

TRAVAUX DE RECHERCHE

MEMOIRE

Présenté devant l'Université Paris XII Val de Marne

Par

Jean-Christophe AUGUSTIN

Maître de conférences à
l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

Pour l'obtention de l'

HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES
Sciences de la vie

Modélisation de la croissance microbienne et gestion de la sécurité sanitaire des aliments

soutenue publiquement le 2 décembre 2005
à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort
devant le jury composé de :

Pascal GUERET
Olivier CERF (rapporteur)
Marie Laure DELIGNETTE-MULLER (rapporteur)
Laurent ROSSO (rapporteur)
Vincent CARLIER
Jean-Louis JOUVE
Jacques POURQUIE

Professeur
Professeur
Maître de conférences
Directeur de recherches
Professeur
Professeur
Professeur

Je remercie les personnes qui ont contribué à l'obtention de ce diplôme.

Je remercie tout particulièrement Vincent Carlier pour la confiance qu'il m'a témoignée depuis le début et pour son soutien tout au long de ces années de recherches.

Je remercie Jacques Pourquoié qui suit mes travaux depuis plusieurs années et qui a accepté de me parrainer pour l'obtention de ce diplôme.

Je remercie Marie Laure Delignette-Müller, Olivier Cerf et Laurent Rosso, pionniers français de la microbiologie prévisionnelle, pour avoir accepté d'être rapporteurs de mon mémoire.

Je remercie Jean-Louis Jouve et Pascal Guéret qui me font l'honneur de participer à mon jury de soutenance.

Je remercie également toutes les personnes avec qui j'ai eu l'occasion de collaborer et qui ont contribué à la réussite des recherches décrites dans ce mémoire.

Je pense en particulier à Laurent Guillier dont les résultats de recherche sont largement présentés dans ce document et qui a enduré mon encadrement pendant trois longues années.

Je pense également aux collègues du pôle HQSA d'Alfort. En particulier, l'équipe microbiologie du CTSCCV pour leur collaboration "historique" qui, je l'espère, pourra se poursuivre dans le futur, et les unités du LERQAP avec qui j'espère que nous pourrons tisser des collaborations durables.

*Je dédie enfin ce travail à Séverine,
Alexia et Charlotte*

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	4
2. MODELISATION DE LA CROISSANCE MICROBIENNE	5
2.1. La cinétique de croissance des populations microbiennes	5
2.1.1. Description de la cinétique de croissance microbienne	5
2.1.2. Modèles déterministes décrivant la cinétique de croissance microbienne	6
2.1.3. Acquisition du temps de latence et du taux de croissance	6
Spectrophotométrie	7
Surface des colonies par analyse d'images	7
2.2. Effet des facteurs environnementaux sur le comportement des micro-organismes	8
2.2.1. Description de l'effet des facteurs environnementaux sur la croissance microbienne	8
2.2.2. Modèles décrivant l'effet des facteurs environnementaux sur le comportement des micro-organismes	9
Modélisation du taux de croissance	9
Modélisation du temps de latence	11
Interface croissance / non croissance	11
2.3. Effet de l'état physiologique des micro-organismes sur leur comportement	12
2.3.1. Description de l'effet de l'état physiologique sur le temps de latence des populations microbiennes	12
2.3.2. Modèles décrivant l'effet de l'état physiologique sur le temps de latence des populations microbiennes	12
2.4. Approche stochastique de la croissance microbienne	13
2.4.1. Lien entre la latence populationnelle et les latences cellulaires	13
2.4.2. Impact de l'état physiologique sur les latences cellulaires	15
2.4.3. Effet des conditions de croissance sur les latences cellulaires	15
2.4.4. Variabilité biologique des latences cellulaires	16
2.4.5. Modélisation des latences cellulaires et de la latence populationnelle	17
2.4.6. Impact du stress et des conditions de croissance sur la probabilité de croissance cellulaire	19
3. APPLICATION DES RECHERCHES A LA GESTION DE LA SECURITE SANITAIRE DES ALIMENTS	20
3.1. Appréciation quantitative des risques et impact des mesures de gestion des risques liés à la présence de micro-organismes pathogènes dans les aliments	20
3.1.1. Logiciel de prévision du comportement microbien – SYM'PREVIUS	20
3.1.2. Impact des mesures de gestion des risques	20
3.1.3. Classification des aliments vis-à-vis du danger représenté par <i>L. monocytogenes</i>	21
3.2. Détection des micro-organismes pathogènes dans les aliments	22
4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	22
REFERENCES	23

1. INTRODUCTION

La formalisation mathématique du comportement des micro-organismes dans les aliments, démarche connue sous le nom de “microbiologie prévisionnelle”, s’est développée à partir des années 1990. L’intérêt de cette science a été rapidement perçu par certains industriels agro-alimentaires qui y voyaient un outil supplémentaire leur permettant d’une part, de gérer les risques liés à la présence accidentelle de micro-organismes pathogènes ou d’altération dans leurs produits et, d’autre part, d’optimiser la formulation de ces produits ou de leurs procédés de fabrication en garantissant leur sécurité et leur salubrité. Les organismes publics se sont également intéressés à cette science, outil indispensable pour apprécier objectivement les risques liés à la présence de micro-organismes pathogènes dans les aliments.

Aujourd’hui, l’entrée en vigueur au 1^{er} janvier 2006 des nouveaux règlements européens en matière d’hygiène des aliments va encore renforcer l’importance de l’évaluation des risques comme démarche préalable à la mise en place de mesures de maîtrise adaptées. Au niveau mondial, les normes en matière de sécurité des aliments discutées au sein de la commission du *Codex Alimentarius* évoluent, quant à elles, vers la notion d’objectifs de sécurité des aliments. Il faudra donc, dans un futur proche, être capable de justifier de la performance sanitaire des mesures de maîtrise des risques sanitaires mises en place dans le domaine agro-alimentaire. Ceci ne peut être réalisé qu’au travers d’une démarche de modélisation des systèmes agro-alimentaires et de la dynamique des contaminants rencontrés dans ces systèmes.

J’ai axé l’essentiel de mon travail de recherche depuis environ 10 ans sur la modélisation du comportement microbien dans les aliments afin de développer les outils permettant aux industriels agro-alimentaires et aux pouvoirs publics d’apprécier et de gérer objectivement les risques sanitaires liés à la présence de micro-organismes pathogènes dans les aliments. Ce mémoire présente donc dans une première partie les principaux résultats scientifiques obtenus puis, dans une deuxième partie, l’utilisation de ces résultats dans un contexte opérationnel d’évaluation et de gestion des risques.

Ces résultats sont issus de ma thèse de Doctorat et de mon activité de recherche en tant que maître de conférences à l’Ecole Nationale Vétérinaire d’Alfort. Pendant cette période, j’ai co-encadré avec Pierre Pardon la thèse de Doctorat de Laurent Guillier qui a travaillé sur la caractérisation des latences cellulaires de *Listeria monocytogenes*, programme de recherche faisant l’objet d’un soutien financier des Ministères en charge de l’Agriculture et de la Recherche (convention du programme interministériel Aliment-Qualité-Sécurité R02/04 Décembre 2002 – Février 2006).

2. MODELISATION DE LA CROISSANCE MICROBIENNE

2.1. La cinétique de croissance des populations microbiennes

2.1.1. Description de la cinétique de croissance microbienne

Depuis la première description de Buchanan (1918), il est classique de distinguer plusieurs phases dans la croissance des cultures bactériennes. Ces phases sont caractérisées par certaines valeurs ou variations de la vitesse de multiplication de la culture. On reconnaît classiquement les sept phases successives suivantes (Fig. 1) :

- i) la phase stationnaire initiale ou phase de latence. Elle est caractérisée par une vitesse de multiplication nulle. Cette phase correspond à une période d'adaptation de l'inoculum à son nouvel environnement de croissance. La durée de cette période dépend de la nature du milieu d'accueil, de l'état physiologique des cellules inoculées et éventuellement de la taille de l'inoculum;
- ii) la phase d'augmentation de la vitesse de croissance qui passe plus ou moins rapidement de zéro à sa valeur maximale ;
- iii) la phase de croissance à vitesse constante maximale ou phase de croissance exponentielle. Elle se présente sous la forme d'une portion linéaire lorsque l'on représente l'évolution du logarithme de la concentration bactérienne ou de la biomasse en fonction du temps. Pour une bactérie donnée, la valeur de cette vitesse de croissance maximale dépend des caractéristiques du milieu de culture ;
- iv) la phase de diminution de la vitesse de croissance qui progressivement devient nulle ;
- v) la phase stationnaire maximale ou plus simplement phase stationnaire qui correspond à un arrêt de la croissance, la culture atteint alors sa densité maximale. Le ralentissement puis l'arrêt de la croissance sont dus à l'épuisement d'une substance nutritive ou à toutes autres modifications des propriétés du milieu de culture le rendant impropre à la croissance des micro-organismes ;
- vi) la phase de début de décroissance ;
- vii) la phase de décroissance.

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

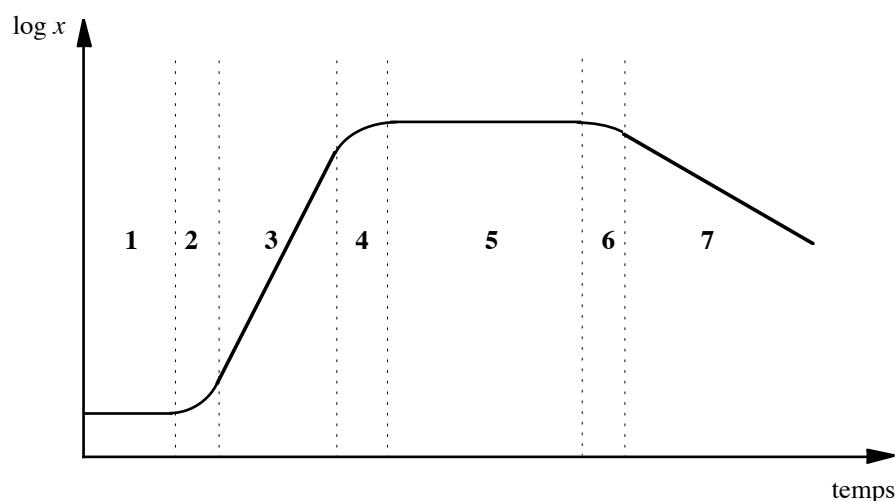


Fig. 1. Courbe de croissance d'une culture bactérienne et ses différentes phases (Buchanan, 1918). x représente la densité ou la biomasse de la culture. Les phases sont : (1) phase stationnaire initiale ou de latence, (2) phase d'accélération de la croissance, (3) phase de croissance à vitesse constante,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

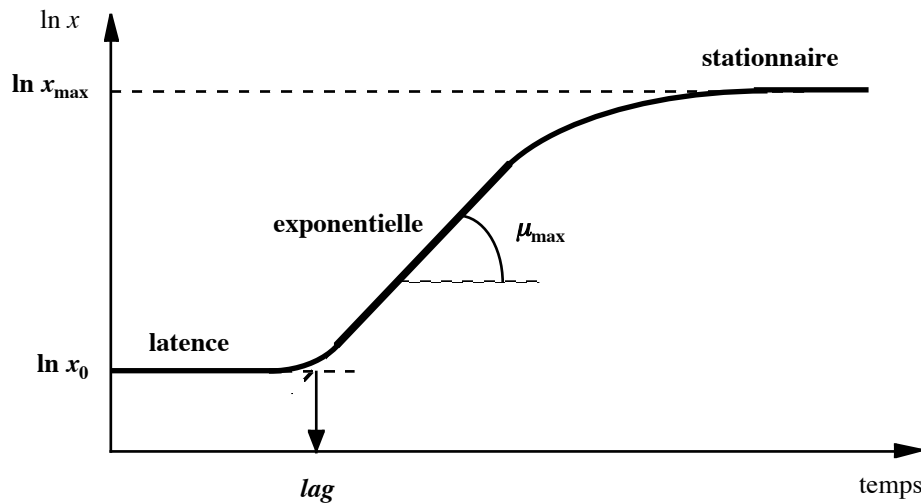


Fig. 2. Principales phases de la courbe de croissance bactérienne et paramètres qui les caractérisent. lag est le temps de latence, $\mu_{\max}$ est le taux de croissance maximum, x_0 et $x_{\max}$ sont les densités cellulaires initiale et maximale.

Le temps de latence, lag , est défini par convention comme étant l'intersection de la droite correspondant à la phase exponentielle (en coordonnées semi-logarithmiques) avec la droite horizontale passant par la concentration initiale, x_0 (Fig. 2). La vitesse de multiplication ou taux de croissance (vitesse de croissance par unité de densité) maximum, $\mu_{\max}$, est la pente correspondant à la phase exponentielle (en coordonnées semi-logarithmiques).

2.1.2. Modèles déterministes décrivant la cinétique de croissance microbienne

Plusieurs modèles primaires de croissance ont été proposés pour décrire la cinétique de croissance des populations microbiennes dans un environnement donné. Les plus utilisés sont les modèles de Gompertz (Gibson *et al.*, 1987 ; Zwietering *et al.*, 1990), de Baranyi (Baranyi *et al.*, 1993 ; Baranyi et Roberts, 1994) ou le modèle logistique avec délai et rupture (Kono, 1968 ; Broughall *et al.*, 1983 ; Rosso, 1995). Ces modèles sont de la forme :

$$\ln x(t) = f(t, \Theta_1) + \varepsilon_t \quad (1)$$

où $x(t)$ est la concentration microbienne à l'instant t , f est la fonction de régression, Θ_1 est le vecteur des paramètres primaires, $\Theta_1 = (x_0, x_{\max}, lag, \mu_{\max})$ avec x_0 , concentration microbienne initiale, $x_{\max}$, concentration microbienne maximale, lag , temps de latence, $\mu_{\max}$, taux de croissance maximum, ε_t est l'erreur (ou résidu) associée à l'observation $\ln x(t)$.

Les ajustements de ces modèles aux courbes de croissance obtenues par dénombrement bactérien sur boîtes de Pétri sont réalisés sur le logarithme de la concentration cellulaire car cette transformation permet de stabiliser la variance des résidus (Dalgaard *et al.*, 1994).

2.1.3. Acquisition du temps de latence et du taux de croissance

La technique classique d'acquisition des courbes de croissance microbienne fait appel aux méthodes de dénombrement bactérien sur boîtes de Pétri. Ces méthodes étant coûteuses et laborieuses, nous nous sommes orientés vers des méthodes alternatives automatisées permettant d'acquérir plus facilement les principaux paramètres caractérisant la croissance des micro-organismes que sont le temps de latence et le taux de croissance.

Nous avons développé une méthode basée sur la spectrophotométrie pour la croissance en milieu liquide et une méthode basée sur la mesure de la surface de colonies pour la croissance sur milieu solide.

Spectrophotométrie

La mesure de la densité optique (DO) avec des spectrophotomètres automatiques permet de suivre en temps réel la croissance de la biomasse bactérienne dans les milieux de culture translucides et ceci pour un coût modéré. Nous avons utilisé un spectrophotomètre automatique : le Bioscreen C (Labsystem, Labsystem France SA, Les Ulis, France). Cet appareil est piloté par un logiciel d'exploitation sur micro-ordinateur PC et permet de suivre simultanément jusqu'à 200 cinétiques d'évolution de la DO de cultures microbiennes (2 plaques Honeycomb de 100 puits). La température d'incubation des plaques et l'intervalle de temps entre deux lectures sont programmables selon les besoins de l'utilisateur (il faut cependant noter qu'en cas de réfrigération, la température d'incubation est au mieux inférieure de 5°C à la température ambiante, cela nécessite l'utilisation d'une chambre froide pour des températures d'incubation faibles).

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

Nous avons proposé une méthode simple d'acquisition des paramètres de croissance de *L. monocytogenes* basée sur la spectrophotométrie permettant d'obtenir des estimations similaires à celles obtenues avec la technique de dénombrement sur boîtes (Augustin *et al.*, 1999). Cette technique nécessite seulement l'acquisition du début des cinétiques d'accroissement de la DO ($DO \leq 0.1$) pour obtenir des estimations précises du taux de croissance maximum connaissant le facteur de correction à appliquer aux taux de croissance estimés sur la DO. Ce facteur de correction était constant pour 10 souches de *L. monocytogenes* pour des croissances à des températures comprises entre 4.0 et 35.4°C. L'estimation précise du temps de latence ne peut être réalisée uniquement sur des données spectrophotométriques et nécessite de connaître la concentration bactérienne initiale et le temps permettant d'obtenir une concentration donnée lors de la croissance. Cette technique a été utilisée pour la mise au point d'un modèle d'évolution du temps de latence à la re-croissance des populations de *L. monocytogenes* en fonction des conditions de pré-incubation (*cf.* 2.3.2).

Nous avons également utilisé cette technique pour l'acquisition des temps de latence individuels de cellules de *L. monocytogenes* stressées par des chocs physico-chimiques divers (*cf.* 2.4). Dans ce cas, nous avons pu montrer que le temps de latence de cellules en phase de croissance exponentielle placées dans de nouvelles conditions de croissance était quasiment nul (Guillier *et al.*, 2005b). Les temps de latence individuels des cellules stressées peuvent alors être déduits des temps de détection de la DO (temps nécessaires pour observer une augmentation de la DO de 0.05) en leur retranchant le temps de détection des cellules inoculées en phase exponentielle et incubées dans les mêmes conditions (Fig. 3).

Surface des colonies par analyse d'images

Nous avons utilisé le même principe que pour la spectrophotométrie pour l'étude des temps de latence individuels de cellules de *L. monocytogenes* lors de leur croissance sur milieu solide (Guillier *et al.*, 2005b). Dans ce cas, nous mesurons de façon automatique par analyse d'images la surface de colonies croissant sur un milieu gélosé et nous avons pu montrer que le temps de détection de la surface (temps nécessaire pour observer une surface de colonie donnée) était corrélé au temps de latence des cellules. Ce temps de latence pour des cellules stressées, est comme dans le cas de la DO, déduit du temps de détection de leur surface en retranchant le temps de détection de la surface de cellules inoculées en phase exponentielle et incubées dans les mêmes conditions (Fig. 3).

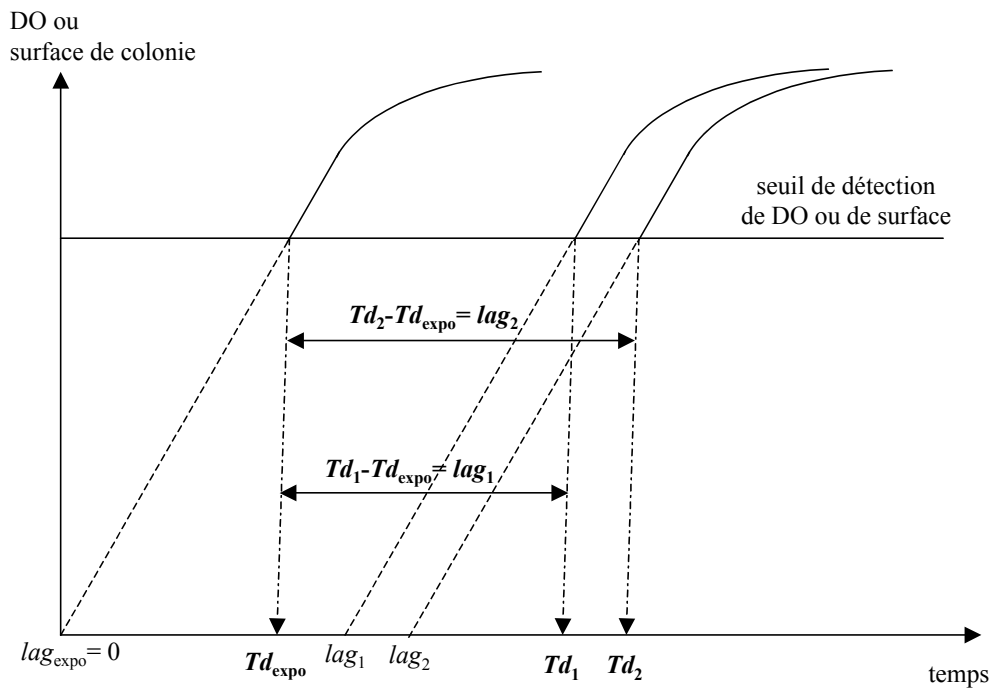


Fig. 3. Principes des méthodes d'acquisition des temps de latence cellulaires par spectrophotométrie en milieu liquide et par mesure de la surface des colonies sur milieu solide. lag_{expo} est le temps de latence de cellules inoculées en phase exponentielle, lag_1 et lag_2 sont les temps de latence de deux cellules stressées, Td_{expo} est le temps de détection de la DO ou de la surface des cellules inoculées en phase exponentielle, Td_1 et Td_2 sont les temps de détection des deux cellules stressées.

2.2. Effet des facteurs environnementaux sur le comportement des micro-organismes

2.2.1. Description de l'effet des facteurs environnementaux sur la croissance microbienne

Les facteurs écologiques susceptibles d'agir sur le comportement et donc la croissance des micro-organismes au sein des aliments sont classés en cinq groupes (Mossel et Ingram, 1955 ; Mossel, 1983). On trouve (Fig. 4) :

- i) les facteurs intrinsèques. Ce sont les caractéristiques physico-chimiques d'un aliment. Ils englobent le pH, l'activité de l'eau, le potentiel d'oxydoréduction, les substances antimicrobiennes, la composition en nutriments et la structure de l'aliment ;
- ii) les facteurs technologiques. Ce sont les traitements délibérément appliqués aux aliments généralement dans le but de détruire la flore microbienne. Ils consistent pour l'essentiel en l'application de chaleur, de radiations U.V. ou ionisantes, de hautes pressions hydrostatiques, ou en des modifications de la structure de l'aliment (émulsions) ;
- iii) les facteurs extrinsèques. Ils sont appliqués pendant la conservation des denrées alimentaires. Ils consistent essentiellement en l'utilisation de froid positif ou négatif et d'atmosphères modifiées ;
- iv) les facteurs microbiens. Ce sont les interactions qui peuvent exister avec les autres micro-organismes présents dans l'aliment. Ils peuvent favoriser ou ralentir la croissance des micro-organismes étudiés ;
- v) les effets combinés. Ce sont les interactions qui peuvent exister entre les facteurs cités auparavant. L'effet d'un facteur écologique sur un micro-organisme est généralement dépendant du niveau des autres facteurs. On peut ainsi observer des synergies ou des antagonismes entre les facteurs. Les synergies entre facteurs environnementaux ont été illustrées par Leistner et Rödel (1976) avec le concept des barrières ("hurdle concept").

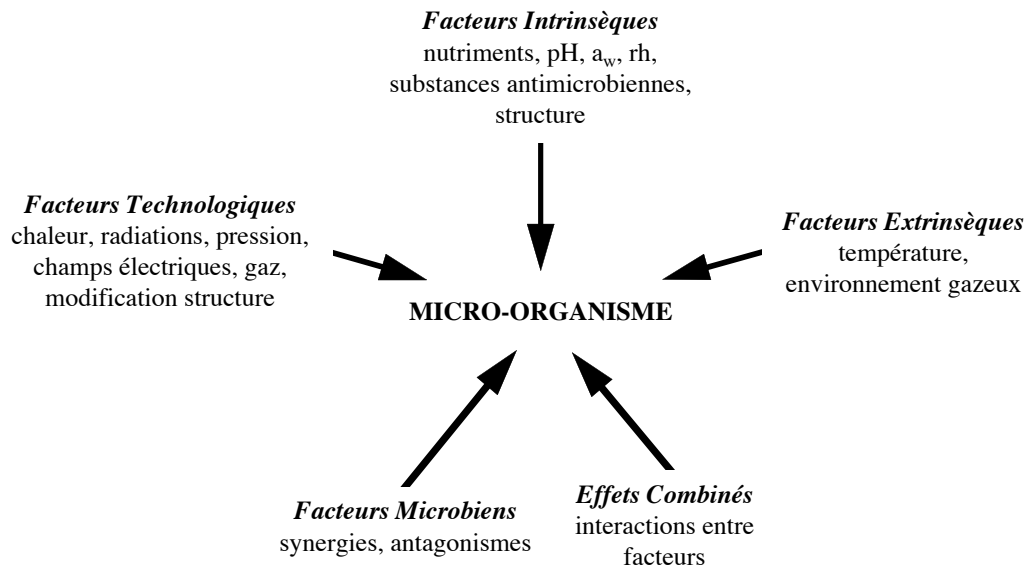


Fig. 4 Nature des facteurs environnementaux agissant sur le comportement des micro-organismes dans les aliments.

2.2.2. Modèles décrivant l'effet des facteurs environnementaux sur le comportement des micro-organismes

Les modèles secondaires permettent de décrire l'influence des facteurs environnementaux sur les paramètres de croissance primaires : taux de croissance maximum et temps de latence. Des modèles ont également été développés afin de définir les conditions environnementales permettant ou non la croissance des micro-organismes et s'attachent essentiellement à modéliser la frontière entre les conditions permettant la croissance et celles ne la permettant pas (modélisation de l'interface croissance / non croissance).

Modélisation du taux de croissance

De nombreux modèles d'évolution du taux de croissance maximum en fonction de l'environnement ont été proposés dans la littérature, ces modèles s'écrivent :

$$\sqrt{\mu_{\max}} = g(e_i, \Theta_2) + \varepsilon_i \quad (2)$$

où e_i est le vecteur de facteurs environnementaux, g est une fonction de régression, Θ_2 est le vecteur des paramètres secondaires apparaissant dans la fonction de régression, ε_i est l'erreur (ou résidu) associée à l'observation $\sqrt{\mu_{\max}}$.

Les ajustements de ces modèles sont réalisés sur la racine carrée du taux de croissance afin de stabiliser la variance des résidus (Zwietering *et al.*, 1990 ; Ratkowsky *et al.*, 1991, 1996).

Les modèles les plus utilisés sont les modèles polynomiaux, les modèles de type racine carrée et les modèles cardinaux. Pour décrire l'effet de la température, du pH et de l'activité de l'eau (a_w) sur le taux de croissance, notre choix s'est porté sur les modèles cardinaux (Rosso *et al.*, 1995) :

$$g(X, \Theta_2) = \sqrt{\mu_{\text{opt}(X)} \cdot CM_n(X)} \quad (3)$$

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

où X est la température, le pH ou l' a_w , $\Theta_2 = (\mu_{\text{opt}(X)}, X_{\min}, X_{\text{opt}}, X_{\max})$, $X_{\min}$ est la valeur cardinale minimale de croissance, X_{opt} est la valeur cardinale optimale de croissance pour laquelle

$\mu_{\max}$ est égal à sa valeur optimale $\mu_{\text{opt}(X)}$, $X_{\max}$ est la valeur cardinale maximale de croissance et n est un paramètre de forme.

Pour décrire l'effet des substances inhibitrices, nous avons utilisé un modèle de type racine carrée (Devlieghere *et al.*, 2001 ; Giménez et Dalgaard, 2004) :

$$g(c, \Theta_2) = \sqrt{\mu_{\text{opt}(c)} \cdot SR(c)} \quad (4)$$

$$SR_n(c) = \begin{cases} \left(1 - \frac{c}{MIC}\right)^n, & c < MIC \\ 0, & c \geq MIC \end{cases}$$

où c est la concentration en inhibiteur, $\Theta_2 = (\mu_{\text{opt}(c)}, MIC)$, MIC est la concentration minimale inhibitrice, $\mu_{\text{opt}(c)}$ est la valeur optimale de $\mu_{\max}$ lorsque $c = 0$ et n est un paramètre de forme.

Notre travail a consisté à développer les modèles secondaires existants en y intégrant l'effet des interactions pouvant exister entre facteurs environnementaux. En 2000, nous avons proposé un modèle général permettant de décrire, pour *L. monocytogenes*, l'influence de la température, du pH, de l' a_w et de différentes substances inhibitrices dans le domaine sub-optimal de croissance (Augustin et Carlier, 2000a, 2000b). Pour la construction de ce modèle (éq. 5), nous avons conservé une approche modulaire pour l'effet de chaque facteur et nous avons émis l'hypothèse que les valeurs cardinales minimales de croissance ainsi que les concentrations minimales inhibitrices des conservateurs varient en fonction du niveau des autres facteurs environnementaux. Cette approche a permis d'améliorer sensiblement les prévisions de croissance près de l'interface croissance / non croissance de la bactérie mais certains auteurs ont montré par la suite que ce modèle surestimait parfois l'effet des interactions entre facteurs environnementaux et pouvait ainsi conduire à des sous-estimations de la vitesse de croissance de *L. monocytogenes*.

$$\mu_{\max} = \mu_{\text{opt}} \cdot CM_2^\circ(T) \cdot CM_1^\circ(pH) \cdot CM_2^\circ(a_w) \cdot \prod_j \left(SR_i^\circ(c_j) \right)^2 \quad (5)$$

$$\text{avec } X_{i, \min} = X_{i, \text{opt}} - (X_{i, \text{opt}} - X_{i, \min}^\circ) \cdot \left[\prod_j (1 - c_j / MIC_j^\circ) - \sum_{k \neq i} \left(\frac{X_{k, \text{opt}} - X_{k, \min}^\circ}{X_{k, \text{opt}} - X_{k, \min}^\circ} \right)^3 \right]^{\frac{1}{3}}, \quad MIC_j = MIC_j^\circ \cdot \left[1 - \frac{\sum_i \left(\frac{X_{i, \text{opt}} - X_{i, \min}^\circ}{X_{i, \text{opt}} - X_{i, \min}^\circ} \right)^3}{\prod_{k \neq j} (1 - c_k / MIC_k^\circ)} \right]$$

En 2002, un modèle basé sur une approche similaire a été proposé par Le Marc *et al.* (2002) pour *L. monocytogenes* (éq. 6), celui-ci inclut une fonction permettant de décrire l'influence des interactions entre la température, le pH et la concentration en acide organique (sous sa forme indissociée AH) dans une zone plus restreinte du domaine de croissance.

$$\mu_{\max} = \mu_{\text{opt}} \cdot CM_2(T) \cdot CM_1(pH) \cdot SR_{0.5}([AH]) \cdot \xi(T, pH, [AH]) \quad (6)$$

$$\xi = \begin{cases} 1, & \psi \leq 0.5 \\ 2 \cdot (1 - \psi), & 0.5 < \psi < 1 \text{ et } \psi = \sum_i \frac{\varphi(i)}{2 \cdot \prod_{j \neq i} (1 - \varphi(j))} \\ 0, & \psi \geq 1 \end{cases}$$

$$\text{avec } \varphi(T) = \left(1 - \sqrt{CM_2(T)}\right)^2, \quad \varphi(pH) = \left(1 - CM_1(pH)\right)^2, \quad \varphi([AH]) = \left(1 - SR_{0.5}([AH])\right)^2$$

Nous avons récemment proposé une nouvelle version du modèle de croissance (éq. 7) reprenant les deux approches précédentes (Augustin *et al.*, 2005). Nous avons utilisé une fonction d'interaction du type de celle proposée par Le Marc *et al.* (2002) en gardant une forme d'interface croissance / non croissance similaire à celle que nous avons proposée en 2000. Les qualités de ce modèle pour la prévision de la croissance de *L. monocytogenes* se sont révélées meilleures que celles d'autres modèles candidats intégrant ou non les interactions entre facteurs environnementaux tout en gardant un formalisme relativement simple.

$$\mu_{\max} = \mu_{\text{opt}} \cdot CM_2(T) \cdot CM_1(pH) \cdot SR_1(a_w) \cdot \prod_j SR_1(c_j) \cdot \xi(T, pH, a_w, c_j) \quad (7)$$

$$\xi = \begin{cases} 1, & \psi \leq 0.5 \\ 2 \cdot (1 - \psi), & 0.5 < \psi < 1 \text{ et } \psi = \sum_k \frac{\varphi(k)}{2 \cdot \prod_{l \neq k} (1 - \varphi(l))} \\ 0, & \psi \geq 1 \end{cases}$$

avec $\varphi(X_i) = \left(\frac{X_{\text{opt},i} - X}{X_{\text{opt},i} - X_{\text{min},i}} \right)^3$, $\varphi(c_j) = 1 - \prod_j SR_1(c_j)$

L'étude de 82 travaux sur la croissance de *L. monocytogenes* issus de différentes équipes nous a permis de caractériser la dispersion des paramètres de ce modèle. Bien que cette dispersion globale reflète la variabilité biologique de *L. monocytogenes* mais également l'incertitude sur les paramètres, ces observations ont permis de définir des intervalles de confiance pour la prévision du taux de croissance de *L. monocytogenes* dans les produits laitiers, les viandes et les poissons. Une forme complète du modèle intégrant l'effet de la température, du pH, de l' a_w , du taux de nitrites, du taux de phénols et de la teneur en CO_2 de l'atmosphère de conditionnement des aliments a été proposée. Nous avons également proposé une forme simplifiée qui ne prend en compte que les principaux facteurs écologiques : température, pH et a_w . Cette forme permet de prévoir le comportement de *L. monocytogenes* dans les aliments même en l'absence de données sur les concentrations en conservateurs.

Modélisation du temps de latence

En ce qui concerne le temps de latence, il est généralement admis que quelles que soient les conditions de croissance, celui-ci est inversement proportionnel au taux de croissance maximum (Zwietering *et al.*, 1994 ; Rosso, 1995, 1998) lorsque les conditions pré-incubatoires sont identiques. Bien que, dans certaines études (Delignette-Muller, 1998 ; Robinson *et al.*, 1998), une influence significative des conditions de croissance sur le produit $\mu_{\max} \text{lag}$ ait été observée, Delignette-Muller (1998) a montré que la relation suivante reste satisfaisante dans la majorité des cas et répond au critère de parcimonie :

$$\ln(\mu_{\max} \cdot \text{lag}) = \ln K + \varepsilon_i \quad (8)$$

où K est une constante dépendant de l'état physiologique de l'inoculum et ε_i est l'erreur (ou résidu) associée à l'observation $\ln(\mu_{\max} \cdot \text{lag})$.

Les ajustements de ce modèle sont réalisés sur le logarithme du produit $\mu_{\max} \cdot \text{lag}$ afin de stabiliser la variance des résidus.

Interface croissance / non croissance

Parallèlement à la modélisation du taux de croissance, nous avons également proposé une fonction (équ. 9) permettant de décrire la probabilité de croissance de *L. monocytogenes* dans les aliments en fonction de leurs caractéristiques et de leur température de conservation (Augustin *et al.*, 2005).

$$P = \frac{1}{1 + \exp[a \cdot (b - \theta)]} \quad (9)$$

$$\theta = 1 - \sum_i \left(\frac{X_{i,\text{opt}} - X_i}{X_{i,\text{opt}} - X_{i,\text{min}}} \right)^3 - \sum_j \frac{c_j}{\text{MIC}_j}$$

où P est la probabilité de croissance, a et b sont les paramètres du modèle.

2.3. Effet de l'état physiologique des micro-organismes sur leur comportement

2.3.1. Description de l'effet de l'état physiologique sur le temps de latence des populations microbiennes

Comme nous l'avons signalé auparavant, la phase de latence correspond à une phase d'adaptation des cellules inoculées à leur nouvel environnement. On peut donc imaginer que la durée de la phase de latence dépend du travail (biosynthèses, adaptations métaboliques) que les cellules doivent accomplir avant d'entrer en division et de la vitesse à laquelle elles sont capables de réaliser ce travail (Robinson *et al.*, 1998). Cette conception rejoint l'hypothèse selon laquelle la croissance des populations bactériennes serait contrôlée par une entité qui doit atteindre une concentration cellulaire critique avant que la division cellulaire ne se produise (Cooper, 1991 ; Baranyi *et al.*, 1993 ; Baranyi et Roberts, 1994 ; Hills et Wright, 1994). Cette entité est généralement supposée augmenter de façon exponentielle pendant la phase de latence à une vitesse égale au taux de croissance maximum (Koch, 1987, 1995 ; Hills et Wright, 1994 ; Baranyi et Roberts, 1994). Cela revient à supposer que la vitesse à laquelle est réalisé le travail nécessaire à l'entrée en croissance dépend uniquement des conditions de croissance et que cette vitesse est égale au taux de croissance maximum. Le produit $\mu_{\max} \cdot lag$ peut donc être interprété d'un point de vue physiologique comme le travail que les cellules doivent accomplir avant d'entrer en division.

L'augmentation du temps de latence lorsque des stress physiques tels que chaleur ou radiations ionisantes sont appliqués aux cellules avant leur mise en culture a fréquemment été signalée dans la littérature (Kaufman *et al.*, 1959 ; Jackson et Woodbine, 1963 ; Mackey et Derrick, 1982 ; Bréand *et al.*, 1997, 1999 ; McKellar *et al.*, 1997). Ceci correspond bien à une augmentation du travail qu'une cellule doit accomplir avant d'entrer en division puisqu'elle doit réparer les dommages métaboliques et cellulaires subis.

Même en l'absence de traitement agressif, les conditions de pré-incubation peuvent influencer la durée de la phase de latence à la re-croissance. Il a ainsi été observé que l'histoire thermique d'un inoculum avait une influence significative sur la durée de la phase de latence lors de la croissance qui suit (Buchanan et Klawitter, 1991 ; Walker *et al.*, 1990 ; Hudson, 1993 ; Gay *et al.*, 1996 ; Dufrenne *et al.*, 1997). Le même phénomène adaptatif pourrait exister avec le pH car Johansen *et al.* (1994) ont signalé une élimination de la phase de latence lorsque, avant de cultiver des cellules à pH 5.5, celles-ci étaient pré-incubées au même pH. La dépendance du temps de latence vis-à-vis de l'histoire de l'inoculum peut enfin être illustrée par un résultat de George et Lund (1992) qui ont observé que des cellules en phase exponentielle de croissance reprenaient immédiatement leur croissance lorsqu'elles étaient transférées dans un milieu de culture frais.

L'histoire de l'inoculum, et en particulier son histoire thermique, influence donc fortement la durée de la phase de latence lors de la re-croissance.

2.3.2. Modèles décrivant l'effet de l'état physiologique sur le temps de latence des populations microbiennes

En 2000, nous avons proposé un modèle (eq. 10) permettant de décrire l'évolution de la latence de *L. monocytogenes* en fonction de l'histoire thermique (température de croissance et durée) de l'inoculum (Augustin *et al.*, 2000b). Ce modèle permet de prédire le temps de latence de cultures placées en conditions dynamiques de température.

$$\mu_{\max} \cdot lag = \text{Sup} \left(\mu_i \cdot (lag_i - t_i); 0; \sqrt{\nu \cdot (t_i - t_s)} \right) \quad (10)$$

$$\nu = 0.035 \cdot \mu_i \text{ et } t_s = -37.4 + 2.70 \cdot \left(lag_i + \frac{1}{\mu_i} \cdot \ln \left(\frac{x_{\max}}{x_0} \right) \right)$$

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

2.4. Approche stochastique de la croissance microbienne

Nous avons montré (Augustin *et al.*, 2000a) que l'approche déterministe classique de la croissance des micro-organismes n'était pas suffisante et que dans les conditions de contamination naturelle des aliments par des cellules stressées en très faible quantité, il était nécessaire d'évoluer vers une approche stochastique de la croissance microbienne en étudiant le comportement individuel de chacune des cellules contaminantes.

2.4.1. Lien entre la latence populationnelle et les latences cellulaires

Les modèles déterministes de croissance présentés dans la partie 2.1.2. supposent que le temps de latence est indépendant du nombre de cellules initiales présentes dans la population microbienne. Si, par contre, on conçoit la cinétique de croissance d'une population microbienne comme la somme des comportements individuels des cellules la constituant, ce modèle n'est pas juste et constitue une approximation uniquement valable dans le cas de populations microbiennes importantes. La Fig. 5 montre ainsi que lorsque la densité cellulaire initiale augmente, la latence populationnelle est de moins en moins variable et converge assez rapidement vers une limite qui est le temps de latence classiquement mesuré lorsque l'on étudie le comportement des populations microbiennes.

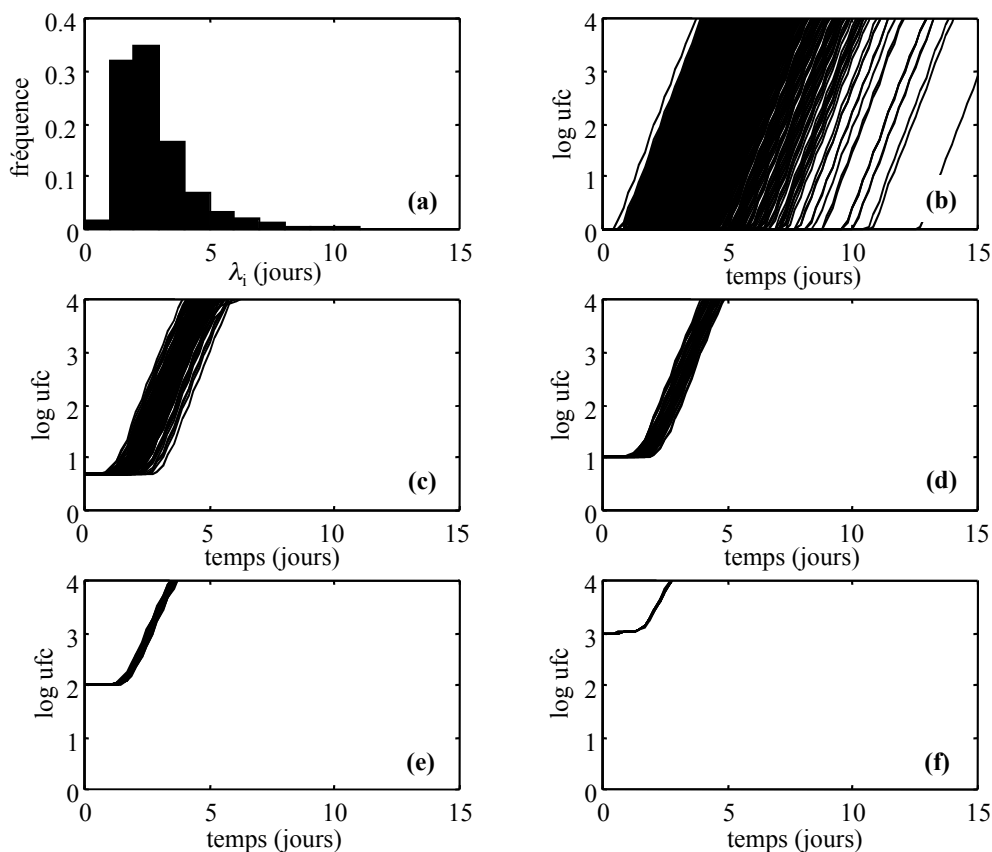


Fig. 5 Influence de la densité cellulaire initiale et de la variabilité du temps de latence individuel sur la latence des populations microbiennes : (a) distribution statistique des temps de latence cellulaires (λ_i), (b) comportements individuels des cellules, (c) variabilité de comportement de populations issues de 5 cellules, (d) variabilité de comportement de populations issues de 10 cellules, (e) variabilité de comportement de populations issues de 100 cellules, (f) variabilité de comportement de populations issues de 1000 cellules.

Baranyi (1998) et Kotalik *et al.* (2005) ont montré que la latence d'une population microbienne, lag , était liée aux latences individuelles, λ_i , des cellules la constituant selon l'équation suivante :

$$lag(x_0) = -\frac{1}{\mu_{\max}} \cdot \ln \left(\frac{1}{x_0} \sum_{i=1}^{x_0} \exp(-\mu_{\max} \cdot \lambda_i) \right) \quad (11)$$

$$\text{et } \lim_{x_0 \rightarrow \infty} lag(x_0) = lag = -\frac{1}{\mu_{\max}} \cdot \ln \left(E[\exp(-\mu_{\max} \cdot \lambda)] \right)$$

où $E[X]$ est l'espérance mathématique de la variable aléatoire X .

La latence populationnelle d'une population microbienne dépend donc de la distribution statistique des latences individuelles des cellules la constituant. Cette distribution influence la valeur de la latence populationnelle mais également la phase d'accélération de la croissance dont la durée dépendra de la dispersion de la distribution (Fig. 6).

La contamination des aliments par des bactéries pathogènes se faisant habituellement à très faible taux, l'appréciation du comportement de ces micro-organismes dans les aliments ne peut être correctement effectuée qu'en connaissant la variabilité des comportements cellulaires individuels. Nous avons donc réalisé des travaux destinés à caractériser les distributions des latences cellulaires de *L. monocytogenes* dans différents états physiologiques, dans différentes conditions de croissance et pour différentes souches de cette espèce.

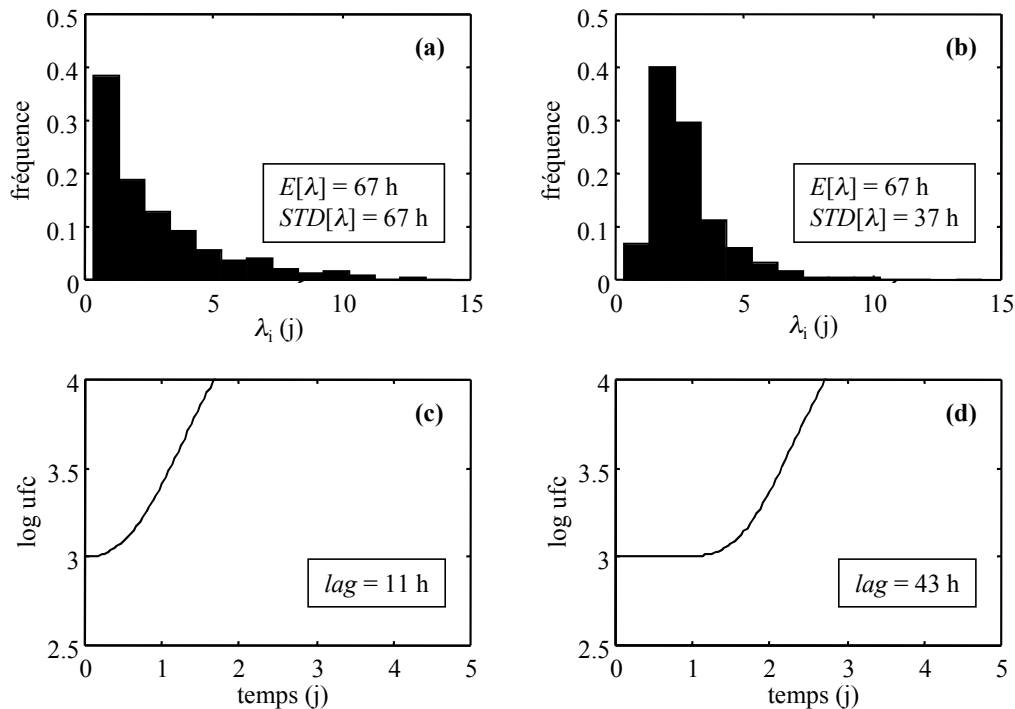


Fig. 6 Influence de la forme de la distribution statistique des temps de latence individuels sur la latence des populations microbiennes et sur la phase d'accélération de la croissance : (a) distribution exponentielle des latences cellulaires ($E[\lambda]$, espérance mathématique des latences individuelles, $STD[\lambda]$, écart-type des latences individuelles), (b) distribution des valeurs extrêmes des latences cellulaires, (c) cinétique de croissance d'une population microbienne composée de 1 000 cellules issues de la distribution décrite en (a), (d) cinétique de croissance d'une population microbienne composée de 1 000 cellules issues de la distribution décrite en (b).

2.4.2. Impact de l'état physiologique sur les latences cellulaires

Les stress engendrés par des chocs physico-chimiques rencontrés par les cellules microbiennes dans les environnements de production des industries agro-alimentaires ou lors des étapes des procédés de fabrication ont un impact plus ou moins grand sur les latences cellulaires de *L. monocytogenes*. Nous avons ainsi observé (Guillier *et al.*, 2005a) que la moyenne et l'écart-type des latences varient considérablement en fonction de l'état physiologique des cellules (Fig. 7a). Cet effet sur les latences individuelles semble, de plus, très difficile à prévoir et n'est pas lié à l'impact du choc sur la viabilité cellulaire (Fig. 7b).

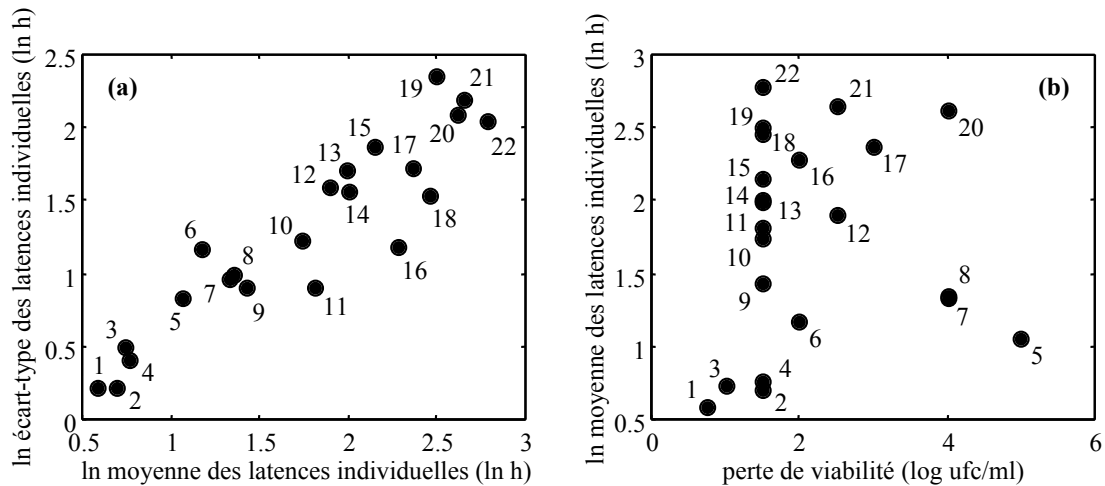


Fig. 7 Impact des chocs physico-chimiques sur (a) la moyenne et l'écart-type des latences individuelles de *L. monocytogenes* et (b) relation entre la perte de viabilité entraînée par ces chocs et la moyenne des latences cellulaires.

Chocs subis : (1) combinaison acide (lactique) + osmotique (NaCl), (2) acide (HCl), (3) osmotique (NaCl), (4) froid (-25°C), (5) froid (-25°C), (6) combinaison osmotique (NaCl) + chimique (phénol) + froid (-18°C), (7) combinaison acide (lactique) + osmotique (NaCl) (8) combinaison osmotique (NaCl) + acide (lactique) (9) acide (lactique), (10) par désinfectant (hypochlorite), (11) acide (lactique), (12) combinaison acide (lactique) + osmotique (NaCl) + désinfectant (hypochlorite), (13) osmotique (NaCl), (14) alcalin (NaOH), (15) nutritionnel, (16) combinaison nutritionnel + osmotique (NaCl), (17) combinaison nutritionnel + chaud (55°C), (18) combinaison acide (lactique) + osmotique (NaCl), (19) par désinfectant (chlorure de benzalkonium), (20) combinaison osmotique (NaCl) + acide (lactique), (21) osmotique (NaCl), (22) chaud (55°C).

2.4.3. Effet des conditions de croissance sur les latences cellulaires

Nous avons pu observer que, pour un état physiologique donné, l'effet des conditions de croissance sur les latences cellulaires est totalement prévisible (Guillier et Augustin, 2005a, 2005b) et qu'il existe une relation de proportionnalité entre la moyenne et l'écart-type des latences individuelles (Fig. 8). Cette proportionnalité est compatible avec l'hypothèse classique de produit $\mu_{\max}lag$ constant et ceci au niveau cellulaire. Nous avons ainsi observé que les distributions des produits $\mu_{\max}\lambda_i$ individuels n'étaient pas significativement influencées par les conditions de croissance (Fig. 9).

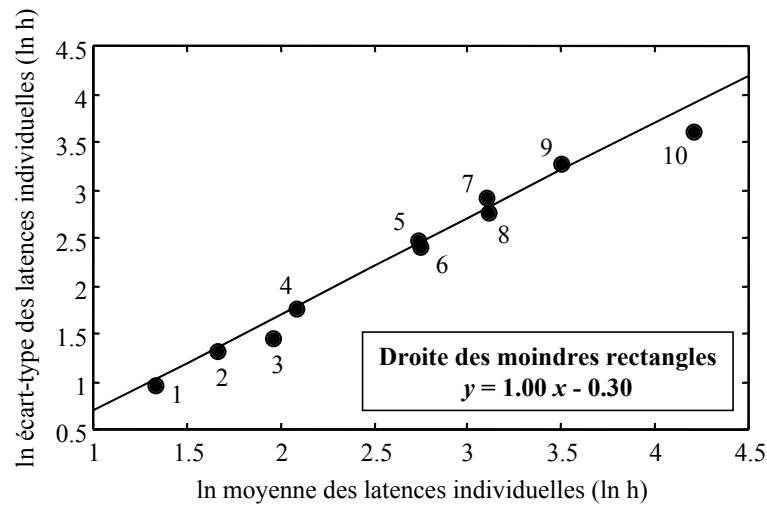


Fig. 8 Effet des conditions de croissance sur les latences individuelles de *L. monocytogenes* stressées par une combinaison de chocs acide (lactique) et osmotique (NaCl). Croissance en : (1) TSBye à 30°C, (2) Fraser demi à 30°C, (3) TSBye ajusté à pH 5.5 (acide lactique) à 30°C, (4) TSBye ajusté à a_w 0.97 (NaCl) à 30°C, (5) TSBye à 15°C, (6) TSBye ajusté à pH 5.5 (acide lactique) et a_w 0.97 (NaCl) à 30°C, (7) TSBye ajusté à a_w 0.97 (NaCl) à 15°C, (8) TSBye ajusté à pH 6 (acide lactique) et a_w 0.98 (NaCl) à 15°C, (9) TSBye à 12°C, (10) TSBye ajusté à pH 5.5 (acide lactique) et a_w 0.97 (NaCl) à 12°C.

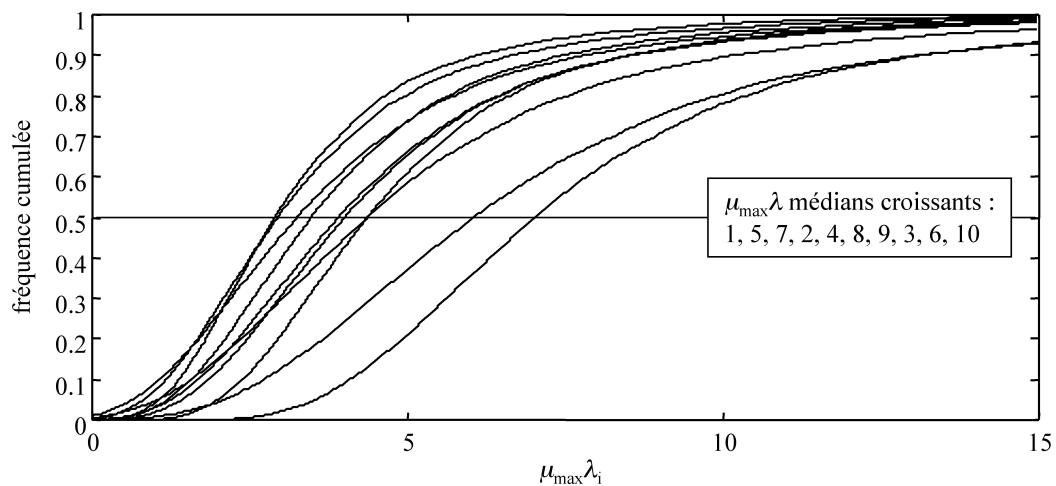


Fig. 9 Effet des conditions de croissance sur la distribution des produits $\mu_{\max}\lambda_i$ individuels de cellules de *L. monocytogenes* stressées par une combinaison de chocs acide (lactique) et osmotique (NaCl). Croissance en : (1) TSBye à 30°C, (2) Fraser demi à 30°C, (3) TSBye ajusté à pH 5.5 (acide lactique) à 30°C, (4) TSBye ajusté à a_w 0.97 (NaCl) à 30°C, (5) TSBye à 15°C, (6) TSBye ajusté à pH 5.5 (acide lactique) et a_w 0.97 (NaCl) à 30°C, (7) TSBye ajusté à a_w 0.97 (NaCl) à 15°C, (8) TSBye ajusté à pH 6 (acide lactique) et a_w 0.98 (NaCl) à 15°C, (9) TSBye à 12°C, (10) TSBye ajusté à pH 5.5 (acide lactique) et a_w 0.97 (NaCl) à 12°C.

2.4.4. Variabilité biologique des latences cellulaires

Nous avons étudié l'impact d'un choc osmotique sur la perte de viabilité et les latences cellulaires à la re-croissance de 11 souches de *L. monocytogenes* d'origines diverses (industrielles, alimentaires et humaines). Le coefficient de variation de la perte de viabilité (log ufc/ml) est de 31% et les coefficients de variation des logarithmes de la moyenne et de l'écart-type des latences individuelles sont respectivement de 22% et 36%. Ces résultats confirment que la variabilité biologique chez l'espèce *L. monocytogenes* reste modérée.

2.4.5. Modélisation des latences cellulaires et de la latence populationnelle

Nous avons pu montrer (Guillier et Augustin, 2005b) que toutes les distributions des latences cellulaires obtenues pour *L. monocytogenes* peuvent être convenablement décrites par des distributions de type valeurs extrêmes avec un paramètre de forme fixé à 5. Lorsque l'on regroupe l'ensemble des données obtenues pour les latences individuelles de *L. monocytogenes*, on observe une forte corrélation linéaire entre les logarithmes des moyennes des latences et de leurs écarts-types (Fig. 10). Nous avons donc proposé un modèle permettant de prévoir la distribution suivie par les latences individuelles d'une population de *L. monocytogenes* connaissant la moyenne de ces latences cellulaires. Nous avons cependant montré précédemment (cf. 2.4.2.) que cette moyenne des latences individuelles était difficilement prévisible et dépend largement de l'état physiologique des cellules. Nous avons donc proposé d'utiliser une relation reliant la latence populationnelle aux latences individuelles pour prévoir celles-ci à partir de l'acquisition relativement simple (suivi d'une cinétique de croissance avec une densité initiale élevée) de la latence populationnelle.

Le modèle permettant de prévoir les distributions des latences cellulaires est donc le suivant :

$$\ln(lag) = 0.907 \cdot \ln(E[\lambda]) - 0.311 \quad (12)$$

$$\ln(STD[\lambda]) = 1.004 \cdot \ln(E[\lambda]) - 0.447$$

$$CDF(\lambda) = \exp\left(-\left(\frac{\lambda - a}{b}\right)^{-5}\right) \text{ avec } a = E[\lambda] - 3.183 \cdot STD[\lambda] \text{ et } b = 2.734 \cdot STD[\lambda]$$

où lag est la latence populationnelle, $E[\lambda]$ est la moyenne des latences cellulaires, $STD[\lambda]$ est l'écart-type des latences cellulaires, $CDF(\lambda)$ est la densité de probabilité des latences cellulaires

La Fig. 12 présente l'utilisation combinée des modèles pour le taux de croissance (éq. 7), pour le temps de latence (éq. 8) et du modèle des latences cellulaires (éq. 12) pour prévoir le comportement de *L. monocytogenes* dans des conditions de croissance quelconques et quelle que soit la densité cellulaire initiale connaissant une cinétique de croissance dans des conditions données et ceci pour un état physiologique fixé.

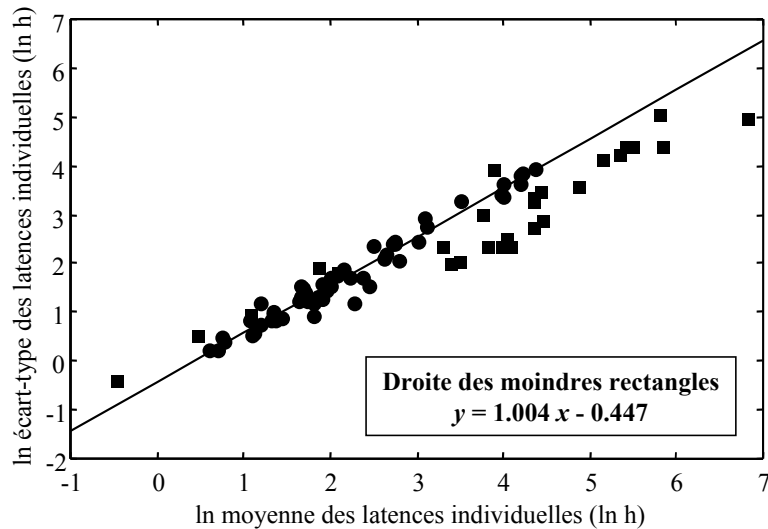


Fig. 10 Relation entre la moyenne et l'écart-type des latences individuelles de *L. monocytogenes*. (●) Données issues de notre étude utilisées pour la construction du modèle, (■) données observées pour *L. monocytogenes* par Francois *et al.* (2005a, 2005b).

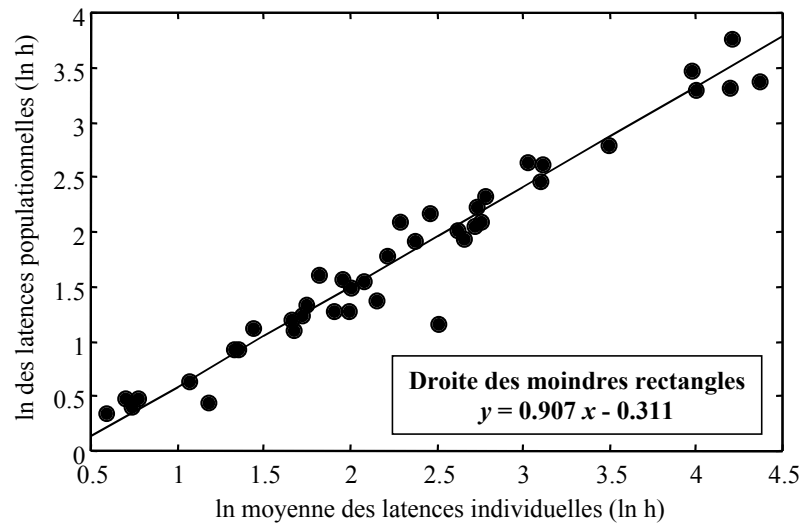


Fig. 11 Relation entre la latence populationnelle et la moyenne des latences individuelles de *L. monocytogenes*.

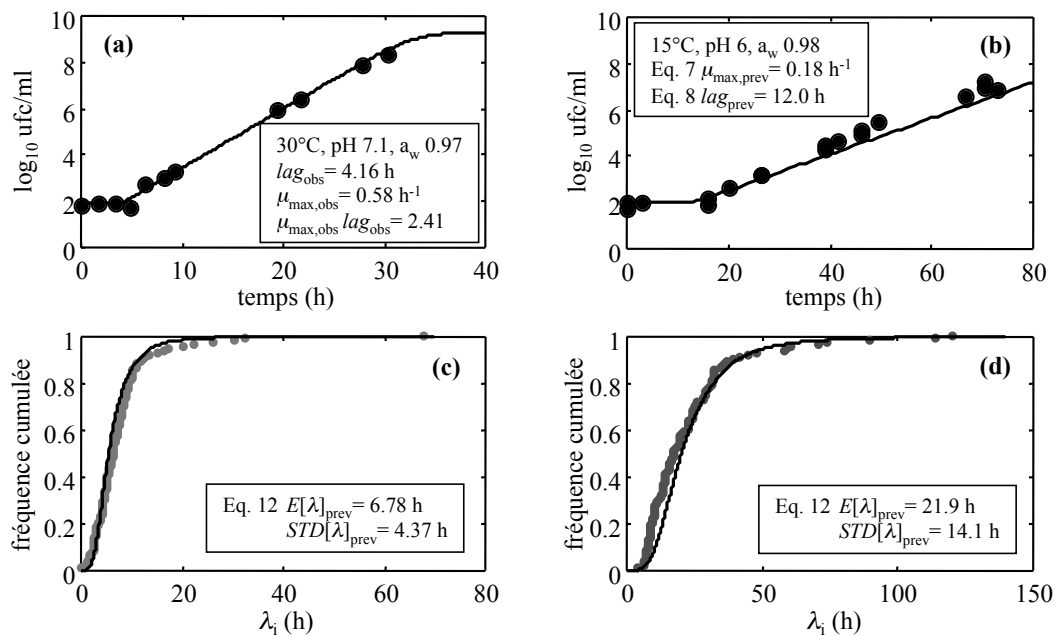


Fig. 12 Observations et prévisions des cinétiques de croissance de *L. monocytogenes* et des distributions de latences cellulaires. La croissance observée en (a) permet d'obtenir le temps de latence populationnel et le taux de croissance dans du TSBye de pH 7.1 et d' a_w 0.97 (NaCl) à 30°C. Les modèles pour le taux de croissance (Eq. 7) et le temps de latence (Eq. 8) permettent de prévoir respectivement le taux de croissance et le temps de latence populationnel dans (b) du TSBye de pH 6 (acide lactique) et d' a_w 0.98 (NaCl) à 15°C. Le modèle des latences cellulaires (Eq. 12) permet de prévoir les distributions des latences cellulaires dans les deux conditions (c) et (d). Les points correspondent aux données observées et les courbes en (b), (c) et (d) correspondent aux prévisions des modèles.

2.4.6. Impact du stress et des conditions de croissance sur la probabilité de croissance cellulaire

Comme d'autres auteurs (Pascual *et al.*, 2001 ; Robinson *et al.*, 2001, McKellar *et al.*, 2002, Koutsoumanis et Sofos, 2005), nous avons observé que la proportion de cellules cultivables dans une population microbienne dépend de leur état physiologique et des conditions de croissance dans lesquelles elles sont placées. Pour un état physiologique donné, la proportion de cellules cultivables semble beaucoup plus affectée par le pH et l' a_w du milieu de croissance que par sa température. De plus, cette proportion semble, sous certaines conditions, liée à la distribution des latences cellulaires (Fig. 13) laissant à penser qu'il serait possible de modéliser cet effet. Nous avons également observé que certaines cellules de *L. monocytogenes* sont incapables de se multiplier dans les bouillons d'enrichissement utilisés lors de la recherche du pathogène dans les aliments. Ainsi, seules 55% des cellules ayant subi une combinaison de chocs acide (lactique) et osmotique (NaCl) ont pu se multiplier dans du bouillon Fraser demi incubé à 30°C. Ces observations doivent être prises en compte pour l'évaluation des performances des méthodes de détection des micro-organismes pathogènes dans les aliments.

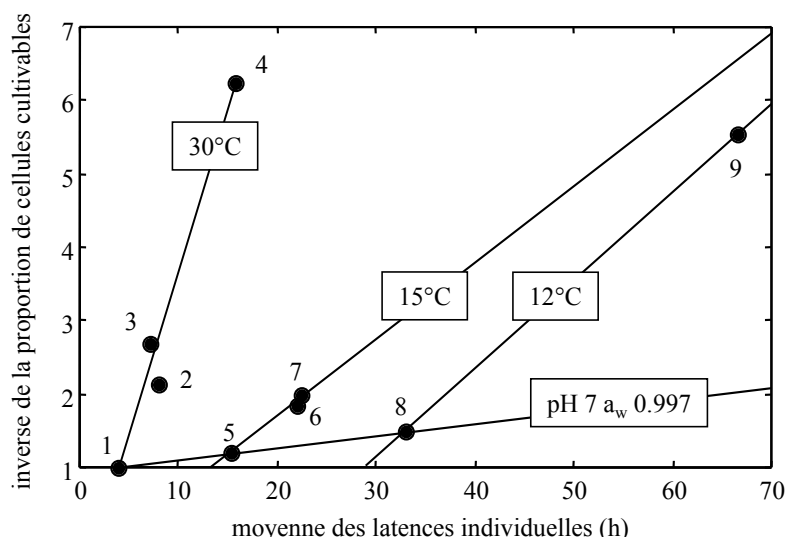


Fig. 13 Effet des conditions de croissance sur la cultivabilité de cellules de *L. monocytogenes* stressées par une combinaison de chocs acide (lactique) et osmotique (NaCl). Croissance en : (1) TSBye à 30°C, (2) TSBye ajusté à a_w 0.97 (NaCl) à 30°C, (3) TSBye ajusté à pH 5.5 (acide lactique) à 30°C, (4) TSBye ajusté à pH 5.5 (acide lactique) et a_w 0.97 (NaCl) à 30°C, (5) TSBye à 15°C, (6), TSBye ajusté à a_w 0.97 (NaCl) à 15°C, (7) TSBye ajusté à pH 6 (acide lactique) et a_w 0.98 (NaCl) à 15°C, (8) TSBye à 12°C, (9) TSBye ajusté à pH 5.5 (acide lactique) et a_w 0.97 (NaCl) à 12°C.

3. APPLICATION DES RECHERCHES A LA GESTION DE LA SECURITE SANITAIRE DES ALIMENTS

3.1. Appréciation quantitative des risques et impact des mesures de gestion des risques liés à la présence de micro-organismes pathogènes dans les aliments

3.1.1. Logiciel de prévision du comportement microbien – SYM'PREVIUS

Les modèles développés pour décrire le taux de croissance et la probabilité de croissance de *L. monocytogenes* ont été intégrés dans le logiciel de simulation du programme national en microbiologie prévisionnelle, SYM'PREVIUS (Fig. 14). Nous avons récemment étendu le domaine d'application de ces modèles aux autres micro-organismes présents dans la base de données du logiciel et nous travaillons actuellement à l'intégration de l'effet des acides organiques.

Le développement de ce logiciel a été réalisé au sein d'un groupement d'intérêt scientifique regroupant les Ministères en charge de l'Agriculture et de la Recherche, des centres techniques agro-alimentaires regroupés au sein de l'ACTIA (ADRIA, Aérial, Arilait Recherches, CTSCCV, IP Lille, ITFF), des organismes publics de recherche (ENVA, INRA) et des industriels membres de l'association UNIR (Bel, Bongrain, Danone, Pernod Ricard). Ce logiciel est accessible aux entreprises agro-alimentaires extérieures au GIS depuis le début de l'année 2005 et leur permet donc d'évaluer quantitativement le comportement de micro-organismes dans leurs produits.

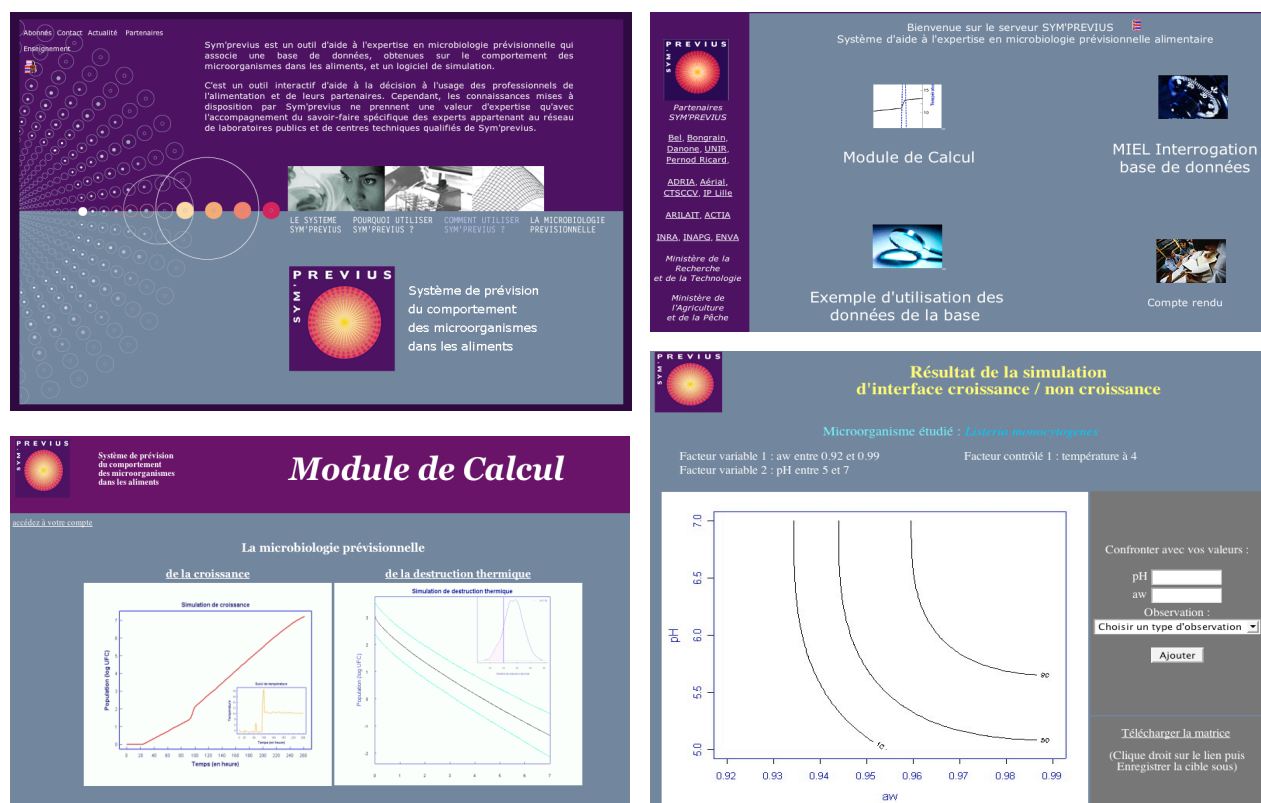


Fig. 14 Ecrans de présentation et de simulation du logiciel SYM'PREVIUS.

3.1.2. Impact des mesures de gestion des risques

Plusieurs communications ont été réalisées afin de montrer l'intérêt que peut avoir la microbiologie prévisionnelle dans l'évaluation des risques liés à la présence de micro-organismes pathogènes dans les aliments (Augustin et Carlier, 2002b ; Augustin, 2003a, 2003b ; Augustin et Carlier, 2004). L'objectif de ces communications était de montrer l'intérêt des modèles de prévision du comportement microbien pour mesurer objectivement l'impact relatif que peuvent avoir différentes options de gestion sur la maîtrise des risques. Nous avons, par exemple, montré (Augustin, 2003a) que le risque lié à la présence de *L. monocytogenes* dans certains aliments

dépendait plus de la durée de vie de ces aliments que de leur taux de contamination et que dans ces conditions, une politique de gestion du risque basée uniquement sur des critères microbiologiques avec une "tolérance zéro" quant à la présence de ce pathogène dans les aliments n'était pas garante d'une bonne maîtrise du risque de listériose.

3.1.3. Classification des aliments vis-à-vis du danger représenté par *L. monocytogenes*

Suite aux avis de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA 2001, 2005) sur la classification des aliments selon le danger représenté par *L. monocytogenes*, les industriels charcutiers-traiteurs se sont inquiétés de la sensibilité de leurs produits au développement de ce micro-organisme. Une démarche collective a été engagée au niveau de la Fédération Française des Industriels Charcutiers-traiteurs, Transformateurs de viande (FICT) afin d'identifier les catégories de produits permettant ou non la croissance de *L. monocytogenes*. Nous les avons aidés dans cette démarche, en collaboration avec le Centre Technique de la Salaison, de la Charcuterie, et des Conserves de Viandes, en comparant les probabilités de croissance prévues par le modèle développé pour *L. monocytogenes* et les données obtenues par tests de croissance ("challenge-tests") sur différents produits de charcuterie (Augustin et Garry, 2005). Cette démarche a permis de valider le modèle décrivant la probabilité de croissance de *L. monocytogenes* dans les produits de charcuterie et de définir des familles de produits permettant ou non la croissance du micro-organisme pathogène (Fig. 15).

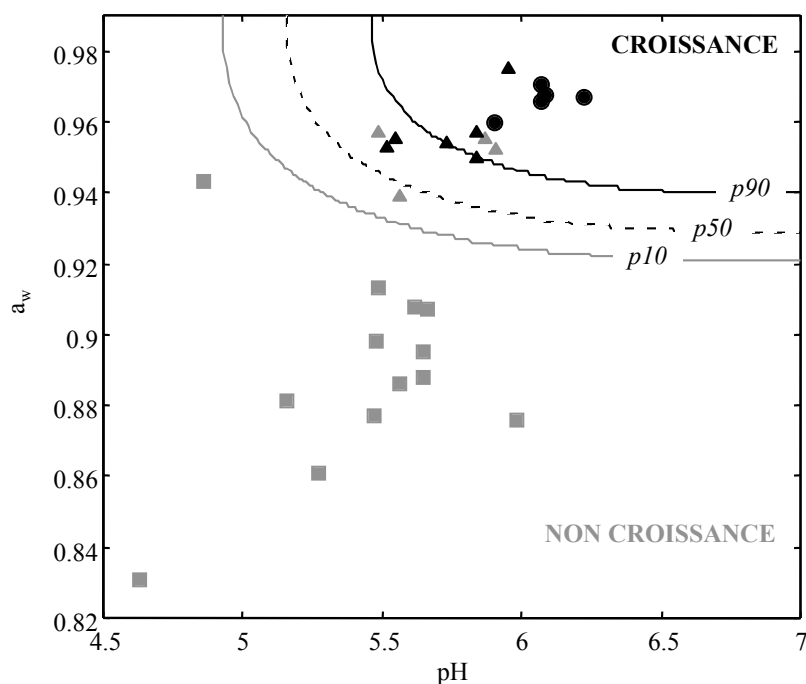


Fig. 15 Zones de croissance / non croissance prévues par le modèle de probabilité de croissance de *L. monocytogenes* et caractéristiques physico-chimiques des produits de charcuterie permettant ou non la croissance du pathogène. (●) rillettes (famille de produits permettant la croissance de *L. monocytogenes*), (■) saucissons secs et jambons secs (famille de produits ne permettant pas la croissance de *L. monocytogenes*), (▲) saucisses crues et tartinettes (famille de produits intermédiaires), symboles noirs, croissance observée, symboles gris, aucune croissance observée, p_{90} probabilité de croissance de 90%, p_{50} probabilité de croissance de 50%, p_{10} probabilité de croissance de 10%.

3.2. Détection des micro-organismes pathogènes dans les aliments

Les résultats obtenus sur la cultivabilité de *L. monocytogenes* dans les bouillons d'enrichissement nous ont permis d'expliquer certains phénomènes observés dans le cadre de l'organisation du Réseau d'Analyses et d'Echanges en Microbiologie des Aliments (RAEMA) qui est une comparaison interlaboratoire en microbiologie des aliments (Augustin et Carlier, 2002a, 2006). Ainsi lors de la 37^{ème} campagne (Carlier et Augustin, 2003), 43% des laboratoires participants, soit 148 laboratoires sur 341, n'ont pas été en mesure de détecter la présence de *L. monocytogenes* dans des échantillons contaminés à 100 ufc/g alors que la bactérie était observée lors de la mise en œuvre de la méthode de dénombrement. Des essais nous ont permis d'observer que dans le cas d'une contamination faible, les cellules présentes étaient dans l'incapacité de se multiplier dans le bouillon Fraser demi et que cette inhibition était très spécifique d'une combinaison niveau de contamination / état physiologique / matrice alimentaire / nature des flores annexes / bouillon d'enrichissement. Il nous semble donc important de poursuivre ces travaux afin d'identifier les situations ne permettant pas un recouvrement optimal des cellules éventuellement stressées et présentes dans les aliments en très faible quantité et ainsi d'optimiser les méthodes de détection des pathogènes dans les aliments.

4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les résultats obtenus ont permis d'améliorer les modèles de microbiologie prévisionnelle et d'étendre leur domaine d'application. Nous disposons aujourd'hui des outils permettant de simuler la croissance microbienne dans une large gamme d'aliments. Cela permet de répondre aux problématiques des gestionnaires du risque, publics ou privés, suivantes :

- probabilité de croissance d'un micro-organisme dans un aliment ;
- classement de produits en fonction de leur sensibilité au développement microbien ;
- estimation de la vitesse de croissance d'un micro-organisme dans un aliment.

D'un point de vue de l'appréciation des risques liés à la présence de micro-organismes pathogènes dans les aliments, les résultats permettent de simuler le comportement de contaminants présents dans les aliments en très faible quantité. La variabilité des temps de latence observée pour des cellules stressées par des traitements technologiques permet d'expliquer en partie la variabilité des niveaux de contamination observés sur le terrain par les industriels de l'agro-alimentaire lors de la découverte de lots de produits contaminés par des micro-organismes pathogènes. Ces résultats vont permettre d'améliorer sensiblement les modèles d'appréciation quantitative des risques en intégrant l'interaction entre le niveau de contamination initial et le comportement ultérieur des contaminants. Ils vont d'ailleurs être incorporés dans un modèle d'appréciation des risques liés à la présence de *L. monocytogenes* dans les fromages à pâte molle (thèse de Doctorat de Fanny Aziza, convention AQS R02/12 "l'appréciation quantitative des risques en tant qu'outil de maîtrise de la sécurité des fromages à pâte molle à base de lait pasteurisé").

Certains phénomènes ayant un impact important sur le comportement microbien restent cependant à étudier pour évaluer correctement l'efficacité des systèmes de maîtrise de la sécurité sanitaire des aliments. Il faudrait ainsi être capable de prévoir l'impact de certains stress sur la cultivabilité et la latence des micro-organismes dans les aliments et dans les milieux de culture. Il faudrait également évaluer l'impact des flores annexes sur le développement des flores pathogènes dans les matrices alimentaires solides. La méthode de suivi des cinétiques de croissance microbienne sur milieu solide par analyse d'images va nous permettre d'aborder cette thématique assez rapidement. Les phénomènes de compétition intraspécifique observés lors de la mise au point de la méthode (Guillier *et al.*, 2005b) seront alors abordés en cultures mixtes.

REFERENCES

- AFSSA. 2001. Avis 2000-SA-0094 de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la classification des aliments selon le danger représenté par *Listeria monocytogenes*. 29/10/01.
- AFSSA. 2005. Avis 2003-SA-0362 de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur la révision de l'avis 2000-SA-0094 sur la classification des aliments au regard du risque représenté par *Listeria monocytogenes* et les protocoles de tests de croissance. 9/03/05.
- Augustin, J.-C.** 2003a. Evaluation of the sensitivity of microbiological criteria for *Listeria monocytogenes* in detecting unsafe food according to the prevalence of the pathogen and the shelf-life of the food. *Food Microbiol.* 20, 681-689.
- Augustin, J.-C.** 2003b. Intérêt de la microbiologie prévisionnelle dans l'appréciation de l'exposition des aliments à *Listeria monocytogenes*. *Bull. Acad. Vét. de France* 156, 67-73.
- Augustin, J.-C.,** Brouillaud-Delattre, A., Rosso, L., Carlier, V. 2000a. Significance of inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1706-1710.
- Augustin, J.-C.,** Carlier, V. 2000a. Mathematical modelling of the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 56, 29-51.
- Augustin, J.-C.,** Carlier, V. 2000b. Modelling the growth rate of *Listeria monocytogenes* with a multiplicative type model including interactions between environmental factors. *Int. J. Food Microbiol.* 56, 53-70.
- Augustin, J.-C.,** Carlier, V. 2002a. French laboratory proficiency testing program for food microbiology. *J. AOAC Int.* 85-4, 952-959.
- Augustin, J.-C.,** Carlier, V. 2002b. Modélisation de la croissance de *Listeria monocytogenes* dans les aliments. *Bull. Acad. Vét. de France* 154, 93-104.
- Augustin, J.-C.,** Carlier, V. 2004. Objectifs de sécurité des aliments et gestion du risque d'intoxication staphylococcique liée à la consommation de pâtisseries à la crème. *Bull. Acad. Vét. de France* 157, 53-58.
- Augustin, J.-C.,** Carlier, V. 2006. Lessons from the organization of a proficiency testing program in food microbiology by interlaboratory comparison: analytical methods in use, impact of methods on bacterial counts and measurement uncertainty of bacterial counts. *Food Microbiol.* 23, 1-38.
- Augustin, J.-C.,** Garry, P. 2005. Comportement de *Listeria monocytogenes* dans les produits de charcuterie. Fédération Française des Industriels Charcutiers, Traiteurs, Transformateurs de Viandes, 26 p.
- Augustin, J.-C.,** Rosso, L., Carlier, V. 1999. Estimation of temperature dependent growth rate and lag time of *Listeria monocytogenes* by optical density measurements. *J. Microbiol. Methods* 38, 137-146.
- Augustin, J.-C.,** Rosso, L., Carlier, V. 2000b. A model describing the effect of temperature history on lag time for *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 57, 169-181.
- Augustin, J.-C.,** Zuliani, V., Cornu, M., Guillier, L. 2005. Growth rate and growth probability of *Listeria monocytogenes* in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions. *J. Appl. Microbiol.*, 99, 1019-1042.
- Baranyi, J. 1998. Comparison of stochastic and deterministic concepts of bacterial lag. *J. Theor. Biol.* 192, 403-408.
- Baranyi, J., Roberts, T.A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* 23, 277-294.
- Baranyi, J., Roberts, T.A., McClure, P. 1993. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiol.* 10, 43-59.
- Bréand, S., Fardel, G., Flandrois, J.P., Rosso, L., Tomassone, R. 1997. A model describing the relationship between lag time and mild temperature increase duration. *Int. J. Food Microbiol.* 38, 157-167.
- Bréand, S., Fardel, G., Flandrois, J.P., Rosso, L., Tomassone, R. 1999. A model describing the relationship between regrowth lag time and mild temperature increase for *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 46, 251-261.
- Broughall, J.M., Anslow, P.A., Kilsby, D.C. 1983. Hazard analysis applied to microbial growth in foods: development of mathematical models describing the effect of water activity. *J. Appl. Bacteriol.* 55, 101-110.
- Buchanan, R.E. 1918. Life phases in a bacterial culture. *J. Infect. Dis.* 98, 1271-1273.

- Buchanan, R.L., Klawitter, L.A. 1991. Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* 12, 235-246.
- Carrier, V., **Augustin, J.-C.** 2003. RAEMA – Compte rendu du 37^{ème} envoi. 8/12/03.
- Cooper, S. 1991. Bacterial Growth and Division. Academic Press, London.
- Dalgaard, P., Ross, T., Kamperman, L., Neumeyer, K., McMeekin, T.A. 1994. Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. *Int. J. Food Microbiol.* 23, 391-404.
- Delignette-Muller, M.L. 1998. Relation between the generation time and the lag time of bacterial growth kinetics. *Int. J. Food Microbiol.* 43, 97-104.
- Devlieghere, F., Geeraerd, A.H., Versyck, K.J., Vandewaetere, B., van Impe, J., Debevere, J. 2001. Growth of *Listeria monocytogenes* in modified atmosphere packed cooked meat products: a predictive model. *Food Microbiol.* 18, 53-66.
- Dufrenne, J., Delfgou, E., Ritmeester, W., Notermans, S. 1997. The effect of previous growth conditions on the lag phase time of some foodborne pathogenic micro-organisms. *Int. J. Food Microbiol.* 34, 89-94.
- Francois, K., Devlieghere, F., Smet, K., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., Debevere J. 2005a. Modelling the individual cell lag phase: effect of temperature and pH on the individual cell lag distribution of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 100, 41-53.
- Francois, K., Devlieghere, F., Smet, K., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., Debevere, J. 2005b. Modelling the effect of environmental parameters (temperature, pH & aw) on the individual cell lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Acta Hort.* 674, 39-46.
- Gay, M., Cerf, O., Davey, K.R. 1996. Significance of pre-incubation temperature and inoculum concentration on subsequent growth of *Listeria monocytogenes* at 14°C. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 433-438.
- George, S.M., Lund, B.M. 1992. The effect of culture medium and aeration on growth of *Listeria monocytogenes* at pH 4.5. *Lett. Appl. Microbiol.* 15, 49-52.
- Gibson, A.M., Bratchell, N., Roberts, T.A. 1987. The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. *J. Appl. Bacteriol.* 62, 479-490.
- Giménez, B., Dalgaard, P. 2004. Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and spoilage micro-organisms in cold-smoked salmon. *J. Appl. Microbiol.* 96, 96-109.
- Guillier, L., **Augustin, J.-C.** 2005a. Influence of stress and growth conditions on individual lag time distributions of *Listeria monocytogenes*. *Acta Hort.* 674, 31-37.
- Guillier, L., **Augustin, J.-C.** 2005b. Modelling the individual cell lag time distributions of *Listeria monocytogenes* as a function of the physiological state and the growth conditions. *Int. J. Food Microbiol.* soumis.
- Guillier, L., Pardon, P., **Augustin, J.-C.** 2005a. Influence of stress on individual lag time distributions of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2940-2948.
- Guillier, L., Pardon, P., **Augustin, J.-C.** 2005b. Automated image analysis of bacterial colony growth as a tool to study individual lag time distributions of immobilized cells. *J. Microbiol. Methods*, sous presse.
- Hills, B.P., Wright, K.M. 1994. A new model for bacterial growth in heterogeneous systems. *J. Theor. Biol.* 168, 31-41.
- Hudson, J.A. 1993. Effect of pre-incubation temperature on the lag time of *Aeromonas hydrophila*. *Lett. Appl. Microbiol.* 16, 274-276.
- Jackson, H., Woodbine, M. 1963. The effect of sublethal heat treatment on the growth of *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Bacteriol.* 26, 152-158.
- Johansen, C., Gram, L., Meyer, A.S. 1994. The combined inhibitory effect of lysozyme and low pH on growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 57, 561-566.
- Kaufman, O.W., Harmon, L.G., Pailthorp, O.C., Pflug, I.J. 1959. Effect of heat treatment on the growth of surviving cells. *J. Bacteriol.* 78, 834-838.
- Koch, A.L. 1987. The variability and individuality of the bacterium, In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. Eds. Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M., Umberger, H.E. American Society for Microbiology, Washington D.C., p. 1606-1614.
- Koch, A.L. 1995. Bacterial Growth and Form. Chapman and Hall, New York.
- Kono, T. 1968. Kinetics of microbial cell growth. *Biotech. Bioeng.* 10, 105-131.

- Koutsoumanis, P.K., Sofos, J.N. 2005. Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and a_w limits for growth of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 104, 83-91.
- Kutalik, Z., Razaz, M., Baranyi, J., 2005. Connection between stochastic and deterministic modelling of microbial growth. *J. Theo. Biol.* 232, 285-299.
- Leistner, L., Rödel, W. 1976. The stability of intermediate moisture foods with respect to micro-organisms. In *Intermediate Moisture Foods*. Eds. Davies, R., Birch, G.G., Parker, J.K. Applied Science Publishers Ltd., London.
- Le Marc, Y., Huchet, V., Bourgeois, C.M., Guyonnet, J.P., Mafart, P., Thuault, D. 2002. Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration. *Int. J. Food Microbiol.* 73, 219-237.
- Mackey, B.M., Derrick, C.M. 1982. The effect of sublethal injury by heating, freezing, drying and gamma-radiation on the duration of the lag phase of *Salmonella typhimurium*. *J. Appl. Bacteriol.* 53, 243-251.
- McKellar, R.C., Butler, G., Stanich, K. 1997. Modelling the influence of temperature on the recovery of *Listeria monocytogenes* from heat injury. *Food Microbiol.* 14, 617-625.
- McKellar, R.C., Lu, X. and Knight, K.P. 2002. Proposal of a novel parameter to describe the influence of pH on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* 73, 127-135.
- Mossel, D.A.A. 1983. Essentials and perspectives of the microbial ecology of foods. In *Food Microbiology: Advances and Prospects*. Eds. Roberts, T.A., Skinner, F.A. Society for Applied Microbiology Symposium Series No. 11. Academic press, London. p. 1-45.
- Mossel, D.A.A., Ingram, M. 1955. The physiology of the microbial spoilage of foods. *J. Appl. Bacteriol.* 18, 232-268.
- Pascual, C., Robinson, T.P., Ocio, M.J., Aboaba, O.O., McKey, B.M. 2001. The effect of inoculum size and sublethal injury on the ability of *Listeria monocytogenes* to initiate growth under suboptimal conditions. *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 357-361.
- Ratkowsky, D.A., Ross, T., McMeekin, T.A., Olley, J. 1991. Comparison of Arrhenius-type and Belehradek-type models for prediction of bacterial growth in foods. *J. Appl. Bacteriol.* 71, 452-459.
- Robinson, T.P., Ocio, M.J., Kaloti, A., Mackey, B.M. 1998. The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 44, 83-92.
- Robinson, T.P., Ocio, M.J., Kaloti, A., McKey, B.M. 2001. The effect of inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 70, 163-173.
- Rosso, L. 1995. Modélisation et Microbiologie Prévisionnelle : Elaboration d'un Nouvel Outil pour l'Agro-alimentaire. Thèse de Doctorat, Université Claude Bernard - Lyon I, n° 95-197.
- Rosso, L. 1998. Quantification et prévision du comportement dynamique des populations microbiennes : Applications à la sécurité des aliments. Mémoire d'Habilitation à Diriger les Recherches, Université de Paris-Sud.
- Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S., Flandrois, J.P. 1995. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 610-616.
- Walker, S.J., Archer, P., Banks, J.G. 1990. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *J. Appl. Bacteriol.* 68, 157-162.
- Zwietering, M.H., Cuppers, H.G.A.M., de Wit, J.C., van't Riet, K. 1994. Evaluation of data transformations and validation of a model for the effect of temperature on bacterial growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 195-203.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., van't Riet, K. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1875-1881.