Citrique-T	28	10,1
Trait ^t Saccharose-Citrique	21	13
Trait ^t Saccharose-Acétique	20	11,9
Trait ^t Saccharose-Lactique	20	12,5
Récup. NaOH	10	9,7
Récup. Citrique	11	9,8
Récup. Acétique	4	8,4
Récup. Lactique	9	10,2
Récup. Saccharose	6	6
Total :	129	1403

Tableau 3.1 – Liste des plans d'étude du traitement thermique et de la récupération.



Figure 3.1 – Cinétique de survie de Bacillus cereus Bce1 à pH=5,5 et $a_W=0,9$ (plan d'étude Traitement Saccharose-Citrique).

3.1.2 Choix du modèle primaire

3.1.2.1 Caractéristiques de la distribution de Weibull

Le modèle log-linéaire supposant l'homogénéité de la thermorésistance au sein de la population n'étant pas valide, c'est du côté des modèles basés sur une distribution de cette résistance que nos regards se sont portés. Les modèles de Fernandez *et al.* (1999) et Peleg et Cole (2000), dont l'hypothèse de départ est une répartition de la résistance suivant une distribution de Weibull, ont particulièrement retenu notre attention. Bien que ces deux modèles soient parfaitement capables de décrire nos cinétiques, leur paramétration ne nous satisfait cependant pas totalement.

Dans le cas de Fernandez *et al.* (équation 1.5), le choix de la base népérienne ne permet pas d'équivalent ou de base de comparaison directe avec le système actuel fondé sur l'association des valeurs D et z. Pour ce qui est de Peleg et Cole (équation 1.6), leur paramètre b possède la dimension de l'inverse d'un temps à la puissance n, ce qui n'est pas très parlant. Pourtant, face au potentiel de ces modèles à seulement trois paramètres, nous nous devons de comprendre leur origine afin de mieux les utiliser voire de les améliorer.

La distribution de Weibull est fort utilisée dans l'industrie où elle sert par exemple au calcul des durées de vie de produits ou de leurs pièces détachées. Les industriels peuvent alors ajuster leur période de garantie ou revoir la conception/fabrication en fonction des résultats statistiques issus de cet outil. Il faut également signaler qu'un grand nombre de logiciels sont munis de fonctions permettant l'accès à ces
différents outils, ce qui pourrait faciliter l'utilisation d'un modèle construit à partir de cette distribution.

Pour définir la distribution de Weibull il faut trois paramètres qui sont :

- $-\beta$, le paramètre de forme (« shape »);
- $-\eta$, le paramètre d'échelle (« scale ») autrement nommé « durée de vie caractéristique »;
- $-\gamma$, le paramètre de position ou de décalage initial (« location »).

Dans notre cas, le paramètre γ est nul, c'est donc la fonction densité de population à deux paramètres qui est utilisée, elle se présente sous la forme :

$$f(t) = \left(\frac{\beta}{\eta}\right) \left(\frac{t}{\eta}\right)^{\beta-1} e^{-\left(\frac{t}{\eta}\right)^{\beta}}$$
(3.1)

elle détermine le pour centage de mortalité dans l'intervalle $[t,t+\Delta t]$ en remplaçant t par Δt dans 3.1.

Sa fonction de répartition, ou cumulative :

$$F(t) = 1 - e^{-\left(\frac{t}{\eta}\right)^{\beta}}$$
(3.2)

représente quant à elle la proportion de morts au temps t. De cette fonction de répartition, on déduit la fonction de fiabilité (« reliability ») qui est simplement égale à 1-F(t), à savoir :

$$R(t) = e^{-\left(\frac{t}{\eta}\right)^{\beta}} \tag{3.3}$$

La fonction de fiabilité, comme son nom l'indique, permet de calculer la proportion de survivants au temps t. Pour une population initiale N_0 , le nombre de survivants au temps t est alors de :

$$N(t) = N_0 e^{-\left(\frac{t}{\eta}\right)^{\beta}} \tag{3.4}$$

Pour finir, nous pouvons introduire le taux de défaillance (« failure rate ») correspondant au taux de mortalité des survivants au temps t :

$$V(t) = \left(\frac{\beta}{\eta}\right) \left(\frac{t}{\eta}\right)^{\beta-1} \tag{3.5}$$

3.1.2.2 Signification des paramètres β et η

$\beta,$ le paramètre de forme

L'effet de β est représenté sur la figure 3.2(a,b,d) où l'on peut voir qu'il existe trois cas qui sont les suivants :

- $-\beta < 1 \text{ (courbes \cdots)}$:
 - la courbe de survie (figure 3.2a) est concave, c'est-à-dire avec la concavité tournée vers le haut;
 - la densité de probabilité (figure 3.2b) s'approche d'une hyperbole;
 - le taux de défaillance décroît très fortement dans les premiers temps puis continue de décroître lentement (figure 3.2d). Pour cette raison, lorsque $\beta < 1$, on qualifie le comportement de mortalité infantile ou initiale.
- $-\beta = 1$ (courbes —) :
 - la cinétique de survie (figure 3.2a) est log-linéaire, ce qui nous ramène au modèle classique;
 - la densité de probabilité (figure 3.2b) est une exponentielle décrite par :

$$f(t) = \frac{1}{\eta} e^{-\frac{t}{\eta}} \tag{3.6}$$

- le taux de défaillance, constant (figure 3.2d), est donné par :

$$V(t) = V = \frac{1}{\eta} \tag{3.7}$$

Le fait d'avoir V constant reflète une mortalité aléatoire ou accidentelle au sein de la population. Ainsi à chaque instant, tout élément a la même probabilité de mourir.

- $-\beta > 1$ (courbes -) :
 - cette fois-ci, la courbe de destruction est convexe avec une concavité orientée vers la bas (figure 3.2a);
 - la densité de probabilité tend vers la densité de la distribution normale lorsque β est proche de 3 (figure 3.2b), sinon il y a dissymétrie vers la droite pour des valeurs supérieures à 3 ou vers la gauche pour les valeurs inférieures;
 - le taux de mortalité, faible au départ, augmente de plus en plus rapidement avec le temps (figure 3.2d). Ce type de comportement traduit généralement une mortalité due à des phénomènes d'usure, de fatigue.



Figure 3.2 – Représentation de l'influence des paramètres β et η sur f(t) la fonction densité de probabilité de la distribution de Weibull, $\ln N(t)$ le nombre de survivants et V(t) le taux de défaillance, avec :

- pour a,b et d, $\eta = 20 \ min.$ avec : (--) $\beta = 1$, (--) $\beta = 3$, (...) $\beta = 0.5$. - pour c, $\beta = 3$ avec : (--) $\eta = 10 \ min.$, (--) $\eta = 20 \ min.$, (...) $\eta = 30 \ min.$

$\eta,$ le paramètre d'échelle :

C'est η qui donne la gamme dans laquelle se situe la résistance. Ce paramètre ne change pas l'allure générale de la densité de probabilité lorsqu'il varie, il étale plus ou moins la résistance dans le temps suivant sa valeur (figure 3.2c). η est généralement appelé durée de vie caractéristique car quelle que soit la valeur de β , lorsque le temps est égal à η alors on a :

$$F(t) = 1 - e^{-\left(\frac{t}{\eta}\right)^{\beta}} = 1 - e^{-1} = 0,632$$
(3.8)

c'est-à-dire 63,2 % de morts. Pour cette raison, les trois cinétiques de la figure 3.2a se coupent pour t = 20 minutes = η .

3.1.2.3 « Reparamétration »

Comme nous pouvons le constater, l'équation de Fernandez *et al.* (1999) (équation 1.5) et l'équation 3.4 sont identiques. Ce modèle, se voulant empirique, possède l'avantage de trois paramètres qui sont tous interprétables. Néanmoins, la base décimale est la plus utilisée dans le domaine de la modélisation de la survie ce qui a conduit Peleg et Cole (2000) à y revenir (équation 1.6) en perdant certains avantages sous la forme proposée.

Il suffit pourtant, par un simple changement de base, de transformer l'équation 3.4 en :

$$N(t) = N_0 \cdot 10^{-\left(\frac{t}{\delta}\right)^{\nu}} \tag{3.9}$$

avec :

$$\begin{cases} p = \beta \\ \delta = \eta \sqrt[p]{ln10} \end{cases}$$

Ce modèle possède trois paramètres dont le sens est le suivant :

- $-N_0$, le nombre de spores dans la population initiale;
- -p, le paramètre de forme qui décrit l'allure de la distribution de la thermorésistance au sein de la population;
- δ, la durée de vie caractéristique, qui dorénavant, correspond au temps au bout duquel il y a 90 % de morts (en appliquant la même démarche que l'équation 3.8). C'est pour cela et en référence à D, que δ est appelé : le temps de première réduction décimale. Tout comme D, il a la dimension d'un temps que l'on exprimera en minutes.

3.1.3 Evaluation du modèle sur une cinétique

3.1.3.1 Estimation des paramètres

Pour tester ce nouveau modèle primaire, nous avons choisi d'étudier une cinétique comportant un maximum de points décrivant une courbe régulière. Notre choix s'est porté sur la cinétique de traitement réalisée à 90°C, pH=7 et $a_W=1$, cinétique dont les quinze points ne paraissent pas trop entachés d'erreur et qui est bien représentative de l'ensemble de nos résultats expérimentaux. Ce choix d'une courbe « adéquate » pour tester le modèle peut également se justifier par la mise en évidence de caractères intrinsèques du modèle lorsque l'erreur semble faible.

L'ajustement à proprement parler est effectué à l'aide de la fonction de régression non linéaire de Matlab 6.1 ©, la fonction nlinfit. Les paramètres initiaux de la fonction sont tirés aléatoirement une centaine de fois et pour l'ensemble de ces tirages, le processus converge systématiquement vers les mêmes valeurs. Dans ce cas précis, les valeurs des paramètres sont les suivantes : $logNo = 7, 18, \delta = 7, 69$ et



Figure 3.3 – Ajustement du nouveau modèle primaire sur la cinétique de traitement réalisée à 90°C, pH=5,5 et $a_W=1$. (a) la courbe de survie et (b) la fonction densité de probabilité.



Figure 3.4 – Projection des régions de confiance des paramètres du modèle primaire pour la cinétique de traitement à 90°C, pH=5,5 et $a_W=1$. La valeur optimale des paramètres se situe au niveau de la croix blanche (+).

p = 1, 31. La figure 3.3a montre visuellement la très bonne adéquation des valeurs calculées selon le modèle avec celles observées expérimentalement. Sur la figure 3.3b, on peut observer la fonction densité de probabilité qui est d'allure dissymétrique vers la gauche du fait d'une valeur de p comprise entre 1 et 3.

L'estimation des paramètres effectuée, leurs intervalles de confiance ont été estimés par projection des régions de confiance. Les résultats présentés figure 3.4 laissent apparaître une très forte corrélation des paramètres δ et p qui se traduit par une projection inclinée de forme très allongée. Cette corrélation structurelle semble se répercuter sur les deux autres projections également inclinées mais à l'aspect moins étiré. Une telle corrélation révèle le plus souvent une surparamétration du modèle étudié avec des paramètres qui peuvent se compenser.

3.1.3.2 Evaluation de la qualité d'ajustement

La bonne qualité d'ajustement observée graphiquement est confirmée par le calcul du coefficient de détermination ajusté avec une valeur de 0,997.



Figure 3.5 – Analyse de la qualité d'ajustement du modèle sur la cinétique de traitement à 90°C, pH=5,5 et a_W=1. (a) courbe de survie; (b) graphiques des résidus (e_i) en fonction du temps; (c) résidus en fonction des quantiles de la loi normale; (d) graphique des e_i en fonction des e_{i-1}.

L'analyse des résidus, notamment celle du graphique des résidus en fonction du temps, la variable explicative, nous dévoile une répartition aléatoire de ces derniers, aucune hétéroscédasticité n'est donc mise en évidence (figure 3.5b).

La réprésentation des résidus en fonction des quantiles de la loi normale (figure 3.5c) laisse apparaître des résidus répartis le long d'une droite. Ceci permet de supposer qu'ils sont distribués normalement, hypothèse confirmée par le test de Shapiro-Wilk qui ne permet pas de rejeter leur normalité au risque 5%.

Enfin, la figure 3.5d des e_i en fonction des e_{i-1} nous les montre localisés autour de l'origine des axes. Il n'y a pas de tendance révélée par ce graphique, les résidus ne seraient donc pas autocorrélés. Cette conclusion est d'ailleurs confortée par le test de Durbin-Watson au risque 5%.

L'examen des résidus pour cette manipulation, en nous démontrant leur homoscédasticité, leur normalité et leur indépendance, met en évidence un modèle d'erreur gaussien confirmant la qualité de l'équation testée.

3.1.4 Application à l'ensemble des cinétiques

3.1.4.1 Calcul des paramètres

Après les premiers résultats très encourageants, le modèle est appliqué à tout notre jeu de données. La qualité d'ajustement de chaque cinétique est excellente puisque le $R^2_{ajusté}$ minimal est de 0,829 et le maximal est quant à lui de 0,999. Le $R^2_{ajusté}$ moyen sur l'ensemble des cinétiques est égal à 0,983 avec un écart-type de 0,021. Ce très bon ajustement peut être constaté en observant le graphique de l'ensemble des valeurs estimées en fonction des valeurs observées (figure 3.6). Sur la totalité des 1403 points, le coefficient de corrélation est égal à 0,994.

Tout comme pour la première cinétique étudiée, la totalité des projections des régions de confiance met en évidence une très forte corrélation entre les paramètres δ et p et l'éventuelle surparamétration de l'équation.

3.1.4.2 Qualité de l'ajustement

L'analyse des différentes représentations graphiques des résidus ne montrent généralement pas d'hétéroscédasticité, d'écart à la normalité ou d'autocorrélation, mais le faible nombre de points (<15) ne permet pas toujours une conclusion aisée et fiable. Ainsi, le test de Shapiro-Wilk démontre au risque 5 % que sur les 129 cinétiques, 6 présentent une répartition des résidus qui s'écarte de la normalité. Dans l'ensemble nous pouvons néanmoins conclure que le modèle d'erreur est gaussien et par la même à la bonne qualité du nouveau modèle.



Figure 3.6 – Evaluation de la qualité d'ajustement du modèle sur l'ensemble de notre jeu de données. Graphique des valeurs du logarithme du nombre de survivants prédites par le modèle pour chaque cinétique en fonction des valeurs observées expérimentalement.

3.2 Discussion

3.2.1 Observation du comportement de p

En observant les figures 3.7, 3.8 et 3.9, on se rend compte que la valeur de p ne varie pas beaucoup, elle est toujours située dans la même gamme. De plus, les facteurs pH, a_W et température ne semblent pas avoir d'influence sur la valeur de p. Seul l'acide lactique utilisé pour la récupération aurait tendance à faire augmenter sa valeur lorsque le pH diminue (figure 3.9a).

Certains auteurs ayant travaillé sur ce type de modèle ont observé des variations de p (ou équivalent de leur modèle) avec la température de traitement (Peleg et Cole, 2000). Néanmoins cette interprétation peut être sujette à caution vu qu'elle est pour une grande partie liée à un seul point expérimental. van Boekel (2002), travaillant avec des données bibliographiques concernant différentes espèces de sal-



Figure 3.7 – Représentation des valeurs de p en fonction du pH ou de l'a_W pour différents plans de traitement. Les intervalles de confiance à 95 % sont estimés par projection des régions de confiance.



Figure 3.8 – Représentation des valeurs de p en fonction du pH, de l'a_W ou de la température pour différents plans de traitement et de récupération. Les intervalles de confiance à 95 % sont estimés par projection des régions de confiance.



Figure 3.9 – Représentation des valeurs de p en fonction du pH pour les plans de récupération utilisant l'acide lactique ou NaOH. Les intervalles de confiance à 95 % sont estimés par projection des régions de confiance.

monelles, observe les deux cas de figure. Pour *Salmonella enteriditis* PT4, la valeur de p varie linéairement avec la température de traitement passant d'une valeur de 1,2 à une valeur de 0,5 indiquant un changement de forme des cinétiques. En revanche, dans le cas de *Salmonella typhimurium* la valeur de p ne semble pas varier et garde une valeur proche de 1,5. Cette influence des facteurs environnementaux sur p semble donc dépendre de l'espèce.

Dans notre cas, vu les résultats expérimentaux, nous considérons que le paramètre p est constant, il serait illusoire de vouloir modéliser ces éventuelles variations au niveau secondaire. De plus, la très forte corrélation structurelle qui existe entre p et δ nous conforte dans notre choix de l'estimer globalement et de le fixer une fois pour toutes.

3.2.2 Evaluation du modèle avec une valeur de p fixe

3.2.2.1 Estimation des paramètres

Le calcul des paramètres avec une valeur de p fixe doit se faire en une seule fois. Les 129 valeurs de logNo, les 129 valeurs de δ et la valeur de p sont estimées par minimisation de la somme des carrés des écarts globale obtenue sur l'ensemble des points expérimentaux. Ceci est effectué par un programme implémenté sous Matlab 6.1 ©qui utilise comme base la fonction nlinfit. Malgré les 259 paramètres à estimer à partir de 1403 points, l'algorithme converge rapidement et systématiquement vers le même vecteur paramètres solution, avec p = 1,335. Cette fois-ci, les intervalles de confiance ne peuvent pas être obtenus en utilisant la méthode de projection des régions de confiance. En effet, cette méthode voit le temps de calcul augmenter de façon exponentielle avec l'augmentation du nombre de paramètres à tester. Avec les moyens informatiques disponibles, il n'est pas envisageable de traiter ces 259 paramètres simultanément. Nous avons donc recours à la technique du jackknife.

3.2.2.2 Utilisation du jackknife pour le calcul des paramètres et de leurs intervalles de confiance

Le modèle considéré est le suivant :

$$y = \log N_0 - \left(\frac{t}{\delta}\right)^p \tag{3.10}$$

- $-\log N_0$ sera estimé par manipulation, on notera \hat{N}_j l'estimation pour la manipulation j;
- δ sera également estimé par manipulation et on notera $\hat{\delta}_j$ l'estimation pour la manipulation j;
- -p sera estimé pour l'ensemble des manipulations, on notera \hat{p} son estimation.

Pour une manipulation j donnée (k au total), on a :

- $-n_j$, le nombre de points de la manipulation j;
- $-t_{ij}$, le i^{eme} temps de traitement;
- $-Y_{ij}$, la i^{eme} valeur observée;
- $-\hat{Y}_{ij}$, la i^{eme} valeur estimée avec :

$$\hat{Y}_{ij} = \hat{N}_j - \left(\frac{t_{ij}}{\hat{\delta}_j}\right)^{\hat{p}}$$
(3.11)

La technique classique du jackknife est alors appliquée, et

$$\hat{\Theta} = \left\{ \hat{\delta}_j, \hat{N}_j, \hat{p}, \ 1 \le j \le k \right\}$$

est estimé par minimisation de la somme des carrés des écarts globale :

$$\hat{\Theta} = \arg\min_{\Theta \in [\mathbb{R}^+]^{2k+1}} \left[\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} \left(Y_{ij} - \hat{Y}_{ij} \right)^2 \right]$$
(3.12)

Les résultats obtenus sont présentés figure 3.10 et nous amènent à conclure que la technique n'est pas valable dans notre cas. La figure 3.10b nous montre en effet que la valeur de p obtenue par cette technique, p=1.313, ne se situe même pas dans la gamme de valeurs obtenues lors des ajustements effectués au cours du processus. L'estimateur du jackknife est peut être sans biais, il semble ici être divergent et par conséquent inutilisable.

Nous pouvons émettre l'hypothèse que cette divergence est due au fait que n_j n'étant pas constant, la contribution à l'erreur des différents points est constante alors que la contribution de chaque manipulation, elle, ne l'est pas.

Notre idée va donc être de pondérer l'erreur en prenant soin que :



Figure 3.10 – Représentation des résultats obtenus par jackknife. (a) les 1403 pseudo valeurs pour p (v_{ℓ}) ; (b) les points représentent les 1403 valeurs estimées de p (p_{ℓ}) au cours du jackknife alors que la droite horizontale figure la position de l'estimation finale obtenue (p=1,313).

 chaque point ait la même chance d'apparaître au sein d'une même manipulation :

$$\rightarrow \frac{1}{n_j}$$

– et que chaque manipulation ait le même poids :

$$\longrightarrow \frac{1}{k}$$

On introduit donc le coefficient de pondération π_j avec pour chaque point :

$$\pi_j = \sqrt{\frac{1}{k.n_j}} \tag{3.13}$$

ainsi en posant $Z_{ij} = \pi_j Y_{ij}$ et $\hat{Z}_{ij} = \pi_j \hat{Y}_{ij}$:

$$\sum_{j=1}^{k} \sum_{i=1}^{n_j} \left(Z_{ij} - \hat{Z}_{ij} \right)^2 = \sum_{j=1}^{k} \sum_{i=1}^{n_j} \pi_j^2 \left(Y_{ij} - \hat{Y}_{ij} \right)^2$$
$$= \sum_{j=1}^{k} \frac{1}{k \cdot n_j} \underbrace{\sum_{i=1}^{n_j} \left(Y_{ij} - \hat{Y}_{ij} \right)^2}_{SCE_j}$$

La somme des carrés des écarts de la manipulation j (SCE_j) se trouve pondérée par un coefficient prenant en compte la taille de cette manipulation. Plus elle possède de points, plus le poids d'un point est faible. Au final, avec :

$$\sum_{j=1}^{k} \sum_{i=1}^{n_j} \pi_j^2 = \sum_{j=1}^{k} \sum_{i=1}^{n_j} \frac{1}{k \cdot n_j} = 1$$

on ne modifie pas globalement l'inertie du système.

Dans le but d'estimer Θ par intervalle de confiance, nous estimons les paramètres à l'aide d'une adaptation du jackknife par bloc. Le D-jackknife est un jackknife où à chaque étape on enlève un bloc de taille d constante. Pour nos calculs, en ayant toujours à l'esprit le fait que nous souhaitons un poids identique de chaque manipulation, nous allons utiliser des blocs de taille variable.

A chaque étape ℓ du processus du jackknife, avec $1 \leq \ell \leq k$, on enlève une manipulation complète et ceci quel que soit le nombre de points qui la constituent. On a alors les estimations suivantes :

$$\hat{\Theta}_{\ell} = \arg\min_{\Theta \in [\mathbb{R}^+]^{2k-1}} \left[\sum_{\substack{j=1\\j \neq \ell}}^k \sum_{i=1}^{n_j} \pi_j^2 \left(Y_{ij} - \hat{Y}_{ij} \right)^2 \right]$$

$$où \quad \pi_j = \sqrt{\frac{1}{(k-1).n_j}}$$
(3.14)

L'ensemble de ces estimations est calculé de façon itérative grâce à un programme Matlab C. Ce dernier recalcule à chaque étape ℓ les coefficients de pondération et les utilise pour minimiser la somme des carrés des écarts pondérés. A l'issu de ce processus nous obtenons :

→ k estimations de $p : \{\hat{p}_{\ell} : 1 \leq \ell \leq k\}$ → (k-1) estimations des δ_j et $log N_0_j$, car lorsque $\ell = j$, il n'y a pas d'estimation de δ_j ni de $log N_0_j$.

Concentrons nous sur p. Nous avons d'une part \hat{p} fourni par la régression pondérée globale, sa valeur est de $\hat{p} = 1,3296$, et d'autre part un échantillon de taille k:

 $\{\hat{p}_\ell \ : \ 1 \leq \ell \leq k\}$ fourni par les kétapes du jackknife. On peut donc calculer les pseudo valeurs :

$$\{v_{\ell} = \hat{p}_{\ell} + k.(\hat{p} - \hat{p}_{\ell}) \quad ; \ 1 \le \ell \le k\}$$
(3.15)

qui sont représentées sur la figure 3.11a.

La conjecture de Tukey (1958) nous dit que les estimateurs associés sont indépendants ce qui permet de penser *via* le théorème de la limite centrale à une asymptotique normalité. Par précaution, nous nous sommes assurés de l'indépendance des v_{ℓ} par un test de Spearman. Les résultats sont probants avec un niveau de probabilité de 86 %. Le test nous laisse penser à l'indépendance des pseudo-valeurs et une droite de Henry nous laisse même penser à une répartition normale de ces pseudo-valeurs (figure 3.11c) ce qui est confirmé par un test de Shapiro-Wilk au risque 5%.

On considère donc l'estimation par jackknife (\tilde{p}) défini par :

$$\tilde{p} = \frac{1}{k} \sum_{\ell=1}^{k} v_{\ell} \tag{3.16}$$

et on utilise l'expression usuelle de l'intervalle de confiance d'un paramètre estimé par cette méthode :

$$\tilde{s}^2 = \frac{1}{k.(k-1)} \sum_{\ell=1}^k \left(v_\ell - \tilde{p} \right)^2$$
(3.17)

avec un intervalle de confiance au niveau de confiance $1 - \alpha$:

$$p \in \left[\tilde{p} - t_{\frac{\alpha}{2}}^{(k-1)} \tilde{s} \quad ; \quad \tilde{p} + t_{\frac{\alpha}{2}}^{(k-1)} \tilde{s} \right]$$
(3.18)

La même démarche est appliquée aux autres paramètres en prenant garde au fait qu'il y a une estimation de moins (k-1) ce qui doit se répercuter sur les équations précédentes.

Avec cette technique associant la pondération de l'erreur avec le jackknife par bloc, nous obtenons une valeur de \tilde{p} égale à $1,3292 \pm 0,0323$ qui est très proche de la valeur globale estimée de 1,3296.

3.2.2.3 Evaluation de la qualité d'ajustement

Avec la perte de 128 paramètres, les 129 valeurs de p ayant été remplacées par une valeur unique, nous sommes en droit de penser que la qualité d'ajustement va s'en ressentir fortement. Or, il n'en n'est rien. Pour s'en convaincre il suffit de regarder le graphique des valeurs prédites en fonction des valeurs observées (figure 3.12). Sur l'ensemble des points, on obtient un coefficient de corrélation de 0,993. Les valeurs de $R_{ajusté}^2$ individuelles témoignent également de la bonne qualité de l'ajustement.



Figure 3.11 – Estimation de la validité des paramètres obtenus à partir des méthodes de pondération et de jackknife par bloc de taille variable. (a) les 129 pseudo valeurs pour p (v_{ℓ}) ; (b) les points représentent les 129 valeurs estimées de p (p_{ℓ}) au cours du jackknife alors que la droite horizontale figure la position de l'estimation finale obtenue (p=1,3292); (c) graphique des pseudo valeurs en fonction des quantiles de la loi normale.

Ainsi, le $R^2_{ajust\acute{e}}$ minimal est de 0,764 alors que le maximal est de 0,999. La valeur moyenne du coefficient de détermination ajusté est située à 0,977 avec un écart-type de 0,03.

L'analyse des résidus, bien que légèrement moins bonne, ne révèle pas d'hétéroscédasticité, ni d'autocorrélation ou encore d'écart à la normalité et ceci pour



Figure 3.12 – Evaluation de la qualité d'ajustement du modèle avec une valeur de p fixe. Graphique des valeurs du logarithme du nombre de survivants prédites par le modèle pour chaque cinétique en fonction des valeurs observées expérimentalement.

la plupart des cinétiques. Cependant, les courbes dont la valeur initiale de p était relativement éloignée de la valeur fixée peuvent présenter une tendance dans la répartition de leurs résidus. Ainsi, alors qu'avec une valeur de p variable, le test de Shapiro-Wilk trouvait 6 cinétiques avec des résidus non normaux, celui-ci en trouve dorénavant 12.

Dans l'ensemble, nous pouvons donc dire que la qualité de l'ajustement est restée excellente malgré le passage d'un modèle à 3 paramètres à un modèle à 2 paramètres.

3.2.3 Conclusion

Avec une perte minime de la qualité d'ajustement pour un gain conséquent en parcimonie nous ne pouvons que faire le choix de fixer le paramètre p à 1,33. Pour le faire, nous disposons de 129 cinétiques dans des conditions variées ce qui permet de se faire une idée relativement globale de sa valeur. On pourrait imaginer

pour trouver rapidement cette valeur une manipulation répétée plusieurs fois dans des conditions standard. Il vaut mieux néanmoins tester quelques conditions environnementales réparties dans la gamme d'utilisation du modèle. Le plus important est sans nul doute la qualité des manipulations en terme de nombre de points et de nombre d'unités log franchies. En effet, lorsque la valeur de p est relativement proche de 1, la courbure est faible et il faut un temps de traitement relativement important afin de pouvoir écarter le modèle linéaire.

Avec cette nouvelle équation, nous disposons d'un modèle parciminieux et robuste dont la qualité d'ajustement a été démontrée. De surcroît, les paramètres ont tous un sens biologique et sont facilement interprétables. Un autre avantage, c'est qu'avec un p unique le modèle devient linéaire lorsque l'on trace le logN(t) en fonction de t^p . Une régression linéaire permet alors d'estimer δ et $logN_0$.

A l'issue de cette première partie, nous avons fait le choix de notre modèle primaire et de la méthode pour estimer ses paramètres. Nous allons maintenant voir si ces paramètres peuvent être décrits au niveau secondaire par les modèles quantifiant l'impact des différents facteurs environnementaux. Les premiers résultats observés dans la bibliographie pour ce type de modèle sont à ce sujet très encourageants. Selon certains auteurs, l'influence de la température de traitement sur le paramètre équivalent à δ pourrait être décrite par les modèles secondaires classiques (Peleg et Cole, 2000; van Boekel, 2002).

Chapitre 4

La modélisation secondaire de la survie

La description complète de la survie se déroule en deux « étapes distinctes ». La première, la modélisation primaire, a été effectuée au chapitre précédent et nous a fourni un modèle cinétique. La seconde étape, la modélisation secondaire, consiste à décrire les variations des paramètres du modèle primaire en fonction des conditions environnementales. Ces variations sont retranscrites au travers des modèles environnementaux dits « secondaires ». Dans le cadre de notre étude, les facteurs étudiés sont la température de traitement, l'activité de l'eau et le pH avec l'utilisation de trois acides organiques.

4.1 Résultats relatifs au traitement thermique

4.1.1 Influence de la température

Au chapitre précédent, le modèle primaire proposé fournissait non plus une valeur de D, mais un δ qui en est proche. Les modèles secondaires que l'on va donc tester sont les modèles classiquement utilisés pour décrire les variations du temps de réduction décimale. La modélisation de l'influence de la température de traitement sur δ est naturellement effectuée en utilisant le modèle de Bigelow (1921) qui dans notre cas s'écrit :

$$\log\delta = \log\delta^* - \left(\frac{T - 90}{z_T}\right) \tag{4.1}$$

 avec :

- $-\delta^*$, la valeur de première réduction décimale à la température de référence que nous avons fixée à 90°C par commodité;
- $-z_T$, l'écart de température induisant une réduction de δ d'un facteur 10.

Ce modèle est appliqué au plan monofactoriel relatif à la température inclu dans l'étude combinant NaCl et acide Citrique, les résultats obtenus sont présentés figure 4.1. Le graphique 4.1(a) révèle la bonne adéquation du modèle avec les données expérimentales, ce qui est confirmé par un coefficient de détermination ajusté de 0,989.



Figure 4.1 – Représentation des résultats obtenus pour le plan de traitement NaCl - Citrique : (a) valeurs de $log(\delta)$ en fonction de la température; (b) graphique des résidus; (c) projection de la région de confiance à 95% des paramètres. Les paramètres et leurs intervalles de confiance sont présentés dans le tableau ci-dessus.

Dans ces conditions, le δ^* correspond au temps de première réduction décimale à T=90°C, pH=5,5 et a_W=0,96, il est donc noté $\delta_{90:5,5:0.96}$ et s'exprime en minutes.

Les différentes représentations graphiques des résidus, comme la figure 4.1(b), permettent de conclure à l'absence d'hétéroscédasticité et d'autocorrélation de ces derniers. De plus, la normalité de ces résidus est mise en évidence par le test de Shapiro-Wilk. La projection de la région de confiance quasiment circulaire, figure 4.1(c), permet de conclure à l'absence de corrélations structurelles entre les paramètres δ^* et z_T .

L'ensemble de ces observations nous permet de conclure qu'il est donc possible d'utiliser avec succès le modèle de Bigelow (1921) pour décrire l'influence de la température de traitement sur les variations de δ . Pour finir, il est intéressant de noter que la valeur de $z_T=8,55^{\circ}$ C est très proche de celle obtenue par Laurent *et al.* (1999) qui était de 8,62°C pour cette même souche de *Bacillus cereus* Bce1.

4.1.2 Influence de l'activité de l'eau

4.1.2.1 Choix du modèle

Les résultats des différents plans monofactoriels sont présentés sur la figure 4.2. Sur cette figure on peut remarquer que le logarithme de δ varie de façon approximativement linéaire en fonction de l'activité de l'eau. De plus, la valeur minimale de ce logarithme semble se situer à $a_W=1$. A partir de ces constatations, c'est le modèle de Gaillard *et al.* (1998a) qui est choisi pour décrire les variations de δ en fonction de l'a_W avec :

$$\log\delta = \log\delta^{\star} - \left(\frac{a_W - 1}{z_{a_W}}\right) \tag{4.2}$$

avec :

 $-\delta^{\star}$, la valeur de première réduction décimale pour $a_{W}=1$;

 $-z_{a_W}$, l'écart d'a_W induisant une augmentation de δ d'un facteur 10.

4.1.2.2 Ajustement et qualité du modèle

L'ajustement de ce modèle pour le plan d'étude Saccharose - acide Citrique est présenté figure 4.3. Sur le graphique 4.3(a) on peut constater que le modèle décrit bien les variations du logarithme de δ en fonction de l'a_W, en témoigne le bon coefficient de détermination ajusté de 0,977. Il en va de même pour l'ensemble des plans dont les résultats sont résumés dans le tableau 4.1.

L'analyse des résidus (figure 4.3(b)) laisse penser à une répartition aléatoire et ne fait apparaître aucune autocorrélation. Le test de Shapiro-Wilk dénote une répartition normale hormis pour le plan utilisant le NaCl comme dépresseur de l'activité de l'eau. En ce qui concerne les projections des régions confiance des paramètres (figure 4.3(c)), ces dernières sont de forme allongée et inclinée pour l'ensemble des



Figure 4.2 – Graphiques représentant l'influence de l'activité de l'eau sur la valeur de $log(\delta)$ pour les plans : (a) NaCl - acide Citrique ; (b) Saccharose - acide Acétique ; (c) Saccharose - acide Citrique ; (d) Saccharose - acide Lactique.

Tableau 4.1 – Valeurs des paramètres du modèle de Gaillard *et al.* (1998a) pour l'ensemble des plans d'étude du traitement thermique. Les intervalles de confiance à 95% ont été estimés par projection des régions de confiance.

Plan	$\delta_{90;5,5;1}$ (min.)	z_{a_W}	pK_{a}	R^2_{aj}
NaCl - Citrique	9,65 (6,94 - 13,41)	0,159 (0,116 - 0,257)	3,13	0,837
Saccharose - Citrique	8,38 (7,29 - 9,63)	0,129 (0,115 - 0,148)	3,13	0,977
Saccharose - Lactique	7,84 (5,99 - 10,25)	0,143 (0,114 - 0,192)	3,86	0,947
Saccharose - Acétique	8,21 (6,58 - 10,26)	0,131 (0,109 - 0,166)	4,75	0,944



Figure 4.3 – Représentation des résultats obtenus pour le plan de traitement Saccharose - Citrique : (a) valeurs de $log(\delta)$ en fonction de l'a_W; (b) graphique des résidus; (c) projection de la région de confiance à 95% des paramètres. Les paramètres et leurs intervalles de confiance sont présentés dans le tableau ci-dessus.

jeux de données. Ceci met en avant une corrélation entre les paramètres δ^* et z_{a_W} .

Comme pour le modèle de Bigelow (1921), le modèle de Gaillard *et al.* (1998a) semble donc à même de décrire les variations de δ en fonction de l'a_W du milieu de traitement.

4.1.2.3 Bilan et interprétations

A partir du tableau 4.1, nous pouvons déduire que la nature du dépresseur de l'activité de l'eau utilisé semble avoir une incidence sur la valeur des paramètres du modèle. Ainsi, le δ^* obtenu avec le NaCl est légèrement plus important que celui obtenu avec le saccharose. Il en va de même pour la valeur du z_{aw} , ce qui permet de conclure à un effet protecteur plus important du saccharose vis-à-vis du traitement thermique.

Le type d'acide employé en parallèle du dépresseur ne semble pas avoir quant à lui d'influence sur la thermorésistance. En effet, les valeurs de δ^* et z_{a_W} issues des plans combinant saccharose et acide sont à peu près constantes, avec $\delta^* \simeq 8, 2 \min$. et $z_{a_W} \simeq 0, 130$. La valeur de z_{a_W} pour le saccharose confirme celle de 0, 129 qui avait été calculée pour la souche de *Bacillus cereus* CNRZ110 dans les travaux de Coroller *et al.* (2001).

4.1.3 Influence du pH

4.1.3.1 Choix du modèle à utiliser

L'influence du pH de traitement est retranscrite au travers de la figure 4.4. On y découvre un comportement qui se rapproche d'une droite, mais il semble tout de même y avoir une légère courbure, courbure variable suivant les plans d'étude. En 2001, Mafart *et al.* proposent dans un premier temps le modèle suivant :

$$log D = log D^{\star} - \left| \frac{pH - pH^{\star}}{z_{pH}} \right|^n$$
(4.3)

pour décrire l'influence du pH de traitement sur la thermorésistance des spores. Dans cette publication, les auteurs en arrivent à la conclusion que ce modèle est surparamétré. En effet, d'après leurs résultats, le pH^* pourrait être fixé à 7 et n pourrait quant à lui ne prendre que deux valeurs suivant la souche étudiée : 1 ou 2. Il existe au final deux versions du modèle permettant de décrire l'influence du pH de traitement, une version au premier degré :

$$log D = log D^* - \left(\frac{7 - pH}{z_{pH}}\right) \tag{4.4}$$

ou une version au second degré :

$$log D = log D^{\star} - \left(\frac{7 - pH}{z_{pH}}\right)^2 \tag{4.5}$$



Figure 4.4 – Graphiques figurant l'influence du pH de traitement sur la valeur de $log(\delta)$ pour les plans : (a) NaCl - acide Citrique ; (b) Saccharose - acide Acétique ; (c) Saccharose - acide Citrique ; (d) Saccharose - acide Lactique.

Tableau 4.2 – Valeurs du R_{aj}^2 obtenues lors de l'ajustement des deux versions du modèle Mafart *et al.* (2001) pour les différents plans d'étude.

Plan	Premier degré	Second degré
NaCl - Citrique	0,847	0,795
Saccharose - Citrique	0,747	$0,\!582$
Saccharose - Lactique	0,796	0,739
Saccharose - Acétique	0,913	0,926

Afin de faire notre choix, les deux versions du modèle appliquées à δ sont ajustées aux différents plans d'étude et leurs qualités d'ajustement respectives sont comparées *via* la valeur du R_{aj}^2 (tableau 4.2). Dans ce tableau nous observons un meilleur ajustement du modèle au premier degré dans trois quarts des cas. Le modèle du second degré n'obtient un meilleur ajustement que pour un plan et dans ce cas précis, la qualité d'ajustement de la version du premier degré n'est qu'en très léger retrait. Signalons également que le modèle au second degré présente dans la majorité des plans une répartition des résidus qui n'est pas aléatoire, ces derniers sont en effet autocorrélés

A partir de ces résultats préliminaires, il est donc décidé de fixer n à 1 et le pH^* à 7 ce qui donne le modèle suivant pour des pH inférieurs ou égaux à 7 :

$$\log\delta = \log\delta^{\star} - \left(\frac{7 - pH}{z_{pH}}\right) \tag{4.6}$$

4.1.3.2 Estimation des paramètres et qualité du modèle

Les résultats concernant le plan Saccharose - acide Citrique sont présentés figure 4.5. On y découvre un ajustement correct du modèle (figure 4.5(a)) avec un R_{aj}^2 de 0,747. Cette valeur est la plus faible obtenue, toutes les valeurs étant regroupées dans le tableau 4.3.

L'analyse des résidus ne montre pas d'hétéroscédasticité évidente ni d'autocorrélation (figure 4.5(b)). Néanmoins, le test de Shapiro-Wilk pour les plans relatifs au NaCl et à l'acide acétique conduit au rejet de l'hypothèse de normalité des résidus au risque 5%. La projection des régions de confiance, pour l'ensemble des plans, présentent de plus une allure allongée et inclinée comme celle de la figure 4.5(c), traduisant une corrélation entre les paramètres. Ceci est classique pour ce modèle, pour lequel il faut faire un choix de la valeur de n (1 ou 2), c'est donc un compromis entre qualité, robustesse et interprétabilité des paramètres. Malgré cela, nous pouvons conclure que le modèle est tout de même de qualité satisfaisante compte tenu des valeurs expérimentales.

Plan	$\delta_{90;7;0,96}$ (min.)	z_{pH}	pK_{a}	R^2_{aj}
NaCl - Citrique	35,42 (26,72 - 46,96)	4,80 (3,62 - 7,13)	3,13	0,847
Saccharose - Citrique	25,04 (18,95 - 33,09)	8,63 (5,50 - 19,96)	3,13	0,747
Saccharose - Lactique	28,52 (20,57 - 39,56)	6,43 (4,29 - 12,78)	3,86	0,796
Saccharose - Acétique	28,15 (22,68 - 34,94)	5,98 (4,58 - 8,61)	4,75	0,913

Tableau 4.3 – Valeurs des paramètres du modèle adopté pour le pH, pour l'ensemble des plans d'étude du traitement thermique. Les intervalles de confiance à 95% ont été estimés par projection des régions de confiance.



Figure 4.5 – Représentation des résultats obtenus pour le plan de traitement Saccharose - Citrique : (a) valeurs de $log(\delta)$ en fonction du pH; (b) graphique des résidus; (c) projection de la région de confiance à 95% des paramètres. Les paramètres et leurs intervalles de confiance sont présentés dans le tableau ci-dessus.

4.1.3.3 Bilan et interprétations

Les valeurs du tableau 4.3 font apparaître un effet du dépresseur de l'activité de l'eau sur l'efficacité de l'acide en terme de diminution de la thermorésistance. En effet, pour l'acide citrique, le z_{pH} avec NaCl est presque deux fois plus faible que celui obtenu avec le saccharose. Ce dernier aurait donc un effet protecteur plus important au niveau du traitement thermique, ce qui était déjà apparent avec le modèle relatif à l'a_W. Il existerait donc une interaction entre la nature du dépresseur et le pH de traitement.

La nature de l'acide employé, quant à elle, possède un effet sur la valeur du z_{pH} alors que le δ^* reste constant. Ainsi, la valeur de z_{pH} diminue lorsque le pK_a de l'acide augmente. Ceci est tout à fait en accord avec les observations qui avaient été faites par Leguérinel et Mafart (2001) travaillant avec neuf acides différents sur une autre souche de *Bacillus cereus* (CNRZ110).

4.1.4 La modélisation multifactorielle

4.1.4.1 Le modèle global : ajustement et qualité

Les résultats précédents, obtenus à partir des plans monofactoriels, sont encourageants puisque l'ensemble des modèles utilisés pour décrire les variations du temps de réduction décimale D ont été appliqués avec succès à δ . Le principe des modèles modulaires nous dicte alors le modèle global à utiliser, il s'écrit :

$$log\delta = log\delta^{\star} - \left(\frac{a_W - 1}{z_{a_W}}\right) - \left(\frac{7 - pH}{z_{pH}}\right) - \left(\frac{T - 90}{z_T}\right)$$
(4.7)

et sous cette forme, il néglige les interactions qu'il pourrait y avoir entre les facteurs.

L'ajustement aux différents jeux de données est excellent, avec des valeurs de R_{aj}^2 pour la plupart proches de 0,94 (tableau 4.4). Cette bonne qualité se remarque également en observant les graphiques des valeurs estimées en fonction des valeurs observées (figures 4.6(a) et 4.7(a)).

L'analyse de la répartition des résidus (figures 4.6(b) et 4.7(b)) ne montre pas d'hétéroscédasticité ni d'autocorrélation. Le test de Shapiro-Wilk nous permet également de conclure, au risque 5%, à leur normalité. Enfin, la projection des régions de confiance laisse entrevoir une très légère corrélation entre le paramètre δ et les z_{a_W} et z_{pH} (figures 4.6(c) et 4.7(c)).

4.1.4.2 Bilan et interprétations

En parcourant le tableau 4.4, on se rend compte que les valeurs des paramètres n'ont presque pas varié par rapport à leurs estimations précédentes. Toutes les remarques sur les effets des dépresseurs et des acides restent par conséquent valides.

L'analyse de variance, dont les résultats sont résumés tableau 4.5, permet de se faire une idée de la proportion maximale qui pourrait être attribuée aux éventuelles

Tableau 4.4 –	Valeurs des paramètres du modèle global, pour l'ensemble des plans d'étude
	du traitement thermique. Les intervalles de confiance à 95% ont été estimés
	par projection des régions de confiance.

Plan	$\delta^{\star}_{90;7;1}$ (min.)	z_{a_W}	z_{pH}	z_T (°C)	R^2_{aj}
NaCl - Citrique	20,84 (13,83 - 31,41)	0,163 (0,115 - 0,281)	4,80 (3,42 - 8,04)	8,55 (7,31 - 10,29)	0,942
Saccharose - Citrique	12,37 (9,69 - 15,81)	0,129 (0,109 - 0,157)	8,63 (5,99 - 15,45)		0,940
Saccharose - Lactique	15,04 (10,36 - 21,75)	0,154 (0,114 - 0,238)	6,43 (4,48 - 11,40)		0,869
Saccharose - Acétique	14,22 (10,86 - 18,62)	0,130 (0,108 - 0,163)	5,98 (4,48 - 9,01)		0,936

Tableau 4.5 – Résultats des analyses de variances réalisées sur les différents plans pour le modèle global.

Plan	Facteur	SCE	% d'explication
	a_{W}	$0,\!553$	$11,\!43$
	$_{\rm pH}$	$0,\!606$	12,53
NaCl - Citrique	Т	$3,\!422$	70,75
	Résiduelle	0,256	$5,\!30$
	Totale	$4,\!837$	100,00
	a_{W}	0,941	$81,\!46$
Saccharosa Citriqua	$_{\rm pH}$	$0,\!151$	$13,\!07$
Saccharose - Onlique	Résiduelle	0,063	$5,\!47$
	Totale	$1,\!155$	100,00
	a_{W}	0,419	$53,\!56$
Saccharose - Lactique	pH	0,272	34,72
Daetharose - Daethque	Résiduelle	0,092	11,72
	Totale	0,784	100,00
	a_{W}	0,858	$68,\!94$
Saccharosa - Acátique	pH	0,314	$25,\!28$
Saccharose - Acetique	Résiduelle	0,072	$5,\!78$
	Totale	$1,\!244$	100,00



Figure 4.6 – Résultats obtenus avec le modèle global pour le plan de traitement NaCl – Citrique : (a) valeurs de $log(\delta)$ prédites en fonction des valeurs observées; (b) graphique des résidus; (c) projection des régions de confiance à 95% des paramètres. Les paramètres et leurs intervalles de confiance sont présentés dans le tableau ci-dessus.



Figure 4.7 – Résultats obtenus avec le modèle global pour le plan de traitement Saccharose - Citrique : (a) valeurs de $log(\delta)$ prédites en fonction des valeurs observées ; (b) graphique des résidus ; (c) projection des régions de confiance à 95% des paramètres. Les paramètres et leurs intervalles de confiance sont présentés dans le tableau ci-dessus.

interactions, la variance résiduelle est en effet d'environ 5% (11,7% avec l'acide lactique). Avec les erreurs expérimentales que l'on a pu constater jusqu'ici, au travers de la répétabilité des résultats pour des conditions identiques, ce n'est pas s'avancer que de dire que les interactions ont une part inférieure à 5%. Avec ce type de modèle, Gaillard *et al.* (1998a) les avaient mesurées à 2,4% à partir d'un plan factoriel complet. La projection des régions de confiance confirme ce résultat, puisqu'on ne voit pas de corrélation entre les différents z qui traduisent les effets des facteurs. L'analyse de variance indique un facteur Température prédominant, suivi de l'a_W puis du pH, en tenant compte des remarques concernant les effets des différents dépresseurs.

4.2 Résultats relatifs à la récupération

4.2.1 Influence de l'activité de l'eau

4.2.1.1 Choix du modèle

Les modèles utilisés pour la description de D fonctionnant bien avec δ , nous poursuivons notre démarche en appliquant les modèles relatifs à D' au δ' . Ainsi, pour décrire l'effet de l'activité de l'eau lors de la récupération (figure 4.8(a)), c'est au modèle de Coroller *et al.* (2001) que l'on fait appel :

$$\log\delta' = \log\delta'_{opt} - \left(\frac{a'_{W} - a'_{W_{opt}}}{z'_{a_{W}}}\right)^{2}$$
(4.8)

4.2.1.2 Ajustement et qualité du modèle

Le modèle est ajusté aux points expérimentaux et les paramètres sont regroupés dans le tableau 4.6. Les intervalles de confiance n'ayant pas pu être déterminés par projection des régions de confiance, ils ont été estimés à l'aide de la fonction « nlparci » de Matlab 6.1 ©. La qualité de l'ajustement est relativement modeste avec un R_{aj}^2 de 0,668. Nous remarquons également que la valeur de l' $a_{W_{opt}}^2$ est très proche de 1 avec 0,999. Ceci justifie notre choix de fixer sa valeur à 1 dans le modèle qui devient :

$$\log\delta' = \log\delta'_{opt} - \left(\frac{a_W' - 1}{z_{a_W}'}\right)^2 \tag{4.9}$$

La figure 4.8(a) traduit un ajustement correct aux valeurs expérimentales avec un R_{aj}^2 de 0,751. Les différentes représentations des résidus, dont la figure 4.8(b), ne

Tableau 4.6 – Valeurs des paramètres du modèle de Coroller *et al.* (2001). Les intervalles de confiance présentés ont été estimés par la fonction « nlparci » de Matlab 6.1 ©.

$a_{W_{opt}}$	$\delta_{opt}^{'}$ (min.)	$z^{,}_{a_W}$	${\rm R}^2_{\rm aj}$
0,999	11,799	0,092	$0,\!668$
(0,921 - 1,077)	(6,726 - 16,872)	((-)0,052 - 0,236)	



Figure 4.8 – Représentation des résultats obtenus pour la récupération avec du Saccharose par le modèle de Coroller *et al.* (2001) en prenant $a_{W_{opt}}^{i} = 1$: (a) valeurs de $log(\delta')$ en fonction de l'a_W; (b) graphique des résidus; (c) projection de la région de confiance à 95% des paramètres. Les paramètres et leurs intervalles de confiance sont présentés dans le tableau ci-dessus.

mettent pas en évidence d'hétéroscédasticité ni d'autocorrélation de ces derniers. Le test de Shapiro-Wilk permet de conclure à leur normalité.

4.2.1.3 Bilan et interprétations

L'augmentation de la valeur du coefficient de détermination ajusté de 0,668 à 0,751 est sans nul doute à imputer à la réduction du nombre de paramètres du modèle. En effet, lorsque l'on observe la valeur des deux autres paramètres après fixation de l' $a_{W_{out}}^{,}$, le constat est qu'ils n'ont que très peu varié. Notons au passage, qu'avec une valeur de 0,094, le $z_{a_W}^i$ lié au saccharose est comparable à celui obtenu par Coroller et al. (2001) sur Bacillus cereus CNRZ110 qui était de 0,068. Enfin, la projection de la région de confiance (figure 4.8(c)) dévoile une forme en « boomrang » avec des bras étirés longeant les axes. Cette forme caractéristique traduit la modeste qualité de la détermination des paramètres avec des intervalles de confiance importants. Cette remarque est à mettre en relation avec le faible nombre de points expérimentaux, à savoir 6. Dans la pratique, Bacillus cereus ayant une a_W minimale de croissance située aux environs de 0,912 (Kramer et Gilbert, 1989), nous avons effectué des cinétiques aux a_W comprises entre 0,91 et 0,94. Pour 0,91 et 0,92, il n'y a pas eu de croissance. En revanche, pour 0,93 et 0,94, il y a bien eu développement mais les résultats étaient inexploitables en terme de modèle, en effet, les valeurs pour différentes dilutions n'étaient pas cohérentes ni reproductibles. Ce résultat peut avoir plusieurs origines comme une a_W minimale de croissance supérieure à 0,912 et plus proche de 0,93 pour notre souche. Une mauvaise dispersion des survivants dans le milieu gélosé très visqueux pourrait expliquer la mauvaise cohérence des comptages. Ces dernières remarques nous ont conduits à privilégier l'étude du facteur pH dans la suite de nos travaux.

4.2.2 Influence du pH

4.2.2.1 Choix du modèle

L'influence du pH de récupération et du type d'acide est représentée figure 4.9. L'effet du pH sur la thermorésistance apparente se traduit par une courbe biphasée du logarithme de δ' tracé en fonction du pH'. Cette résistance est maximale aux abords de la neutralité et décroît de part et d'autre de ce maximum. Ceci a déjà été observé à maintes reprises et traduit en équation par des modèles quadratiques comme celui de Couvert *et al.* (1999). Dans notre cas, on est amené, tout comme pour le pH de traitement, à se poser la question de l'ordre du modèle. En effet, la courbe semble pouvoir être décomposée en deux droites ce qui nous amène à proposer le modèle suivant :

$$\log\delta' = \log\delta'_{opt} - \left| \frac{pH'_{opt} - pH'}{z'_{pH}} \right|^n$$
(4.10)

avec n égal à 1 ou 2 comme précédemment. Dans la même démarche les deux versions du modèle ont été testées et les résultats des ajustements regroupés dans le tableau 4.7. Les valeurs de R_{aj}^2 avec n = 1 sont supérieures dans deux des trois cas. De plus la répartition des résidus joue également en faveur d'une valeur de n égale à 1


Figure 4.9 – Graphiques figurant l'influence du pH de récupération sur la valeur de $log(\delta')$ pour les acides : (a) Acétique ; (b) Citrique ; (c) Lactique. Les pH supérieurs à 7 ont été obtenus par addition de NaOH 5 M. et sont communs à l'ensemble des plans.

Tableau 4.7 – Valeurs du R_{aj}^2 obtenues lors de l'ajustement des deux versions du modèle proposé pour les différents acides étudiés.

Plan	n = 1	n=2
Acide Citrique	0,891	0,824
Acide Lactique	0,918	0,805
Acide Acétique	0,859	0,901

puisque ces derniers semblent être autocorrélés dans l'autre cas de figure. Le modèle adopté après cette première étape est donc le suivant :

$$\log\delta' = \log\delta'_{opt} - \left|\frac{pH'_{opt} - pH'}{z'_{pH}}\right|$$

$$(4.11)$$

4.2.2.2 Ajustement et qualité du modèle

L'ajustement de l'équation 4.11 au plan d'étude de l'acide Citrique est présenté figure 4.10(a). L'ajustement est bon avec une valeur de R_{aj}^2 égale à 0,891. Les différentes valeurs issues des autres plans sont résumées dans le tableau 4.8.

Les diverses représentations des résidus permettent de conclure à l'absence d'hétéroscédasticité ainsi qu'à l'absence d'autocorrélations (figure 4.10(b)). Le test de Shapiro-Wilk permet dans tous les cas d'accepter au risque 5% l'hypothèse de normalité des résidus. Enfin, la projection des régions de confiance, tout comme lors de l'étude du pH de traitement, met en évidence une corrélation entre les paramètres δ'_{opt} et z'_{pH} . Une nouvelle fois, celle-ci traduit le compromis qui est fait au nom de la parcimonie et de la robustesse en fixant n à 1.

4.2.2.3 Bilan et interprétations

L'observation du tableau 4.8 révèle un comportement très proche quel que soit l'acide utilisé. Ainsi, les valeurs de pH'_{opt} et δ'_{opt} sont à peu près constantes dans les trois cas. Bien que les valeurs de z'_{pH} diffèrent légèrement, il ne semble pas y avoir de relation entre ces dernières et le pK_a de l'acide comme cela avait été le cas lors de l'étude du traitement.

Ici, la nature de l'acide et son action sur la thermorésistance apparente se traduit par une influence sur la valeur de pH minimale permettant la croissance, le pH_{min}. Reed (1994), dans ses travaux, estimait ce pH minimal à 4,3 pour *Bacillus cereus*. Au cours de notre étude, nous avons observé un lien entre le pK_a et le pH_{min} avec une valeur de pH_{min} qui augmente lorsque le pK_a augmente. Levine et Fellers (1940) relèvent un pH_{min} de 4,9 pour *Bacillus cereus* exposé à de l'acide acétique. Dans notre cas, nous avons obtenu avec ce même acide un développement jusqu'à pH' = 5. L'acide lactique permettait la croissance pour des pH' légèrement inférieurs à 5 alors que l'acide citrique l'autorisait jusqu'à des valeurs voisines de 4,5. Pourtant, si l'on observe la figure 4.9, on constate que seules les valeurs de δ'

Tableau 4.8 – Valeurs des paramètres du modèle adopté pour le pH de récupération, pour les trois acides étudiés. Les intervalles de confiance à 95% ont été estimés par projection des régions de confiance.

Plan	$pH_{opt}^{'}$	$\delta_{opt}^{'}$ (min.)	$z^{,}_{pH}$	pK_a	R^2_{aj}
Acide Citrique	7,77 $(7,59 - 7,98)$	21,75 (18,81 - 25,15)	4,13 (3,27 - 5,58)	3,13	0,891
Acide Lactique	7,81 (7,63 - 8,03)	20,52 (18,06 - 23,35)	4,78 (3,83 - 6,27)	3,86	0,918
Acide Acétique	7,73 (7,49 - 8,03)	22,45 (18,31 - 27,52)	3,94 (2,85 - 6,34)	4,75	0,859



Figure 4.10 – Représentation des résultats obtenus avec l'acide Citrique lors de la récupération : (a) valeurs de $log(\delta')$ en fonction de pH'; (b) graphique des résidus; (c) projection de la région de confiance à 95% des paramètres. Les paramètres et leurs intervalles de confiance sont présentés dans le tableau ci-dessus.

correspondant à des pH' supérieurs ou égaux à 5,5 sont représentées. En effet, dans la pratique, les comptages pour les pH' inférieurs à 5,5 étaient inexploitables en terme de modélisation, avec des valeurs totalement incohérentes d'une dilution à l'autre. Ces données n'ont par conséquent pas été prises en compte.

Enfin, le modèle proposé (4.11), bien qu'ayant une bonne qualité d'ajustement, est un modèle discontinu. Comme nous le montre le tableau 4.8, le pH'_{opt} se situe à 7,7-7,8, or les industriels fournissent généralement des produits neutres ou acides. Ce modèle pourrait donc s'écrire :

$$\log\delta' = \log\delta'_{opt} - \left(\frac{7 - pH'}{z'_{pH}}\right) \tag{4.12}$$

avec δ'_{opt} , la valeur du temps de première réduction décimale à pH' = 7. La zone de validité de ce modèle est alors limitée aux pH' inférieurs ou égaux à 7.

4.2.3 Effet global du pH

L'influence du pH a été jusqu'à présent étudiée pour le traitement et la récupération. Les manipulations associant à la fois le traitement et la récupération, que l'on nommera « diagonales », nous permettent de mimer ce qu'il advient des spores dans un aliment. En effet, dans les produits alimentaires les spores subissent le traitement au sein du produit puis les survivantes récupèrent dans ce même environnement. Les données utilisées ici proviennent des manipulations réalisées afin d'étudier l'évolution du temps de latence en fonction des conditions environnementales.

4.2.3.1 Influence du type de milieu de récupération

Lors de l'étude du temps de latence, nous avons été confronté à l'obtention de λ négatifs, ce qui, pour des spores, devrait être impossible. Au cours de ces travaux, nous en sommes arrivés à privilégier le dénombrement par la méthode du nombre le plus probable (NPP). Nos démarches sont développées dans le chapitre suivant consacré à la recroissance. En comparant le dénombrement en milieu solide (gélose) et celui en milieu liquide (NPP), nous avons obtenu des résultats fort différents. Ainsi, alors que les valeurs de pH'_{opt} sont relativement proches, 7,85 avec la gélose et 7,27 avec le NPP, celles de z'_{pH} sont très différentes. Le z'_{pH} est de 3,8 en milieu solide et de 9,7 en milieu liquide. Cet écart important traduit une bien meilleure capacité des spores à récupérer en milieu liquide. Cette différence de z'_{pH} est telle qu'à pH' = 5,5 en milieu liquide, les spores récupèrent aussi bien qu'à pH' = 7 en milieu solide.

4.2.3.2 Choix d'un modèle global

Dans un premier temps, nous avons essayé la combinaison des modèles de traitement et de récupération pour décrire les données des manipulations « diagonales ». Pour ce faire, aucun ajustement n'est effectué, nous utilisons les valeurs des paramètres estimés au cours des points précédents. Les manipulations utilisant toutes



Figure 4.11 – Graphique figurant l'influence global du pH sur la survie des spores de Bacillus cereus. Les spores sont traitées à 90°C et l'acide utilisé dans les milieux de traitement et de récupération est l'acide citrique. (•) points expérimentaux;
(—) combinaison des modèles de traitement et de récupération précédemment ajustés.

la technique NPP, le $z_{pH}^{,}$ utilisé est celui déterminé par cette même voie, à savoir 9,7. Le résultat est présenté figure 4.11.

La conclusion est sans appel, le modèle ne permet pas de décrire l'effet global du pH. Sur cette figure, on remarque qu'il y a une courbure dans l'évolution de δ' avec le pH'. Or ceci ne peut pas être retranscrit par la combinaison de deux modèles linéaires. D'un point de vue qualitatif, on enregistre un effet plus marqué du pH à mesure que celui-ci décroît, avec des valeurs qui s'écartent de plus en plus de la prédiction. Il existerait donc un effet synergique entre pH de traitement et pH de récupération.

Au niveau de la modélisation, la figure 4.11 nous laisse penser qu'un modèle du second degré serait plus adapté pour décrire l'effet global du pH sur δ' . On peut par exemple proposer :

$$\log\delta' = \log\delta_{max} - \left(\frac{pH - pH_{opt}}{Z}\right)^2 \tag{4.13}$$

où δ_{max} est la valeur maximale du temps de première réduction décimale aux

conditions optimales et Z représente l'écart de pH par rapport au pH_{opt} induisant une division de δ d'un facteur 10.

Les expériences sont réalisées en majeure partie en traitant les spores à 90°C mais également à 85 et 95°C. Ce modèle est donc complété pour prendre en compte la température de traitement et devient :

$$\log\delta' = \log\delta_{max} - \left(\frac{T - 90}{z_T}\right) - \left(\frac{pH - pH_{opt}}{Z}\right)^2 \tag{4.14}$$

4.2.3.3 Ajustement et qualité du modèle

La figure 4.12a témoigne d'une bonne qualité de l'ajustement de l'équation 4.14 aux données expérimentales avec une valeur de R_{aj}^2 de 0,978.

L'examen des différentes représentations des résidus telle que la figure 4.12b ne révèle pas d'hétéroscédasticité ou d'autocorrélation des ces derniers. La normalité de ces résidus est confirmée par le test de Shapiro-Wilk au risque d'erreur de 5%. Enfin, la projection des régions de confiance (figure 4.12c) met en évidence une forte corrélation entre les paramètres Z et pH_{opt} et, dans une moindre mesure, entre δ_{max} et les paramètres Z et pH_{opt} . Ceci pourrait s'expliquer par un modèle 4.14 surparamètré.

4.2.3.4 Bilan et interprétations

L'observation de la figure 4.11 nous montre que le pH_{opt} est relativement proche de 7 ce qui est confirmé par la valeur estimée par le modèle qui est de 6,85 (figure 4.12). Cette remarque nous conduit, comme pour les précédents modèles, à proposer un modèle réduit en fixant la valeur de pH_{opt} à 7. Le modèle :

$$\log\delta' = \log\delta^{\star} - \left(\frac{T - 90}{z_T}\right) - \left(\frac{pH - 7}{Z}\right)^2 \tag{4.15}$$

est alors testé et les résultats présentés figure 4.13. La qualité d'ajustement de cette dernière équation s'avère excellente avec un R_{aj}^2 de 0,985 (figure 4.13a). Les mêmes remarques concernant les résidus peuvent être appliquées à la figure 4.13b. En revanche, du fait de la réduction du nombre dce paramètres, les résultats obtenus par projection des régions de confiances s'améliorent fortement (figure 4.13c). Ainsi, ne subsiste qu'une très légère corrélation entre les paramètres Z et δ_{max} . Pour ce qui est des paramètres Z et z_T , aucune corrélation ne semble exister. L'analyse de variance présentée tableau 4.9, quand à elle, révèle un facteur température dont l'effet est prépondérant avec plus de 79% d'explication des variations observées suivi du facteur pH avec 18%. Pour finir, l'analyse de variance ne laisse place qu'à 1,35% aux éventuelles interactions entre la température et le pH, facteurs que l'on peut donc considérer comme indépendants.

Ainsi, nous constatons que la valeur de z_T de 8,03°C obtenue avec l'équation 4.15, est tout à fait comparable à ce que nous avions mesuré lors de l'étude du traitement (page 80) qui était de 8,55°C. Pour le pH il en est autrement. En effet, les valeurs de z_{pH} et z'_{pH} , respectivement de 8,63 (86) et 9,7 (NPP), sont bien éloignées du Z



Figure 4.12 – Résultats obtenus pour le plan diagonal. (a) graphique des valeurs prédites en fonctions des valeurs observées; (b) étude des résidus; (c) projections des régions de confiance à 95 %.



Figure 4.13 – Résultats obtenus pour le plan diagonal en fixant le pH_{opt} à 7. (a) graphique des valeurs prédites en fonctions des valeurs observées; (b) étude des résidus; (c) projections des régions de confiance à 95 %.

Facteur	SCE	% d'explication
Т	2,385	79,92
$_{\rm pH}$	$0,\!559$	18,73
Résiduelle	0,040	$1,\!35$
Totale	2,984	

Tableau 4.9 – Résultats de l'analyse de variance pour le modèle global avec pH_{opt} fixé à 7.

qui est obtenu avec le modèle 4.15. Le modèle confirme donc bien un effet beaucoup plus important du pH global qu'il n'était prévisible par l'association des modèles de traitement et de récupération. C'est cette synergie qui est d'ailleurs au coeur des technologies barrières, avec un effet global plus important que la somme de petits effets cumulés.

4.3 Discussion

4.3.1 Méthodes de dénombrement

Comme nous l'avons signalé, nous avons rencontré certaines difficultés pour obtenir des cinétiques exploitables pour des pH et a_W de récupération faibles. Ainsi, alors que la limite de croissance de *Bacillus cereus* se situe à pH=4,3 (Reed, 1994) ou à $a_W=0.912$ (Kramer et Gilbert, 1989), nous n'avons obtenu des résultats utilisables que pour des pH supérieurs ou égaux à 5,5 et des a_W supérieures ou égales à 0.95.

Une partie de l'explication se trouve sans nul doute dans le type de milieu de dénombrement utilisé. Ainsi Robinson et al. (1991), décrivant le comportement de Bacillus cereus, relatent la formation de gradients de pH autour des colonies. Ce microorganisme possède la capacité de créer un environnement local favorable pour son développement grâce aux voies métaboliques classiques. Le pH peut se voir diminuer lors du catabolisme du glucose produisant et libérant des acides organiques. A l'inverse, le pH peut également augmenter avec la désamination oxydative des acides aminés libérant de l'ammoniac. Robinson et al. (1991) signalent que les microorganismes capables d'adapter leur environnement immédiat ont un très fort intérêt aux yeux des industriels car ils peuvent, sous certaines conditions, contaminer et altérer les produits utilisant l'acidification comme moyen préventif. Dans notre cas, les comptages sur boîte de Pétri aux pH de récupération faibles n'ont pas été utilisables du fait de dilutions successives totalement incohérentes. La neutralisation du pH autour des colonies pourrait expliquer ce phénomène. En effet, nous avons observé des boîtes de Pétri sur plusieurs jours et le nombre de colonies ne cessait d'augmenter. Ceci pourrait s'expliquer par une neutralisation progressive du milieu autorisant les spores survivantes les plus endomagées à germer puis se développer à leur tour.

La seconde remarque, concernant le milieu de dénombrement, est liée à sa nature liquide ou solide, avec les différences que cela implique sur la valeur de z'_{pH} par exemple. Stecchini *et al.* (2001) remarquent que la teneur en agar du milieu peut avoir une forte influence sur les colonies de *Bacillus cereus*. Cet effet est tel qu'il peut favoriser la voie de la sporulation en limitant la mobilité des cellules végétatives qui se trouvent alors en compétition dans un milieu défavorable. Cette dernière remarque pourrait expliquer le comportement que nous avons observé à a_W réduite, car en plus de l'agar du milieu, le saccharose augmente encore la viscosité. La seconde et dernière différence entre les deux techniques, réside dans le fait que le milieu gélosé soit coulé à une température comprise entre 50 et 55 °C ce qui pourrait être à l'origine d'un stress thermique supplémentaire. Ainsi en milieu solide, les spores les plus endommagées pourraient être définitivement inactivées par cette seconde exposition à des températures élevées.

Pour toutes ces raisons, dans la dernière partie de notre étude, c'est le dénombrement en milieu liquide qui a été utilisé. Nous voyons donc que ce choix du milieu de dénombrement n'est pas à prendre à la légère puisqu'il peut conduire à une estimation totalement erronée des paramètres des modèles avec une forte sous-estimation du nombre de survivants au traitement thermique.

4.3.2 Calcul des barèmes

L'association du nouveau modèle primaire et des modèles secondaires nous conduit à revoir la notion de valeur stérilisatrice ainsi que la méthode pour l'estimer. Dorénavant, pour deux traitements thermiques successifs, on n'a plus :

$$F = F_1 + F_2 \tag{4.16}$$

car les valeurs stérilisatrices ne sont plus additives, mais l'on a :

$$F^p = F_1^p + F_2^p \tag{4.17}$$

Le concept même de valeur stérilisatrice perd donc de son intérêt et c'est plutôt vers n, le nombre de réductions décimales, qu'il faut se tourner (Mafart *et al.*, 2002). Ainsi, à température constante nous pouvons écrire :

$$n = \left[\frac{L(T).t}{\delta^{\star}}\right]^p \tag{4.18}$$

alors qu'en conditions variables on a :

$$n = p \int_0^t \left[\frac{L(T)}{\delta^\star}\right]^p .t^{p-1}.dt$$
(4.19)

qui peut être estimé par intégration numérique avec :

$$n = p \sum_{1}^{m} \left[\frac{L(T_i)}{\delta^{\star}} \right]^p .t_i^{p-1}.\Delta t_i$$
(4.20)

4.3.3 Conclusion

A l'issue de ce chapitre consacré aux modèles secondaires, nous pouvons conclure que les modèles classiques applicables à D le sont également à δ . La somme de ces modèles primaires et secondaires forme donc un ensemble cohérent et homogène. Notons au passage qu'il sera indispensable d'étudier ces modèles secondaires sur différentes souches afin de comparer les pH_{opt} et le degré des modèles relatifs au pH par exemple. Maintenant que l'on a la capacité d'estimer le nombre de survivants à la suite d'un traitement thermique, nous allons pouvoir passer à l'étude de leur devenir. C'est l'objet du dernier chapitre, l'étude de la recroissance, qui met plus particulièrement l'accent sur le temps de latence.

Chapitre 5

Etude de la recroissance

Dans ce dernier chapitre, nous présentons les résultats concernant la recroissance des spores après un traitement thermique. Dans ce cadre, les effets de la température de traitement et du pH global sont explorés. Notre intérêt a surtout porté sur l'étude et la modélisation primaire et secondaire du temps de latence.

5.1 Manipulations préliminaires

5.1.1 La calibration

L'étude de la croissance se fait par suivi de la densité optique, nous avons donc recours à la calibration. La figure 5.1a nous montre le suivi du logarithme népérien de la densité optique en fonction du temps. Parallèlement, le dénombrement des cellules végétatives est représenté figure 5.1b sous la forme du logarithme népérien en fonction du temps. Enfin, la figure 5.1c nous montre la courbe de calibration obtenue. La qualité d'ajustement est bonne avec un \mathbb{R}^2 égal à 0.991. On peut remarquer que les premiers points ne se situent pas sur la courbe de calibration. En effet, ceux-ci n'ont pas été pris en compte puisqu'il s'agit de spores et non pas de cellules végétatives. Les spores possèdant des caractéristiques de réfringence particulières, il ne nous est pas possible de différencier les spores des cellules végétatives dans un mélange. Ainsi, avec cette méthode de suivi, nous ne pouvons pas estimer le nombre de spores germées au cours du temps. En effet, les spores qui germent perdent progressivement leur réfringence et se fondent dans la population de cellules végétatives déjà en cours de croissance. Avec cette courbe de calibration, nous pouvons extrapoler le temps de latence à partir de la phase exponentielle de croissance combinée à un dénombrement des cellules initiales, en l'occurence ici, le nombre de spores survivantes après traitement thermique.

5.1.2 Influence de la taille de l'inoculum

L'impact de la taille de l'inoculum sur l'estimation du temps de latence est mesuré en ensemençant des dilutions successives au dixième d'une suspension de spores traitée une minute à 90°C. Huit fioles de culture sont ensemencées, deux par dilution testée $(1, 1/10^{\text{eme}}, 1/100^{\text{eme}} \text{ et } 1/1000^{\text{eme}})$, et le suivi de croissance est réalisé. Les résultats sont présentés figure 5.2a.



Figure 5.1 – Courbe de calibration pour l'étude de la croissance. (a) graphique ln DO en fonction du temps; (b) graphique du ln N en fonction du temps; (c) courbe de calibration ln DO=0,793.ln N-15,583 ($\mathbb{R}^2 = 0,991$).



Figure 5.2 – Vérification de l'influence de la taille de l'inoculum de départ. (a) courbes de croissance : (◦, •) concentration du capillaire (∇, ▼) dilution au 1/10^{eme} (□, ■) dilution au 1/100^{eme} (◊, ♦) dilution au 1/1000^{eme}; (b) temps de latence λ estimé en fonction du taux de dilution.

Nous pouvons observer sur cette figure que les courbes de croissance correspondant aux différentes dilutions sont parallèles ce qui nous indique un taux de croissance identique. A partir de ces courbes et des dénombrements des survivants, nous calculons le temps de latence représenté figure 5.2b. Nous constatons ici, malgré une tendance apparente, qu'il n'y a pas de différence significative entre les temps de latence des différentes dilutions. Le taux d'ensemencement semble donc sans effet sur la détermination de ce temps de latence.



Figure 5.3 – Temps de latence obtenus pour un pH global de 6,5 en utilisant les différentes méthodes de dénombrement :. (•) dénombrement en milieu gélosé, (•) dénombrement en milieu liquide NPP.

5.1.3 Test du protocole complet

Les premières manipulations test furent réalisées à pH 7 et donnèrent de relativements bons résultats. Mais dès que nous sommes passé à des pH de test acides, pH=6,5 par exemple, nous avons obtenus des résultats aberrants. Ainsi, comme le montre la figure 5.3, le temps de latence estimé en utilisant le dénombrement en milieu gélosé devient négatif à partir de 21 minutes de traitement. Ce résultat est tout à fait incohérent pour des spores puisque ces dernières doivent germer avant de donner des cellules végétatives capables de croître. Le temps de latence ne peut donc pas être inférieur ou égal à zéro. Le protocole est donc entaché d'une source d'artéfact qu'il convient de lever.

Nous pouvons émettre l'hypothèse d'une variation de pH au cours des premières étapes de la croissance. En effet, le pH étant ajusté avec de l'acide citrique, on peut se poser la question de savoir si ce dernier ne serait pas utilisé comme source de carbone ou d'énergie au cours de la germination et des premières étapes de la croissance. Cette neutralisation, si elle s'avérait effective, introduirait donc un biais dans notre protocole d'estimation du temps de latence aux pH acides. Afin de vérifier cette hypothèse, nous réalisons quatre manipulations en erlens à pH=6 avec des spores issues de deux traitement thermiques, l'un d'une minute et le second de cinq minutes. Régulièrement on prélève 2 ml dans les erlens pour en mesurer le pH ainsi que la densité optique. Cette manipulation nous a permis de constater que le pH ne variait pas pendant la phase de germination ni au cours de la phase exponentielle de croissance. En effet, celui-ci reste constant et égal à 6 pendant ces deux phases et n'évolue qu'à partir du ralentissement de la croissance pour tendre vers 7.

L'obtention de temps de latence négatifs n'est donc pas liée à une éventuelle variation de pH. Dans notre protocole, λ est extrapolé à partir de l'intersection de la droite correspondant à la phase exponentielle de croissance et le logarithme du nombre de survivants issus du traitement thermique. Il semblerait donc qu'il n'y ai pas de biais pendant la phase de croissance, reste donc à savoir si la détermination du nombre de survivants reflète bien la réalité. En effet, bien que les milieux de traitement, de croissance et de dénombrement soient de composition strictement identique, le milieu de dénombrement est additionné d'agar afin de le faire gélifier. Nous pouvons donc nous interroger sur un éventuel « effet matrice » qui induirait une différence entre le nombre de survivants capables de se développer en milieu (traitement, croissance) et en milieu solide (dénombrement). Dans le protocole, si l'on sous-estime le nombre de survivants, on obtient alors des temps de latence négatifs.

Comme nous l'avons déjà dit au chapitre précédent, les résultats obtenus en milieu liquide et solide diffèrent fortement avec toutes les conséquences signalées sur les paramètres des modèles secondaires de récupération. Les spores récupèrent donc beaucoup mieux en milieu liquide ce qui nous amenait à sous-estimer le nombre de survivants en utilisant le dénombrement en mileu gélosé. Si l'on réalise l'étude de λ à pH=6,5 en utilisant la technique NPP pour le dénombrement des survivants, nous n'obtenons plus de λ négatifs comme le montre la figure 5.3. A partir de cette dernière observation, nous décidons d'utiliser la méthode NPP pour tous nos dénombrements jusqu'à la fin de cette étude.

5.2 Résultats

5.2.1 Modélisation du temps de latence en fonction du temps de traitement thermique

L'utilisation de la méthode de dénombrement nous permettant d'obtenir des résultats cohérents, nous réalisons donc un ensemble de cinétiques pour des températures de traitement de 85, 90 et 95°C et des pH variant de 7 à 5,5. Une manipulation complète effectuée à 90°C pH=7 est représentée figure 5.4. L'estimation des temps de latence (figure 5.4c) est extrapolée à partir de la cinétique de survie (figure 5.4a) et des cinétiques de croissance (figure 5.4b).

La figure 5.5 nous montre le bilan d'une série de manipulations réalisées à 90°C.



Figure 5.4 – Résultats obtenus pour un traitement à 90°C avec un pH global de 7. (a) cinétique de survie; (b) courbes de croisance; (c) temps de latence λ estimés.



Figure 5.5 – Valeurs de λ obtenues pour des traitements effectués à 90°C à différents pH : (•) pH=7; (•) pH=6,5; (**v**) pH=6; (∇) pH=5,78; (**E**) pH=5,75; (**D**) pH=5,5.



Figure 5.6 – Graphiques représentant les variations de λ en fonction du temps de traitement thermique pour : (a) pH=7; (b) pH=5,5.

En premier lieu, nous pouvons dire que nous enregistrons le même comportement de λ en fonction du temps de traitement thermique que ce qu'avait observé Laurent *et al.* (1999) avec la souche de *Bacillus cereus* Bce9. Tout comme ces auteurs, nous constatons que sur la figure 5.4c le temps de latence λ augmente avec le temps de traitement thermique jusqu'à un optimum puis diminue légèrement. En revanche Laurent *et al.* (1999) n'avait pas utilisé de traitements thermiques suffisamment longs pour voir ce qu'il advenait ensuite. Ce même comportement a été observé par Bréand *et al.* (1997) sur *Listeria monocytogenes* pour laquelle, λ se stabilisait au niveau d'un plateau. Pour *Bacillus cereus* Bce1 il en est autrement. En effet, nous observons qu'après cet optimum, voir plateau (nos résultats ne sont pas très nets de ce point de vue), λ augmente à nouveau (figure 5.4c, figure 5.5).

Signalons également que nous avons effectué des répétitions de ces manipulations avec pour résultats des valeurs reproductibles pour les temps de traitement courts (figure 5.6). Plus le temps de traitement est important et plus les variations le sont également. Enfin, tout comme Bréand *et al.* (1997) et Laurent *et al.* (1999), nous remarquons que pour les temps de traitement courts les valeurs de λ se répartissent approximativement le long d'une droite (figure 5.6).

La très forte dispersion des valeurs aux temps de traitement important rendant la modélisation globale peu crédible, nous décidons de nous limiter à la partie linéaire initiale. Ainsi, le modèle « primaire » proposé, limité dans sa zone d'application, est tout simplement le suivant :

$$\lambda = \lambda_0 + m.t \tag{5.1}$$

Pour estimer les paramètres λ_0 et m nous devons donc choisir la zone où l'on considère avoir une droite. Le choix des points doit se faire selon un critère objectif. En y regardant de plus près, nous remarquons alors que pour chaque manipulation, la fin de cette partie linéaire correspond à la perte de 2 unités log au niveau de la cinétique de survie. Ainsi, le modèle primaire limité sera ajusté pour les temps de traitement induisant un nombre de réductions décimales $n \leq 2$ à savoir $logN \geq 5$.

5.2.2 Modélisation « secondaire » de λ en fonction de la température de chauffage et du pH du milieu

5.2.2.1 Modélisation des variations du paramètre m

L'analyse de variance présentée tableau 5.1 nous indique que les deux facteurs que sont la température de traitement et le pH global sont significatifs pour expliquer les variations de m. 50,18% des variations sont attribuées à la température et 40,06% au pH. On note également que la variance résiduelle est de 9,76% ce qui pourrait traduire une légère interaction entre la température et le pH.

Suite aux résultats de l'analyse de variance, l'allure des variations est observée *via* la figure 5.7. On y découvre un log(m) qui varie de façon linéaire avec la température de traitement rappelant le modèle de Bigelow (1921) (figure 5.7a). Sur la figure 5.7b, le comportement du log(m) en fonction du pH rappelle ce qui avait été observé par Mafart et Leguérinel (1998). Ceci nous amène naturellement à proposer un modèle comme ceux étudiés précédemment avec :

$$log(m) = log(m^*) + \left(\frac{T - T^*}{\xi_T}\right) + \left(\frac{pH - pH_{opt}}{\xi_{pH}}\right)^2$$
(5.2)

Notons au passage le changement de notation effectué, ceci afin d'éviter la confusion entre les valeurs des paramètres liées au couple traitement / récupération et celles liées au temps de latence. ξ_T et ξ_{pH} sont, respectivement, les équivalents de z_T et Zdéjà rencontrés, ils possèdent les mêmes propriétés que ces derniers. ξ_T représente cette fois l'écart de température induisant une variation de m d'un facteur 10 alors que ξ_{pH} est l'écart de pH, par rapport au pH_{opt} , qui entraîne la multiplication de md'un facteur 10.

Tableau 5.1 – Résultats de l'analyse de variance pour le paramètre m.

Facteur	SCE	% d'explication
Т	$3,\!258$	$50,\!18$
$_{\rm pH}$	$2,\!601$	40,06
Résiduelle	$0,\!6335$	9,76
Totale	$6,\!492$	



Figure 5.7 – Graphiques représentant les variations de la pente m en fonction : (a) de la température de traitement avec un milieu à pH=7; (b) du pH global lorsque le traitement est réalisé à 90°C.

L'ajustement du modèle est bon comme on peut le constater en observant la figure 5.8a. Ceci est confirmé avec la valeur du R_{aj}^2 qui est de 0,889. L'analyse des résidus (figure 5.8b) ne montre pas d'hétéroscédasticité ni d'autocorrélation. Le test de Shapiro-Wilk permet d'accepter l'hypothèse de normalité de ces derniers au risque d'erreur de 5%. Enfin, la projection des régions de confiance (figure 5.8c) révèle une corrélation entre les paramètres ξ_{pH} et pH_{opt} ce qui est fréquent avec ce type d'équation. En revanche, l'éventuelle interaction entre température et pH évoquée lors de l'analyse de variance ne semble pas être important puisque la projection de confiance ne révèle pas de corrélation entre ξ_{pH} et ξ_T .

Concernant la valeur des paramètres du modèle, on peut remarquer que la valeur de ξ_T de 7,06 °C reste proche de 8,03 °C que l'on avait estimée pour le z_T lors de la modélisation de la survie. Il en va de même pour le pH_{opt} de 6,59 qui est très proche de 6,85 obtenu avec le modèle global 4.14 relatif au pH. Ces observations sont très intéressantes car elles démontrent que le stress lié au traitement thermique agit de façon similaire sur le temps de latence λ . A noter toutefois, le ξ_{pH} n'est ici que de 0,977 ce qui est relativement faible. En effet, cela signifie qu'un écart d'une seule unité pH par rapport au pH_{opt} entraîne une multiplication du temps de latence d'un facteur 10.



Figure 5.8 – Ajustement du modèle 5.2 appliqué à l'ensemble du jeux de données. (a) graphique des valeurs estimées en fonction des valeurs observées; (b) étude des résidus; (c) projections des régions de confiance à 95 %.

5.2.2.2 Etude des variations du paramètre λ_0

L'observation de la figure 5.9a nous indique que la température de traitement ne semble pas avoir d'effet sur la valeur de λ_0 ce qui est confirmé par l'analyse de variance (tableau 5.2). Le pH quant à lui possède un effet puisqu'il expliquerait 69% des variations de λ_0 observées. On peut d'ailleur s'en rendre compte en examinant la figure 5.9b. Enfin, notons que l'analyse de variance indique une variance résiduelle de 31% qui peut s'expliquer par l'imprécision des données.

Nous pourrions penser à un modèle pour λ_0 de même type que le précédent, où seul le pH serait pris en compte :

$$log(\lambda_0) = log(\lambda_{0_{max}}) + \left(\frac{pH - pH_{opt}}{\xi_{pH}}\right)^2$$
(5.3)

Toutefois, la qualité d'ajustement du modèle est insuffisante avec un R_{aj}^2 de 0,475. En nous cantonant à un point de vue descriptif, nous pouvons juste signaler que les paramètres estimés (tableau 5.3) ne sont pas sans rappeler les valeurs des paramètres déjà rencontrés avec un pH_{opt} égal à 6,56 et un ξ_{pH} de 2,09 à comparer à la valeur de 2,03 précédemment obtenue pour Z.

L'aspect modélisation de cette dernière partie, bien que limité, est riche d'enseignement et ouvre des pistes quand à l'impact des traitements thermiques sur



Figure 5.9 – Graphiques représentant les variations de λ_0 en fonction : (a) de la température de traitement dans un milieu à pH=7; (b) du pH global associé à un traitement thermique effectué à 90°C.

Facteur	SCE	% d'explication
Т	0,000	0
$_{\rm pH}$	$0,\!156$	69
Résiduelle	0,070	31
Totale	0,226	

Tableau 5.2 – Résultats de l'analyse de variance pour le paramètre λ_0 .

Tableau 5.3 – V	aleurs des	paramètres	estimés	pour	le	modèle	relatif	à	λ_0 .
-----------------	------------	------------	---------	------	----	--------	---------	---	---------------

$\lambda_{0_{max}}$	ξ_{pH}	pH_{opt}	R_{aj}^2
$3,\!554$	2,098	6,561	$0,\!475$

le temps de latence. A l'issue de cette dernière étape, faisant un bilan, nous nous apercevons que tout est lié, du traitement thermique, en passant par la récupération et ceci jusqu'au temps de latence. Ainsi, il n'est pas étonnant que Laurent *et al.* (1999) aient remarqué une relation entre la valeur de D_{opt} du modèle de Bréand *et al.* (1997) et la valeur du temps de réduction décimale D.

5.3 Discussion

5.3.1 Influence des conditions environnementales

Le temps de latence pour les spores comprend l'activation, la germination et le temps de première division. Déjà en 1955, Powell et Hunter constatent que la température de traitement thermique possède un effet sur la germination du genre Bacillus. Les auteurs testent des températures comprises entre 50 et 80° C et remarquent que le pourcentage de spores germées diminue lorsque la température augmente. Levinson et Hyatt (1970), travaillant sur l'activation de Bacillus megaterium, observent une meilleure capacité d'activation aux températures de traitement plus importantes. Cette capacité d'activation est optimale entre 62 et 78° C avec un taux de germination maximal obtenu entre 64 et 68°C. Enfin, Levinson et Hyatt (1970) enregistrent une diminution du taux de germination et une augmentation du temps de latence à la germination lorsque la température devient supérieure à 68°C. Ces différentes observations concordent avec nos travaux puisque nous obtenons également une augmentation de λ lorsque la température augmente. Nous avons également remarqué que la perte de réfringence des spores était plus rapide avec l'utilisation de température ou de temps de traitement plus élevés. Ceci traduit bien une activation plus rapide. Ces résultats ne sont que descriptifs puisque nous nous trouvons alors à la limite de détection du spectrophotomètre. Busta et Ordal (1964) qui étudient l'activation chez *Bacillus subtilis* remarquent qu'il existe une relation entre le taux d'activation et la température de traitement. Cette relation obéit même à la loi d'Arrhenius (1889). Ces résultats sont à mettre en parallèle avec la valeur de ξ_T obtenue pour décrire les variations de la pente m puisque les modèles de Bigelow (1921) et d'Arrhenius (1889) sont de performances égales. Busta et Ordal (1964) relient leur modèle à un phénomène de rupture de liaisons au sein de la paroi sporale, rupture obtenue grâce à l'énergie fournie par le traitement thermique. La cible, ou les cibles, de ce phénomène seraient des enzymes lytiques impliquées dans le processus de dégradation du peptidoglycane qui conduit à la réhydratation et par conséquent à la germination de la spore. Ces enzymes seraient stables et inactives lorsqu'elles sont liées (Makino *et al.*, 1994; Leuschner et Lillford, 1999). La température de traitement peut donc avoir plusieurs effets, comme l'activation par libération des enzymes, mais elle peut aussi, lorsqu'elle devient trop importante, désactiver ces même enzymes comme le constatent Srivastava et Fitz-James (1981) avec *Bacillus cereus*.

Pour ce qui est de l'effet du pH, Blocher et Busta (1985) remarquent une inhibition progressive de la germination des spores de *Clostridium botulinum* lorsque le pH varie de 7 à 5,5. Vas et Proszt (1957), qui travaillent sur *Bacillus cereus*, enregistrent également une diminution du pourcentage de germination et de la vitesse de germination lorsque le pH décroît. Ces mêmes auteurs constatent que l'effet du pH semble être indépendant du type d'acide (lactique, citrique, *etc.*) avec une exception pour l'acide acétique. En effet avec cet acide, ils obtiennent un taux et une vitesse de germination nuls dès pH=5,5, ce qui est proche de nos observations.

Notre méthode de suivi de la croissance a permis de mettre en avant des effets de la température et du pH mais ne nous permet pas de dire si ces effets sont à attribuer au taux de germination ou au temps de latence à la germination, voire aux deux.

5.3.2 La variabilité dans les mesures

Pour le modèle, nous nous sommes limité à la partie pour laquelle nous avions moins de deux réductions décimales afin d'éviter la très grande variabilité du temps de latence. Au vu des résultats, on peut se poser la question : n'avons nous pas atteint les limites de la modélisation classique?

Augustin et Carlier (2000) qui étudient *Listeria monocytogenes*, remarquent que pour des cellules stressées, la taille de l'inoculum possède un effet sur le temps de latence. Or, dans notre cas, les spores subissent un stress très important et la taille de l'inoculum varie fortement. Ainsi, la zone où nous enregistrons les très fortes variations correspond à moins d'1 % de la population initiale. Cette population possèdant une résistance décrite par une distribution de Weibull, les spores contenues dans ce faible pourcentage ont donc des caractéristiques très différentes. Face à ce problème, Augustin et Carlier (2000) recommandent l'utilisation de modèles stochastiques capables de prendre en compte cette distribution. Ces auteurs rencontrent déjà des variations avec des cellules végétatives alors on peut imaginer ce que cela peut donner avec des spores pour lesquelles il faut ajouter les variations liées à l'activation et à la germination. Ainsi, Shull *et al.* (1963) proposent un modèle où l'activation se ferait selon une loi exponentielle. Vary et Halvorson (1965) enregistrent une répartition des spores gemées en présence de L-alanine selon une distribution de Weibull. On le voit bien, avec l'étude des spores on multiplie les sources de variation et par conséquent les erreurs. Ces remarques mettent en évidence l'intérêt des modèles stochastiques qui prennent en compte la latence de chaque cellule individuelle. Cette démarche complète utilement notre approche plus classique qui consiste à estimer un temps de latence moyen global d'une population. Mais si l'on suppose que seules les plus rapides capables de se développer contribuent à la croissance, cela signifie que l'on surestime fortement le temps de latence pour ces cellules. Nous pouvons donc, à juste titre, nous interroger sur la signification du λ estimé pour de forts niveaux de stress. Dans de telles conditions, il semble bien que seule la démarche stochastique ait une signification empirique, mais comme le concluent Leblanc et Lefebvre (1984), cette voie est difficile car très souvent les données sont en nombre insuffisant.

Jòzsef Baranyi, dans une série d'articles théoriques, développe cette approche stochastique. Un nouveau modèle de croissance est ainsi proposé (Baranyi *et al.*, 1993). L'influence des conditions environnementales telles que la température, le pH et l'a_W peut être prise en compte (Baranyi et Roberts, 1994). Ces modèles mettent en lumière le fait qu'à de faibles niveaux d'ensemencement la variabilité de λ augmente très fortement (Baranyi, 1998) ce qui correspond bien à ce que nous obtenons. A partir de ces hypothèses, Baranyi et Pin (1999) proposent une méthode d'estimation des paramètres de croissance en mesurant le temps moyen de détection. Baranyi (2002) publie enfin un modèle stochastique pour décrire le temps de latence. Dans cet article, il conclue que les courbes de croissance classiques obtenues par dénombrement et suivi de densité optique sont totalement insuffisantes pour permettre la caractérisation de le distribution au sein de la population.

On le voit bien, l'avenir verra sûrement la multiplication des études liées aux modèles stochastiques. Pour s'en convaincre, il suffit de consulter le programme du Colloque « Predictive Modelling in Foods » qui s'est tenu à Quimper en Juin 2003. Dans la section dédiée au temps de latence, on propose des modèles, des méthodologies pour isoler des cellules, et des simulations. Dans leur conférence, Barker et al. (2003) mettent ainsi en évidence pour des spores, la relation entre la variabilité des temps de latence individuels et celle du temps de latence de la population. Leur étude les amène à conclure que plus la population de spores est faible et stressée, plus la distribution des temps de latence individuels a de l'importance. Nous avons essayé d'aborder la modélisation stochastique lors de notre étude mais la quantité et la qualité de nos données ne nous ont pas permis d'aboutir à des résultats concluants. Toutefois, bien que ces modèles stochastiques possèdent un pouvoir explicatif indéniable, leur éventuelle mise en œuvre au sein de bases de données pourrait s'avérer des plus difficiles. Les deux démarches, classique et stochastique, resteront donc à développer de concert afin de mettre au point un outil permettant une description efficace du comportement de la population totale.

Conclusion et perspectives

Bilan des travaux réalisés

Notre étude nous a amenés à tester avec succès le modèle primaire de destruction thermique basé sur la distribution des fréquences de Weibull pour les courbes de survie non linéaires, il s'écrit, selon notre reparamétration :

$$N(t) = N_0 \cdot 10^{-\left(\frac{t}{\delta}\right)^p}$$

Ce modèle a été complété par les modèles secondaires de traitement et de récupération qui sont respectivement :

$$log\delta = log\delta^{\star} - \left(\frac{T - T^{\star}}{z_T}\right) - \left(\frac{7 - pH}{z_{pH}}\right) - \left(\frac{a_W - 1}{z_{a_W}}\right)$$

 et

$$log\delta' = log\delta'_{opt} - \left(\frac{7 - pH'}{z'_{pH}}\right) - \left(\frac{a'_{W} - 1}{z'_{a_{W}}}\right)^{2}$$

Lorsque l'on combine les effets du pH de traitement et de récupération uniquement, l'a_W n'ayant pas été étudiée, le modèle global devient :

$$\log\delta' = \log\delta^{\star} - \left(\frac{T - T^{\star}}{z_T}\right) - \left(\frac{pH - 7}{Z}\right)^2$$

A la suite du traitement thermique survient une phase de la chauffage t avec :

$$\lambda = \lambda_0 + m.t$$

Ce modèle « primaire » très simple est comme précédemment associé à un modèle « secondaire » qui décrit les variations de m en fonction des conditions environnementales :

$$log(m) = log(m^{\star}) + \left(\frac{T - T^{\star}}{\xi_T}\right) + \left(\frac{pH - pH_{opt}}{\xi_{pH}}\right)^2$$

Dans le cas de λ_0 , aucun modèle ne nous a permis d'obtenir une bonne qualité d'ajustement. Néanmoins, les valeurs de λ_0 ne varient pas de manière importante,

p	1,33
δ^{\star}	20,8 min.
z_T	$8,5;8,0~^{\circ}C$
z_{pH}	4,8;8,6;6,4;6,0
z_{a_W}	0,16;0,13;0,14;0,13
z'_{pH}	4,1;4,8;3,9
z'_{a_W}	0,09
Z	2,1
λ_0	4,42 h.
m^{\star}	0,21
ξ_T	$7,1~^{\circ}\mathrm{C}$
ξ_{pH}	0,98
pH_{opt}	$6,\!59$
pH_{min}	$4,\!3$
pH_{max}	9,3

Tableau 5.4 – Tableau récapitulatif des différents paramètres rencontrés au cours de l'étude.

c'est pourquoi nous avons décidé de le fixer à la valeur moyenne, à savoir 4,42 heures.

L'estimation du temps de latence étant effectuée par les modèles précédents, la première étape du modèle tri-linéaire adopté pour la recroissance est complète. La seconde étape, la phase exponentielle de croissance est décrite par le modèle des pH cardinaux de Rosso *et al.* (1995). Les valeurs des pH_{min} et pH_{max} sont obtenues à partir de la bibliographie alors que la valeur du pH_{opt} est déterminée par ajustement sur nos données expérimentales. La dernière étape, la phase stationnaire de croissance, ne sera pas décrite puisque la sporulation en fin de croissance ne nous a pas permis de mesurer le plateau par densité optique.

Les valeurs de l'ensemble des paramètres rencontrés au cours de l'étude sont regroupées dans le tableau 5.4. Au final, le schéma figure 5.10 nous montre comment l'on peut décrire les évènements qui surviennent du traitement thermique jusqu'à la recroissance.

Nous avons donc la possibilité de simuler le comportement des spores bactériennes et le devenir de la population sous certaines conditions. Nous devons nous maintenir sous le seuil des deux réductions décimales, contrainte imposée par le modèle décrivant le temps de latence. Si ce n'était pas le cas, le temps de latence pourrait être fortement surestimé. Les conditions de validité vérifiées, l'application de la démarche présentée figure 5.10 nous permet d'obtenir des courbes comme celle de la figure 5.11. Cette figure simule le comportement pour un traitement thermique de 30 minutes réalisé à 88 °C dans un milieu de pH 6,3. Comme on peut le constater, au départ de la cinétique, l'erreur prédite est relativement faible. Puis, viennent s'y ajouter les erreurs liées à la détermination du temps de latence. Nous obtenons au final une « bande de confiance » relativement importante imposant une certaine prudence quant à l'interprétation de ces simulations. En effet, selon les conditions testées, les variations calculées s'échelonnent de quelques heures à plusieurs jours.



Figure 5.10 – Schéma représentant le bilan des différentes étapes de notre étude de l'impact du traitement thermique sur les spores de *Bacillus cereus*. Les facteurs pris en compte sont la température de chauffage et le pH du milieu.



Figure 5.11 – Exemple de simulation obtenue en traitant les spores à 88 °C pendant 30 minutes dans un milieu à pH 6,3 : (—) courbe utilisant les paramètres optimaux déterminés pour chaque modèle ; (- -) limites supérieure et inférieure obtenues à partir de jeux de paramètres issus des régions de confiance à 95 %.

Perspectives

La modélisation primaire de la survie des spores s'est avérée satisfaisante avec le bon comportement du nouveau modèle qui décrit correctement la majorité des courbes de survie. Seules les courbes d'allure sigmoïdale ne peuvent faire l'objet d'un ajustement satisfaisant du modèle. Ce dernier cas, rencontré dans certains traitements thermiques légers, nécessiterait la mise en œuvre d'autres modèles tels que ceux de Geeraerd *et al.* (2000) ou d'Albert et Mafart (2003).

Les modèles secondaires de la survie et de la récupération sont de bonne qualité, ils sont robustes et parcimonieux, avec des paramètres possèdant une signification biologique facilement interprétable. L'association des modèles primaires et secondaires forme un ensemble homogène très cohérent, simple d'utilisation de surcroît puisque l'estimation des paramètres reste relativement aisée. Dans l'avenir, pour rendre ces modèles opérationnels, les valeurs des différents paramètres devront être déterminées pour d'autres souches afin d'alimenter les bases de données.

Concernant la latence, les premiers résultats sont intéressants et ouvrent plusieurs pistes qui justifient le développement d'une approche stochastique. Dans cette optique, un nouveau protocole devra être mis au point, protocole qui devra donné accès aux distributions des spores intactes, activées et germées. Il est possible, par exemple, que la cytométrie de flux puisse être un outil des plus utiles.

Bien évidemment, les modèles devront tous être validés sur des produits alimentaires. Signalons au passage que quelques manipulations préliminaires nous ont fourni des résultats des plus encourageants.

En l'état actuel de nos connaissances, peut-on espérer un jour obtenir un modèle global qui prenne en compte le traitement thermique, la récupération, la latence et la croissance? Ces interrogations quant aux limites de la microbiologie prédictive (Gay et Cerf, 1994; Schaffner et Labuza, 1997) ne découragent pas certains auteurs qui proposent déjà des modèles couvrant plusieurs de ces sections (Hills et Mackey, 1995; Zwietering *et al.*, 1997). Pour le moment, la communauté est unanime et s'accorde à dire que tous ces modèles ne sont que des outils informatifs précieux qui complètent la microbiologie alimentaire classique (Zwietering *et al.*, 1992; Rosso et Flandrois, 1995; Buchanan, 1993; Whiting, 1995; McMeekin et Ross, 2002).

Il reste donc encore beaucoup de travail avant d'aboutir à un outil complet, fiable et totalement opérationnel. Il faut signaler que de nouveaux outils tels que Combase (Baranyi et Tamplin, 2003) et Sym'Previus (Leporq *et al.*, 2003) vont toutefois grandement faciliter le travail en donnant accès à une très grande source d'information. A terme, dans le cadre du projet Sym'Previus, les résultats de notre étude doivent d'ailleurs participer à l'implémentation de l'aspect « inactivation thermique » tout en alimentant la base de données associée.

Bibliographie

- Ababouch, L., Grimit, L., Eddafry, R., Busta, F., 1995. Thermal inactivation kinetics of *Bacillus subtilis* spores suspended in buffer and in oils. Journal of Applied Bacteriology 78 (6), 669–676.
- Achard, C., Gros, J., Dussap, C., 1992. Prédiction de l'activité de l'eau, des températures d'ébullition et de congélation de solutions aqueuses de sucres par un modèle UNIFAC. Industries Alimentaires et Agricoles 109, 93–101.
- Adams, D., 1978. Heat injury of bacterial spores. Advance in Applied Microbiology 23, 245–261.
- Adams, M., Little, C., Easter, M., 1991. Modelling the effect of pH, acidulant and temperature on the growth rate of *Yersinia entericolitica*. Journal of Applied Bacteriology 71, 65–71.
- Albert, I., Mafart, P., 2003. A modified Weibull model for bacterial inactivation. In : Van Impe, J., Geeraerd, A., Leguérinel, I., Mafart, P. (Eds.), Predictive Modelling in Foods, 4th international conference. pp. 158–160.
- Amaha, M., Ordal, Z., 1957. Effect of divalent cations in the sporulation medium on the thermal death rate of *Bacillus coagulans* var *thermoacidurans*. Journal of Bacteriology 74, 596–604.
- Anderson, A., Rönner, U., Granum, P. E., 1995. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? International Journal of Food Microbiology 28, 145–155.
- Anderson, E., Essenlen jr, W., Fellers, C., 1949. Effect of acids, salt, sugar and other food ingredient on thermal resistance of *Bacillus thermoacidurans*. Food Research 14, 499–510.
- Anderson, W., McClure, P., Braid-Parker, A., Cole, M., 1996. The application of a log-logistic model to describe the thermal inactivation of *Clostridium botulinum* 213B at temperature below 121.1°C. Journal of Applied Bacteriology 80, 283–290.
- Angelotti, R., Maryanski, J., Butler, T., Pellet, J., Campbell, J., 1968. Influence of spore moisture content on the dry heat resistance of *Bacillus subtilis var. niger*. Applied Microbiology 16 (5), 735–745.
- Arrhenius, S., 1889. Über die Reaktiongeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. Zeitschrift für Physikalische Chemie 4, 226–248.

- Augustin, J., Brouillaud-Delattre, A., Rosso, L., Carlier, V., 2000. Significance of inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology 66 (4), 1706–1710.
- Augustin, J., Carlier, V., 2000. Mathematical modelling of the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology 56, 29–51.
- Baird-Parker, A., Freame, B., 1967. Combined effect of water activity, pH and temperature on the growth of *Clostridium botulinum* from spore and vegetative cell inocula. Journal of Applied Bacteriology 30 (3), 420–429.
- Bajard, S., Rosso, L., Fardel, G., Flandrois, J., 1996. The particular behaviour of *Listeria monocytogenes* under suboptimal conditions. International Journal of Food Microbiology 29, 201–211.
- Baker, J., Griffiths, M., 1993. Predictive modeling of psychrotrophic *Bacillus cereus*. Journal of Food Protection 56 (8), 684–688.
- Ball, C., 1923. Thermal process time for canned food. National Research Council, Washington, DC .
- Ball, C., Olson, F., 1957. Sterilisation in food technology. McGraw-hill Book Co., New York.
- Baranyi, J., 1997. Simple is good as long as it is enough. Food Microbiology 14, 391–394.
- Baranyi, J., 1998. Comparaison of stochastic and deterministic concepts of bacterial lag. Journal of Theoretical Biology 192, 403–408.
- Baranyi, J., 2002. Stochastic modelling of bacterial lag phase. International Journal of Food Microbiology 73, 203–206.
- Baranyi, J., Pin, C., 1999. Estimating bacterial growth parameters by means of detection times. Applied and Environmental Microbiology, 732–736.
- Baranyi, J., Roberts, T., 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food (review paper). International Journal of Food Microbiology 23, 277–294.
- Baranyi, J., Roberts, T., Clure, P. M., 1993. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. Food Microbiology 10, 43–59.
- Baranyi, J., Tamplin, M., 2003. A new international effort for the advance of predictive microbiology. ComBase : Combined database of microbial responses to food environments. In : Van Impe, J., Geeraerd, A., Leguérinel, I., Mafart, P. (Eds.), Predictive Modelling in Foods, 4th international conference. pp. 50–51.
- Barker, G., Malakar, P., Peck, M., 2003. Germination and growth from spores : Variability and uncertainty in the assessment of food borne hazards. In : Van Impe, J., Geeraerd, A., Leguérinel, I., Mafart, P. (Eds.), Predictive Modelling in Foods, 4th international conference. pp. 206–208.

- Beale, E., 1960. Confidence regions in non-linear estimation. Journal of the Royal Statistical Society 22B, 41–88.
- Beaman, T., Gerhardt, P., 1986. Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydratation, mineralisation and thermal adaptation. Applied and Environmental Microbiology 52 (6), 1242–1246.
- Beaman, T., Greenamyre, J., Corner, T., Pankratz, H., Gerhardt, P., 1982. Bacterial spore heat resistance correlated with water content, wet density, and protoplast/sporoplast volume ratio. Journal of Bacteriology 150 (2), 870–877.
- Behringer, R., Kessler, H., 1992. Influence of pH value and concentration of skimmilk on heat resistance of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus stearothermophilus* spores. Milchwissenschaft 47 (4), 207–211.
- Berg, R., Sandine, W., 1970. Activation of bacterial spores : a review. Journal of Milk Food Technology 10, 435–441.
- Bergère, J.-L., Cerf, O., 1992. Heat resistance of *Bacillus cereus* spores. Bulletin of the International Dairy Federation 275, 23–25.
- Bhothipaksa, K., Busta, F., 1978. Osmotically induced increase in thermal resistance of heat sensitive, dipicolinic acid less spores of *Bacillus cereus* ht-8. Applied and Environmental Microbiology 35 (4), 800–808.
- Bigelow, W., 1921. The logarithmic nature of thermal death time curves. Infectious Diseases 29, 528–536.
- Bigelow, W., Esty, J., 1920. The thermal death point in relation to time of typical thermophilic organisms. Journal of Infectious Diseases 27, 602–617.
- Blocher, J., Busta, F., 1983. Bacterial spores resistance to acid. Food Technology 37 (11), 87–99.
- Blocher, J., Busta, F., 1985. Multiple mode of inhibition of spore germination and outgrowth by reduced pH and sorbate. Journal of Applied Bacteriology 59, 469– 478.
- Braithwaite, P., Perigo, J., 1971. The influence of pH, water activity and recovery temperature on the heat resistance and outgrowth of *Bacillus* spores. In : Barker, gould, w. e. (Ed.), Spore research 71. Academic press London, pp. 289–302.
- Braun, O., Hays, G., Benjamin, H., 1941. Use a dry sugar in sweetening foods canned in sirup. Food Industries 13, 64–65.
- Bréand, S., Fardel, G., Flandrois, J., Rosso, L., Tomassone, R., 1997. A model describing the relationship between lag time and mild temperature increase duration. International Journal of Food Microbiology 38, 157–167.
- Bréand, S., Fardel, G., Flandrois, J., Rosso, L., Tomassone, R., 1999. A model describing the relationship between regrowth lag time and mild heat temperature increase for *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology 46, 251–261.

- Briggs, A., Yazdany, S., 1970. Effect of sodium chloride on the heat and radiation resistance and on the recovery of heated or irradiated spores of the genus *Bacillus*. Journal of Applied Bacteriology 33, 621–632.
- Buchanan, R., 1918. Life phases in a bacterial culture. Journal of Infectious Deseases 23, 109–125.
- Buchanan, R., 1993. Predictive food microbiology. Trend in Food Science and Technology 4 (January), 6–11.
- Buchanan, R., Phillips, J., 1990. Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection 53 (5), 370– 376.
- Buchanan, R., Whiting, R., Damert, W., 1997. When is simple good enough : a comparaison of the gompertz, baranyi and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. Food Microbiology 14, 313–326.
- Busta, F., Ordal, Z., 1964. Heat activation kinetics of endospores of *Bacillus subtilis*. Journal of Food Science 29, 345–353.
- Carlin, F., Guinebretiere, M., Choma, C., Pasqualini, R., Braconnier, A., Nguyen, C., 2000. Spore-forming bacteria in commercial cooked, pasteurised and chilled vegetable purees. Food Microbiology 17 (2), 153–165.
- Casolari, A., 1994. About basic parameters of food sterilization technology. Food Microbiology 11, 75–84.
- Cazemier, A., Wagenaars, S., ter Steeg, P., 2001. Effect of sporulation and recovery medium on the heat resistance and amount of injury of spores from spoilage bacilli. Journal of Applied Microbiology 90, 761–770.
- Cerf, O., 1977. A review. Tailing of survival curves of bacterial spores. Journal of Applied Bacteriology 42, 1–19.
- Cerf, O., Davey, K., Sadoudi, A., 1996. Thermal inactivation of bacteria a new predictive model for the combined effect of three environmental factors : temperature, pH and water activity. Food research international 29 (3-4), 219–226.
- Chea, F., Chen, Y., Montville, T., Schaffner, D., 2000. Modeling the germination kinetics of *Clostridium botulinum* 56A spores as affected by temperature, pH, and sodium chloride. Journal of Food Protection 63 (8), 1071–1079.
- Chick, H., 1908. An investigation of the laws of disinfection. Journal of Hygiene Cambridge 8, 92–158.
- Christian, J., 1980. Reduced water activity. Vol. Factors affecting the life and death of microorganisms. New-York academic press.
- Christiansson, A., Satyanarayan, A., Nilsson, I., Wadström, T., Pettersson, H., 1989. Toxin production by *Bacillus cereus* dairy isolate in milk at low temperature. Applied and Environmental Microbiology 55 (10), 2595–2600.
- Condon, S., Bayarte, M., Sala, F., 1992. Influence of the sporulation temperature upon the heat resistance of *Bacillus subtilis*. Journal of Applied Bacteriology 73, 251–256.
- Condon, S., Palop, A., Raso, J., Sala, F., 1996. Influence of incubation temperature after heat treatment upon the estimated heat resistance values of spores of *Bacillus subtilis*. Letters in Applied Microbiology 22, 149–152.
- Cook, A., Brown, M., 1965. Relationship between heat activation and percentage colony formation for *Bacillus stearothermophilus* spores : effects of storage and pH on the recovery medium. Journal of Applied Bacteriology 28 (3), 361–364.
- Cook, A., Gilbert, R., 1968. Factors affecting the heat resistance of *Bacillus stearo-thermophilus* spores I- The effect of recovery condition on colony count of unheated and heated spores. Journal of Food Technology 3, 285–293.
- Coroller, L., Leguérinel, I., Mafart, P., 2001. Effect of water activities of heating and recovery media on apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores. Applied and Environmental Microbiology 67 (1), 317–322.
- Couvert, O., Leguérinel, I., Mafart, P., 1999. Modelling the overall effect of pH on the apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores. International Journal of Food Microbiology 49, 57–62.
- Couvert, O., Leguérinel, I., Mafart, P., 2000. Modelling the influence of the incubation temperature upon the estimated heat resistance value of heated spores. In : 3rd International Conference on Predictive modelling in foods. pp. 82–85.
- Craven, E., 1990. The effect of pH of sporulation environment on the heat resistance of *Clostridium perfringens* spores. Current Microbiology 22, 233–237.
- Davey, K., 1993. Extension of the generalized sterilisation chart for combined temperature and pH. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie 26, 476–479.
- Davey, K., Lin, S., Wood, D., 1978. The effect of pH on continuous high-temperature / short time sterilization of liquid foods. American Institut Chemistry Engineering Journal 24 (3), 537–540.
- de Jong, P., te Giffel, M., Kiezebrink, E., 2002. Prediction of the adherence, growth and release of microorganisms in production chains. International Journal of Food Microbiology 74, 13–25.
- de Man, J., 1975. The probability of most probable numbers. European Journal of Applied Microbiology 1, 67–78.
- de Man, J., 1977. MPN tables for more than one test. European Journal of Applied Microbiology 4, 307–316.
- Delignette-Muller, M., 1998. Relation between the generation time and the lag time of bacterial growth kinetics. International Journal of Food Microbiology 43, 97– 104.

- Delignette-Muller, M., Rosso, L., 2000. Biological variability and exposure assessment. International Journal of Food Microbiology 58 (3), 203–212.
- Dilasser, F., De Buyser, M., 1989. Fréquence d'isolement de *Bacillus cereus* dans différents aliments. Sciences des Aliments 9 (Hors série n° X), 103–105.
- Duh, Y., Schaffner, D., 1993. Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag time of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection 56 (3), 205–201.
- El Bisi, H., Ordal, Z., 1956. The effect of certain sporulation conditions on the thermal resistance of *Bacillus coagulans* var. *thermoacidurans*. Journal of Bacteriology 71, 1–9.
- Elliott, P., Schaffner, D., 2001. Germination, growth and toxin production of nonproteolytic *Clostridium botulinum* as affected by multiple barriers. Journal of Food Science 66 (4), 575–579.
- Eneroth, A., Christiansson, A., Brendehaug, J., Molin, G., 1998. Critical contamination sites in the production line pasteurised milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora. International Dairy Journal 8, 824–834.
- Esty, J., Meyer, K., 1922. The heat resistance of spores of *B. botulinus* and allied anaerobes. Journal of Infectious Diseases 31, 650–663.
- Esty, J., Williams, C., 1924. Heat resistance studies. A new method for determination of heat resistance of bacterial spores. Journal of Infectious Diseases 34, 516–528.
- Faille, C., Fontaine, F., Membré, J., 1999. Factors influencing recovery of heat injured *Bacillus thuringensis* spores. Statistical approach. Journal of Food Science 64 (1), 1–4.
- Faille, C., Lebret, V., Gavani, F., Maingonnat, J., 1997. Injury and lethality of heat treatment of *Bacillus cereus* spores suspended in buffer and poultry meat. Journal of Food Protection 60 (5), 544–547.
- Feeherry, F., Munsey, D., Rowley, D., 1987. Thermal inactivation and injury of Bacillus stearothermophilus spores. Applied and Environmental Microbiology 53 (2), 365–370.
- Fernandez, A., Salmeron, C., Fernandez, P., Martinez, A., 1999. Application of a frequency distribution model to describe the thermal inactivation of two strain of *Bacillus cereus*. Food Science and Technology 10, 158–162.
- Fernandez, P., Ocio, M., Rodrigo, F., Rodrigo, M., Martinez, A., 1996. Mathematical model for the combined effect of temperature and pH on thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* and *Clostridium sporogenes* spores. International Journal of Food Microbiology 32, 225–233.
- Fernandez, P., Ocio, M., Sanchez, T., Martinez, A., 1994. Thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores heated in acidified mushroom extract. Journal of Food Protection 57 (1), 37–41.

- Finley, N., Fields, M., 1962. Heat activation and heat-induced dormancy of *Bacillus stearothermophilus* spores. Applied Microbiology 10, 231–236.
- Fluer, F., Ezepchuk, Y., 1970. Microbiologiya 39, 396–401.
- Frank, H., Campbell, L., 1957. The non logarithmic rate of thermal destruction of spores of *Bacillus coagulans*. Applied Microbiology 5, 243–248.
- Gaillard, S., Leguérinel, I., Mafart, P., 1998a. Model for combined effects of temperature, pH and water activity on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. Journal of Food Science 63 (5), 887–889.
- Gaillard, S., Leguérinel, I., Mafart, P., 1998b. Modelling combined effect of the temperature and pH on the heat resistance of spores of *Bacillus cereus*. Food Microbiology 15, 625–630.
- Garthright, W., 1997. The three-phase linear model of bacterial growth : a response. Food Microbiology 14, 395–397.
- Gay, M., Cerf, O., 1994. Microbiologie prédictive : quelles limites? Revue Laitière Française 539, 26–27.
- Gay, M., Cerf, O., Davey, K., 1996. Significance of pre-incubation temperature and inoculum concentration on subsequent growth of *Listeria monocytogenes*. Journal of Applied Bacteriology 81, 433–438.
- Geeraerd, A., Herremans, C., Van Impe, J., 2000. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. International Journal of Food Microbiology 59, 185–209.
- Gombas, D., 1983. Bacterial spore resistance to heat. Food Technology Nov, 105–110.
- Gonzalez, I., Lopez, M., Mazas, M., Bernardo, A., Martin, R., 1996. Effect of pH of the recovery medium on the apparent heat resistance of three strains of *Bacillus cereus*. International Journal of Food Microbiology 31, 341–347.
- Gould, G., Hurst, A., 1969. The bacterial spore. Academic Press, London and New York.
- Granum, P., 1994. *Bacillus cereus* and its toxins. Journal of Applied Bacteriology 76 (Symposium supplement), 61–66.
- Granum, P., Lund, T., 1997. Bacillus cereus and its food poisoning toxins. FEMS Microbiology Letters 157, 223–228.
- Grecz, N., Tang, T., Rajan, K., 1972. Relation of metal chelate stability to heat resistance of bacterial spores. In : Halvorson, Hanson, Campbell (Eds.), Spores. Vol. 5. American Society for Microbiology, Washington, pp. 53–60.
- Hachisuka, Y., Kozuka, S., Tsujikawa, M., 1984. Exosporia and appendages of spores of *Bacillus* species. Microbiology and Immunology 28, 619–624.

- Han, Y., 1975. Death rates of bacterial spores : nonlinear survivor curves. Canadian Journal of Microbiology 21, 1464–1467.
- Härnulv, B., Snygg, B., 1972. Heat resistance of *Bacillus subtilis* spores at various Water Activities. Journal of Applied Bacteriology 35, 614–625.
- Hashimoto, T., Black, S., Gerhardt, P., 1960. Development of fine structure, thermostability and dipicolinate during sporogenesis in *Bacillus*. Canadian Journal of Microbiology 6, 203–212.
- Henriques, A. O., Moran, C., 2000. Structure and assembly of the bacterial endospore coat. Methods 20, 95–110.
- Hersom, A., Hulland, E., 1980. Effects of heat on micro-organisms. In : Canned foods thermal processing and microbiology, 7th Edition. Churchill Livinstone, Edinburg London New York.
- Hills, B., Mackey, B., 1995. Multi-compartment kinetic models for injury, resuscitation, induced lag and growth in bacterial cell populations. Food Microbiology 12, 333–346.
- Huet, S., Jolivet, E., Messéah, A., 1992. La régression non-linéaire, méthodes et applications en biologie. Editions INRA, Paris.
- Husmark, U., Rönner, U., 1990. Forces involved in adhesion of *Bacillus cereus* spores to solid surfaces under different environmental conditions. Journal of Applied Bacteriology 69, 557–562.
- Jakobsen, M., Murrell, W., 1977. The effect of water activity and aw-controlling solute on sporulation of *Bacillus cereus T*. Journal of Applied Bacteriology 43, 239–245.
- Jean Stone, M., 1952. The action of the lecithinase of *Bacillus cereus* on the globule membrane of milk fat. Journal of Dairy Research 19, 311–315.
- Johnson, K., 1984. *Bacillus cereus* foodborne illness an update. Journal of Food Protection 47 (2), 145–153.
- Juneja, V., Marmer, B., Phillips, J., Miller., A., 1995. Influence of the intrinsec properties of food on thermal inactivation of spores of nonproteolitic *Clostridium botulinum*: development of predictive model. Journal of Food Safety 15, 349–364.
- Katzin, L. I., Sandholzer, L. A., Strong, M. E., 1943. Application of the decimal reduction time principle to a study of the resistance of coliform bacteria to pasteurization. Journal of Bacteriology 45, 256–272.
- Kaufmann, O., Harmon, L., Pailthorp, O., Pflug, I., 1959. Effect of heat treatment on the growth of surviving cells. Journal of Bacteriology 78, 834–838.
- Kramer, J., Gilbert, R., 1989. Foodborne Bacterial Pathogens. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. Marcel Dekker, Inc., New-York.

- Labuza, T., 1980. The effect of water activity on reaction kinetics of food deterioration. Food Technology 34 (4), 31–41,59.
- Laurent, Y., Arino, S., Rosso, L., 1999. A quantitative approach for studying the effect of heat treatment conditions on resistance and recovery of *Bacillus cereus* spores. International Journal of Food Microbiology 48, 149–157.
- Le Marc, Y., 2001. Développement d'un modèle modulaire décrivant l'effet des interactions entre les facteurs environnementaux sur les aptitudes de croissance de *Listeria monocytogenes*. Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale.
- Leblanc, R., Lefebvre, G., 1984. A stochastic model of bacterial spore germination. Bulletin of Mathematical Biology 46 (3), 447–460.
- Leclerc, H., Gaillard, J.-L., Simonet, M., 1995. Microbiologie générale. La bactérie et le monde bactérien. Doin Editeurs.
- Leguérinel, I., Mafart, P., 2001. Modelling the influence of pH and organic acid type on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. International Journal of Food Microbiology 63, 29–34.
- Leistner, L., 1978. Microbiology of Ready-to-serve Foods. Die Fleischwirtschaft 12, 2008–2011.
- Leporq, B., Buche, P., Membré, J., Guyonnet, J., 2003. Comment construire une base de données en microbiologie alimentaire? Projet Sym'Previus. Bulletin de la société Française de Microbiologie 18 (2), 129–134.
- Leuschner, R., Lillford, P., 1999. Effects of temperature and heat activation on germination of individual spores of *Bacillus subtilis*. Letters in Applied Microbiology 29, 228–232.
- Leuschner, R., Lillford, P., 2001. Investigation of bacterial spore structure by high resolution solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy and transmission electron microscopy. International Journal of Food Microbiology 63, 35–50.
- Levine, A., Fellers, C., 1940. Action of acetic acid on food spoilage micro-organisms. Journal of Bacteriology 39, 499–514.
- Levinson, H. S., Hyatt, M., 1970. Effects of temperature on activation, germination and outgrowth of *Bacillus megaterium* spores. Journal of Bacteriology 101 (1), 58–64.
- Lobry, J., Rosso, L., Flandrois, J., 1991. A fortran subroutine for the determination of parameter confidence limits in non-linear models. Binary 3, 86–93.
- Lopez, M., Gonzalez, I., Condon, S., Bernardo, A., 1996. Effect of pH heating medium on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. International Journal of Food Microbiology 28, 405–410.
- Lund, D., 1977. Design of thermal processes for maximizing nutrient retention. Food Technology 31, 71–78.

- Lund, D., 1982a. Influence of processing on nutrients in foods. Journal of Food Protection 45 (4), 367–373.
- Lund, D., 1982b. Quantifying reaction influencing quality of foods : texture, flavor and apparence. Journal of Food Processing and Preservation 6, 133–135.
- Mafart, P., 1995. Modelling germination kinetics of spores of *Clostridium tyrobutyricum*: a tool for predictive microbiology. Journal of Applied Bacteriology 78, 477–780.
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., Leguérinel, I., 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods : application of the Weibull frequency distribution model. International Journal of Food Microbiology 72, 107–113.
- Mafart, P., Couvert, O., Leguérinel, I., 2001. Effect of pH on the heat resistance of spores. Comparison of two models. International Journal of Food Microbiology 63, 51–56.
- Mafart, P., Leguérinel, I., 1997. Modelling the heat stress and the recovery of bacterial spores. International Journal of Food Microbiology 37, 131–135.
- Mafart, P., Leguérinel, I., 1998. Modelling combined effect of temperature and pH on the heat resistance of spores by a non-linear bigelow equation. Journal of Food Science 63, 6–8.
- Makino, S., Ito, N., Inoue, T., Miyata, S., Moriyama, R., 1994. A spore-lytic enzyme released from *Bacillus cereus* spores during germination. Microbiology 140, 1403–1410.
- Mallidis, C., Scholefield, J., 1986. Evaluation of recovery media for heated spores of *Bacillus stearothermophilus*. Journal of Applied Bacteriology 61, 517–523.
- Manly, B., 1997. Randomization, Bootstrap and Monte-Carlo Methods in Biology. Second Edition. Chapman & Hall, Texts in Statistical Science Series.
- Masana, N., Baranyi, J., 2000. Adding new factors to predictive models : the effect on the risk of extrapolation. Food Microbiology 17 (4), 367–374.
- Masson, A., 1983. L'avenir des tests actuels de contrôle : *Bacillus cereus*. La technique laitière 975, 55–59.
- Mazas, M., Gonzalez, I., Lopez, M., Gonzalez, J., Sarmiento, R., 1995. Effects of sporulation media and strain on thermal resistance of *Bacillus cereus* spores. International Journal of Food Science and Technology. 30, 71–78.
- McClure, P., Blackburn, C. d. W., Cole, M., Curtis, P., Jones, J., Legan, J., Ogden, I., Peck, M., Roberts, T., Sutherland, J., Walker, S., 1994. Modelling the growth, survival and death of micro-organisms in food : the UK food micromodel approach. International Journal of Food Microbiology 23, 265–275.
- McCormick, N., 1965. Kinetics of spore germination. Journal of Bacteriology 89 (5), 1180–1185.

- McCormick, R., 1983. The pH factor : choosing the optimum acidulent. Prepared Foods , 106–113.
- McKellar, R., Knight, K., 2000. A combined discret-continuous model describing the lag phase of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology 54 (3), 171–180.
- McMeekin, T., Chandler, R., Doe, P., Garland, C., Olley, J., Purtos, S., Ratkowsky, D., 1987. Model for combined effect of temperature and salt concentration/water activity on the growth rate of *Staphilococcus xylosus*. Journal of Applied Bacteriology 62, 543–550.
- McMeekin, T., Ross, T., 2002. Predictive microbiology : providing a knoledge-based framework for change management. International Journal of Food Microbiology 78, 133–153.
- Meador-Parton, J., Popham, D., 2000. Structural analysis of *Bacillus subtilis* spore peptidoglycan during sporulation. Journal of Bacteriology 182 (16), 4491–4499.
- Molin, N., Snygg, B., 1967. Effect of lipid materials on heat resistance of bacterial spores. Applied Microbiology 15 (6), 1422–1426.
- Mosso, A., Garcia Arribas, L., Cuena, J., De La Rosa, C., 1989. Enumeration of *Bacillus cereus* spores in food from Spain. Journal of Food Protection 52, 184–188.
- Murrel, G., Scott, W., 1966. The heat resistance of bacterial spores at various water activities. Journal of General Microbiology 43, 411–425.
- Nelson, F., 1943. Further studies of the effect of the medium on the apparent survival of heat-treated bacteria. Journal of Bacteriology 46, 486.
- Nortermans, S., Dufrenne, J., Lund, B., 1990. Botulism risk of refrigerated, processed foods of estended durability. Journal of Food Protection 53 (12), 1020–1024.
- O'Connor, R., Halvorson, H., 1961. L-alanine dehydrogenase : a mechanism controlling the specificity of amino acid-induced germination of *Bacillus cereus* spores. Journal of Bacteriology 82, 706–713.
- Ohlsson, T., 1980. Temperature dependence of sensory quality during thermal processing. Journal of Food Science 45, 836–839,847.
- Okabe, M., 1979. Texture measurement of cooked rice and its relationship on the heating quality. Journal of Texture studies 10, 131–152.
- Olson, A., Scott, W., 1950. Enumeration of heated bacterial spores, experiments with *Clostridium botulinum* and other species of *Clostridium*. Australian Journal of Scientific Research Series 3, 219–233.
- Palop, A., Manas, P., Condon, S., 1999. Sporulation temperature and heat resistance of *Bacillus* spores : a review. Journal of Food Safety 19, 57–72.
- Pang, K., Carroad, P., Wilson, A., 1983. Effect of culture pH on D value, cell growth and sporulation rates of P.A. 3679 spores produced in aerobic fermentor. Journal of Food Science 48, 467–470.

- Peck, M., 1997. *Clostridium botulinum* and the safety of refrigerated processed food of extended durability. Trend in Food Science and Technology 8 (6), 186–192.
- Peleg, M., Cole, M., 2000. Estimating the survival of *Clostridium botulinum* spores during heat treatment. Journal of Food Protection 63 (2), 190–195.
- Penfold, N., 1914. On the nature of bacterial lag. Journal of Hygiene 14, 215–238.
- Peng, J., Tsai, W., Chou, C., 2002. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. International Journal of Food Microbiology 77, 11–18.
- Pflug, I., Odlaug, T., 1978. A review of z and F values used to ensure the safety of low-acid canned food. Food Technology June, 63–70.
- Pflug, I., Odlaug, T., Christensen, R., 1985. Computing a minimum public health sterilizing value for food with pH values from 4.6 to 6. Journal of Food Protection 48 (10), 848–850.
- Picoche, B., Denis, C., Pichon, P., 1993. Comportement des spores de Bacillus cereus dans des légumes cuits sous vide. Industries Alimentaires et Agricoles juin, 454–459.
- Powell, J. F., Hunter, J. R., 1955. Spore germination in the genus *Bacillus* : the modification of germination requirements as a result of preheating. Journal of General Microbiology 13, 59–67.
- Prendhan, L., Kanekar, P., Godbole, S., 1985. Microbiology of spoiled mango pickles. Tolerance to salt, acidity and oil of the microbes isolated from spoiled mango pickles. Journal of Food Science and Technology India 22 (5), 339–341.
- Prescott, L., Harley, J., Klein, D., 1995. Prescott, Harley, Klein Microbiologie. De Boeck-Wesmael S.A., Bruxelles.
- Prost, H., Hugues, B., 1982. Dénombrement des microorganismes par la technique du nombre le plus probable (indice NPP) : emploi statistique de cet indice. Ann. Fals. Exp. Chim. 75 (807), 185–207.
- Quenouille, M., 1956. Notes on bias in estimation. Biometrica 43, 353–360.
- Radhika, B., Padmapriya, B., Chandrashekar, A., Keshava, N., Varadaraj, M., 2002. Detection of *Bacillus cereus* in foods by colony hybridization using PCR-generated probe and characterization of isolates for toxins by PCR. International Journal of Food Microbiology 74, 131–138.
- Rahn, O., 1943. The problem of the logarithmic order of death in bacteria. Biodynamica 4 (86), 81–130.
- Raso, J., Palop, A., Bayarte, M., Condon, S., Sala, F., 1995. Influence of sporulation temperature on the heat resistance of a strain of *Bacillus licheniformis* (spanish type culture collection 4523). Food Microbiology 12, 357–361.
- Ratkowsky, D., Lowry, R., McMeekin, T., Stokes, A., Chandler, R., 1983. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. Journal of Bacteriology 154 (3), 1222–1226.

- Ratkowsky, D., Olley, J., McMeekin, T., Ball, A., 1982. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. Journal of Bacteriology 149, 1–5.
- Reed, G., 1994. Foodborne illness (Part 4) : *Bacillus cereus gastroenteritis*. Dairy, Food and Environmental Sanitation 14 (2), 87.
- Reichart, O., 1994. Modelling the destruction of *Escherichia coli* on the base of reaction kinetics. International Journal of Food Microbiology 23, 449–465.
- Roberts, T., Gilbert, R., Ingram, M., 1966. The effect of sodium chloride on heat resistance and recovery of heated spores of *Clostridium sporogenes* (PA 3679/s). Journal of Applied Bacteriology 29 (3), 549–555.
- Robinson, T., Ocio, M., Kaloti, A., Mackey, B., 1998. The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology 44, 83–92.
- Robinson, T., Wimpenny, J., Earnshaw, R., 1991. Ph gradients through colonies of *Bacillus cereus* and the surrounding agar. Journal of General Microbiology 137, 2885–2889.
- Rodrigez, A., Smerage, G., Teixeira, A., Busta, F., 1988. Kinetic effects of lethal temperature on population dynamics of bacterial spores. Transactions of the American Society of Agricultural Engineers 31, 1594–1606.
- Rönner, U., Husmark, U., Henriksson, A., 1990. Adhesion of *Bacillus* spores in relation to hydrophobicity. Journal of Applied Microbiology 69, 550–556.
- Rosso, L., Apr. 1997. L'industrie fait face aux bactéries. Biofutur 166, 25–27.
- Rosso, L., 1998. Predictive microbiology : validation of the models in the industrial context. COST 914 workshop. Validation of predictive models in wide rage of european foods, 10-11 décembre Cordoba Espagne .
- Rosso, L., Flandrois, J., 1995. Application de la modélisation à la description et la prévision de la croissance des flores de micro-organismes. Bulletin de la Société Française de Microbiologie 10 (3), 194–200.
- Rosso, L., Lobry, J., Bajard, S., Flandrois, J., 1995. Convenient model to describe the combined effect of temperature and pH on microbial growth. Applied and Environmental Microbiology 61 (2), 610–616.
- Rosso, L., Lobry, J., Flandrois, J., 1993. An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model. Journal of Theorical Biology 162, 447–463.
- Sanaa, M., Bemrah, N., S.Meyer, Cerf, O., Mohammed, H., 2000. Quantitative risk assessment related to microbial food contamination. Revue d'épidémiologie et de la santé publique 48 suppl. 2, 11–23.
- Santos, M. S., Kalasic, H., Goti, A., Enguidanos, M., 1992. The effect of pH on the thermal resistance of *Clostridium sporogenes* (PA 3679) in asparagus puree acidified with citric acid and glucono-delta-lactone. International Journal of Food Microbiology 16, 275–281.

- Sapru, V., Teixeira, A., Smerage, G., Lindsay, J., 1992. Predicting thermophilic spore population dynamics for UHT sterilisation processes. Journal of Food Science 57 (5), 1248–1252.
- Schaffner, D., Labuza, T., 1997. Predictive Microbiology : Where Are We, and Where Are We Going? Food Technology 51 (4), 95–99.
- Senhaji, 1973. Protection des microorganismes par les matères grasses au cours des traitements thermiques. Thèse de doctorat, Paris 6.
- Shimoni, E., Labuza, T., 2000. Modeling pathogen growth in meat products : future challenges. Trends in Food Science and Technology 11 (11), 394–402.
- Shull, J., Cargo, G., Ernst, R., 1963. Kinetics of heat activation and of thermal death of bacterial spores. Applied Microbiology, 485–487.
- Skinner, G., Larkin, J., Rhodehamel, E., 1994. Mathematical modeling of microbial growth : a review. Journal of Food Safety 14, 175–217.
- Smelt, J., Silva, M. S. d., Hass, H., 1976. The combined influence of pH and water activity on the heat resistance of *Clostridium botulinum* type A and B. In : Barker, w. (Ed.), Spore research. Vol. 2. Academic press London New-York, San-Fransisco, pp. 469–476.
- Spiegelberg, C., 1940. Clostridium pasteurianum associated with spoilage of an acid canned fruit. Food Research 5, 115.
- Srivastava, O., Fitz-James, P., 1981. Alteration by heat activation of enzymes localized in spore coats of *Bacillus cereus*. Canadian Journal of Microbiology 27, 408–416.
- Stalheim, T., Granum, P., 2001. Characterization of spore appendages from *Bacillus cereus* strains. Journal of Applied Microbiology 91, 839–845.
- Stecchini, M., Torre, M. D., Donda, S., Maltini, E., Pacor, S., 2001. Influence of agar content on the growth parameters of *Bacillus cereus*. International Journal of Food Microbiology 64 (1-2), 81–88.
- Stephens, C., 1998. Bacterial sporulation : a question of commitment? Current Biology 8, R45–R48.
- Stringer, S. ., Peck, M., 1997. Combining heat treatment and subsequent incubation temperature to prevent growth from spores of non-proteolitic *Clostridium botulinum*. Journal of Applied Microbiology 82, 128–136.
- Stringer, S., Peck, M., 1996. Vegetable juice aids the recovery of heated spores of non-proteolytic *Clostridium botulunum*. Letters in Applied Microbiology 23, 407– 411.
- Sugiyama, H., 1951. Studies on factor affecting the heat resistance of spores of *Clostridium botulinum*. Journal of Bacteriology 62, 81–96.

- Sutherland, J., Aherne, A., Beaumont, A., 1996. Preparation and validation of growth model for *Bacillus cereus*: the effects of temperature, pH, sodium chloride and carbon dioxide. International Journal of Food Microbiology 30, 359–372.
- Tomassone, R., Audrain, S., Lesquoy-de Turckheim, E., Millier, C., 1992. La régression Nouveaux regards sur une ancienne méthode statistique. Masson.
- Tomassone, R., Dervin, C., Masson, J., 1993. Biométrie Modélisation de phénomènes biologiques. Masson.
- Tukey, J., 1958. Bias and confidence in not-quite large samples. (Abstract). Annals of Mathematical Statistics 29, 614.
- van Boekel, M., 2002. On the use of the weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. International Journal of Food Microbiology 74, 139–159.
- Vary, J., Halvorson, H., 1965. Kinetics of germination of *Bacillus spores*. Journal of Bacteriology 89 (5), 1340–1347.
- Vas, K., Proszt, G., 1957. Effect of temperature and hydrogen-ion concentration on the germination of *Bacillus cereus*. Nature 179, 1301–1302.
- Warth, A., 1978. Relationship between the heat resistance of spores and the optimum and maximum growth temperature of *Bacillus* species. Journal of Bacteriology 134 (3), 699–705.
- Weiss, H., 1921. The thermal death point of the spores of *Bacillus botulinus* in canned foods. Journal of Infection Disease 29, 362–368.
- Whiting, R., 1995. Microbial modeling in foods. Critical review in Food Science and Nutrition 35 (6), 467–494.
- Wijtzes, T., McClure, P., Zwietering, M., Roberts, T., 1993. Modeling bacterial growth of *Listeria monocytogenes* as a function of water activity, pH and temperature. International Journal of Food Microbiology 18, 139–149.
- Williams, A., Blackburn, C., Gibbs, P., 1992. Adavances in the use of predictive techniques to improve the safety and extend the shelf life of foods. Food Sciences and Technology Today 6 (3), 148–151.
- Williams, O., Reed, J., 1942. The significance of the incubation temperature of recovery culture in determining spore resistance to heat. Journal of Infection Disease 71, 225–227.
- Xezones, H., Hutching, I., 1965. Thermal resistance of *Clostridium botulinum* (62A) spores as affected by fundamental food constituents. Food Technology 19, 113–115.
- Zhao, L., Montville, T., Schaffner, D., 2000. Inoculum size of *Clostridium botuli*num 56A spores influences time-to-detection and percent growth-positive samples. Journal of Food Science 65 (8), 1369–1375.

- Zwietering, M., de Wit, J., Notermans, S., 1997. Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurised milk at the point of consumption. International Journal of Food Microbiology 30, 55–70.
- Zwietering, M., Jongenburger, J., Rombouts, F., Riet, K. V., 1990. Modeling the bacterial growth curve. Applied and Environmental Microbiology 56 (6), 1875– 1881.
- Zwietering, M., Koos, J. d., Hasenack, B., Wit, J. d., Riet, K. v., 1991. Modeling of bacterial growth as a function of temperature. Applied and Environmental Microbiology 57 (4), 1094–1101.
- Zwietering, M., Wijtzes, T., de Wit, J., Van't Riet, K., 1992. A decision support system for prediction of the microbial spoilage in foods. Journal of Food Protection 55 (12), 973–979.
- Zwietering, M., Wit, J. d., Notermans, S., 1996. Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurised milk at the point of consumption. International Journal of Food Microbiology 30, 55–70.