THESE

Présentée

devant l'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE U.F.R Sciences et techniques

pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE Mention Microbiologie

par

Yvan Le Marc

DEVELOPPEMENT D'UN MODELE MODULAIRE DECRIVANT L'EFFET DES INTERACTIONS ENTRE LES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX SUR LES APTITUDES DE CROISSANCE DE *LISTERIA*.

Soutenue le 14 Mai 2001 devant la commission d'examen :

M. Thuault D., Responsable Recherche Microbiologie ADRIA	Président
M. Pourquié J., Professeur à l'I.N.A.	Rapporteur
M. Wilson P., Docteur, Institute of Food Research	Rapporteur
M. Guyonnet J.P., Ingénieur de recherches, ARILAIT	Examinateur
M. Tirilly Y., Professeur à l'U.B.O.	Examinateur
M. Zwietering M., Docteur, Ingénieur de recherches, Danone Vitapole	Examinateur
M. Mafart P., Professeur à l'U.B.O.	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué dans le cadre d'une collaboration entre l'ADRIA de Quimper (Association pour le Développement de la Recherche Appliquée aux Industries Agricoles et Alimentaires) et LUMAQ (Laboratoire Universitaire de Microbiologie Appliquée de Quimper).

Je tiens à remercier Pierre Mafart et Dominique Thuault pour avoir assuré le suivi de ce travail et l'intérêt qu'ils y ont porté.

Merci à Peter Wilson et Jacques Pourquié pour avoir accepté la charge de rapporteur, ainsi qu'à Jean Pierre Guyonnet, Yves Tirilly et Marcel Zwietering pour avoir accepté d'être membres du jury.

Je tiens particulièrement à marquer ma reconnaissance à l'ensemble du personnel et des stagiaires du laboratoire : Anne, Claudie, Danièle, Marie-Laure, Maryse, Muriel, Nadine et Véronique. Je ne saurais non plus oublier Eric, Dominique, Anne laure, Christophe, Laurence, Christelle, Bénédicte, Anne Cécile et Nolwenn. La liste n'étant pas exhaustive.

Ce travail a bénéficié du soutien financier de l'ANRT (dossier 97-570). Des données nécessaires à la réalisation des travaux ont été collectées dans le cadre du projet européen PREMIUN (FAIR CT 97-3129).

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	9
CHAPITRE 1 MICROBIOLOGIE PREVISIONNELLE : ETAT DES LIEUX	.11
1.1. Dynamique de croissance d'une population microbienne	.11
 1.2. Modélisation primaire 1.2.1. Ajustement d'une cinétique de croissance obtenue par énumération sur be de Pétri 1.2.2. Méthodes automatisées d'estimation du taux de croissance 	. 13 Dîte . 13 . 15
 1.3. Modèles secondaires 1.3.1. Les modèles de type racine carrée 1.3.2. Le modèle Gamma 1.3.3. Le modèle des températures et des pH cardinaux 1.3.4. Modélisation des interactions : le modèle CTPMI 1.3.5. Modélisation de l'effet des acides organiques sur le taux de croissance 1.3.6. L'« anomalie <i>Listeria</i> » 1.3.7. Estimations des paramètres 	17 18 19 20 22 24 24 26
1.4. Modèles probabilistes	31
1.5. Validation des modèles	32
 1.6.1. Choix d'un modèle primaire	. 35 . 35 . 35 . 36 . 37
CHAPITRE 2 MATERIELS ET METHODES	.39
 2.1. Souches bactériennes et milieux de culture 2.1.1. Souches bactériennes 2.1.2. Milieux utilisés 2.1.3. Préparation de l'inoculum 2.1.4. Etudes des cinétiques de croissance 2.1.5. Conditions expérimentales 	. 39 . 39 . 39 . 40 . 41 . 42
2.2. Traitement des données 2.2.1. Ajustement des données 2.2.2. Régions et intervalles de confiance	45 45 46

2.3. Simulation de la croissance	.49
2.3.1. Modèle primaire	. 49
2.3.2. Prévision des cinétiques en conditions dynamiques	. 49
CHAPITRE 3	
ETUDE DES EFFETS DES FACTEURS ENVIRONNEIMENTAUX :	50
TEMPERATURE, PH, CONCENTRATIONS D'ACIDE ORGANIQUE.	.53
3.1 Effot do la tompóraturo sur lo taux do croissanco do Listoria	52
3.1. Linei de la temperature sur le taux de croissance de Listeria.	. 53
3.1.2. Développement d'un modèle décrivant l'effet de la température sur le taux	. 55 v do
croissance de <i>l isteria</i>	54
3.1.3. Conclusion	. 57
3.2. Effet du pH sur le taux de croissance de Listeria	.58
3.2.1. Ajustement du modèle des pH cardinaux	. 58
3.2.2. Conclusion	. 60
3.3. Développement d'un modèle général décrivant l'effet des	
concentrations d'acide sur le taux de croissance	.60
3.3.1. Effet des acides organiques	. 60
3.3.2. Ajustement du modèle général	. 65
3.3.3. Modèle simplifié. Cas des faibles concentrations d'acide	. 66
3.3.4. Effet des acides organiques sur le taux de croissance de <i>L.innocua</i> ATCC	;
33090	. 68
3.3.5. Estimation du parametre <i>MIC_U</i> pour <i>L. monocytogenes</i> Scott A	72
du pH minimal	
	. 73
3.4 Conclusion	77
EFFET COMBINE DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX :	
MODELISATION DES INTERACTIONS	.79
1.1. Miss en évidence des interactions	70
4.1. Mise en evidence des interactions	.79
1.2 Développement d'un modèle d'interaction	83
4.2.1 Approche d'Augustin et al	. UJ
4.2.1. Approvide d'Augustin <i>et al</i>	. 05
	. 04
4.3. Evaluation de la capacité prédictive des modèles CT _P PM et	
CT₀PM ^ɛ dans le milieu BHIM	.89
4.3.1. Prévision du comportement de L. innocua ATCC 33090 en conditions	
statiques	. 89
4.3.2. Prévision du comportement de <i>L. monocytogenes</i>	102

4.4. Prévision du comportement de <i>Listeria</i> en conditions variables
4.4.1 Conditions dynamiques de température
4.5. Prévision du comportement de <i>L. innocua</i> aux hautes
concentrations d'acide lactique 113 4.5.1. Croissance de L. innocua ATCC 33090 à pH 6 113 4.5.2. Interface croissance/ non croissance de L. innocua DSM 20649 en présence d'acide lactique 114
4.6. Extension du modèle : prise en compte des effets de l'activité
de l'eau dans le modèle d'interaction 117 4.6.1. Effet spécifique de l'aw sur le taux de croissance de L. innocua 117 4.6.2. Extension du modèle d'interaction 118 4.6.3. Prévision du comportement de L. innocua en fonction de la température et de l'aw 119 4.6.4. Prédiction de l'interface croissance/ non croissance de L.monocytogenes 119 Scott A en fonction du pH et de l'aw à 20°C en présence d'acide lactique 122
4.7. Perspectives
4.7.1. Effet d'un mélange d'acide
4.7.2. Hypothese de la constance du produit μ_{max} lag
4.8. Conclusion125
CHAPITRE 5 PREVISIONS DU COMPORTEMENT DE <i>LISTERIA</i> DANS DES MATRICES ALIMENTAIRES ET APPLICATION A D'AUTRES MICROORGANISMES127
5.1. Prévisions du comportement de <i>Listeria</i> dans des matrices
alimentaires 127 5.1.1 Méthode d'utilisation du modèle 127
5.1.2. Prise en compte de l' "effet matrice"
5.1.3. Prévision du comportement de Listeria dans des produits laitiers 128
5.1.4. Prévision du comportement de <i>L. monocytogenes</i> dans des produits carnés
5.1.5. Prévision de la croissance de <i>L. innocua</i> dans du saumon
5.2. Application à d'autres microorganismes
5.2.1. Modèles de croissance
5.2.2. Prevision du comportement de <i>E. coli</i>
5.3. Conclusion

CONCLUSION	149
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	153
ARTICLES ET COMMUNICATIONS	161

Introduction

Les toxi-infections dues à des contaminations de produits alimentaires de fabrication industrielle par des micro-organismes pathogènes constituent un problème important pour l'industrie agroalimentaire. En 1994, 533 foyers de toxi-infections alimentaires et 9532 cas de maladies ont été recensées en France (Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire n°21/1996). Parmi les agents pathogène s, *Listeria monocytogenes* est responsable des infections les plus graves : ainsi en 1992 ce micro-organisme a causé en France la mort de 38 personnes (sur 157 malades dénombrés). Des cas plus récents ont également eu lieu en 1999 (6 cas de listériose identifiés entre le 18/10/99 et le 24/12/99 causant la mort de deux personnes).

En dépit d'un nombre important de publications scientifiques, la compréhension de la contribution de chacun des facteurs environnementaux à la croissance, à la survie, à la destruction des pathogènes dans les aliments reste partielle. La mise en œuvre de contrôles biologiques plus fréquents et plus rigoureux ainsi que des procédés de maîtrise de la qualité peut permettre de diminuer les dangers. Cependant les méthodes basées uniquement sur l'expérimentation ont leurs limites : Les faibles pourcentages de contamination et les faibles taux de *Listeria* dans les échantillons contaminés impliquent la réalisation d'un grand nombre d'analyses afin de mettre en évidence des produits non conformes. Ceci entraîne des coûts d'analyse importants. Les délais d'obtention des résultats sont de plus relativement longs. Ces délais excèdent parfois la mise sur le marché des produits ou même leur consommation.

Face aux limites des méthodes traditionnelles, une solution consiste à construire des modèles de description du comportement bactérien en fonction des conditions physico-chimiques. Cette approche, appelée microbiologie prévisionnelle, a connu un essor important depuis le début des années 1980. De nombreux modèles ont été développés pour décrire le comportement bactérien en fonction des principales caractéristiques écologiques des produits. Les modèles développés sont en général performants dans des conditions où les micro-organismes se développent bien. Ils sont souvent moins performants dans des conditions où les micro-organismes se développent peu, dans les conditions limites croissance/ non croissance. Pourtant, ces conditions correspondent à des situations souvent rencontrées dans l'industrie

agroalimentaire où les risques de développement sont de mieux en mieux maîtrisés grâce à la combinaison de la formulation (acidulants, conservateurs), du process et des conditions de conservation.

L'objectif de ce travail est le développement de modèles plus fiables dans les zones limites pour la croissance des microorganismes. Les microorganismes tests pour notre étude ont été *Listeria innocua* et *Listeria monocytogenes*. Dans la première partie, nous avons exposé les principales méthodes mises en œuvre en microbiologie prévisionnelle. Après avoir défini le cadre de l'étude, le comportement de plusieurs souches en fonction de facteurs biologiques d'intérêt industriel (température, pH, acides organiques) a été étudié.

Microbiologie prévisionnelle : état des lieux

Dans cette première partie, nous présentons les principales méthodologies mises en œuvre dans le cadre de la microbiologie prévisionnelle. Les principales méthodes d'acquisition de données, les modèles les plus utilisés et leur mise en œuvre sont exposés. Cette partie est également destinée à préciser les orientations de notre étude en discutant les avantages et les inconvénients des différentes approches.

1.1. Dynamique de croissance d'une population microbienne



Temps (h)

Figure I.1. Différentes phases de la dynamique des populations bactériennes (Buchanan, 1918) 1. phase de latence, 2. phase d'accélération de la croissance, 3. phase de croissance exponentielle, 4. phase de ralentissement, 5. phase de saturation, 6 et 7. phases de décroissance.

L'évolution de l'effectif d'une population bactérienne (notée *x*) en fonction du temps comporte sept phases caractéristiques (Buchanan, 1918 ; cf. Figure I.1) qui peuvent être regroupées fonctionnellement :

 - une phase de latence où la croissance bactérienne est nulle. Cette phase peut être vue comme une transition entre un état physiologique initial et l'état de croissance (phase 1).

- une phase de croissance (correspondant aux phases 2 et 3) : cette phase est caractérisée par la présence d'une zone de croissance exponentielle où le logarithme de la densité de la population varie linéairement en fonction du temps. La pente de cette portion linéaire est appelée taux de croissance maximal et est notée μ_{max}.
- une phase de ralentissement de la croissance, puis une phase de saturation liée aux fortes densités bactériennes, à la limitation en substrat ou aux modifications du milieu (phases 4 et 5). Cette phase est suivie d'une décroissance de la population des microorganismes (phases 6 et 7).

Le temps de latence est généralement défini comme l'abscisse du point d'intersection entre la tangente à la phase exponentielle de croissance et l'horizontale passant par le point ln (x_0) (Zwietering *et al.*, 1990; Rosso, 1995b). Cette définition est explicitée graphiquement à la Figure I.2. Une cinétique de croissance microbienne est caractérisée par les paramètres suivants :

- la taille de l'inoculum, notée x_o
- la durée de phase de latence ou temps de latence, notée lag
- le taux de croissance maximum, μ_{max}
- la densité de saturation, x_{max}



Figure I.2. Définition du temps de latence : il est défini comme l'abscisse du point d'intersection entre la tangente à la phase exponentielle de croissance et l'horizontale passant par l'inoculum.

La modélisation se fait habituellement en deux étapes. La première consiste à ajuster les cinétiques de croissance de façon à estimer les valeurs de *lag* et μ_{max} . On

parle alors de modélisation primaire. Dans la seconde étape, appelée modélisation secondaire, les estimations du taux de croissance et du temps de latence sont reliées aux facteurs environnementaux : température, pH, concentrations d'acide et activité de l'eau.

1.2. Modélisation primaire

1.2.1. Ajustement d'une cinétique de croissance obtenue par énumération sur boîte de Pétri

Plusieurs modèles primaires ont été proposés dans la littérature afin d'ajuster les cinétiques de croissance microbienne. Le modèle de Gompertz reparamétré par Zwietering *et al.* (1990) a d'abord été couramment utilisé dans les travaux de microbiologie prévisionnelle (équation [I.1]).

$$\ln(x) = \ln(x_o) + A \exp\left(-\exp\left(\frac{\mu_{\max}e}{A}(lag - t) + 1\right)\right)$$
[I.1]

x est la concentration microbienne (en UFC/ml) A= $ln(x_{max})-ln(x_o)$

Certains auteurs, notamment Rosso (1995b), ont mis en évidence certains problèmes dans l'utilisation de ce modèle : l'ajustement au modèle de Gompertz induit une surestimation du taux de croissance par rapport à la définition classique de μ_{max} (pente obtenue en représentation logarithmique pendant la phase de croissance exponentielle). De plus, l'inoculum est différent du paramètre x_0 . A *t*=0, on a en effet :

$$\ln(x(0)) = \ln(x_o) + A \exp\left(-\exp\left(\frac{\mu_{\max}e}{A}(lag) + 1\right)\right) \neq \ln(x_o)$$
[1.2]

Baranyi *et al.* (1994, 1993a, 1993b) ont développé une équation non autonome modélisant la croissance bactérienne. La forme générale de l'équation est la suivante :

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{\max} \alpha_n(t) \left(1 - \frac{x}{x_{\max}} \right)$$
[I.3]
avec $\alpha_n(t) = \frac{t^n}{lag + t^n}$

L'estimation de *n* pouvant poser des difficultés, Baranyi *et al.* (1994) proposent de le fixer à 4. Selon Delignette-Muller (1998a), ce modèle semble être un meilleur descripteur des cinétiques microbiennes que le modèle de Gompertz. Les paramètres sont consistants par rapport aux définitions proposées. Un des inconvénients du modèle de Baranyi réside dans sa complexité.

Des modèles plus simples ont donc été développés. Rosso *et al.* (1996) ont proposé un modèle logistique avec délai et rupture qui sous sa forme différentielle, s'écrit :

$$\begin{cases} \frac{dx}{dt} = 0 & si \ t \le lag \\ \frac{dx}{dt} = \mu_{\max} \left(1 - \frac{x}{x_{\max}} \right) & si \ t > lag \end{cases}$$
[I.4]

Rosso (1995b) a montré que dans la grande majorité des cas, le modèle [I.4] était suffisant pour décrire les cinétiques de croissance microbiennes.

Citons enfin le modèle trilinéaire (Buchanan *et al.*, 1996). Ce modèle est apparu plus robuste que le modèle de Baranyi surtout dans le cas d'échantillons de petite taille. Ce modèle s'écrit sous la forme suivante :

$$\ln(x) = \begin{cases} \ln(x_0) & \text{si } t \le lag \\ \ln(x_0) + \mu_{\max}(t - lag) & \text{si } t > lag \text{ et } t \le t_s \\ \ln(x_{\max}) & \text{si } t > t_s \end{cases}$$
[1.5]

 t_s est l'instant où la population bactérienne x atteint son niveau maximal x_{max}

Le choix d'un modèle primaire n'est pas sans conséquences : pour une même cinétique de croissance, les estimations des taux de croissance sont différents suivant le modèle utilisé (Delignette-Muller, 1998a). De ce fait, la comparaison des résultats d'équipes de chercheurs différentes n'utilisant pas les mêmes modèles primaires peut être difficile.

Pour résoudre ce problème, certains auteurs ont cherché à établir des relations entre les valeurs de μ_{max} estimées d'après la même cinétique par différents modèles.

Baranyi *et al.* (1993b) ont ainsi noté une surestimation moyenne d'environ 13% des taux de croissance par le modèle de Gompertz par rapport au modèle [I.3].

A partir de 505 courbes de croissance de *Listeria monocytogenes*, Augustin (1999) a établi des relations linéaires entre les taux de croissance obtenus avec les modèles de Gompertz, de Baranyi et ceux obtenus par le modèle logistique avec délai et rupture :

$$\begin{cases} \mu_{\max_{l_{d_r}}} = 0.84 & \mu_{\max_{Gompertz}} & r^2 = 0.994 \\ \mu_{\max_{l_{d_r}}} = 0.97 & \mu_{\max_{Baranyi}} & r^2 = 0.994 \end{cases}$$
[I.6]

où $\mu_{max l_d_r}$ est le taux de croissance calculé par le modèle logistique avec délai et rupture

1.2.2. Méthodes automatisées d'estimation du taux de croissance

Les modèles présentés dans le paragraphe ci-dessus permettent d'ajuster des cinétiques de croissance obtenues par dénombrement sur boîtes de Pétri. Cette technique classique présente les avantages de ne dénombrer que des cellules viables et d'être utilisable pour estimer les concentrations des microorganismes aussi bien en milieu synthétique que dans les produits alimentaires. L'inconvénient majeur de cette méthode réside dans son coût en terme de matériel, de milieux de culture et de temps de manipulation. Une estimation correcte des paramètres de croissance (*lag*, μ_{max}) nécessite en effet l'acquisition d'un nombre important de points expérimentaux.

Face à ce problème, des méthodes d'acquisition rapide ont été développées, telles que la turbidimétrie et l'impédancemétrie.

1.2.2.1. Turbidimétrie

1.2.2.1.1. Principe

La méthode est basée sur la proportionnalité entre la densité optique d'une suspension bactérienne et la concentration cellulaire. Dans la limite de cette linéarité (entre 10⁶ et 5.10⁷ bactéries/ ml), l'évolution de la densité optique (DO) reflète la croissance bactérienne. Le taux de croissance bactérien peut être estimé par la méthode dite des dilutions ou par ajustement à un modèle de croissance.

1.2.2.1.2. Méthode des dilutions

Temps de latence et taux de croissance sont en principe indépendants du taux d'inoculation. Le décalage entre deux courbes correspondant à des taux d'inoculation différents obtenus par dilution au 1/2 correspond à un temps de génération (ln(2)/ μ_{max}).

Certaines études ont montré qu'il n'existait pas de différence significative entre les taux de croissance calculés par cette méthode et ceux estimés par l'ajustement des modèles de Baranyi ou du modèle logistique avec délai et rupture à des cinétiques de croissance obtenues par dénombrement (Bajard, 1996b ; Augustin, 1999).

1.2.2.1.3. Ajustement à un modèle de croissance

 μ_{max} peut être estimé en ajustant un modèle de croissance à la totalité de l'évolution de DO en fonction du temps. Ainsi Cheroutre-Vialette *et al.* (1998) proposent l'ajustement au modèle de Gompertz suivant :

$$\log\left(\frac{(\Delta Do)_t}{(\Delta Do_{\min})}\right) = A \exp\left(-\exp\left(\frac{\mu e}{A}(lag-t)+1\right)\right)$$
[I.7]

où ∆Do est la différence de densité optique entre le milieu inoculé et le milieu témoin non inoculé.
 ∆Do_{min} est la valeur de ∆Do minimale, c'est à dire la première valeur supérieure au seuil de détection

Plus récemment, Augustin *et al.* (2000) ont proposé d'estimer μ_{max} à partir d'une courbe de suivi de DO par l'ajustement de la fonction suivante :

$$\ln(DO(t) + 1) = \ln(k x_o \exp(\mu_{\max}(t - lag)))$$
[I.8]

où k est le coefficient de proportionnalité entre la densité optique et la concentration bactérienne

L'ajustement de l'équation [I.8] se fait sur la partie exponentielle de la courbe de croissance de la densité optique. Pour *Listeria*, Augustin *et al.* (2000) ont montré que, à pH 7 et pour des températures comprises entre 4 et 35°C, cette zone exponentielle de croissance est comprise entre 0 et 0.1. Les auteurs ont mis en évidence une bonne correspondance entre les taux de croissances calculés par l'ajustement de l'équation [I.8] et les valeurs de μ_{max} calculées par la méthode des

dilutions. Contrairement à cette dernière méthode, l'ajustement du modèle [I.8] ne nécessite qu'un seul suivi de DO par condition testée.

1.2.2.2. Impédancemétrie

Le principe de cette technique repose sur le fait que le métabolisme des microorganismes dans un milieu de culture se traduit par une transformation des molécules peu chargées électriquement (protéines, glucides) en des molécules plus chargées (peptides, acides organiques). Les caractéristiques électriques du milieu peuvent s'exprimer de la façon suivante :

$$Z = \sqrt{R^2 + \left(\frac{1}{2\Pi FC}\right)^2}$$
[I.9]

Z est l'impédance, R la résistance, C la capacité, F la fréquence

La présence de microorganismes modifie les propriétés électriques du milieu et la croissance bactérienne peut être mise en évidence par l'augmentation de la conductance (1/R). La variation de conductance qui traduit la détection apparaît d'autant plus tôt que l'inoculum est élevé. Le temps de détection peut ainsi être relié à l'inoculum de départ. La méthode des dilutions peut alors être utilisée pour l'estimation du taux de croissance. L'inconvénient de la méthode est lié aux interférences électriques pouvant se produire dans des milieux acides ou salés.

1.3. Modèles secondaires

La modélisation secondaire consiste à relier l'effet des facteurs environnementaux (température, pH, concentrations d'inhibiteurs) au taux de croissance (μ_{max}) et au temps de latence (*lag*). On peut distinguer deux approches méthodologiques :

 La première consiste à décrire simultanément l'effet de tous les facteurs environnementaux à l'aide de fonctions polynomiales. Le développement de ces modèles se fait de façon systématique selon un plan d'expérience défini et dans une gamme de variation donnée. Cette approche permet d'obtenir dans tous les cas un modèle prenant en compte les interactions entre les différents facteurs. Cependant ces modèles sont souvent peu robustes (Delignette-Muller, 1998a ; Baranyi *et al.*, 1996). La seconde approche, que nous appellerons modulaire, consiste à modéliser individuellement l'effet de chaque facteur. A partir de ces modules simples, un modèle général prenant en compte l'effet combiné de l'ensemble des facteurs environnementaux est ensuite élaboré.

Cette dernière approche présente de nombreux avantages : les modèles sont en général définis par un petit nombre de paramètres. Au moins une partie de ces paramètres ont une signification biologique simple. Ils apparaissent aussi plus robustes que les modèles polynomiaux (Delignette-Muller *et al.*, 1995). C'est donc l'approche modulaire qui semble offrir les meilleures perspectives. Dans la suite du chapitre, nous présenterons les modèles modulaires les plus utilisés.

Certains auteurs ont mis en évidence une corrélation entre le temps de latence et l'inverse du taux de croissance (Cooper, 1963 ; Rosso, 1995b). On a alors pour des conditions pré-incubatoires identiques :

$$lag \quad \mu_{\max} = K \tag{I.10}$$

où K est une constante pour des conditions pré-incubatoires données

Delignette-Muller (1998b) a montré que si la présence d'inhibiteurs pouvait avoir un effet sur le produit *'lag.* μ_{max} , l'utilisation de la relation [I.10] donnait des résultats satisfaisants dans la plupart des cas. L'estimation du temps de latence pouvant être déduite de μ_{max} , la plupart des auteurs n'ont donc modélisé que le taux de croissance.

1.3.1. Les modèles de type racine carrée

Les modèles secondaires les plus utilisés sont les modèles racine carrée. Historiquement, le premier facteur étudié a été la température. Ratkowsky *et al.* (1983) ont proposé la fonction suivante pour décrire l'effet de la température sur μ_{max} :

$$\sqrt{\mu_{\max}} = \left[b_1 (T - T_{\min}) \left(1 - e^{c_1 (T - T_{\max})} \right) \right]$$
[I.11]

où T_{min} , T_{max} sont les valeurs extrapolées des températures minimale et maximale de croissance pour la bactérie b_1 , c_1 sont des coefficients sans signification biologique

Ce modèle fait suite à une première version basée sur l'hypothèse d'une relation linéaire entre $\sqrt{\mu_{\text{max}}}$ et la température dans la zone suboptimale (Ratkowsky *et al.*, 1982) :

$$\sqrt{\mu_{\max}} = b(T - T_{\min})$$
[I.12]

Ces modèles ont ensuite été complexifiés pour prendre en compte le pH. Ainsi pour décrire les effets de la température et du pH dans la zone suboptimale sur le taux de croissance de *Yersinia enterocololitica*, Adams *et al.* (1991) proposent le modèle suivant :

$$\sqrt{\mu_{\text{max}}} = b(T - T_{\text{min}})\sqrt{(pH - pH_{\text{min}})}$$
[1.13]

Certains auteurs, notamment Wijtzes *et al.* (1993), ont étendu ce dernier modèle pour intégrer l'effet de l'activité de l'eau :

$$\sqrt{\mu_{\max}} = b(T - T_{\min})\sqrt{(pH - pH_{\min})}\sqrt{(aw - aw_{\min})}$$
[1.14]

1.3.2. Le modèle Gamma

Zwietering *et al.* (1992) proposent un modèle appelé « modèle Gamma », décrivant le taux de croissance μ_{max} relativement à sa valeur maximale μ_{opt} obtenue pour des conditions optimales de culture :

$$\mu_{\max} = \mu_{opt} \quad \gamma \text{ avec } \gamma = \gamma(T) \gamma(pH) \gamma(aw)$$
[I.15]

Chaque fonction γ décrit l'effet relatif (normalisé entre 0 et 1) d'un facteur sur μ_{max} . En zone suboptimale, μ_{max} est supposé varier avec le carré de la température :

$$\mu_{\max} = (b(T - T_{\min}))^2$$
[I.16]

Lorsque T prend sa valeur optimale, l'équation s'écrit :

$$\mu_{opt} = (b(T_{opt} - T_{min}))^2$$
[1.17]

L'effet relatif de la température $\gamma(T)$ s'obtient en divisant les valeurs de μ_{max} à la température T (équation [I.16]) par la valeur à T_{opt} (équation [I.17]):

$$\gamma(T) = \left(\frac{T - T_{\min}}{T_{opt} - T_{\min}}\right)^2$$
[1.18]

Les effets relatifs du pH γ (pH) et de l'activité de l'eau γ (a_w) s'obtiennent de façon similaire :

$$\gamma(pH) = \frac{pH - pH_{\min}}{pH_{opt} - pH_{\min}}$$
[1.19]

$$\gamma(aw) = \frac{aw - aw_{\min}}{1 - aw_{\min}}$$
[I.20]

L'effet combiné de l'ensemble des facteurs est supposé pouvoir être décrit par la multiplication de l'effet de chacune des contributions (cf. équation [I.15]).

1.3.3. Le modèle des températures et des pH cardinaux

Le modèle cardinal noté CTPM développé par Rosso *et al.* (1993, 1995a) est un autre exemple de modèle construit selon l'approche modulaire. L'effet de la température sur μ_{max} est décrit par un module (appelé CTM, « Cardinal Temperature Model ») défini par les températures cardinales (T_{min} , T_{max} , la température maximale de croissance, T_{opt} , la température à laquelle le taux de croissance est optimal) :

$$\rho(T) = \begin{cases}
T < T_{\min}, & 0 \\
T_{\min} < T < T_{\max}, & \frac{(T - T_{\min})^2 (T - T_{\max})}{(T_{opt} - T_{\min}) [(T_{opt} - T_{\min}) (T - T_{opt}) - (T_{opt} - T_{\max}) (T_{opt} + T_{\min} - 2T)]} \\
T > T_{\max}, & 0
\end{cases}$$
[I.21]

De la même façon, une fonction (appelée module CPM, « Cardinal pH Model ») définie par les pH cardinaux est utilisée pour décrire l'effet du pH sur le taux de croissance (équation [I.22]).

$$\gamma(pH) = \begin{cases} pH < pH_{\min}, & 0\\ pH_{\min} < pH < pH_{\max}, & \frac{(pH - pH_{\min})(pH - pH_{\max})}{(pH - pH_{\min})(pH - pH_{\max}) - (pH - pH_{opt})^{2}} & [1.22]\\ pH > pH_{\max}, & 0 \end{cases}$$

Les fonctions $\rho(T)$ et $\gamma(pH)$ proposées par Rosso (1993, 1995a) représentent comme dans le modèle de Zwietering *et al.* (1992) les effets relatifs de la température et du pH. Comme pour le modèle Gamma, l'effet combiné de ces facteurs sur μ_{max} est obtenu en multipliant leurs effets séparés :

$$\mu_{\max} = \mu_{opt} \gamma(pH)\rho(T)$$
[I.23]

Plus récemment, Rosso (1998) a proposé de décrire l'effet de l'a_w sur μ_{max} par le module suivant :

$$\delta(aw) = \begin{cases} aw < aw_{\min}, & 0\\ aw_{\min} < aw, & \frac{(aw - aw_{\min})^2(aw - 1)}{(aw_{opt} - aw_{\min})[(aw_{opt} - aw_{\min})(aw - aw_{opt}) - (aw_{opt} - 1)(aw_{opt} + aw_{\min} - 2aw)] \end{cases}$$
[1.24]

La qualité d'ajustement du modèle cardinal [I.23] est aussi bonne que celle des modèles de type Belehradek ou du modèle Gamma. Les avantages du modèle résident dans la faible corrélation entre les différents paramètres et la signification biologique de tous les paramètres (Rosso *et al.*, 1995a ; Geeraerd *et al.*, 1998).

Dans l'approche cardinale, le temps de latence est comme mentionné plus haut déduit de la corrélation entre *lag* et l'inverse de μ_{max} (équation [I.10]). Rosso (1995b) propose une autre paramétrisation de cette équation. Quand le taux de croissance est optimal, le temps de latence est minimal. Il vient alors :

$$\mu_{opt} \, lag_{\min} = K \tag{I.25}$$

où lag_{min} est le temps de latence minimal

En intégrant la valeur de K dans l'équation [I.10], elle s'écrit alors :

$$\mu_{\max} \ lag = \mu_{opt} \ lag_{\min}$$
[I.26]

En intégrant l'équation [I.23] dans la relation ci-dessus, il vient finalement :

$$lag = \frac{lag_{\min}}{\gamma(pH)\rho(T)}$$
[I.27]

1.3.4. Modélisation des interactions : le modèle CTPMI

Dans les modèles modulaires, les valeurs T_{min} , pH_{min} et a_{wmin} sont supposées constantes, indépendantes des conditions expérimentales. Pourtant de nombreux auteurs ont signalé l'influence de ces conditions sur les températures, les a_w et les pH minimaux de croissance observés expérimentalement. Ainsi, plus la température est basse, plus le pH pour lequel une croissance bactérienne pourra être observée sera élevé (Farber *et al.*, 1989; Cole *et al.*, 1990). Le même phénomène est observé pour le pH : la température minimale permettant la croissance est d'autant plus haute que les niveaux de pH sont bas.

Augustin *et al.* (2000) ont illustré la conséquence de l'hypothèse de la constance des valeurs cardinales sur l'interface entre la croissance et l'absence de croissance de *L.monoytogenes* en fonction du pH et de la température (Figure I.3).



Figure I.3. Courbes d'isoréponse de μ_{max} d'après le modèle cardinal CTPM en fonction de la température et du pH. Les paramètres du modèle utilisés pour la simulation sont : $\mu_{opt}=1$ h⁻¹; $T_{min}=0$ °C; $T_{opt}=35$ °C; $T_{max}=45$ °C; $pH_{min}=4.5$; $pH_{opt}=7$; $pH_{max}=9.5$ (Augustin *et al.*, 2000).

Les combinaisons des deux facteurs pour laquelle aucune croissance n'est prédite sont représentées par la surface sombre. Aucune croissance n'est prédite lorsque la température est inférieure à T_{min} ou lorsque le pH est inférieur à pH_{min} . Cette frontière entre les zones de croissance et de non croissance semble peu réaliste (Augustin *et al.*, 2000). Les modèles modulaires tendraient donc à sous-estimer l'effet des interactions entre les facteurs environnementaux. La conséquence la plus importante est la surestimation du taux de croissance bactérien dans des conditions limites pour la croissance (Augustin *et al.*, 2000).

Afin de mieux appréhender l'effet des interactions sur la croissance de *L.monoytogenes*, Augustin *et al.* (2000) proposent une nouvelle utilisation du modèle cardinal (équation [I.28]) : les valeurs cardinales minimales ne sont plus constantes mais dépendent du niveau des autres facteurs. Ce modèle, pour l'effet combiné de la température, du pH et de l'a_w (modèle CTPMI) s'écrit :

$$\mu_{\max} = \mu_{opt} \gamma(pH) \rho(T) \delta(aw)$$
[I.28]

$$\text{avec } pH_{\min} = pH_{opt} - \left(pH_{opt} - pH_{\min}^{0}\right) \left(1 - \left(\frac{T_{opt} - T}{T_{opt} - T_{\min}^{0}}\right)^{3} - \left(\frac{aw_{opt} - aw}{aw_{opt} - aw_{\min}^{0}}\right)^{3}\right)^{\frac{1}{3}}$$

$$T_{\min} = T_{opt} - \left(T_{opt} - T_{\min}^{0}\right) \left(1 - \left(\frac{pH_{opt} - pH}{pH_{opt} - pH_{\min}^{0}}\right)^{3} - \left(\frac{aw_{opt} - aw}{aw_{opt} - aw_{\min}^{0}}\right)^{3}\right)^{\frac{1}{3}}$$

$$aw_{\min} = aw_{opt} - \left(aw_{opt} - aw_{\min}^{0}\right) \left(1 - \left(\frac{pH_{opt} - pH}{pH_{opt} - pH_{\min}^{0}}\right)^{3} - \left(\frac{T_{opt} - T}{T_{opt} - T_{\min}^{0}}\right)^{3}\right)^{\frac{1}{3}}$$

 T_{min}^{0} est la température minimale de croissance lorsque le pH et l'a_w sont optimaux pH_{min}^{0} est la température minimale de croissance à a_{wopt} et T_{opt}^{0} awmin est la température minimale de croissance à pH_{opt} et T_{opt}

D'après le modèle, il n'y a pas croissance (*i.e* μ_{max} est égal à 0) lorsque :

$$\left(\frac{T_{opt}-T}{T_{opt}-T_{\min}^{0}}\right)^{3} + \left(\frac{pH_{opt}-pH}{pH_{opt}-pH_{\min}^{0}}\right)^{3} + \left(\frac{aW_{opt}-aW}{aW_{opt}-aW_{\min}^{0}}\right)^{3} = 1$$
[1.29]

La Figure I.4 montre l'effet de la température et du pH sur la prédiction de l'évolution de μ_{max} par le modèle CTPMI. L'interface entre croissance et non croissance semble plus réaliste que pour le modèle cardinal classique (Augustin *et al.*, 2000).



Figure I.4. Courbes d'isoréponse de μ_{max} d'après le modèle CTPMI en fonction de la température et du pH. Les paramètres utilisés pour la simulation sont : $\mu_{opt}=1$ h⁻¹; $T^{o}_{min}=0$ °C; $T_{opt}=35$ °C; $T_{max}=45$ °C; $pH^{o}_{min}=4.5$; $pH_{opt}=7$; $pH_{max}=9.5$ (Augustin *et al.*, 2000).

1.3.5. Modélisation de l'effet des acides organiques sur le taux de croissance

Les modèles présentés jusqu'ici concernent les effets de la température, du pH et de l'activité de l'eau. En ce qui concerne l'effet des acides organiques, deux approches sont proposées dans la littérature pour décrire leur effet sur μ_{max} . La première approche est basée sur la description du taux de croissance en fonction des concentrations d'acide. Ainsi Presser *et al.* (1997) ont proposé le module [I.30] pour décrire l'effet de l'acide lactique non dissocié sur le taux de croissance de *E. coli.* Cette fonction est basée sur l'hypothèse de l'existence d'une concentration minimale d'acide non dissocié inhibant la croissance, notée C_U :

$$\theta([AH]) = 1 - \frac{[AH]}{C_U}$$
[1.30]

où [AH] est la concentration d'acide non dissocié C_U est la concentration minimale d'acide non dissocié inhibant la croissance

La seconde approche a été proposée par L. Rosso (1997, 1995b). Elle est différente de la précédente dans la mesure où le modèle développé ne fait pas intervenir directement les concentrations d'acide : il est basé sur la description du pH minimal de croissance (lorsque le pH est contrôlé par ajout d'acide faible) en fonction de la nature de l'acide.

Le modèle proposé relie le pH minimum de croissance à la nature de l'acide impliqué, en choisissant le pKa pour caractériser l'acide. Il a été développé à partir des observations suivantes :

- en dessous d'une valeur seuil de pKa notée pKa⁰, pH_{min} est constant et égal à une valeur minimale, notée pH⁰_{min}.
- pour des valeurs supérieures à pKa⁰, pH_{min} augmente en suivant une évolution de type polynomiale du second degré.

Compte tenu de ces observations, le modèle s'écrit sous la forme :

$$\begin{cases} pKa < pKa^{\circ}, \quad pH_{\min} = pH^{\circ}_{\min} \\ pKa \ge pKa^{\circ}, \quad pH_{\min} = k(pKa - pKa^{\circ})^{2} + pH^{\circ}_{\min} \end{cases}$$
[I.31]

où pH^{o}_{min} est le pH minimal de croissance en présence d'acide fort pKa^{o} est la valeur seuil de pKa en dessous de laquelle pH_{min} est constant

Un exemple d'ajustement du modèle [I.31] proposé par Rosso (1995b) pour *L. monocytogenes* est présenté Figure I.5.



Figure I.5. Evolution du pH_{min} de *L. monocytogenes* ajustée par le modèle [I.31] (Rosso, 1995b).

La valeur prédite de pH_{min} en fonction de l'acide majoritaire dans le milieu est alors introduite dans le module CPM du modèle cardinal (équation [I.22]).

La technique d'évaluation du pH minimum consiste à étudier les aptitudes de croissance du microorganisme dans un milieu à des valeurs de pH de plus en plus faibles, par l'ajout d'une quantité croissance d'acide, jusqu'à que l'inhibition soit constatée. Pour Rosso *et al.*, la valeur de *pH_{min}* est liée à une concentration critique en acide non dissocié inhibant la croissance. Ceci expliquerait que les pH minimaux observés pour les acides faibles prennent souvent une valeur voisine de pK_a+1, qui correspond la limite supérieure de la zone tampon de l'acide. L'effet tampon de l'acide apparaissant, une solution à un pH plus faible nécessite un ajout proportionnellement plus important d'acide. Cette augmentation importante de la concentration d'acide associée à une diminution du pH provoque un afflux d'acide non dissocié dans le milieu, ce qui cause l'inhibition (Rosso, 1995b).

L'approche développée par L. Rosso est basée, comme le modèle [I.30] proposé par Presser *et al.* (1997), sur l'hypothèse d'une concentration critique d'acide non dissocié permettant l'inhibition. L'inconvénient du modèle [I.31] vient du fait que les valeurs du pH_{min} dépendent du pouvoir tampon du milieu et peuvent donc varier d'un milieu à l'autre (Rosso, 1995b).

1.3.6. L'« anomalie Listeria »

Les modèles modulaires présentés dans les paragraphes précédents sont théoriquement valables pour l'essentiel des espèces bactériennes. Augustin *et al.* (2000) ont certes développé leur modèle d'interaction pour *Listeria monocytogenes*, mais les auteurs estiment possible de développer la même approche pour d'autres bactéries.

Tous ces modèles sont donc en théorie utilisables pour *Listeria*. Cependant certains auteurs (Rosso, 1995b; Bajard, 1996a) ont mis en évidence la non conformité du comportement de certaines souches de *Listeria* aux basses températures.

Pour la plupart des bactéries, il a été constaté que la racine carrée du taux de croissance variait linéairement en fonction de la température dans la majeure partie de la zone de température suboptimale. Cette constatation expérimentale est à la base des modèles de température proposés dans la littérature. Cependant pour

certaines souches de *Listeria*, la relation $\sqrt{\mu_{max}}$ -température suboptimale n'est pas linéaire : une température de cassure apparaît entre 10 et 15°C (Figure I.6).



Figure I.6. Représentation en racine carrée de la relation $\mu_{max^{-}}$ température pour *Escherichia. coli* et *Listeria monocytogenes* CIP 7831. Dans le cas de *Listeria*, une cassure de pente est visible entre 10 et 15°C (Bajard, 1996b).

D'un point de vue mathématique, l'utilisation des modèles classiques (Modèle cardinal CTM, modèle de type Belehradek) entraîne une autocorrélation des résidus et une sous-estimation des taux de croissance aux basses températures (Bajard, 1996b). Pour décrire ce comportement particulier dans la zone suboptimale, Sandrine Bajard a développé un modèle appelé CSC (« Continuous Slope Change ») valable dans la zone suboptimale de croissance :

$$\mu_{\max} = \mu_c \eta_{Listeria}(T) \qquad [I.32] \qquad \text{avec:}$$

$$\eta_{Listeria}(T) = \left\{ \frac{T - T_{\min}}{T_c - T_1} + \frac{T_1 - T_{\min}}{(T_c - T_1)(T_c - T_{\min})} (1 + \exp(T_{\min} - T_c)) \ln\left[\frac{1 + \exp(T_c - T)}{1 + \exp(T_c - T_{\min})}\right] \right\}^2$$

L'interprétation des paramètres du modèle CSC apparaît explicitement sur la Figure I.7. T_c est la température de rupture de pente et T_1 l'intersection de la première partie linéaire avec l'axe des abscisses. En fait, T_1 représente la température minimale que l'on obtiendrait si l'ajustement était réalisé pour les températures supérieures à la température de rupture. μ_c est la valeur du taux de croissance à la température T_c .



Figure I.7. Courbe théorique du modèle CSC en représentation racine carrée et interprétation graphique des paramètres. Les valeurs utilisées pour la simulation sont : $\mu_c = 0.15 \text{ h}^{-1}$; $T_{min} = -5 \text{ C}$; $T_1 = 2 \text{ C}$; $T_c = 12 \text{ C}$.

Ce modèle a été utilisé avec succès pour prédire le taux de croissance de *Listeria* aux basses températures (Bajard, 1996b). Cependant, il ne permet pas la description du comportement de *Listeria* dans toute la zone de croissance.

1.3.7. Estimations des paramètres

1.3.7.1. Mise en œuvre du modèle cardinal CTPM

Dans sa thèse, L. Rosso (1995b) utilise comme valeurs de paramètres des estimations obtenues à partir de jeux de données indépendants : les températures cardinales sont ainsi identifiées sur un jeu de données décrivant le taux de croissance en fonction de la température à des niveaux de pH proches des valeurs optimales de croissance. Dans ce cas, le modèle partiel CTM peut être ajusté :

$$\mu_{\max} = \mu_{opt_{nH}} \quad \rho(T) \tag{I.33}$$

 $\mu_{opt \, pHe}$ est le taux de croissance à T_{opt} et au pH de l'expérience pH_e

 $\mu_{opt, pHe}$ s'écrit :

$$\mu_{opt_{pHe}} = \mu_{opt} \gamma(pH_e)$$
[I.34]

L'ajustement au modèle partiel [I.34] est justifié par le fait que $\mu_{opt} \gamma(pH_e)$ est supposé indépendant de la température. De la même façon, le modèle des pH cardinaux peut être ajusté sur un jeu de données décrivant l'effet du pH sur μ_{max} à une température proche de T_{opt} (on parlera alors de l'ajustement du modèle partiel CPM) :

$$\mu_{\max} = \mu_{opt_{Te}} \gamma(pH)$$
[I.35]

où $\mu_{opt, Te}$ est le taux de croissance optimal à la température de l'expérience notée T_e

La possibilité de pouvoir travailler sur des modèles partiels est intéressante puisque ceci permet d'utiliser des jeux de données acquis de façon indépendante. Les températures cardinales d'une même espèce peuvent ainsi être tirées d'une publication, alors que les pH cardinaux peuvent être identifiés à partir d'une autre publication (sur des données acquises dans un autre milieu de culture et pour des conditions de préculture différentes).

1.3.7.2. Mise en œuvre du modèle d'interaction CTPMI

Nous avons vu que l'établissement du modèle CTPM peut théoriquement se faire par les deux ajustements des modèles CPM et CTM sur des jeux de données indépendants. Ceci se justifie puisque γ (pH) ne dépend pas de la température et τ (T) ne dépend pas non plus du pH. Au contraire, dans le modèle CTPMI, la valeur de la fonction γ (pH) dépend de la température. De la même façon, la valeur prise par τ (T) ne dépend pas seulement de la température mais aussi du pH. L'ajustement de formes partielles sur des jeux de données indépendants n'est possible que dans des cas particuliers : l'estimation des températures cardinales n'est possible qu'à pH_{opt} (et a_{wopt}), l'estimation des pH cardinaux n'est possible qu'à T_{opt} (et a_{wopt}). Cet ajustement de s formes partielles nécessite à la fois :

- un jeu de données décrivant l'effet de la température à pHopt (et awopt)
- un jeu de données décrivant l'effet de l'effet du pH à Topt (et awopt)
- une connaissance a priori des paramètres cardinaux optimaux (*T_{opt}*, *pH_{opt}* et *a_{wopt}*)

Autrement dit, la détermination des paramètres du modèle CTPMI sur des jeux de données indépendants (par exemple tirés de la littérature) nécessite une connaissance a priori de paramètres que l'on souhaite justement estimer. C'est pourtant cette méthode qu'ont utilisée Augustin *et al.*. Les modèles CPM et CTM ont

d'abord été considérés comme suffisants pour estimer les paramètres T_{opt} , T_{max} d'une part et pH_{opt} , pH_{max} d'autre part. T_{min} a ensuite été estimée sur des données de la littérature décrivant l'évolution de μ_{max} en fonction de T (à des valeurs de pH_{opt} et d' a_{wopt} supposées vraies).

Les estimations des autres paramètres se sont faites ensuite de façon récursive. La valeur de T_{min} a été introduite dans l'équation [I.28] pour estimer pH_{min}° sur des jeux de données décrivant μ_{max} en fonction du pH. Les estimations de T_{min}° et de pH_{min}° ont ensuite été utilisées pour estimer a_{wmin} .

Cette méthode présente certains inconvénients d'ordre théorique : les paramètres optimaux et maximaux sont estimés en utilisant un modèle supposé au départ incomplet. L'estimation des paramètres minimaux se fait de façon récursive sans que la propagation de l'erreur d'estimation sur les paramètres suivants soient étudiée. Malgré ceci, ce modèle permet d'améliorer sensiblement les prédictions du taux de croissance de *Listeria* par rapport au modèle cardinal classique, surtout dans les zones de faible croissance et de non croissance (Augustin *et al.*, 2000).

1.3.7.3. Estimation dynamique des paramètres

On a vu que la méthode courante d'estimation des paramètres d'un modèle secondaire consistait à générer des courbes de croissance sous des conditions environnementales constantes. Ces courbes sont ajustées à un modèle dit primaire. Dans un second temps, les taux de croissance ainsi estimés sont ajustés en fonction du niveau des facteurs environnementaux au modèle secondaire.

Bernaerts *et al.* (2000) proposent d'estimer les paramètres d'un modèle secondaire à partir d'une seule courbe de croissance obtenue en conditions dynamiques de température.

Sous l'hypothèse d'une réponse instantanée d'une population microbienne à un changement de température, le modèle de Ratkowsky (équation [I.12]) peut être incorporé dans une forme reparamétrée du modèle primaire de Baranyi :

$$\begin{cases} \frac{dx}{dt} = \frac{Q(t)}{Q(t)+1} \mu_{\max} (T(t)) [1 - \exp(x(t) - x_{\max})] \\ \frac{dQ}{dt} = \mu_{\max} (T(t)) Q(t) \\ \sqrt{\mu_{\max} (T(t))} = b(T(t) - T_{\min}) \end{cases}$$
[1.36]

Les paramètres *b* et T_{min} sont alors directement ajustés à la courbe de croissance obtenue en conditions dynamiques. A partir d'une connaissance à priori des paramètres, des plans optimaux peuvent être mis en œuvre pour déterminer le profil de température le plus adéquat à appliquer. Cette méthode permet d'identifier les paramètres en une seule étape. De plus, le travail expérimental nécessaire est sensiblement réduit par rapport à l'approche classique (Bernaerts *et al.*, 2000).

D'autres chercheurs (Arino *et al.*, 1998) ont également utilisé cette méthode en suivant par turbidimétrie des courbes de croissances soumis à des gradients de température.

1.4. Modèles probabilistes

Des modèles probabilistes ont récemment été développés pour décrire l'interface croissance/ non croissance. Cette méthode a notamment été développée par les équipes australiennes (Ratkowsky et Ross, 1995 ; Presser *et al.*, 1998 ; Tienungoon *et al.*, 2000).

Le modèle de probabilité de croissance se construit généralement à partir d'un modèle de croissance de type modulaire. Les variables explicatives du modèle probabiliste sont les composantes linéarisées du modèle de croissance (Ratkowsky et Ross, 1995). La démarche est basée sur l'hypothèse d'une similitude entre la topographie séparant la croissance et la non croissance d'une part et la topographie entre deux taux de croissance d'autre part.

Ratkowsky et Ross (1995) proposent ainsi le modèle de croissance suivant pour décrire les effets du pH, de la température et du nitrite de sodium sur *Shigella flexneri* sur la racine carrée de μ_{max} :

$$\sqrt{\mu_{\text{max}}} = b(T - T_{\text{min}})\sqrt{(pH - pH_{\text{min}})}\sqrt{(a_w - a_{w\text{min}})}\sqrt{(NO_{2\text{max}} - NO_2)}$$
 [1.37]

où NO₂ est la concentration de nitrite de sodium NO_{2 max} est la concentration minimale inhibitrice de NO₂

Selon ces auteurs, un modèle de probabilité de croissance peut être déduit en prenant le logarithme de l'équation [I.37] et en remplaçant $\ln(\mu_{max})$ par *logit* (*p*)= $\ln(p/(1-p))$. Les paramètres du modèle sont les coefficients affectés à chaque composante de l'équation obtenue :

$$logit(p) = a_0 + a_1 \ln(T - T_{\min}) + a_2 \ln(pH - pH_{\min}) + a_3 \ln(a_w - a_{w\min}) + a_4 \ln(NO_{2\max} - NO_2)$$
[1.38]

où $(a_i)_{i=0,...,4}$ sont des coefficients de régression

Les paramètres du modèle (a_0 , ..., a_4) sont ajustés aux observations expérimentales (croissance ou non croissance). Cette approche aide à délimiter les zones qui vont permettre d'assurer la sécurité microbiologique des aliments. Elle présente le désavantage de requérir un nombre important d'expériences afin d'estimer ces nouveaux paramètres.

Presser *et al.* (1998) et Tienungoon *et al.* (2000) ont remarqué le caractère abrupt de la frontière séparant la croissance de la non croissance. En particulier, ils ont observé une très faible proportion de conditions expérimentales pour lesquelles seules certaines répétitions donnaient lieu à une croissance ou à une non croissance.

Dans ces conditions, le choix d'une approche probabiliste (probabilité de croissance d'une population microbienne, 0) par rapport à une approche déterministe comme celle développée par Augustin*et al.* $(1999, 2000) avec le modèle CTPMI (croissance : <math>\mu_{max} > 0$ ou non croissance : $\mu_{max} = 0$) n'est pas forcément convaincante.

1.5. Validation des modèles

La validation des modèles proposés est un aspect important de la modélisation. Les modèles de prévision sont construits le plus souvent dans des milieux synthétiques et pour une seule souche. Il est important de tester les aptitudes du modèle à décrire le comportement de différentes souches du micro-organisme considéré dans aliments.

La validation sur produit consiste à comparer les taux de croissance prédits aux valeurs de μ_{max} observées dans les produits alimentaires. Des graphes prédits/ observés permettent de visualiser la qualité des prédictions. L'objectif des chercheurs est souvent de proposer des estimations « fail safe », de façon à ne pas sous-estimer le danger. Des comparaisons sur le r² des prédictions par rapport aux observations sont également utilisées notamment par Augustin *et al.* (2000). D'autres critères de comparaison ont été proposés. Citons le facteur exactitude (« accuracy factor ») et le facteur biais (« bias factor »). L'erreur moyenne est le plus souvent évaluée à partir du facteur exactitude défini par l'équation suivante (Baranyi *et al.*, 1999, 1996, Ross, 1996) :

$$AF = \exp\left(\sqrt{E(Y^2)}\right)$$
[1.39]

où E (Y) est l'espérance mathématique de la variable Y (estimée par la moyenne) Y= ln(y_{observé}) -ln(y_{prédit})

 $y_{observé}$ et $y_{prédit}$ sont respectivement les valeurs observées et prédites pour le temps de génération (ou le temps de latence)

L'erreur moyenne est alors définie par (AF - 1)x100. Augustin *et al.* (2000) ont enfin proposé la définition d'une exactitude basée sur la médiane au lieu de la moyenne :

$$AF_{M} = \exp\left(\sqrt{M\left(Y^{2}\right)}\right)$$
[I.40]

où M(Y) est la médiane de la variable Y

Ce dernier critère est moins sensible aux valeurs extrêmes ou aberrantes (Augustin, 1999). Les facteurs de biais à partir des moyennes et des médianes sont définis respectivement par :

$$BF = \exp(E(Y))$$
[I.41]

$$BF_M = \exp(M(Y))$$
[1.42]

Baranyi et al. (1999) définissent le pourcentage de biais par :

$$100 \ signe(\ln(BF))(\exp(\ln(BF))) - 1)$$
[I.43]

La limite de ces critères vient du fait qu'ils ne permettent pas de prendre en compte les données de non croissance (observées ou prédites). Selon Baranyi *et al.* (1996), l'erreur sur l'estimation du temps de génération est d'environ 10%, il est donc improbable d'obtenir en prédiction des erreurs moyennes inférieures à cette valeur. Pour fixer les idées, nous citerons des exemples rencontrés dans la littérature : pour le modèle CSC, Bajard (1999) obtient une erreur moyenne calculée sur les logarithmes décimaux des temps de génération de 60%. Pour leur modèle d'interaction CTMPI testé sur 1392 conditions tirées de la littérature, Augustin *et al.* (2000) obtiennent une erreur moyenne de 250% et une erreur médiane de 38%.

Dans le cas d'une validation dans un contexte industriel, le critère de validation ne sera pas forcément seulement l'écart entre le temps de génération prédit et observé. Il peut s'agir d'estimer le temps de dépassement d'un niveau de microorganismes dans le produit ou le nombre maximal de germes atteint pendant un processus de fabrication. La précision exigée peut être variable suivant les besoins de l'utilisateur et les souches incriminées.

Pour atteindre ces objectifs, la microbiologie prévisionnelle doit être capable de décrire de façon suffisamment précise le comportement bactérien au cours des différentes

étapes de la fabrication d'un produit. La validation se fait alors en inoculant un germe bactérien dans un produit alimentaire, en suivant sa cinétique pendant des processus de fabrication et de conservation et en comparant les concentrations bactériennes dénombrées pendant la fabrication aux prédictions des modèles.

Un exemple de validation du modèle tiré de la thèse de L. Rosso (1995b) est présenté Figure I.8. La simulation de la croissance de *Bacillus cereus* s'est faite à partir des paramètres de la fiche descriptive ci dessous. Dans cet exemple, le modèle permet d'estimer précisément le temps nécessaire à une multiplication par 1000 de l'inoculum avec une erreur inférieure à 15% (Rosso, 1995b).





Figure I.8. Prévision de la croissance de *Bacillus cereus* dans un plat à base de poisson (trait continu) soumis une variation de température (trait pointillé). Seul l'inoculum (\Box) est pris en compte dans la simulation. Les points correspondent aux dénombrements observés (Rosso, 1995b).

1.6. Conclusions et méthodes d'approche

Notre objectif est de développer un modèle décrivant l'effet combiné de la température, du pH et des concentrations d'acide organique, fiable dans la zone limite de croissance. Il doit aussi permettre de décrire une éventuelle absence de croissance des microorganismes.

En vue d'une utilisation dans un cadre industriel, les paramètres du modèle doivent pouvoir être estimés de façon simple à l'aide de méthodes automatisées.

A ce stade de l'étude, il nous faut définir le modèle primaire que nous allons utiliser. Il convient également de préciser le type de modèle secondaire et le type de planification expérimentale qui seront mis en œuvre.

1.6.1. Choix d'un modèle primaire

Parmi les modèles primaires présentés, nous avons retenu le modèle logistique avec délai et rupture (équation [I.4]). Outre l'avantage de la simplicité, les paramètres *lag* et μ_{max} du modèle ont la signification que les microbiologistes donnent usuellement au temps de latence et au taux de croissance.

Les relations proposées par Augustin (1999) entre les taux de croissance estimés par des différents modèles seront utilisées pour comparer nos résultats avec des données bibliographiques.

1.6.2. Choix d'un type de modèle secondaire

Pour décrire les effets combinés de ces facteurs environnementaux, notre choix s'est orienté vers l'approche modulaire et en particulier vers les modèles de type cardinaux, dont tous les paramètres ont une signification biologique simple.

Si besoin, ces modèles pourront être adaptés pour tenir compte d'une situation particulière : par exemple le comportement de *L. monocytogenes* aux basses températures.

Dans l'approche proposée par L. Rosso, la prise en compte des effets des acides organiques se fait par l'intermédiaire de la nature de l'acide. Les valeurs de pH_{min}

dépendent de l'effet tampon des milieux de culture. Nous nous orienterons donc vers l'extension des modèles cardinaux en incluant un module décrivant l'effet des concentrations d'acide faible (approche développée notamment par Presser *et al.*, 1997, cf. paragraphe 1.3.5).

1.6.4. Planification expérimentale et estimation des paramètres

Il est possible d'identifier l'ensemble des paramètres de croissance (températures cardinales, pH cardinaux, a_w cardinales, paramètres liés à la présence d'acide faible) sur un même jeu de données où chaque facteur serait étudié à plusieurs niveaux selon un plan d'expérience. Cette méthode, rigoureuse, permettrait notamment de définir des intervalles de confiance non conditionnés sur les paramètres du modèle.

Pourtant, dans un contexte industriel ou dans le contexte d'une acquisition en routine des paramètres (pour un nombre élevé de souches), il est important de minimiser le coût et le temps nécessaire aux expériences. Cette minimisation du coût passe par un suivi automatisé de la croissance bactérienne, notamment par turbidimétrie.

Certains appareils d'acquisition automatisée de données comme le Bioscreen C ne disposent pas de dispositif réfrigérant. Il est donc difficile de les utiliser pour des températures inférieures à 20°C.

De plus, toujours avec le Bioscreen C, on ne peut tester qu'une seule température par expérience. Il est donc difficile, comme dans le cadre d'un plan d'expérience classique, de faire varier tous les niveaux des facteurs en utilisant uniquement des suivis de croissance automatisés.

Nous avons vu qu'une méthode compatible avec cette démarche consiste à étudier séparément l'effet de chaque facteur en fixant les niveaux des autres facteurs à un niveau proche de sa valeur optimale pour la croissance. Cette méthode est compatible avec le suivi automatisé de la croissance par turbidimétrie et a été retenue dans ce travail. Pour des raisons pratiques, les méthodes automatisées n'ont pas été systématiquement mises en œuvre dans cette étude. Cependant, nous nous plaçons délibérément dans une démarche dans laquelle les effets des facteurs sont étudiés indépendamment.

Dans la mesure du possible, l'effet d'un facteur sera étudié séparément, en fixant les niveaux des autres facteurs à des niveaux favorables pour la croissance. L'effet de la température sur μ_{max} sera étudié à pH 7, l'effet du pH à 30°C. Précison s cependant que dans le cas des acides organiques, les effets ont été étudiés à 20°C à plusieurs
niveaux de pH, ceci afin de vérifier la capacité du modèle CPM à décrire les effets combinés du pH et des concentrations d'acide par le développement d'un nouveau terme.

D'une façon pratique, cette méthode facilite les conditions d'obtention des estimations des paramètres. Comme déjà signalé, l'approche permet également d'utiliser des jeux de données tirés de la littérature pour estimer certains paramètres.

Les taux de croissance optimaux et les temps de latence minimaux seront déduits à partir de courbes de référence dans les produits ou les milieux de culture considérés.

Un des objectifs de ce travail est de vérifier que les estimations des paramètres acquises dans ces conditions permettent une bonne prédiction du comportement bactérien dans la totalité du domaine expérimental.

1.6.3. Modélisation des interactions entre facteurs

D'après Augustin *et al.* (2000), les modèles secondaires les plus utilisés sous-estiment les interactions entre les facteurs. Ceci conduirait à une surestimation du taux de croissance dans des zones limites de la croissance bactérienne.

Il semble important de vérifier l'existence de ces interactions sur des données concernant une même souche et de corriger un éventuel biais apparaissant entre un modèle modulaire classique et les observations expérimentales.

L'aptitude du modèle développé à décrire les interactions sera testée pour plusieurs souches de *Listeria innocua* et *monocytogenes* en milieu de culture et en matrice alimentaire. L'estimation du pH minimum permettant la croissance en fonction de la concentration en acide organique et de la température sera un important point à aborder.

Enfin, l'approche proposée pour *Listeria* sera testée sur des jeux de données bibliographiques concernant d'autres microorganismes.

Matériels et Méthodes

2.1. Souches bactériennes et milieux de culture

2.1.1. Souches bactériennes

Le comportement d'une souche de *Listeria innocua* et de plusieurs souches de *Listeria monocytogenes* a été étudié au laboratoire ADRIA. Ces différentes souches sont énumérées dans le Tableau 2.1. Une souche test de *Lactococcus lactis, Lc. lactis* SL 05 a été utilisée pour l'étude du comportement de *Listeria* pendant une fermentation lactique. Les souches sont conservées à -55°C sous forme concentrée (10⁷-10⁸ UFC/ml).

Tableau 2.1. Micro-organismes utilisés au laboratoire pour les expériences.

Souches	Provenance	Milieu d'isolation
L. innocua ATCC 33090	ATCC	bovin
L. monocytogenes 17501	Isolé à l'ADRIA	Lait
L. monocytogenes Scott A	Université de Cork	Etre humain
Lc. lactis SL 05	Collection ARILAIT	Lait

2.1.2. Milieux utilisés

2.1.2.1. Milieux de culture

Les suivis de croissance ont été réalisés dans du BHI supplémenté en glucose (0.2%) et en extraits de levure (0.3%). Par commodité, nous appellerons dans la suite ce milieu BHIM. Les concentrations d'acide lactique, acétique et propionique ont été

ajoutées en fonction de la planification expérimentale. Le pH a été ajusté par l'addition de HCl et de NaOH.

Afin de valider le modèle développé, des cinétiques de *L. innocua ATCC 33090* ont été acquises dans du lait UHT supplémenté par 35 mM d'acide lactique à différentes températures.

2.1.2.2. Milieux et conditions de dénombrement

Les dénombrements ont été effectués sur un milieu gélosé non sélectif (PCA ; Oxoïd). Dans le cas des cocultures, les milieux Oxford (Oxoïd) et MRS (Oxoïd) ont été utilisés pour dénombrer respectivement *Listeria* et *Lc. lactis. Listeria* et *Lc. lactis* ont été énumérés après 48 h d'incubation à 30°C.

2.1.3. Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture congelée, l'inoculum est mis en culture à 20°C pendant 24 h dans du BHIM. Après une dilution au 100^{ème}, une seconde culture est mise à incuber à 20°C pendant 24 h. L'inoculum obtenu est alors en p hase stationnaire (Figures II.1 et II.2).



Figure II.1. Croissance de L. innocua ATCC 33090 pendant les pré-cultures à 20°C.



Figure II.2. Croissance de *Lc. lactis* SL05 pendant les pré-cultures à 20°C.

2.1.4. Etudes des cinétiques de croissance

La croissance bactérienne a été suivie par la méthode classique de dénombrement sur milieu gélosé ou par turbidimétrie.

2.1.4.1. Dénombrement sur milieu gélosé

La croissance bactérienne a été suivie en erlenmeyer. Les microorganismes ont été inoculés dans 50 ml de milieu de culture à10³, 10⁵ ou 10⁶ UFC/ml suivant les microorganismes et les expériences.

Comme déjà signalé, les cinétiques de croissance ont été ajustées au modèle logistique avec délai et rupture (équation [I.4]). Ce modèle permet d'ajuster les cinétiques pour lesquelles la population bactérienne atteint son niveau maximal x_{max} . Pour certaines conditions, les microorganismes croissent très peu, sans qu'une phase de saturation n'apparaisse. Dans ces cas, une estimation consistante de x_{max} n'est pas possible et le paramètre x_{max} a été fixé à 10⁹ UFC/ml.

2.1.4.2. Turbidimétrie

Les cultures sont réalisées dans les cupules de 400 μ l des plaques d'un turbidimètre automatique : le Bioscreen C (Labsystems, P.O. Box, Helsinki, Finlande).

Pour estimer la concentration minimale inhibitrice d'acide non dissocié de *L. monocytogenes* Scott A, c'est le modèle [I.8] qui a été utilisé pour estimer les taux de croissance.

Pour les autres expériences, c'est la méthode des dilutions successives qui a été retenue pour le calcul de μ_{max} . La Figure II.3 montre un exemple de l'utilisation de cette méthode (basée sur la relation linéaire entre l'inoculum et le temps de détection) pour l'estimation du taux de croissance de *L. innocua* ATCC 33090 à 20°C et pH 5.54.



Figure II.3. (a) Evolution de la densité optique pour 8 inoculum différents de *L. innocua* ATCC 33090 obtenus par dilution au $\frac{1}{2}$ à 20°C et pH 5.54. (b) Relation linéaire entre le temps de détection et le logarithme népérien de l'inoculum de *L. innocua* ATCC 33090 à 20°C et pH 5.54

2.1.4.2.1. Préparation des inoculum

Après deux pré-cultures à 20°C, les échantillons sont obtenus par dilutions successives pour obtenir 8 inoculum différents entre 1.10^5 et 0.7 10^3 UFC/ml : 1.10^5 , 5 10^4 , 2.5 10^4 , 1.25 10^4 , 0.61. 10^4 , 3 10^3 , 1.5 10^3 , 0.7 10^3 .

2.1.5. Conditions expérimentales

2.1.5.1. Estimation des paramètres

Les paramètres des modèles secondaires ont été estimés pour différentes souches de *Listeria* d'après des données acquises au laboratoire ou des données bibliographiques. Les facteurs étudiés et les conditions d'obtention des paramètres sont précisés au Tableau 2.2.

Souche	Facteur	Lieu	Suivi	Niveaux fixe des autres facteurs	Facteur concomitant
<i>L. innocua</i> ATCC 33090	Température	L*	D***	pH 7	_
	рН	L	D	30℃	-
	Acide lactique	L	B****	20°C	рН
	Acide propionique	L	В	20°C	рН
	Acide acétique	L	В	20°C	рН
	a _w (humectant : NaCl)	L	В	20℃, pH 7	_
L. innocua DSM 20649	Acide lactique	Bb**		20°C	рН
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	Température	Bb		pH 7.1	-
	рН	L	D	30°C	Ι
	Acide lactique	L	В	30℃, pH 5.1	_
L. monocytogenes 17501	рН	L		30°C	_
L. monocytogenes CIP 7831	Température	Bb	В	pH 7.1	_

(*) données du laboratoire ADRIA; (**) données bibliographiques, (***) dénombrement sur milieu gélosé, (****) Bioscreen.

2.1.5.2. Etude des interactions dans du BHIM. Interface croissance non croissance

L'interface séparant les conditions qui permettent la croissance des pathogènes des conditions qui vont inhiber cette croissance présente un intérêt essentiel pour la sécurité alimentaire.

Cette interface a été étudiée à la fois sur des données cinétiques acquises par turbidimétrie (Bioscreen) et par dénombrement sur boîtes de Pétri. Les données pour lesquelles une croissance a été constatée et ayant servi à l'élaboration des modèles permettent une première évaluation de l'interface. Ces données ont donc été incluses dans les jeux "croissance/ non croissance". Parmi les données acquises par turbidimétrie, seules ont été incluses dans les jeux "croissance" les conditions pour lesquelles une croissance a été observée pendant la durée des expériences (au maximum 20 jours).

Des expériences complémentaires ont été réalisées en erlenmeyer en zone présumée limite pour la croissance et en zone de non croissance. Ces dernières données ont été utilisées pour valider les prévisions des taux de croissance et des cinétiques observées. Deux situations ont été envisagées : l'étude des effets combinés de la température et du pH en absence d'acide organique d'une part et l'étude de l'effet du pH et des concentrations d'acide à 20 et/ ou 10°C d'autre part.

Température/ pH: la croissance ou la non croissance a été suivie à partir d'un inoculum de 10³ UFC/ml. *Listeria* a été énumérée à intervalles réguliers pendant 30 jours. Deux souches ont été étudiées : *L. innocua* ATCC 33090 et *L. monocytogenes* 17501.

Certaines conditions ont également été testées à partir d'un inoculum de de10⁵ UFC/ml.

Température/ pH/ acide: afin d'autoriser une future modélisation de la destruction des germes microbiens, le comportement de *L. innocua* ATCC 33090 a été suivi à partir d'une population initiale de inoculum de10⁵ UFC/mI. *Listeria* a été énumérée à intervalles réguliers pendant 30 jours.

Des données ont également été acquises à pH 7 à différentes températures et concentrations en NaCl. La croissance ou la non croissance de *L. innocua* ATCC 33090 a été suivie à partir d'un inoculum de 10^3 UFC/ml. *Listeria* a été énumérée à intervalles réguliers pendant 40 jours. Les valeurs d'a_w utilisées ont été obtenues par des lissages « spline » en utilisant une table de correspondance a_w= f(%NaCl) à 25°C (Tableau 2.3 ; Robinson et Stokes, 1965).

%NaCl (w/w)	a _w
0.58	0.996
1.15	0.993
1.72	0.990
2.28	0.986
2.84	0.983
3.39	0.980
3.93	0.976
4.47	0.973
5.00	0.970
5.52	0.966
6.55	0.960
7.56	0.953
8.55	0.946
9.52	0.938
10.46	0.931
11.39	0.924
12.3 0	0.916
13.19	0.908
14.06	0.901
14.92	0.893
15.75	0.885

Tableau 2.3. A_w d'une solution aqueuse en fonction des concentrations de NaCl à 25°C (d'après Robinson et stockes, 1965).

2.1.5.3. Evaluation de la croissance et la non croissance

<u>**Turbidimétrie**</u>: la croissance a été rapportée pour une augmentation significative de la turbidité ($DO_{initiale}$ +0.1) à partir d'un inoculum à10⁵ UFC/ml. <u>**Enumération sur boîte de Pétri**</u>: la croissance a été reportée pour une multiplication par un facteur 10 de la concentration bactérienne initiale. Une « non croissance » a été rapportée dans les autres cas.

2.1.5.4. Croissance de L.innocua dans du lait

La croissance de *L. innocua* ATCC 33090 dans du lait supplémenté en acide lactique (pour atteindre une concentration de 35 mM) a été suivie à différentes températures (entre 4 et 20°C) par dénombrement à partir d'un in oculum de 10³ UFC/ml. *Listeria* a été énumérée à intervalles réguliers pendant 30 jours.

2.1.5.5. Croissance de L. innocua en présence de Lc. lactis

La croissance de *L. innocua* ATCC 33090 a été suivie à 20 et 30°C dans du BHIM ajusté à différents pH (entre 4.70 et 7) par addition d'HCl N. *L. innocua* a été inoculée à environ 10³ UFC/ml, *Lc. lactis* à environ 10⁶ UFC/ml. Les cinétiques de *Listeria* et de *Lc. lactis* ont été suivies par dénombrement pendant 48 h. Dans certaines expériences, les concentrations d'acide lactique ont été mesurées (kit acide lactique, Boehringer Mannheim, Cat. No: E 1112 821) à différents stades de la fermentation.

2.2. Traitement des données

2.2.1. Ajustement des données

2.2.1.1. Modèle de régression

Un modèle de régression se formalise de la façon suivante :

$$y = f(X, \beta) + \zeta$$
[II.1]

où y est la variable indépendante
 f est la fonction de modélisation
 X est le vecteur des variables explicatives
 β est le vecteur des paramètres du modèle
 ζ est le vecteur des erreurs

Les erreurs ζ_i sont supposées indépendantes et distribuées suivant une loi normale de moyenne nulle et de variance σ^2 . Les ajustements des données expérimentales aux

modèles nécessitent l'utilisation de la régression non linéaire. Les ajustements se font par la méthode des moindres carrés qui consiste à déterminer $\hat{\theta}$ l'estimateur du vecteur des paramètres θ qui minimise la somme des carrés des résidus (écarts entre les valeurs observées et prédites par le modèle).

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

$$SCE_{\min}(\theta) = Min\left(\sum_{i=1}^{n} (y_i - f(x_i, \theta))^2\right) = SCE(\hat{\theta})$$
[II.3]

Pour la recherche du minimum de la *SCE*, un module de régression non linéaire (NLINFIT, MATLAB 5.2, The Mathworks Inc, Natick, MA, USA) a été utilisé.

2.2.1.2. Régression par segments

Lorsqu'un modèle est défini par morceaux, une méthode alternative au modèle de régression classique peut être utilisée : la régression par segments. La méthode de régression a été développée par Hudson (1966). Dans le cas où il y seulement un point de discontinuité, le modèle peut être formalisé sous la forme :

$$y = f(x, \beta) = \begin{cases} f_1(x, \beta_1) & \text{si } x < \alpha \\ f_2(x, \beta_2) & \text{sinon} \end{cases}$$
[II.4]

L'estimation des vecteurs β_1 , β_2 et α se fait de façon itérative. A chaque itération, le jeu de données est divisé en deux sous-échantillons distincts. Le premier sous-échantillon sert à estimer le vecteur β_1 et le second à l'estimation de β_2 . L'estimateur de α est calculé comme l'intersection des fonctions f_1 et f_2 . A la fin des itérations, l'estimateur retenu (β_1 , β_2 , α) est celui qui minimise la somme des carrés des écarts entre les prédictions et les observations. La régression par segments a été programmée sous le logiciel MATLAB 5.2.

2.2.2. Régions et intervalles de confiance

La construction de la région de confiance sur les paramètres peut se faire suivant différentes méthodes (Beale, 1960; Bates et Watts, 1988). Nous avons utilisé la

méthode la plus courante, dite de "linéarisation". Les intervalles de confiance ont été calculés au niveau α = 0.05. La méthode consiste à utiliser la matrice jacobienne J :

$$J = \left[\frac{\partial f(x_i, \theta)}{\partial \theta_j}\right]_{\theta = \hat{\theta}}$$
[11.5]

La matrice de variance- covariance est définie par :

^

$$R = \sigma^{2}_{R} (J^{T} J)^{-1} = [r_{ij}]$$
[II.6]

L'intervalle de confiance calculé pour le paramètre θ_i par la méthode de linéarisation est défini par :

$$\boldsymbol{\theta}_{i} = \boldsymbol{\theta}_{i} + t_{\alpha/2, n-p} \sqrt{r_{ii}}$$
[II.7]

t (*n* –*p*) est la valeur de Student à *n* – *p* degrés de liberté au risque α

2.2.3. Evaluation de la qualité d'ajustement

Différents critères sont utilisés pour évaluer la qualité d'un ajustement. Ces critères sont basés sur l'examen des résidus et sur des critères quantitatifs. L'ensemble de ces critères peut permettre le choix entre des modèles concurrents.

2.2.3.1. Critères quantitatifs d'ajustement global

Les critères du R^2_{adj} et de la variance résiduelle (σ^2_{res}) permettent d'estimer la qualité globale de l'ajustement. L'ajustement est d'autant meilleur que la valeur du R^2_{adj} est proche de 1 et que la variance résiduelle est faible.

$$R_{adj}^{2} = 1 - \frac{n-1}{n-p} \frac{\sum_{i=1}^{n} \left(yi - yi\right)^{2}}{\sum_{i=1}^{n} \left(yi - y\right)^{2}}$$

$$\hat{\sigma}_{R}^{2} = \sqrt{\frac{SCE}{n-p}}$$
[II.8]

2.2.3.2. Examen des résidus

Hétéroscédasticité

Une hypothèse de la régression non linéaire est la constance de la variance des résidus σ^2 (on parle alors d'hétéroscédasticité). Cette hypothèse peut être vérifiée sur le graphe des résidus en fonction des valeurs prédites.

Test de la normalité des résidus.

Les résidus sont supposés suivre une loi normale. Cette hypothèse peut être vérifiée par un test de Kolmogorov-Smirnov. Le graphe des quantiles résiduels en fonction des quantiles de la loi normale (graphe de normalité des résidus) aide également à visualiser la véracité de cette hypothèse.

Test d'autocorrélation (d'ordre 1)

Ce test est utilisé lorsque la variable indépendante est une variable ordonnée (comme la température et le pH par exemple). On suppose que la valeur d'un résidu est la somme d'un multiple de l'erreur précédente et d'une erreur indépendante. Deux erreurs successives sont reliées par la forme :

$$\mathcal{E}_i = \rho \, \mathcal{E}_i + u_i \tag{II.10}$$

Le coefficient ρ est appelé coefficient de corrélation d'ordre 1. Il y a autocorrélation lorsque la valeur de ρ est significativement différente de zéro. Le test de Durbin Watson permet de confronter l'hypothèse de non corrélation (Ho : ρ =0) à l'hypothèse de l'existence d'une corrélation (H1 : ρ >0). ρ est estimé par l'équation suivante :

$$\hat{\rho} = \frac{\sum_{i=1}^{n} e_i e_{i-1}}{\sum_{i=1}^{n} e_i^2}$$
[II.11]

La statistique de Durbin Watson (D) s'écrit :

$$D = 2 \quad \left(1 - p\right)$$
[II.12]

Les valeurs de la statistique D sont à comparer aux valeurs critiques des tables statistiques.

2.3. Simulation de la croissance

Après avoir modélisé l'effet des facteurs étudiés sur les paramètres de la croissance de *Listeria*, il est nécessaire de confronter les cinétiques prévues aux observations pour des conditions n'ayant pas servi au développement des modèles mathématiques. Dans ce paragraphe sont détaillées les conditions de ces simulations, notamment lorsque le niveau d'un ou plusieurs des facteurs limitants varie au cours du temps.

2.3.1. Modèle primaire

Le modèle primaire utilisé pour l'ajustement des cinétiques de croissance (équation [I.4]) a logiquement été utilisé pour les simulations. Ces simulations nécessitent, en plus de la connaissance de l'inoculum x_o , la prédiction du taux de croissance, du temps de latence et de la concentration bactérienne maximale x_{max} . La valeur de x_{max} a été estimée à partir de l'ajustement de courbes de référence dans les produits et considérée comme indépendante des facteurs environnementaux. Cette approche concernant x_{max} est notamment celle proposée par L. Rosso (1995b) dans sa thèse.

2.3.2. Prévision des cinétiques en conditions dynamiques

Pendant la fabrication et les différentes phases de stockage et de conservation, les conditions de température et de pH peuvent varier au cours du temps.

Dans ces cas, la simulation de la croissance se fait en intégrant numériquement le modèle logistique avec délai et rupture. Le modèle différentiel à intégrer s'écrit alors (Rosso, 1995b) :

$$\begin{cases} t < lag_{[T(t),pH(t),[acide](t)]}, & \frac{dx}{xdt} = 0\\ t \ge lag_{[T(t),pH(t),[acide](t)]}, & \frac{dx}{xdt} = \mu_{\max}(T(t),pH(t),[acide](t))\left(1 - \frac{x}{x_{\max}}\right) \end{cases}$$
[II.13]

La prise en compte des variations des facteurs environnementaux s'accompagne d'hypothèses importantes. En particulier, comme de nombreux auteurs (Rosso, 1995b, Van Impe *et al.*, 1995), on a admis que ces variations n'engendraient pas de stress significatif et que les microorganismes répondent aux variations des facteurs en

adoptant les valeurs de *lag* et μ_{max} prédites par le modèle établi en conditions constantes.

La connaissance des profils de variation de la température, du pH, et des concentrations d'acide nous permet de simuler la cinétique théorique des germes microbiens. Les profils de variation des facteurs environnementaux sont généralement discrets. Il est donc nécessaire d'utiliser des interpolations et des lissages pour l'intégration. La méthode d'interpolation choisie va dépendre de la nature des données.

2.3.2.1. Interpolation des profils de température

Des fonctions « spline » ont été utilisées pour le lissage des mesures de température.

2.3.2.2. Interpolation des profils de pH et des concentrations d'acide

Dans des expériences (réalisées au laboratoire) de coculture de *Listeria* avec une flore lactique, le pH a été mesuré à intervalles rapprochés (1/2 h ou 1 h). Des lissages « spline » ont été utilisés et décrivent correctement l'évolution du pH.

Dans certains cas, les mesures peuvent être plus espacées (3-4 h) et les lissages « spline » se révèlent souvent inadéquats à décrire l'évolution du pH. Dans ces cas, les données de pH ont été ajustées au modèle de Weibull (équation [II.14]) qui permet une bonne description de l'évolution du pH pendant des processus d'acidification (Lebreton et Millier, 1982) :

$$pH = a - ((a - b)\exp(-\exp(-c)\exp(d \ln(t))))$$
où a, b, c, d dont des coefficients de régression
[II.14]

Contrairement aux mesures de température et de pH, l'évaluation des concentrations d'acide n'est pas automatisable et peut s'avérer fastidieuse.

Dans certaines situations, nous avons utilisé la « théorie du pouvoir tampon » développée par Wilson *et al.* (2000). Cette théorie permet, à partir d'une courbe de titration pH= $f([H^+]_{ajoutée})$ dans un milieu donné, l'estimation de la concentration d'acide par une simple mesure de pH. La courbe de titration est obtenue en ajoutant des quantités croissantes d'acide fort et en mesurant le pH du milieu.

La « théorie du pouvoir tampon » est basée sur le fait qu'à chaque mole d'acide dissocié correspond une mole de protons supplémentaire (équation [II.15]).

$$AH \leftrightarrow A^- + H^+$$
 [II.15]

Le rapport de dissociation est contrôlé par le pKa de l'acide selon l'équation d'Henderson-Hasellbach qui peut s'écrire sous la forme :

$$10^{(pKa-pH)} = \frac{[acide total]}{[A^-]} - 1$$
[II.16]

Or, d'après l'équation d'équilibre [II.15], $[A^{-}] = [H^{+}]_{ajoutée}$. Il vient donc :

$$10^{(pKa-pH)} = \frac{[acide \ total]}{[H^+]_{ajout\acute{e}}} - 1$$
[II.16]

L'équation [II.16] s'écrit encore :

$$[acide total] = (10^{(pKa-pH)} + 1)[H^+]_{ajout\acute{e}}$$
[II.17]

En intégrant la relation pH= $f([H^+]_{ajouté})$ à l'équation [II.17], la concentration d'acide total s'exprime en fonction du pH et du pKa de l'acide :

$$[acide total] = (10^{(pKa-pH)} + 1)f^{-1}(pH)$$
[II.18]

Pour les expériences en BHIM, la table de référence pH= $f([H^+]_{ajouté})$ nous a été fournie par l'Institute of Food Research (IFR) de Norwich.

La Figure II.4 montre les prédictions du pH en fonction des concentrations d'acide lactique et acétique dans du BHIM par l'utilisation de la théorie du pouvoir tampon.



Figure II.4. Prévision du pH du milieu BHIM en fonction des concentrations d'acide acétique et lactique à partir d'une table de référence pH = $f([H^{+}]_{ajoutée})$.

Pour les simulations de la croissance de *Listeria* dans du lait en présence de *Lc.lactis*, une table de correspondance $pH = f([H^+]_{ajoutée})$ a été établie à l'ADRIA dans du lait UHT.

Etude des effets des facteurs environnementaux : température, pH, concentrations d'acide organique

Dans ce chapitre, l'effet de la température puis du pH (contrôlé par ajout d'HCl) sur le taux de croissance de Listeria a été étudié. L'ajout d'un nouveau module dans le modèle pour décrire l'effet des concentrations d'acide organique s'est fait par agrégation selon l'approche modulaire classique. Les effets de trois acides (acides lactique, acétique et propionique) ont été étudiés.

3.1. Effet de la température sur le taux de croissance de *Listeria*

3.1.1. Ajustement du modèle des températures cardinales

Pour la plupart des bactéries, il a été remarqué que $\sqrt{\mu_{max}}$ varie linéairement avec la température dans la zone suboptimale. Bajard *et al.* (1996a) ont cependant mis en évidence un comportement spécifique de certaines souches de *L. monocytogenes* (CIP 7831, Scott A) aux faibles températures (cf. paragraphe 1.3.6).

L'étude d'autres souches de *L. monocytogenes* notamment Murray B dans de la viande (Grau et Vanderline, 1993) met en évidence un comportement (Bajard, 1996b). Ces résultats tendent à montrer que cette anomalie n'est pas un cas isolé observable seulement pour quelques souches, mais concernerait la plupart des souches de *Listeria* (Bajard, 1996b)

L'ajustement du modèle des températures cardinales (équation [I.33]) aux données publiées par Bajard (1996b) met en évidence certains problèmes : pour la souche

Scott A, une température minimale de croissance de -0.5°C est estimée alors qu'une croissance a été observée à -2°C (Figure III.1). Pour la souche CIP 7831, on note une sous-estimation systématique du taux de croissance pour les températures inférieures à 15°C (Figure III.2).



Figure III.1. Ajustement du modèle des températures cardinales (CTM) à l'évolution de la racine carrée du taux de croissance de *L. monocytogenes* Scott A (jeu de données : Bajard, 1996b).



Figure III.2. Ajustement du modèle des températures cardinales (CTM) à l'évolution de la racine carrée du taux de croissance de *L. monocytogenes* CIP 7831 (données publiées par Bajard, 1996b). (a) totalité du jeu de données ; (b) visualisation de l'ajustement pour les températures entre -2 et 14°C.

3.1.2. Développement d'un modèle décrivant l'effet de la température sur le taux de croissance de Listeria

Il s'est alors agi pour nous de développer un modèle décrivant l'effet de la température dans la totalité de la zone de croissance et permettant la description du comportement spécifique de *Listeria* aux basses températures.

Le modèle développé, que nous appellerons CT_RM , est défini par les températures cardinales (T_{min} , T_{opt} , T_{max}) ainsi que de deux paramètres supplémentaires : T_c , la température de rupture de pente et T_1 l'intersection de la première partie linéaire avec l'axe des abscisses. Comme dans le modèle CSC (équation [I.32]), T_1 est la température minimale que l'on obtiendrait si l'ajustement était réalisé pour les températures supérieures à la température de rupture.

$$\mu_{\max} = \mu_{opt} \rho_{CT_R M}(T)$$
[III.1]

$$\rho_{CT_{R}M}(T) = \begin{cases} \frac{(T-T_{1})^{2}(T-T_{\max})}{(T_{opt}-T_{1})[(T_{opt}-T_{1})(T-T_{opt})-(T_{opt}-T_{\max})(T_{opt}+T_{1}-2T)]} & si \ T \ge T_{c} \\ \frac{(T_{c}-T_{1})^{2}(T_{c}-T_{\max})}{(T_{opt}-T_{1})[(T_{opt}-T_{1})(T_{c}-T_{opt})-(T_{opt}-T_{\max})(T_{opt}+T_{1}-2T_{c})]} \left(\frac{T-T_{\min}}{T_{c}-T_{\min}}\right)^{2} & si \ T < T_{c} \end{cases}$$

Au-dessus de la température de rupture T_c , le modèle CT_RM correspond au modèle cardinal CTM classique où T_{min} est remplacé par le paramètre T_1 . Pour les températures inférieures à T_c , le modèle CT_RM décrit une variation linéaire de $\sqrt{\mu_{max}}$ en fonction de la température.



Figure III.3. Courbe théorique du modèle CT_RM en représentation racine carrée et interprétation graphique de ses paramètres. Les paramètres du modèle pour la simulation sont : $\mu_{opt} = 1.15 \text{ h}^{-1}$; $T_{min} = -4^{\circ}$; $T_1 = 3^{\circ}$; $T_c = 12^{\circ}$; $T_{opt} = 37^{\circ}$; $T_{max} = 47^{\circ}$.

Le modèle CT_RM est défini par morceaux et présente un point de discontinuité à la température T_c (Figure III.3). Les ajustements ont donc été effectués à la fois par régression non linéaire classique et par régression segmentée. Les deux types de

régression ont conduit aux mêmes estimations. L'avantage pratique de l'utilisation de la régression linéaire segmentée n'est donc pas convaincante sur nos jeux de données.

Le modèle CT_RM a été ajusté sur les données rapportées par S. Bajard dans sa thèse. Les résultats des ajustements sont présentés Figure III.4 et montrent une bonne adéquation entre les courbes ajustées et les données expérimentales (R^2_{adj} =0.99). Aucune auto-corrélation entre les résidus n'est apparue. Les graphes de normalité ne mettent pas en évidence de violation de l'hypothèse de normalité des résidus.



Figure III.4. Ajustement du modèle CT_RM pour différentes souches de *L. monocytogenes* d'après des jeux de données de Bajard (1996b) et graphes de normalité des résidus.

Le modèle a aussi été ajusté aux données acquises au laboratoire pour la souche ATCC 33090 entre 0.5 et 43°C. Comme pour les souche s de *L. monocytogenes*, les résultats de l'ajustement (R^2_{adj} =0.99) mettent en évidence une bonne description de l'effet de la température sur le taux de croissance de cette souche (Figure III.5). Le modèle CT_RM sera donc utilisé dans la suite de l'étude pour décrire l'effet spécifique de la température sur le taux de croissance de cette souche. Les paramètres estimés pour les trois souches considérées sont rapportés au Tableau 3.1.



Figure III.5. Ajustement du modèle CT_RM aux données de *L. innocua* ATCC 33090 acquises au laboratoire à pH 7 dans du BHIM et graphe de normalité des résidus.

Tableau 3.1. Valeurs estimées des paramètres du modèle CT_RM pour différentes souches de *Listeria.*

	L. monocytogenes CIP 7831	L. monocytogenes Scott A	L. innocua ATCC 33090
R^2_{adj}	0.99	0.99	0.99
<i>T_{min}</i> (℃)	-5.6 [-7.6 – 3.7]	-5.4 [-10.8 – 0.1]	-4.5 [-5.6 – 3.4]
<i>T</i> ₁(℃)	3.9 [1.6 – 6.3]	4.9 [-0.0 – 10.0]	0.6 [-0.5 – 1.8]
<i>T</i> _c (℃)	12.9 [10.1 – 15.6]	12.0 [7.3 – 16.7]	10.0 [8.0 – 12.0]
<i>T_{opt}</i> (℃)	35.8 [34.5 – 37.2]	34.9 [32.7 –37.1]	37.4 [36.9 – 37.9]
<i>T_{max}(℃</i>)	43.2 [42.5 – 43.9]	47.7 [41.3 – 54.1]	45.4 [44.8 – 46.0]

3.1.3. Conclusion

Listeria est en mesure de se développer en milieu liquide à de très basses températures (-2 $^{\circ}$). Les souches étudiées semblent capables de mettre en œuvre

des mécanismes spécifiques aux basses températures. Un modèle décrivant ce comportement spécifique aux basses températures a été proposé pour décrire le taux de croissance de *Listeria* dans l'ensemble de la gamme de température permettant la croissance.

3.2. Effet du pH sur le taux de croissance de Listeria

3.2.1. Ajustement du modèle des pH cardinaux

Le modèle des pH cardinaux (module CPM, équation [I.22]) a été ajusté sur des jeux de données décrivant l'effet du pH à 30°C sur les souches ATCC 33090, 17501 et Scott A. Le pH est contrôlé par ajout de HCI et de NaOH (sans ajout d'acide organique). Les résultats des différents ajustements sont présentés Figure III.6 et les paramètres estimés au Tableau 3.2. L'adéquation des courbes théoriques aux données expérimentales confirme le choix du modèle CPM pour décrire la relation μ_{max} -pH pour *Listeria*.



Figure III.6. Ajustement du modèle CPM aux jeux de données de *L. innocua* ATCC 33090 et de *L. monocytogenes* Scott A acquis au laboratoire à 30°C dans du BHIM .



Figure III.7. Ajustement du modèle CPM aux données de *L. monocytogenes* 17501 acquises au laboratoire à 30°C dans du BHIM.

Tableau	3.2.	Estimations	des	рΗ	cardinaux	obtenues	pour	les	différentes	souches	de
Listeria é	tudi	ées.									

	L. innocua	L. monocytogenes	L. monocytogenes	
-2	A100 33030	Scoll A	17501	
R⁻ _{adj}	0.94	0.97	0.96	
рН _{тіп}	4.21 [4.05 – 4.36]	4.24 [4.07 - 4.41]	4.27 [4.10 – 4.44]	
pH _{opt}	7.21 [6.86 – 7.55]	7.07 [6.80 – 7.35]	7.10 [6.84 – 7.37]	
pH _{max}	10.07 [9.54 – 10.61]	10.46 [10.19 –10.71]	10.26 [9.78 – 10.73]	

Les estimations des pH minimaux et optimaux sont voisines pour les souches de *Listeria* testées. Les pH_{min} estimés se situent autour de 4.25 pour les souches étudiées. Ces estimations sont légèrement inférieures à celles habituellement proposées dans la littérature : Augustin (2000) et Rosso (1995b) proposent ainsi une valeur de 4.40 pour *Listeria*. Cependant des croissances de *Listeria* ont été constatées par certains chercheurs à des niveaux de pH inférieurs : Tienungoon *et al.* (2000) ont ainsi observé des croissances de *L. monocytogenes* Scott A à pH 4.23, ce qui est proche de la valeur estimée de pH_{min} dans cette étude.

Les valeurs de pH_{max} estimées sont supérieures à celles rapportées dans la littérature : pour la souche Scott A, une croissance a été observée au laboratoire à pH 10 alors que les valeurs de pH_{max} habituellement proposées sont comprises entre 9.5 et 9.8 (Petran et Zolotta, 1989, te Giffel *et al.*, 1999).

3.2.2. Conclusion

Contrairement au comportement de *Listeria* aux basses températures, aucun comportement spécifique n'a été constaté en réponse à une baisse de pH. Cette étude, en accord avec les travaux de Rosso (1995b), montre que l'effet du pH sur le taux de croissance de *Listeria* peut être décrit par le modèle des pH cardinaux.

3.3. Développement d'un modèle général décrivant l'effet des concentrations d'acide sur le taux de croissance

Il est classiquement reconnu que les aptitudes de croissances des bactéries dépendent non seulement du pH mais aussi de la nature et des concentrations d'acidulant (Young *et al.*, 1993; Houtsma *et al.*, 1994; Presser *et al.*, 1997). Dans ce paragraphe, nous proposons un modèle général pour décrire l'effet des acides faibles sur μ_{max} .

3.3.1. Effet des acides organiques

3.3.1.1. Observations

Les monoacides faibles se présentent sous deux formes différentes : une forme dissociée (A⁻) et une forme non dissociée (AH). Ces deux formes n'ont pas les

mêmes effets sur les aptitudes de croissance des flores bactériennes : l'effet inhibiteur est généralement attribué à la forme non dissociée (lta *et al.*, 1991 ; Adams *et al.*, 1991 ; Houtsma *et al.*, 1994). La molécule d'acide non dissocié est capable de traverser la membrane de la cellule et de se dissocier à l'intérieur du cytoplasme, ce qui provoque l'inhibition.

La concentration d'acide non dissocié peut être calculée à partir du pH et de la concentration d'acide total par l'équation d'Henderson-Hasselbalch :

$$\frac{[A-]}{[AH]} = 10^{(pH-pKa)}$$
[III.2]

où pKa est le pKa de l'acide faible [AH] est la concentration d'acide non dissocié [A⁻] est la concentration d'acide dissocié

La Figure III.8 montre l'évolution du taux d'acide non dissocié en fonction du pH pour trois valeurs de pKa (3.86, 4.30 et 4.75). Cette figure montre que plus le pH est faible et plus le pKa de l'acide est fort, plus l'acide organique va se présenter sous sa forme non dissociée, favorisant ainsi l'inhibition.



Figure III.8. Influence du pKa et du pH sur le pourcentage d'acide non dissocié par rapport à l'acide total pour trois valeurs de pKa. (a) pKa =3.86 (acide lactique); (b) pKa=4.30 (acide glutarique); (c) pKa=4.87 (acide propionique).

Certaines études ont montré que si l'acide non dissocié jouait un rôle majeur, la forme dissociée pouvait également contribuer à l'inhibition. Eklund (1984, 1989) et Houtsma *et al.* (1994) ont observé que la concentration minimale inhibitrice d'acide non dissocié, C_U , varie avec la concentration d'acide dissocié. Ceci suggère une interaction entre la forme dissociée et la forme non dissociée dans les mécanismes d'inhibition : plus la concentration d'acide dissocié est importante, plus la concentration d'acide dissocié est importante, plus la concentration d'acide nécessaire pour inhiber la croissance microbienne est faible (Tableau 3.3).

Tableau 3.3. Concentrations minimales d'acide inhibant la croissance de *L. innocua* DSM 20649 observées à 20°C et à différents pH (Hout sma *et al.*, 1994).

	Concentration d'acide lactique	Concentration d'acide	Concentration
рН	total la plus faible ayant inhibée	lactique non dissocié	d'acide lactique
	la croissance (mM)	(mM)	dissocié (mM)
5.5	217	4.8	212.2
6	582	4.2	577.8
6.5	969	2.2	936.8
7	1250	0.9	1249.1

Notons enfin qu'à pH 7, l'inhibition est obtenue pour une concentration très faible d'acide non dissocié (0.9 mM), ce qui suggère dans ce cas un effet propre de l'acide dissocié (Tableau 3.3). Au vu de toutes ces observations, il apparaît que l'effet d'un acide organique sur le taux de croissance bactérien est fonction de :

- la concentration d'acide non dissocié [AH]
- la concentration d'acide dissocié [A⁻]
- une interaction entre la forme dissociée A⁻ et non dissociée AH

3.3.1.2. Prise en compte de l'effet de l'acide non dissocié

Presser *et al.* (1997) ont montré que le taux de croissance de *E. coli* variait linéairement en fonction des concentrations d'acide lactique non dissocié. Le terme décrivant l'effet de l'acide non dissocié s'écrit alors :

$$\theta([AH]) = 1 - \frac{[AH]}{C_U}$$
[1.30]

Dans le cas de l'acide lactique, Chorin (1999) et Breidt et Fleming (1998) ont mis en évidence la même relation pour respectivement *L. innocua* et *L. monocytogenes*. Cette linéarité entre μ_{max} et la concentration d'acide non dissocié n'étant pas forcément valable pour d'autres acides organiques, nous proposons une forme plus générale de l'équation [I.30] :

$$\theta([AH]) = 1 - \left(\frac{[AH]}{C_U}\right)^{\alpha}$$
[III.3]

avec α coefficient sans signification, dépendant de l'acide

Dans l'équation ci-dessus, α est un coefficient sans signification biologique, permettant de décrire une éventuelle non linéarité de la relation μ_{max} -[AH].

3.3.1.3. Prise en compte de l'interaction acide non dissocié/ acide dissocié

Eklund (1989, 1984) a proposé une équation reliant la concentration minimale inhibitrice aux concentrations d'acide non dissocié et dissocié présentes à l'inhibition. Cette équation repose sur les hypothèses suivantes :

- (i) les formes d'acide dissocié et non dissocié ont une concentration minimale inhibitrice caractéristique, respectivement MIC_U et MIC_D .
- (ii) à chaque concentration minimale inhibitrice d'acide total (notée MIC),
 il y a une contribution des deux formes de l'acide.
- (iii) la contribution totale à l'inhibition est 1.

Ces hypothèses s'expriment par l'équation suivante (Eklund, 1989, 1984) :

$$\frac{C_U}{MIC_U} + \frac{C_D}{MIC_D} = 1$$
[III.4]

où C_U et C_D sont les concentrations d'acide non dissocié et dissocié à l'inhibition MIC_U est la concentration minimale inhibitrice d'acide non dissocié MIC_D est la concentration minimale d'acide dissocié

En réarrangeant l'équation [III.4], C_U peut s'exprimer en fonction de C_D , MIC_U et MIC_D :

$$C_U = MIC_U \left(1 - \frac{C_D}{MIC_D} \right)$$
[III.5]

Formellement, pour une concentration d'acide dissocié [A⁻] présente dans le milieu, la concentration minimale d'acide non dissocié qui va inhiber la croissance s'écrit d'après l'équation [III.5] :

$$C_{U} = MIC_{U} \left(1 - \frac{\left[A^{-} \right]}{MIC_{D}} \right)$$
[III.6]

En incorporant l'équation [III.5] dans l'équation [III.3], il vient :

$$\theta([AH], [A^-]) = 1 - \left(\frac{[AH]}{MIC_U \left(1 - \frac{[A^-]}{MIC_D}\right)}\right)^{\alpha}$$
[III.7]

3.3.1.4. Prise en compte de l'effet de l'acide dissocié

En se basant sur les travaux d'Houtsma *et al.* (1996, 1994, cf. paragraphe 3.3.2), nous avons supposé que l'effet spécifique de l'acide dissocié sur le taux de croissance de *Listeria* pouvait être décrit par la fonction suivante :

$$\delta([A^-]) = 1 - \left[\frac{[A^-]}{MIC_D}\right]^3$$
[III.8]

où MIC_D est la concentration d'acide minimale inhibitrice théorique d'acide non dissocié

3.3.1.5. Modèle général décrivant l'effet des concentrations d'acide organique

Suivant l'approche modulaire classique, la fonction modélisant l'effet relatif de l'acide $(\tau([acide]))$ s'obtient par agrégation à partir des équations [III.7] et [III.8] :

$$\tau([acide]) = \theta([AH], [A^-]) \quad \delta([A^-])$$
[III.9]

Nous obtenons donc le module suivant :

$$\tau([acide]) = \left(1 - \left(\frac{[AH]}{MIC_{U}\left(1 - \frac{[A^{-}]}{MIC_{D}}\right)}\right)^{\alpha}\right) \left(1 - \left[\frac{[A^{-}]}{MIC_{D}}\right]^{3}\right)$$
[III.10]

Le taux de croissance est alors supposé pouvoir être décrit par l'équation :

$$\mu_{\max} = \mu_{[acide]=0} \quad \tau([acide])$$
[III.11]

L'équation [III.11] est définie par seulement quatre paramètres dont trois ont une signification biologique : $\mu_{[acide]=0}$, MIC_U et MIC_D . Si le paramètre α n'a pas de signification biologique simple, on a vu que d'après les travaux de plusieurs chercheurs (Chorin, 1999; Breidt et Fleming, 1998; Presser *et al.*, 1997), il pouvait être supposé égal à 1 dans le cas de l'acide lactique.

La structure de la fonction développée pour décrire l'effet des concentrations d'acide sur μ_{max} (équations [V.10]) apparaît relativement complexe. Une estimation précise de *MIC_D* nécessite des expériences à de très fortes concentrations d'acide. Houtsma *et al.* (1994) ont rapporté des croissances de *Listeria innocua* DSM 20649 à des concentrations supérieures à 1000 mM d'acide lactique. Dans les aliments, les concentrations d'acide lactique rencontrées dépassent très rarement 250 mM (22.5 g/l). Les plages de variation des quantités d'acide nécessaires à l'estimation de *MIC_D* ne sont donc pas réalistes par rapport aux gammes de variation des acides dans les produits alimentaires. Le modèle constitue néanmoins une version générale à partir de laquelle des versions plus simples et plus adaptées pourront être déduites. Lorsque le nombre de données disponibles aux fortes concentrations est suffisant, ce modèle général pourra cependant être utilisé avec succès. Un exemple est donné au paragraphe suivant.

3.3.2. Ajustement du modèle général

Le modèle [III.11] a été ajusté sur des données publiées par Houtsma *et al.* (1994). Les auteurs ont étudié l'effet de l'acide lactique sur le taux de croissance de *L.innocua* DSM 20649 à 20°C à pH 5.5, 6, 6.5 et 7 dans la tot alité de la gamme d'acide permettant la croissance. Dans l'ajustement du modèle [III.11], le paramètre α a été fixé à 1. Un autre paramètre de l'équation [III.11] est $\mu_{[acide]=0}$, le taux de

où $\mu_{[acide]=0}$ est le taux de croissance à la température et au pH et en l'absence d'acide faible $\tau([acide])$ est défini par l'équation [III.10]

croissance en l'absence d'acide organique. Ce paramètre dépend du niveau de pH dans le milieu de culture. Pour chacun des 4 niveaux de pH testés, $\mu_{[acide]=0}$ a été fixé dans l'ajustement au taux de croissance observé en absence d'acide lactique et au pH considéré.

Les valeurs de MIC_U et MIC_D ont été estimées respectivement à 7.9 [7.4-8.4] mM et 1500 [1400-1600] mM. La bonne adéquation entre le modèle ajusté et les observations (R^2_{adj} =0.96) est mise en évidence sur la Figure III.9. Le module [III.10] nous semble donc un bon candidat pour décrire les effets des acides organiques dans la totalité de la gamme de variation permettant la croissance de *Listeria*.



Figure III.9. Ajustement du modèle [III.10] aux taux de croissance de *L. innocua* DSM 20649 à 20°C observés par Houtsma *et al.* (1996) à 20°C.

3.3.3. Modèle simplifié. Cas des faibles concentrations d'acide

Nous avons déjà signalé la complexité de la structure du modèle complet et les problèmes relatifs à l'estimation de MIC_D . Il est donc légitime d'examiner dans quelles conditions ce modèle général peut être simplifié.

Lorsque la concentration d'acide lactique est relativement faible, par exemple de 80 mM, [A⁻], la concentration d'acide non dissocié est par conséquent strictement inférieure à 80 mM. Il vient alors :

$$\sqrt{1 - \frac{\left[A^{-}\right]}{MIC_{D}}} > \sqrt{1 - \frac{80}{1500}} = 0.97$$

Le terme $\sqrt{1-\frac{[A_-]}{MIC_D}}$ est alors très proche de 1 et est négligeable dans l'équation [III.10]. De la même façon, on a :

$$1 - \frac{\left[A^{-}\right]}{MIC_{D}} > 1 - \frac{80}{1500} = 0.95 \text{ et donc } MIC_{U} \left(1 - \frac{\left[A^{-}\right]}{MIC_{D}}\right) \approx MIC_{U}$$

Le module acide complet [III.10] peut alors se réduire à la fonction suivante :

$$\tau([acide]) = \tau([AH]) = \left(1 - \left(\frac{[AH]}{MIC_U}\right)^{\alpha}\right)$$
[III.12]

Ceci revient en fait à négliger l'effet de l'acide dissocié aux faibles concentrations, l'effet de la forme dissociée étant surtout visible aux fortes concentrations d'acide (Eklund, 1984, 1989 ; Houtsma *et al.*, 1994).

La simulation du modèle simplifié sur les données de Houtsma *et al.* à 20°C est présentée sur la Figure III.10. Pour une concentration d'acide lactique de 200 mM, la description du taux de croissance apparaît satisfaisante : l'utilisation du modèle simplifié suffit pour décrire correctement le taux de croissance de *L. innocua*. Pour des concentrations supérieures, la qualité de la description de μ_{max} est beaucoup plus faible et il est nécessaire d'utiliser le modèle complet. Notons que l'ajustement des données au modèle simplifié [III.12] ne permet pas d'améliorer la qualité de la description par rapport à la simulation présentée.



Figure III.10. Comparaison de la simulation du modèle simplifié [III.12] et des taux de croissance observés par Houtsma *et al.* (1996) à 20°C. Les carrés correspondent aux taux d e croissance observés en absence d'acide lactique.

Sur la Figure III.11, l'effet relatif du pH sur μ_{max} (*i.e* τ (*[acide]*)) à été simulé suivant les modules complet [III.10] et simplifié [III.12] pour des concentrations d'acides entre 40 et 140 mM. On retrouve bien les résultats évoqués précédemment : la différence entre les deux modèles est très faible aux faibles concentrations. Une différence de 5% entre les deux prédictions n'est visible à 60 mM que pour des pH inférieurs à 4.8, et à 140 mM à partir de pH 5.6.



Figure III.11. Simulation de l'effet normalisé de l'acide lactique sur μ_{max} décrit par le modèle simplifié (trait pointillé) et le modèle complet (trait continu). Les paramètres utilisés sont ceux estimés pour la souche DSM 20649.

3.3.4. Effet des acides organiques sur le taux de croissance de L.innocua *ATCC 33090*

Dans ce paragraphe, nous nous proposons d'étudier les effets des acides lactique, acétique et propionique sur le taux de croissance *de L. innocua* ATCC 33090 à 20 $^{\circ}$ pour différentes valeurs de pH.

3.3.4.1. Conditions expérimentales

Les conditions testées pour étudier les effets séparés des trois acides sont présentées Figure III.12. Dans une première expérience à 20 mM, les taux de croissance calculés étaient supérieurs à ceux observés en l'absence d'acide lactique. Ces résultats, considérés comme aberrants, n'ont pas été utilisés dans l'ajustement.

Pour l'acide lactique, les conditions testées ne permettent pas d'estimer correctement le paramètre MIC_D . Cependant, pour ces conditions, en utilisant les valeurs des paramètres estimées pour la souche *L. innocua* DSM 20649, la différence entre le modèle complet et le modèle simplifié n'excède pas 5%. Il nous donc a semblé légitime d'utiliser le modèle simplifié [III.12] (donc de négliger l'effet de l'acide dissocié).

De la même façon, pour les acides acétique et propionique, nous avons supposé que dans la gamme de variation étudiée, l'effet de [A⁻] pouvait aussi être négligé devant l'effet de [AH]. C'est donc encore le module simplifié [III.12] qui a été utilisé.



Figure III.12. Conditions expérimentales testées pour estimer les concentrations minimales inhibitrices d'acide lactique, acétique et propionique pour *L. innocua* ATCC 33090.

3.3.4.2. Ajustement du modèle simplifié

Suivant l'approche modulaire classique, un modèle décrivant les effets combinés du pH et de [AH] s'obtient en multipliant les effets relatifs du pH et des concentrations d'acide non dissocié.

Le modèle s'écrit donc :

$$\mu_{\max} = \mu_{opt, 20^{\circ}C} \gamma(pH) \tau([AH])$$
[III.13]

où γ(pH) est la fonction des pH cardinaux, modèle CPM τ([AH]) est le modèle simplifié [III.12] $\mu_{opt,20C}$ est le taux de croissance à 20°C à pH_{opt} et en absence d'acide organique

Les valeurs des pH cardinaux ont été fixées dans le modèle aux valeurs estimées dans le paragraphe 3.2.1. Le module cardinal CPM (γ (pH)) permet ici de distinguer entre l'effet de la concentration en protons et l'effet spécifique de l'acide non dissocié. Comme dans le paragraphe 3.3.2, la valeur de α a été fixée à 1 pour l'acide lactique. Un premier ajustement a permis de montrer que, pour les acides acétique et propionique, le paramètre α n'était pas significativement différent de 0.5. Afin de simplifier le modèle, l'équation [III.13] a été réajustée en fixant α à 0.5 pour ces deux acides.

Les comparaisons entre les courbes ajustées et les observations sont présentées Figures III.13, III.14 et III.15. Les estimations des paramètres sont proposées à la Table 3.4. Une valeur de MIC_U de 8.0 mM d'acide lactique a été estimée, ce qui très proche de la valeur estimée pour *L. innocua* DSM 20649 sur le jeu de données de Houtsma *et al.* (cf. paragraphe 3.3.2). Les concentrations minimales inhibitrices estimées sont proches de celles proposées dans la littérature. Ainsi Augustin *et al.* (2000) rapportent pour *L. monocytogenes* une valeur de MIC_U de 20.1 mM pour l'acide acétique, contre 19.2 mM dans cette étude.

Table 3.4.	Concentration	ns minimales	inhibitrices	d'acide	lactique,	acétique	et propionique
non dissoc	ié pour <i>L. inn</i>	ocua ATCC 3	3090, estimé	es par l'a	ajustemei	nt du mod	èle [III.13].

Acide organique	R^2_{adj}	Paramètre	Estimation	Intervalle de confiance 95 %
Acido lactiquo	0.07	<i>MIC_U</i> (mM)	8.0	[6.0 - 10.0]
Acide lactique	0.97	α	1	
	0.98	<i>MIC_U</i> (mM)	19.2	[17.0 - 21.1]
Acide acelique		α	0.5	
	0.06	<i>MIC_U</i> (mM)	8.9	[7.4 - 10.4]
Acide propionique	0.96	α	0.5	



Figure III.13. Effet du pH et de la concentration d'acide propionique à 20℃ sur le taux de croissance de *L. innocua* ATCC 33090. Comparaison entre le modèle ajusté [III.13] pour 18 (-), 36 (--), 55 (-.-) mM d'acide et les taux de croissance observés pour 18 (■), 36 (♦) et 55 (●) mM d'acide.



Figure III.14. Effet du pH et de la concentration d'acide acétique à 20°C sur le taux de croissance de *L. innocua* ATCC 33090. Comparaison entre le modèle ajusté [III.13] pour 16 (-), 32 (--), 48 (-.-) et 64 (--) mM d'acide et les taux de croissance observés pour 16 (\square), 32 (\blacklozenge), 48 (×) et 64 (\bigcirc) mM d'acide.



Figure III.15. Effet du pH et de la concentration d'acide lactique à 20°C sur le taux de croissance de *L. innocua* ATCC 33090. (a) Comparaison entre le modèle ajusté [III.13] pour 40 (-) et 80 (-) mM et les taux de croissance observés à 40 (o) et 80 (\blacksquare) mM d'acide. (b) Comparaison entre le modèle ajusté [III.13] pour 60 (-), 100 (-.-) et 138 (--) mM et les taux de croissance observés à 60 (\blacksquare), 100 (\square) et 138 (\diamondsuit) mM d'acide.

3.3.5. Estimation du paramètre MIC_U pour L. monocytogenes Scott A

Dans le paragraphe précédent, les concentrations minimales d'acide non dissocié ont été estimées sur des jeux de données décrivant l'effet des concentrations d'acide à différents pH. Les résultats ont montré que dans la zone étudiée, l'effet combiné du pH et des acides organiques est correctement décrit par la multiplication des effets relatifs du pH (module des pH cardinaux) et de la concentration d'acide non dissocié (équation [III.12]).

Ce résultat étant acquis, il ne nous a pas semblé nécessaire d'utiliser le même type de planification expérimentale pour d'autres souches. Pour la souche Scott A, l'effet de l'acide lactique n'a donc été étudié qu'à un seul pH.

Différentes quantités d'acide lactique (entre 0 et 100 mM) ont été ajoutées au milieu de culture et le pH a été ajusté à 5.1. Pour chacune des conditions, le taux de croissance a été calculé à 30°C (croissance suivie par turbidimétrie). L'ajustement du modèle acide simplifié [III.12] (Figure III.16) conduit à l'estimation d'une valeur de MIC_U de 9.3 [8.8 –9.7] mM (R²_{adj}=0.97).


Figure III.16. Evolution du taux de croissance de *L. monocytogenes* Scott A en fonction des concentrations d'acide non dissocié à 30℃ et pH 5.1. La courbe correspond à l'ajustement du modèle [III.13].

3.3.6. Utilisation de la « théorie du pouvoir tampon ». Comparaison avec l'approche du pH minimal

Dans le paragraphe 3.3.3, nous avons proposé un modèle décrivant l'effet des acides faibles sur le taux de croissance de *Listeria*. Le modèle consiste à relier μ_{max} au pH, à la concentration d'acide non dissocié et éventuellement à la concentration d'acide dissocié. L'utilisation du modèle nécessite à la fois la mesure du pH et celle des concentrations d'acide organique.

Dans certaines situations rencontrées dans l'industrie alimentaires, le pH et les concentrations d'acide varient au cours du temps (fermentation, affinage des fromages, ...). Si les mesures de pH sont automatisables et relativement aisées à effectuer, les dosages d'acide à des intervalles de temps rapprochés sont plus fastidieux.

Il est donc intéressant de pouvoir prédire le comportement des microorganismes en connaissant uniquement les évolutions de pH dans les aliments. Nous avons vu qu'il était possible d'utiliser la « théorie du pouvoir tampon » (cf. paragraphe 2.3.2.2) pour déduire les concentrations d'acide organique des mesures de pH. Dans ces conditions, le modèle [III.13] peut être utilisé à partir des seules mesures de pH.

L'objet de ce paragraphe est d'évaluer la capacité du modèle [III.13] à prédire le comportement de *Listeria* en présence d'acide dans le milieu BHIM à partir des seules mesures de pH. En utilisant la « théorie du pouvoir tampon », la courbe de

titration pH= $f([H^+]_{ajoutée})$ nous a permis de relier le pH aux concentrations d'acide organique. Ceci nous a permis d'utiliser l'équation [III.13] pour simuler l'évolution théorique du taux de croissance de *L. innocua* ATCC 33090 à 20°C en fonction du pH quand celui ci est seulement contrôlé par l'ajout d'acide faible.

Les cas des acides lactique, propionique et acétique ont été considérés. Pour chaque acide, les évolutions prédites ont été comparées aux taux de croissance observés à 20°C pour différents pH (lorsque ce dern ier est contrôlé uniquement par ajout d'acide faible). Ces conditions correspondent à de nouvelles données non utilisées pour ajuster l'équation [III.13]. D'après les résultats des paragraphes 3.1 et 3.2, la valeur de μ_{max} à 20°C dans du BHIM en l'absence d'acide organique (notée $\mu_{opt,20°C}$ dans l'équation [III.13]) a été fixée à 0.46 h⁻¹. La comparaison des racines carrées des taux de croissance prédits et observés met en évidence une bonne capacité prédictive du modèle (Figure III.17). L'erreur moyenne sur les temps de génération est de 9% tandis que l'erreur médiane est de 6%, ce qui est tout à fait satisfaisant.



Figure III.17. Comparaison des racines carrées des taux de croissance observés pour les acides lactique (\diamond), acétique (\bullet) et propionique (\Box) et prédits par le modèle [III.13]. Les concentrations d'acide utilisées en prédiction sont les valeurs déduites des mesures de pH en utilisant la théorie du pouvoir tampon.

Les évolutions prédites (Figure III.18) confirment les principaux résultats exposés par Rosso (1997, 1995b). Plus le pKa de l'acide augmente, plus le pH minimal autorisant la croissance est élevé. Dans le milieu BHIM, un pH minimal de croissance d'environ 4.55 est prédit pour l'acide lactique (pKa 3.86), de 4.95 pour l'acide acétique (pKa 4.75) et de 5.40 pour l'acide propionique (pKa 4.87). De plus, l'évolution $\mu_{max} = f$ (pH)



exhibe la forme typique du modèle CPM dans la zone suboptimale de pH (Figure III.18).

Figure III.18. Evolution du taux de croissance de *L. innocua* ATCC 33090 dans du BHIM à 20°C en fonction du pH (uniquement contrôlé par l'ajout d'acide faible) pour trois acides. (a) Acide lactique ; (b) acide acétique ; (c) acide propionique. Prédictions du modèle de Rosso (équation [I.31], trait pointillé) et du modèle [III.13] (trait continu). Les points correspondent aux taux de croissance observés.

Pour les trois acides, nous avons simulé l'évolution $\mu_{max} = f(pH)$ selon le modèle de Rosso (équation [I.31]). Les valeurs de k et pH^{0}_{min} utilisées sont celles proposées dans la thèse de L. Rosso pour *Listeria*. Les valeurs de pH_{opt} et pH_{max} sont les estimations obtenues au paragraphe 3.2 pour la souche considérée. Notons que le modèle de Rosso a été ajusté pour des pKa entre 0 et 4.75 (pKa de l'acide acétique). Le cas de l'acide propionique (pKa =4.87) constitue donc une extrapolation du modèle.

Dans le cas des acides lactique et acétique, les résultats du modèle de Rosso sont proches des données expérimentales et des taux de croissance prédits par l'équation [III.13] (Figure III.18). Dans le cas de l'acide propionique, il y a surestimation du taux

de croissance de *Listeria*. Comme signalé plus haut, ce cas constitue une extrapolation du modèle, ce qui peut expliquer la différence entre les prévisions et les observations.

Une comparaison équitable des deux approches aurait requis l'estimation des pH minimaux (pH contrôlé par ajout d'acide faible) pour la souche de *L. innocua* considérée suivant la méthode proposée par Rosso (1997, cf. paragraphe 1.3.5). A partir des données présentées, il est donc difficile d'évaluer les capacités prédictives des deux approches sur un plan purement statistique. Il semble pourtant que ces deux approches donnent des résultats tout à fait comparables dans un milieu de culture semi-synthétique comme le BHIM.

Le choix du modèle acide pour la suite s'est fait sur des considérations pratiques. La valeur du pH minimum tel que défini par Rosso est liée à une concentration minimale inhibitrice d'acide non dissocié : le pH pour lequel cette concentration inhibitrice sera atteinte dépend du pouvoir tampon du milieu de culture. Les pouvoirs tampon dans les milieux de cultures utilisés en laboratoire sont sensiblement différents des pouvoirs tampon dans certaines matrices alimentaires. L'ajout de 45 mM d'acide lactique suffit à amener le pH du milieu BHIM de 7.20 à 4.50. Dans de la viande de bœuf, la production d'environ 100 mM d'acide lactique entraîne la diminution de pH de 6.5 à seulement 5.6 en moyenne (Dacosta, 1987). Compte tenu de ces différences, une valeur de pH_{min} obtenue dans un milieu de culture semi-synthétique ne sera donc pas *a priori* extrapolable à certaines matrices alimentaires.

Le modèle [III.13] nous apparaît plus facilement utilisable dans une matrice alimentaire. Lorsque les conditions de pH et d'acides restent stables, la prédiction de la croissance ne nécessite qu'un relevé du pH et un dosage de l'acide dans le produit considéré. Dans certains produits fermentés où les concentrations d'acide et de pH varient au cours du temps, la théorie du pouvoir tampon peut être utilisée pour s'affranchir de fastidieux dosages d'acide.

D'un point de vue théorique, l'utilisation du modèle [III.13] nous semble également préférable puisqu'il prend directement en compte les facteurs affectant la croissance : concentration en protons (pH) et concentration d'acide non dissocié. C'est donc le modèle [III.13] qui a été retenu dans la suite de ce travail.

3.4. Conclusion

Dans cette partie, nous avons étudié les effets des différents facteurs que nous nous proposions d'étudier sur différentes souches de *Listeria*. Les mêmes modèles ont pu être utilisés pour caractériser l'effet des facteurs sur ces différentes souches.

Un nouveau terme a été proposé pour décrire l'effet des concentrations d'acide organique. Nous avons vérifié que dans les gammes de variation étudiées, les effets combinés du pH et des concentrations d'acide pouvaient être décrits selon l'approche modulaire classique en multipliant les effets du pH (module CPM) et des concentrations d'acide sur μ_{max} .

Enfin, lorsque le pH du milieu est contrôlé uniquement par un acide faible, nous avons montré qu'il était possible d'utiliser la théorie du pouvoir tampon pour décrire μ_{max} à partir de la seule connaissance du pH. Dans un milieu de culture classique, les résultats obtenus sont concordants avec l'approche des pH minimaux proposée par Rosso *et al.* (1997, 1995b).

Effet combiné des facteurs environnementaux : Modélisation des interactions

Nous avons vu que, selon certains auteurs, les modèles développés selon la démarche modulaire tendent à sous-estimer les interactions dans les zones limites de croissance. L'objectif de cette partie est, après confirmation de cette sous-estimation, de proposer l'extension d'un modèle modulaire classique en développant un nouveau module décrivant l'effet de ces interactions.

4.1. Mise en évidence des interactions

A ce stade de notre étude, nous avons proposé plusieurs équations décrivant les effets de la température, du pH et des concentrations en acide organique. Un modèle combinant les effets de ces facteurs suivant la démarche modulaire classique s'écrit :

$$\mu_{\max} = \mu_{opt} \rho_{CT_{pM}}(T) \gamma(pH) \tau([acide])$$
[IV.1]

$$lag = \frac{lag_{\min}}{\rho_{CT_{R}M}(T) \gamma(pH)\tau([acide])}$$
[IV.2]

Ce modèle sera appelé dans la suite CT_RPM . Augustin *et al.* (2000) ont montré qu'un tel modèle pouvait surestimer la croissance dans la zone limite de croissance. Des données préliminaires à 3 et 10°C concernant *L. innocua* ATCC 33090 ont été acquises dans du BHIM afin de vérifier cette surestimation. Des valeurs de μ_{opt} de 1.12 h⁻¹ et de *lag_{min}* de 0.6 h ont été estimées pour cette souche d'après une courbe de référence à 30°C dans du BHIM. Les Figures IV.1 et IV.2 nous montrent les cinétiques de observées à différents pH et prédites par le modèle CT_RPM.



Figure IV.1. Prévision de la croissance de *L. innocua* ATCC 33090 (modèle CT_RPM) à 3°C pour différentes valeurs de pH.

A 3 $^{\circ}$ C, la croissance est prédite de façon satisfais ante pour des pH supérieurs à 5.38. Par contre, à pH 5.00, aucune croissance n'est observable alors qu'une augmentation de la concentration bactérienne d'environ 4 log₁₀ en 30 jours est prédite.

De la même façon, à 10°C, les simulations sont proches des dénombrements expérimentaux pour des valeurs de pH supérieurs à 5.0. Mais à pH 4.71, la croissance bactérienne est largement surestimée : une croissance de *Listeria innocua* de 6 log₁₀ en 21 jours est prédite alors qu'une augmentation de la concentration bactérienne de 1log₁₀ est observée expérimentalement. A pH 4.46, aucune croissance n'est observable alors que le modèle prévoit une augmentation de la population bactérienne de plus de 5 log10. Il apparaît donc que lorsque les conditions de température et de pH sont drastiques pour la croissance, l'approche modulaire n'est plus suffisante pour



décrire le comportement de *Listeria* : sur les exemples précédents, la différence entre les concentrations microbiennes prédites et observées est parfois supérieure à 4 log₁₀.

Figure IV.2. Prévision de la croissance de *L. innocua* ATCC 33090 (modèle CT_RPM) à 10°C pour différentes valeurs de pH.

Pour expliquer cette différence entre prévision et observation, trois hypothèses peuvent être émises.

On peut émettre l'hypothèse d'une estimation non consistante des paramètres dans le chapitre 3. Cependant, l'utilisation de valeurs plus élevées pour pH_{min} et T_{min} entraîne une sous estimation de la croissance pour des conditions expérimentales où la qualité de prédiction était jusque là satisfaisante.

Les deux dernières explications possibles remettent en cause les deux hypothèses fortes qui sont sous jacentes au modèle secondaire utilisé :

- 1. le produit ' μ_{max} lag' n'est pas constant
- 2. il n'existe pas d'interactions entre les facteurs environnementaux

L'hypothèse 1 expliquerait le décalage observé par une sous estimation du temps de latence. Cette hypothèse ne nous semble pas pouvoir expliquer à elle seule le décalage entre les courbes simulées et les cinétiques observées. Ainsi à 10°C et pH 4.71, le décalage entre prévision et observation découle manifestement d'une mauvaise prédiction de μ_{max} (Figure IV.2).

En accord avec les travaux d'autres chercheurs (Augustin *et al.*, 2000), nous avons donc privilégié l'hypothèse 2, à savoir l'existence d'interactions entre les facteurs environnementaux.

Nous avons montré que les prévisions du modèle CT_RPM ne sont valides que dans une partie du domaine expérimental. Pour certaines conditions, la croissance observée est surestimée par le modèle. Pour d'autres conditions encore plus drastiques, le modèle prédit une croissance qui n'est pas observée expérimentalement. D'après ces observations, le domaine suboptimal de température et de pH semble pouvoir être divisé en trois zones (Figure IV.3) :

- une zone où le modèle CT_RPM décrit de façon satisfaisante le comportement bactérien (Zone A)
- une bande d'interaction où la croissance bactérienne constatée n'est pas bien décrite par le modèle CT_RPM (Zone B)
- une zone où aucune croissance n'a été constatée alors que le modèle prédit une croissance significative (Zone C)



Figure IV.3. Division théorique de la zone suboptimale de pH et de température. (A) zone où le taux de croissance est bien décrit par l'approche modulaire; (B) zone intermédiaire où la croissance bactérienne est observée mais où elle est surestimée par l'approche modulaire; (C) zone où le modèle modulaire prévoit une croissance alors qu'aucune croissance n'est observable expérimentalement.

Dans le paragraphe suivant, le modèle CT_RPM a été étendu par le développement d'un nouveau module d'interaction, basé sur cette division du domaine expérimental.

4.2. Développement d'un modèle d'interaction

4.2.1. Approche d'Augustin et al.

Afin d'améliorer la qualité de prévision en zone limite, Augustin *et al.* (2000) ont proposé un modèle d'interaction (cf. paragraphe 1.3.4, équation [I.28]). Certaines hypothèses sous-jacentes à l'établissement de ce modèle d'interaction sont indiquées ci-dessous :

1. L'interface croissance/ non croissance de *Listeria* peut être décrite par une fonction déterministe définie uniquement par les paramètres du modèle de croissance (températures cardinales, pH cardinaux, …). Elle est définie comme une transition entre une zone où le taux de croissance est strictement positif et une zone où μ_{max} est nul.

Ce modèle d'interface (équation [I.29]) peut s'écrire sous la forme suivante :

$$\psi = \sum_{i} \varphi_{ei} = 1$$
 [IV.3]

où les e_i sont les facteurs environnementaux et les fonctions ϕ_{ei} sont définies comme suit :

$$\varphi_{T}(T) = \left(\frac{T_{opt} - T}{T_{opt} - T^{0}_{\min}}\right)^{3}; \ \varphi_{pH}(pH) = \left(\frac{pH_{opt} - pH}{pH_{opt} - pH^{0}_{\min}}\right)^{3}; \ \varphi_{aw}(a_{w}) = \left(\frac{a_{wopt} - a_{w}}{a_{wopt} - a_{w}^{0}_{\min}}\right)^{3}$$
[IV.4]

Le terme ϕ_{ei} peut être vu comme la contribution spécifique du facteur e_i aux interactions. Lorsque le facteur e_i est à son niveau optimal pour la croissance, ϕ_{ei} est égal à zéro. Au contraire lorsque le facteur e_i est à son niveau minimal, la contribution à l'inhibition est égale à 1.

$$\varphi_{T}\left(e_{i_{opt}}\right) = \left(\frac{e_{i_{opt}} - e_{i_{opt}}}{e_{i_{opt}} - e_{i_{\min}}}\right)^{3} = 0$$
[IV.5]

$$\varphi_T(e_{i_{\min}}) = \left(\frac{e_{i_{opt}} - e_{i_{\min}}}{e_{i_{opt}} - e_{i_{\min}}}\right)^3 = 1$$
[IV.6]

2. Dans leur modèle, Augustin *et al.* (2000) proposent de définir les valeurs cardinales par les valeurs appartenant à l'interface croissance/ non croissance (cf. chapitre1).

Le modèle d'Augustin *et al.* (2000) ne tient pas compte du comportement spécifique de *L. monocytogenes* aux faibles températures. La valeur de T_{min} estimée par l'ajustement du modèle cardinal sera inférieure à celle estimée en utilisant le modèle modifié. Le terme φ_T proposé par Augustin *et al.* peut donc amener à une surestimation de l'interface de croissance. De plus, l'inclusion du modèle d'acide organique de Rosso (équation [I.30]) dans le modèle ne permet pas la description de l'évolution du pH minimal de croissance en fonction des concentrations d'acide organique.

Enfin, dans le modèle CTPMI les valeurs cardinales dépendent du niveau des autres facteurs. Il s'ensuit une déviation systématique des prévisions du modèle cardinal classique CTPM et du modèle CTPMI. Cependant les données préliminaires obtenues laissent penser que l'approche classique est suffisante pour décrire le taux de croissance dans la plus grande partie de la zone expérimentale permettant la croissance. Un biais entre cinétiques prédites et observées ne semble apparaître que dans une étroite zone d'interaction. Ces remarques justifient le développement d'une nouvelle approche.

4.2.2. Inclusion d'un module d'interaction dans le modèle CT_RPM

Certaines des hypothèses qui ont servi à développer notre modèle ont également servi de base au modèle d'Augustin *et al.* (2000) :

- •L'interface croissance/ non croissance peut être définie par une équation intégrant les paramètres du modèle de croissance. L'interface est définie comme la transition entre la zone ($\mu_{max} > 0$) et la zone ($\mu_{max}=0$).
- •Le niveau des interactions peut être décrit par la combinaison des contributions spécifiques des facteurs φ_{ei} . Au niveau optimal de chaque facteur e_i , φ_{ei} = 0, au niveau minimum, φ_{ei} = 1 (cf. les équations [IV.5] et [IV.6]).

4.2.2.1. Contributions spécifiques à l'inhibition

Nous avons supposé que les contributions spécifiques de la température, du pH et des acides organiques pouvaient être décrites par les fonctions suivantes :

$$\varphi_{T}(T) = \left(1 - \sqrt{\rho_{CT_{R}M}(T)}\right)^{2}; \quad \varphi_{pH}(pH) = \left(1 - \gamma(pH)\right)^{2}; \quad \varphi_{HA}(0) = \left(\frac{[HA]}{MIC_{U}}\right)^{2} [IV.7]$$

Comme pour les fonctions proposées par Augustin et al., on a bien :

$$\varphi_T(T_{opt}) = \varphi_{pH}(pH_{opt}) = \varphi_{[acide]}(0) = 0$$
[IV.8]

et

$$\varphi_T(T_{\min}) = \varphi_{pH}(pH_{\min}) = \varphi_{[HA]}(MIC_U) = 1$$
[IV.9]

4.2.2.2. Description du niveau d'interaction

Dans un premier temps, nous avons proposé une équation pour décrire les interactions entre la température et le pH. L'équation obtenue a ensuite été étendue pour prendre en compte l'effet des concentrations d'acide organique.

•Interactions entre température et pH

Considérons le cas où seulement la température et le pH interagissent. Nous avons fait l'hypothèse que l'effet des interactions est dû pour moitié :

- à la température qui augmente l'effet du pH
- au pH qui augmente l'effet inhibiteur de la température



D'après cette hypothèse, avons supposé que le niveau d'interaction pouvait être défini par l'équation :

$$\psi = \frac{1}{2} \frac{\varphi_T}{(1 - \varphi_{pH})} + \frac{1}{2} \frac{\varphi_{pH}}{(1 - \varphi_T)}$$
[IV.10]

•Interactions entre la température, le pH et la concentration d'acide

Pour 3 facteurs environnementaux pris ensemble, nous proposons de complexifier l'équation [IV.10] selon l'équation suivante :

$$\Psi = \sum_{i} \frac{\varphi_{e_i}}{2\prod_{j \neq i} (1 - \varphi_{e_j})}$$
[IV.11]

En absence d'acide organique dans le milieu, nous avons $\varphi_{[AH]} = 0$ et par conséquent $(1 - \varphi_{[AH]}) = 1$. Dans ce cas, l'équation [IV.11] est bien identique à l'équation [IV.10] proposée pour la température et le pH :

$$\psi = \sum_{i} \frac{\varphi_{e_{i}}}{2\prod_{j \neq i} (1 - \varphi_{e_{j}})} = \frac{1}{2} \frac{\varphi_{T}}{(1 - \varphi_{pH}) \cdot 1} + \frac{1}{2} \frac{\varphi_{pH}}{(1 - \varphi_{T}) \cdot 1} + \frac{1}{2} \frac{0}{(1 - \varphi_{pH}) \cdot 1} = \frac{1}{2} \frac{\varphi_{T}}{(1 - \varphi_{pH}) \cdot 1} + \frac{1}{2} \frac{\varphi_{pH}}{(1 - \varphi_{T}) \cdot 1} + \frac{1}{2} \frac{\varphi_{pH}}{(1 - \varphi_{T}) \cdot 1} = \frac{1}{2} \frac{\varphi_{pH}}{(1 - \varphi_{pH}) \cdot 1} + \frac{1}{2} \frac{\varphi_{pH}}{(1 - \varphi_{T}) \cdot 1} = \frac{1}{2} \frac{\varphi_{pH}}{(1 - \varphi_{pH}) \cdot 1} + \frac{1}{2} \frac{\varphi_{pH}}{(1 - \varphi_{T}) \cdot 1} = \frac{1}{2} \frac{\varphi_{pH}}{(1 - \varphi_{pH}) \cdot 1} + \frac{1}{2} \frac{\varphi_{pH}}{(1 - \varphi_{T}) \cdot 1} = \frac{1}{2} \frac{\varphi_{pH}}{(1 - \varphi_{pH}) \cdot 1} = \frac{1}{2} \frac{\varphi_{PH}}{(1 - \varphi_{PH$$

D'après l'hypothèse (iii), l'interface croissance/ non croissance s'obtient pour les conditions telles que la contribution des facteurs aux interactions est égale à 1, c'est à dire :

$$\psi = \sum_{i} \frac{\varphi_{e_i}}{2\prod_{j \neq i} (1 - \varphi_{e_j})} = 1$$
 [IV.12]

4.2.2.3. Effet des interactions sur les paramètres de croissance

Nous nous proposons de développer un nouveau terme pour décrire l'effet des interactions sur le taux de croissance en zone limite. L'inclusion d'un terme d'interaction que nous avons noté ξ conduit au modèle que nous appellerons dans la suite CT_RPM ξ :

$$\begin{cases} \mu_{\max} = \mu_{opt} \ \rho_{CT_{RM}}(T) \gamma(pH) \tau([AH]) \ \xi(T, pH, [AH]) \\ lag = \frac{lag_{\min}}{\rho_{CT_{RM}}(T) \gamma(pH) \tau([AH]) \ \xi(T, pH, [AH])} \end{cases}$$
[IV.13]

où ξ (T, pH, [AH]) est le terme décrivant les effets des interactions non pris en compte par l'approche modulaire

Nous avons supposé que ξ était une fonction de ψ (le niveau des interactions) conformément aux hypothèses suivantes :

- (i) Lorsque la valeur de ψ est inférieure à une valeur seuil τ_1 , le taux de croissance est bien décrit par le modèle modulaire classique (Zone A). Dans ce cas, ξ est égal à 1.
- (ii) Au dessus d'une seconde valeur seuil (fixée à 1), toute croissance est bloquée du fait des interactions (Zone C). Dans ce cas le taux de croissance est nul et ξ est égal à 0.
- (iii) Dans la zone intermédiaire (Zone B), nous avons considéré que ξ décroît linéairement en fonction de ψ .

Conformément aux hypothèses précédentes, le terme d'interaction s'écrit :

$$\xi(\varphi(T, pH, [AH])) = \begin{cases} 1 & si \quad \psi \le \tau_1 \\ 2(1-\psi) & si \quad \psi > \tau_1 \text{ et } \psi \le 1 \\ 0 & si \quad \psi > 1 \end{cases}$$
[IV.14]

Dans l'équation ci-dessus, τ_1 a été défini comme la valeur seuil de ψ en dessous de laquelle le terme d'interaction ξ était égal à 1. τ_1 a été fixé à 1/2. En effet, nous avons

supposé plus haut que lorsqu'un facteur était optimal, il n'interagissait pas avec les autres facteurs. Ce qui veut dire que lorsque deux facteurs sur les trois considérés sont optimaux pour la croissance, le modèle ne doit pas exhiber d'interaction. Dans ce cas, ξ doit être égal à 1 (et par conséquent ψ inférieur à τ_1 , cf. équation [IV.14]).

 τ_1 a donc été défini comme la valeur maximale prise par ψ lorsque deux facteurs sur 3 sont optimaux.

$$\tau_{1} = \max(\psi(T, pH_{opt}, [AH] = 0)) = \max(\psi(T_{opt}, pH, [AH] = 0)) = \max(\psi(T_{opt}, pH_{opt}, [AH]))$$
[IV.15]

Lorsque par exemple pH = pH_{opt} et [AH]=0, nous avons par construction :

$$\varphi_{pH}(pH_{opt}) = (1 - \gamma(pH_{opt}))^2 = 0$$
 et $1 - \varphi_{pH}(pH_{opt}) = 1$ [IV.16]

$$\varphi_{acide}(0) = \left(\frac{0}{MIC_U}\right)^2 = 0 \text{ et} \qquad 1 - \varphi_{acide}(0) = 1 \qquad [IV.17]$$

Il vient alors :

$$\psi(T, pH_{opt}, 0) = \sum_{e_i} \frac{1}{2} \frac{\varphi_{e_i}}{\prod_{i \neq j} (1 - \varphi_{e_j})} = \frac{1}{2} \left(\frac{\varphi_T}{1 \times 1} + 0 + 0 \right) = \frac{1}{2} \varphi_T$$
 [IV.18]

 $τ_1$ est donc défini comme *max*(0.5 $φ_T(T)$). $φ_T$ prend sa valeur maximale à T_{min} et est égale à 1. Finalement, nous obtenons donc :

$$\tau_{1} = \max(\psi(T, pH_{opt}, [AH] = 0)) = \max(\frac{1}{2}\varphi_{T}(T)) = \max(\frac{1}{2}(1 - \sqrt{\rho(T)}))$$
[IV.19]

$$\tau_{1} = \left(\frac{1}{2}\left(1 - \sqrt{\rho(T_{\min})}\right)\right) = \frac{1}{2}$$
[IV.20]

Nous avons pris l'exemple (pH = pH_{opt} , [AH]=0). Le même résultat est bien sûr obtenu pour (T = T_{opt} , [AH]=0) ou pour (T = T_{opt} , pH = pH_{opt}).

4.3. Evaluation de la capacité prédictive des modèles CT_RPM et $CT_RPM\xi$ dans le milieu BHIM

Par construction, le terme d'interaction ξ est défini uniquement par les paramètres du modèle CT_RPM. Dans les chapitres 3 et 4, ces paramètres ont été estimés pour plusieurs souches de *Listeria*, en dehors de la zone d'interaction. Aucun ajustement supplémentaire n'est donc a priori requis pour l'utilisation du modèle d'interaction CT_RPM ξ .

Le modèle proposé a été testé sur des données de la littérature ou obtenues au laboratoire en milieu synthétique. Plusieurs situations ont été étudiées : croissance de *L. innocua* et *monocytogenes* en fonction de la température et du pH ; prédiction du pH minimum autorisant la croissance en fonction de la température et des concentrations d'acide organique.

Pour la souche ATCC 33090, nous avons aussi utilisé le modèle pour prévoir l'effet des acides organiques sur le comportement de cette souche à des concentrations supérieures à celles utilisées pour ajuster le modèle.

Les prédictions du modèle d'interaction ont enfin été confrontées à des cinétiques observées en condition variables de température ou de pH.

La souche ATCC 33090 a particulièrement été étudiée, sur des données acquises au laboratoire. Pour *L. monocytogenes*, le modèle a été testé à la fois sur données du laboratoire (souche 17501) et des données bibliographiques (souche Scott A).

4.3.1. Prévision du comportement de L. innocua ATCC 33090 en conditions statiques

4.3.1.1. Etude des interactions température/ pH

Dans un premier temps, la capacité du modèle $CT_RPM\xi$ à décrire les effets combinés de la température et du pH (pH contrôlé par HCI, sans ajout d'acide faible) a d'abord été évaluée.

Pour 56 nouvelles conditions (non utilisées pour ajuster le modèle) couvrant le domaine suboptimal, les cinétiques de *L. innocua* ATCC 33090 ont été suivies pendant 30 jours.

Les données de la zone suboptimale ayant servi à ajuster le modèle ont été incluses dans les jeux de données pour comparer l'interface croissance/ non croissance.

L'interface théorique définie par notre modèle d'interaction a été comparée aux observations croissance/ non croissance pour les données utilisées pour le développement du modèle et ces nouvelles conditions. La Figure IV.4 montre que le modèle proposé décrit correctement la frontière entre croissance et absence de croissance.



Figure IV.4. Interface croissance/ non croissance de *L. innocua* ATCC 33090 en fonction du pH et de la température. Comparaison entre l'interface théorique (modèle $CT_RPM\xi$) et les observations expérimentales (croissance : • , non croissance : •).

Parmi la totalité des observations couvrant la zone suboptimale, une non croissance est prédite à tort : à 20°C et pH 4.38. Deux croissance s sont prédites à tort : à 30°C et pH 4.3 et à 0.5°C et pH 5.63. Pour cette dernière condition, le cas est litigieux puisqu'une légère croissance a été observée pendant la durée de l'expérience sans quelle soit significative (<1 log₁₀). A titre de comparaison, sans tenir compte de cette combinaison, 12 croissances sont prédites à tort par le modèle sans interaction CT_RPM .

L'approche développée est une approche déterministe : à chaque condition est associée une valeur 0 (absence de croissance : $\mu_{max}= 0$) ou une valeur 1 (croissance $\mu_{max}>0$). Certains auteurs (Tienungoon *et al.*, 2000, Presser *et al.*, 1998, Ratkowsky et Ross, 1995) ont envisagé une approche probabiliste : une probabilité de croissance p (0<p<1) est associée à chaque condition expérimentale.

Ces chercheurs ont cependant remarqué que la frontière séparant la croissance et la non croissance était particulièrement abrupte. Leurs observations ne sont pas remises en cause par nos résultats puisque aucun chevauchement entre les conditions de croissance et de non croissance n'est observé sur la Figure IV.4. Dans ces conditions, il semble raisonnable d'envisager une approche déterministe plutôt que probabiliste.

Pour les conditions n'ayant pas servi à ajuster le modèle, la comparaison des racines carrées des taux de croissance prédits et observés montre une meilleure capacité de prédiction du modèle avec interaction (Figure IV.5). La variabilité expliquée par le modèle $CT_RPM\xi$ est de 94% contre seulement 67% pour le modèle CT_RPM .

Ce résultat est confirmé par les calculs d'erreur moyenne pour les deux modèles. L'erreur moyenne calculée sur les temps de génération (pour les conditions μ_{max} >0) est de 20% pour le modèle CT_RPMξ contre 64% pour le modèle CT_RPM. L'erreur médiane est de 11% pour le modèle CT_RPMξ et est de 12% pour le modèle sans terme d'interaction.



Figure IV.5. Comparaison des racines carrées des taux de croissance de *L. innocua* ATCC 33090 dans du BHIM observés et prédits par les modèles CT_RPM et $CT_RPM\xi$ à différentes températures et valeurs de pH.

Pour mieux visualiser l'apport de la fonction d'interaction ξ sur la qualité de prévision, des exemples de cinétiques observées et simulées suivant les modèles CT_RPM et CT_RPM ξ sont présentés sur les Figures IV.6 à IV.11.



Figure IV.6. Prévision de la croissance de *L. innocua* ATCC 33090 dans du BHIM modifié (trait continu : modèle $CT_RPM\xi$; trait pointillé : modèle CT_RPM) à 0.5°C pour différentes valeurs de pH. Seul l'inoculum () est pris en compte dans la simulation. Les cercles correspondent aux dénombrements observés.



Figure IV.7. Prévision de la croissance de *L. innocua* ATCC 33090 dans du BHIM (trait continu : modèle $CT_RPM\xi$; trait pointillé : modèle CT_RPM) à 3°C pour différentes valeurs de pH.



Figure IV.8. Prévision de la croissance de *L. innocua* ATCC 33090 dans du BHIM (trait continu : modèle $CT_RPM\xi$; trait pointillé : modèle CT_RPM) à 5 et 7°C pour différentes valeurs de pH.



Figure IV.9. Prévision de la croissance de *L. innocua* ATCC 33090 dans du BHIM (trait continu : modèle $CT_RPM\xi$; trait pointillé : modèle CT_RPM) à 7, 8 et 10°C pour différentes valeurs de pH.



Figure IV.10. Prévision de la croissance de *L. innocua* ATCC 33090 dans du BHIM (trait continu : modèle $CT_RPM\xi$; trait pointillé : modèle CT_RPM) à 10 et 15°C pour différentes valeurs de pH.



Figure IV.11. Prévision de la croissance de *L. innocua* ATCC 33090 dans du BHIM (trait plein : modèle $CT_RPM\xi$; trait pointillé : modèle CT_RPM) à 15 et 20°C pour différentes valeurs de pH.

4.3.1.2. Comparaison avec le modèle CTPMI

A partir des mêmes résultats expérimentaux que dans le paragraphe précédent, l'aptitude du modèle CTPMI à décrire les effets combinés de la température et du pH sur les paramètres de croissance de *L. innocua* a été étudiée.

Les paramètres de croissance du modèle d'interaction CTPMI (équation [I.28]) ont été estimés sur les deux jeux de données présentés au chapitre 3 (μ_{max} en fonction de la température à pH 7.0, μ_{max} en fonction du pH à 30°C). Dans l'ajustement du modèle, l'a_w n'a pas été prise en compte : on a considéré que l'a_w du milieu BHIM correspondait à l'activité de l'eau optimale de croissance. Les paramètres estimés sont présentés à la Table IV.2. Une valeur de pH^{0}_{min} de 4.20 a été estimée comme dans le paragraphe 3.2. T_{opt} et T_{max} sont également très proches des estimations du paragraphe 3.1. La différence dans l'estimation de T_{min} est liée à l'utilisation du modèle des températures cardinales plutôt que du modèle modifié (équation [III.1]). La valeur de *lag_{min}* utilisée pour la prévision des cinétiques a été déduite d'une courbe de référence à 30°C (*lag_{min}=*0.5 h).

Tableau 4.1. Valeurs cardinales de *L. innocua* ATCC 33090 et intervalles de confiance à 95% estimées par l'ajustement du modèle d'interaction CTPMI.

μ_{opt} (h ⁻¹)	рН ^о _{тіп}	pH _{opt}	рН _{тах}	$T^{o}_{min}(\mathbf{C})$	$T_{opt}(\mathbf{C})$	$T_{max}(\mathfrak{C})$
1.18	4.21	6.92	10.69	-1.2	37.6	44.8
[1.05-1.31]	[4.06-4.36]	[6.58-7.27]	[9.9-11.4]	[-2.9- 0.5]	[36.1- 39.2]	[43.1-46.5]

La comparaison des racines carrées des taux de croissance prédits et observés sur la totalité des données montre une meilleure qualité prédictive pour le modèle $CT_RPM\xi$ que pour le modèle CTPMI (Figure IV.12). Pour les conditions de non croissance (μ_{max} = 0), la qualité de prédiction est aussi bonne qu'avec le modèle $CT_RPM\xi$, ce qui explique que les variabilités expliquées par les deux modèles soient proches (0.91 contre 0.94 respectivement).

Cependant on note une sous estimation des taux de croissance pour les faibles valeurs de μ_{max} . Lorsque on ne tient pas compte des données de non croissance, par exemple dans le calcul de l'erreur médiane, la comparaison est nettement à l'avantage du modèle $CT_RPM\xi$: l'erreur médiane calculée est de 65% pour le modèle CTPMI contre 11% pour le modèle $CT_RPM\xi$.



Figure IV.12. Comparaison des racines carrées des taux de croissance de *L. innocua* ATCC 33090 observés et prédits par les modèles CTPMI et $CT_RPM\xi$.





Figure IV.13. Exemples de prévision de la croissance de *L. innocua* ATCC 33090 dans du BHIM (trait continu : modèle $CT_RPM\xi$; trait pointillé : modèle CTPMI) à 3, 5, et 10°C p our différents pH.

Pour certaines combinaisons de température et de pH où l'on observe une sous estimation de la croissance par le modèle CTPMI, le modèle CTPM classique utilisé avec les mêmes valeurs de paramètres que le modèle CTPMI (Tableau 4.1) conduit à une meilleure prévision des cinétiques (Figure IV.15). Notons que pour les deux conditions expérimentales présentées, les prévisions du modèle sans interaction CT_RPM sont aussi de bonne qualité (les deux conditions se situent à l'extérieur de la zone d'interaction définie par le terme ξ).



Figure IV.15. Exemples de prévisions de la croissance de *L. innocua* par les modèles CT_RPM (-.-), CTPM (--) et CTPMI (-). Les points correspondent aux dénombrements expérimentaux.

Dans le modèle CTPMI, comme nous l'avons déjà indiqué, les valeurs de T_{min} et pH_{min} dépendent du niveau de respectivement du pH et de la température. Pour la condition (5°C pH 5.75), on a selon ce modèle $T_{min} = -0.14$ °C et $pH_{min} = 4.9$. L'introduction de ces valeurs dans les modules cardinaux entraîne une diminution de 35% des prévisions de μ_{max} par rapport aux prévisions du modèle CTPM. Pour la combinaison (3.2°C, pH 5.82), cette diminution par rapport aux prévisions du modèle CTPM est de 46%. Pourtant expérimentalement, cette diminution n'est pas constatée (Figure IV.15)

Cette sous-estimation, constatée pour des conditions expérimentales où deux modèles sans interaction (CTPM et CT_RPM) sont suffisants pour décrire les cinétiques de *Listeria*, suggère une surestimation des effets des interactions sur μ_{max} plutôt qu'une estimation non consistante des paramètres du Tableau 4.1.

Dans la suite de l'étude, nous avons donc préféré l'utilisation du modèle CT_RPMξ.

4.3.1.3. Etude des interactions température / pH/ [acide]

L'aptitude du modèle d'interaction $CT_RPM\xi$ à décrire l'interface croissance/ non croissance de *L. innocua* ATCC 33090 en présence d'acide organique à 10°C et 20°C a été étudiée.

L'interface croissance/ non croissance déduite du terme d'interaction ξ est en adéquation avec les résultats observés expérimentalement en présence d'acide lactique à 10 et 20°C (Figure IV.16) et en présence d'acide acétique à 20°C (Figure IV.17).



Figure IV.16. Prédiction de l'interface croissance/ non croissance de *L. innocua* ATCC 33090 en fonction du pH et des concentrations d'acide lactique à 10 et 20°C. Comparaison avec les données expérimentales (croissance : \bullet , non croissance :o).



Figure IV.17. Prédiction de l'interface croissance/ non croissance de *L. innocua* ATCC 33090 à 20℃ en fonction du pH et des concentrations d'acid e acétique comparée au observations expérimentales (croissance :●, non croissance :o).

4.3.2. Prévision du comportement de L. monocytogenes

Le comportement de *L. monocytogenes* 17501 a été étudié au laboratoire pendant 30 jours à différents niveaux de pH (entre 4.3 et 6) et de température (5, 10 et 15°). Pour une condition (5°C et pH 4.93), la cinétique n'a été suivie que pendant 21 jours. Cette expérience a été exclue des jeux de données pour la comparaison des interfaces prédites et observées et des taux de croissance prédits et observés.

Les pH cardinaux utilisés pour les simulations sont ceux estimés au paragraphe 3.1. Des données préliminaires ont été obtenues pour la souche 17501 à pH 7 à 5, 8, 15 et 20°C. La comparaison des taux de croissance observés pour cette souche et prédits en utilisant les paramètres de la souche Scott A met en évidence une sousestimation de μ_{max} à 8°C d'environ 40% (le taux de croissance prédit est de 0.062 h⁻¹ contre 0.100 h⁻¹ pour la valeur observée).

Bien que la souche Scott A soit souvent utilisée comme une souche de référence pour *L. monocytogenes* par de nombreux chercheurs, il nous a semblé plus pertinent d'utiliser en prédiction les valeurs des paramètres estimés pour la souche ATCC 33090.

Des valeurs de μ_{opt} de 1.06 h⁻¹ et de *lag_{min}* de 0.9 h ont été estimées pour la souche 17501 d'après une courbe de référence à 30°C dans d u BHIM.



Figure IV.18. Comparaison des taux de croissance de *L. monocytogenes* 17501 estimés à pH 7 et à 5, 8, 15 et 20°C et prédits par le modèle CT _RM en utilisant les paramètres estimés pour la souche Scott A (\Box) et ATCC 33090 (o). Les bornes correspondent à l'intervalle de confiance à 95% des estimations de μ_{max} .

La comparaison des racines carrées des taux de croissance prédits et observés est présentée à la Figure IV.19.



Figure IV.19. Comparaison des racines carrées des taux de croissance de *L. monocytogenes* 17501 observés et prédits par les modèles CT_RPM et $CT_RPM\xi$.

La variabilité expliquée est de 96% pour le modèle $CT_RPM\xi$ contre 72% pour le modèle sans interaction CT_RPM . L'erreur moyenne calculée sur les temps de génération (pour les conditions μ_{max} >0) est de 25% pour le modèle $CT_RPM\xi$ contre 75% pour le modèle CT_RPM . L'erreur médiane est enfin de 24% pour les deux modèles.

Notons qu'en utilisant les valeurs des paramètres du module température estimées pour la souche Scott A, l'erreur moyenne est de 50% pour le modèle $CT_RPM\xi$ contre 25% précédemment. Ceci étant essentiellement dû à la sous estimation de μ_{max} pour les différentes conditions à 10°C.

Les résultats confirment le choix du modèle $CT_RPM\xi$ pour décrire les effets combinés de la température et du pH par rapport au modèle sans interaction. La Figure IV.20 montre des exemples entre cinétiques prédites et observées, permettant de visualiser la capacité prédictive du modèle développé.



Figure IV.20. Prévision de la croissance de *L. monocytogenes* 17501 dans du BHIM (trait plein : modèle $CT_RPM\xi$; trait pointillé : modèle CT_RPM).



Figure IV.20 (suite).

A 5°C et pH 4.93, le comportement de *Listeria* est bien décrit par le modèle pendant 21 jours où la cinétique microbienne a été suivie (Figure IV.21). Bien que cette condition soit théoriquement dans la zone de croissance (une valeur de μ_{max} strictement positive est prédite), le temps de latence prédit étant d'environ 400 heures et le taux de croissance prédit étant très faible, aucune croissance significative (supérieur à 1 log₁₀) n'est prédite à la fin des 30 jours d'expérience.



Figure IV.21. Prévision de la croissance de *L. monocytogenes* 17501 dans du BHIM à 5°C et pH 4.93 (trait plein : modèle $CT_RPM\xi$; trait pointillé: modèle CT_RPM).

La Figure IV.22 montre que les observations croissance/ non croissance sont en adéquation avec l'interface prédite par le modèle CTRPMξ.



Figure IV.22. Interface de croissance de *L. monocytogenes* 17501 prédite par le modèle $CT_RPM\xi$. Comparaison avec les observations expérimentales (\bullet : croissance, o: non croissance).

En ce qui concerne la souche Scott A, l'interface prédite en fonction de la température et du pH (modèle $CT_RPM\xi$) a été confrontée aux observations de Tienungoon *et al.* (2000) et de George *et al.* (1988).

Les cinétiques de *L. monocytogenes* Scott A à différentes températures et niveaux de pH ont été suivies pendant 28 jours par George *et al.* (1988). Dans l'expérience de Tienungoon *et al.* (2000), le comportement de la souche a été suivi pendant 90 jours. Pour chaque condition, les différents auteurs ont noté si une croissance était constatée.

Les prédictions du modèle $CT_RPM\xi$ ont été comparées aux observations expérimentales publiées et aux résultats du modèle de probabilité de croissance développé par Tienungoon *et al.* (2000) :

$$\ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = -6.023 + 19.00\ln(T - 0.4164) + -3.049\ln^2(T - 0.4164) + \dots$$

$$7514\ln\left(1 - \exp\left[0.536(T - 48)\right]\right) + 141.0\ln\left(1 - 10^{(3.35-pH)}\right) + \dots$$

$$2402\ln^2\left(1 - 10^{(3.35-pH)}\right) + 4.635\ln\left(a_w - 0.9142\right) + 31.98\ln\left(1 - \frac{[AH]}{23.68}\right)$$
[V.4]

où p est la probabilité de croissance

Par rapport aux observations de Tienungoon *et al.*, 5 conditions donnent lieu à une prédiction erronée par le modèle $CT_RPM\xi$ (Figure IV.23). Deux de ces conditions (10°C et pH 4.65 ; 8°C et pH 4.75) pour lesquelles une non croissance est prédite à tort sont extrêmement proches de l'interface prédite (la différence entre l'interface prédite et les valeurs de pH est inférieure à 0.1).

A 10°C et pH 4.5, une absence de croissance est pré dite par le modèle alors que Tienungoon *et al.* ont constaté une croissance expérimentalement. Notons que pour cette même condition, d'autres auteurs (George *et al.*, 1988) n'ont pas observé de croissance pendant 28 jours, ce qui semble indiquer que cette condition est très proche des limites de croissance. Notons aussi qu'au laboratoire, pour les mêmes conditions, aucune croissance significative n'a été constatée pendant 30 jours pour la souche 17501. A 4°C et pH 5.1, le modèle prédit une croissance alors qu'aucune croissance n'est observée respectivement par Tienungoon *et al.* et par George *et al.*. Cette condition peut être rapprochée de la condition 5°C pH 4.93 testée pour la souche *L. monocytogenes* 17501 : les valeurs prédites de *lag* et de μ_{max} étant respectivement très fortes et très faibles, aucune croissance significative n'était prédite pendant la durée de l'expérience (alors que la condition se situait dans la zone de croissance théorique).

Pour conclure sur cette condition expérimentale, il serait nécessaire d'obtenir les valeurs de lag_{min} et μ_{opt} de la souche par rapport au milieu de culture utilisé par les auteurs et des conditions préincubatoires des microorganismes. On pourrait alors comparer le temps prédit nécessaire à une augmentation significative de *L. monocytogenes* Scott A à la durée de l'expérience.



Figure IV.23. Interface de croissance de *L. monocytogenes* Scott A en fonction de la température et du pH. Comparaison des prédictions du modèle $CT_RPM\xi$ (-) et du modèle de probabilité de croissance (*p*=0.5 :--, *p*=0.1 :--; ; Tienungoon *et al.*, 2000) avec les observations expérimentales : (•) croissance ; (o) : non croissance.



Figure IV.24. Interface de croissance de *L. monocytogenes* Scott A en fonction de la température et du pH. Comparaison des observations de George *et al.* (1988) avec les prédictions du modèle $CT_RPM\xi$ et du modèle de probabilité de croissance (p=0.5 :--, p=0.1 -.-) établi par Tienungoon *et al.* (2000).
Pour développer leur modèle de probabilité, Tienungoon *et al.* n'ont testé que des températures supérieures à 3°C et le modèle est difficilement extrapolable pour des températures inférieures : en comparant leurs résultats avec des données tirées de la littérature, les auteurs ont remarqué que le modèle tendait à minimiser le risque aux températures inférieures à 3°C.

Dans ce cas, y compris à pH 7.1, des valeurs de probabilité très faibles sont prédites alors que des croissances ont été observées jusqu'à -2.5°C (Walker *et al.*, 1990, Bajard, 1996b). A 0.5°C, une probabilité de croissance de 4.5^{e-03} est prédite par le modèle. Pour des températures inférieures à 0.4°C, le modèle n'est pas défini. Soulignons que par contre le modèle CT_RPM ξ est en mesure de prévoir ces croissances observées à très basses températures.

4.4. Prévision du comportement de *Listeria* en conditions variables

Le modèle $CT_RPM\xi$ a été utilisé pour prédire le comportement de *L. innocua* ATCC 33090 dans du BHIM lorsque les facteurs environnementaux varient au cours du temps. Deux situations ont été envisagées :

- un changement de température pendant une phase de conservation
- une évolution du pH pendant une fermentation lactique

4.4.1 Conditions dynamiques de température

La Figure IV.25 montre les cinétiques observées et prédites pour la souche étudiée dans du BHIM en conditions variables de température pour différentes valeurs de pH (contrôlé par HCI). Les simulations sont présentées pour les modèles sans (modèle CT_RPM) et avec terme d'interaction (modèle $CT_RPM\xi$).

Pour les situations testées, les prévisions du modèle $CT_RPM\xi$ sont en adéquation avec les cinétiques observées. Ces expériences illustrent l'importance du facteur température pour la croissance de *Listeria*. A pH 5.05 pour une température de 4°C, seule une croissance très faible est observable (Figure IV.25a.). Pour le même pH, la concentration de *Listeria* est multipliée environ par 10 en 10 jours à 8°C (Figure IV.25c) et par 1000 en moins de 5 jours à 12°C (Fig ure IV25a).



Figure IV.25. Cinétiques de croissance observées de *L. innocua* ATCC 33090 et prédites par les modèles $CT_RPM\xi$ (-) et CT_RPM (-.-) en conditions dynamiques de température (--).

4.4.2. Conditions dynamiques de pH et d'acide lactique

Des cocultures de *Listeria* avec *Lc. lactis* SL05 ont été réalisées à 20 et 30°C dans du BHIM. *L. innocu*a et *Lc. lactis* ont été inoculés à environ 10³ et 10⁶ UFC/ml respectivement. Les cocultures ont été réalisées à différents pH initiaux (entre 4.70 et 7.10). Les différentes conditions expérimentales testées sont présentées au Tableau 4.2.

Des études préliminaires ont montré que la souche lactique utilisée ne produit pas de bactériocines telles que la nisine. La température, le pH et les concentrations d'acide lactique ont donc été les seuls facteurs pris en compte pour la prévision.

N°condition	Laboratoire	T(°C)	pН	Inoculum	Inoculum	
			initial	Lc. lactis (UFC/ml)	L. innocua (UFC/ml)	
1	ADRIA	20	7.11	2.5 [°] 06	1.3 ^e 03	
3	IFR	20	5.38	7.9 ^e 05	1.1 ^e 03	
4	ADRIA	30	6.90	6.5 ^e 05	1.2 ^e 03	
5	ADRIA	30	5.35	8.0 ^e 05	1.1 ^e 03	
6	ADRIA	30	4.70	1.1 ^e 06	1.0 ^e 03	

Tableau 4.2. Conditions de fermentation lactique étudiées au laboratoire ADRIA et à l'IFR.

L'évolution du pH au cours des différentes fermentations présente la même allure caractéristique : le pH est constant pendant une courte période, puis diminue progressivement au cours de la fermentation ; cette baisse de pH étant liée à la production d'acide lactique par *Lc. lactis*. Pour l'expérience 1, une augmentation du pH à la fin de la fermentation, à partir d'un instant que nous appellerons t_c , a été constatée. Cette augmentation du pH pourrait être liée à la production d'ammonium NH₄⁺ par *Lc.lactis* (et à l'arrêt de la production d'acide lactique) après que les extraits de levure aient été totalement consommés par les micro-organismes. Avant t_c , le pH dépend des quantités d'acide lactique produites par *Lc. lactis*. Après t_c , la concentration d'acide peut être considérée comme constante.

Les cinétiques de pH ont été décrites au moyen de lissage « spline ». L'évolution de la concentration en acide lactique a été déduite du lissage en utilisant la courbe de titration $pH=f([H^+]_{ajoutée})$. Pour l'expérience 1, les dosages effectués montrent une bonne correspondance entre les concentrations d'acide prédites et mesurées (Figure IV.26).



Figure IV.26. Evolution prédite de la concentration d'acide lactique pendant une coculture (condition 1) à partir des cinétiques de pH (trait pointillé). Comparaison entre la simulation (trait continu) et les dosages effectués au laboratoire (**■**).

Les comparaisons entre les cinétiques observées et les simulations montrent que le modèle $CT_RPM\xi$ permet une description précise des interactions microbiennes entre *L. innocua* et *Lc. lactis* dans du BHIM (Figure IV.27). Pour toutes les expériences réalisées, la différence entre le niveau maximal de contamination par *Listeria* prédit et observé pendant la fermentation est inférieure à 1 log₁₀. Ces résultats illustrent la capacité du modèle $CT_RM\xi$ à décrire les cinétiques de *Listeria* en conditions variables de pH et d'acide pendant une fermentation lactique.



Figure IV.27. Cinétiques de croissance de *L. innocua* pendant des fermentations lactiques à 20 et 30°C prédites par le modèle $CT_RM\xi$ (trait continu). Seuls l'inoculum de *Listeria* (\Box) et l'évolution du pH (trait pointillé) sont pris en compte dans la simulation. Les points correspondent aux dénombrements de *Listeria*. A titre indicatif, les dénombrements de *Lc.lactis* sont également présentés (\diamond).



Figure IV.27 (suite).

Ils montrent également que les interactions microbiennes entre *Listeria* et *Lc. lactis* peuvent être modélisées par l'intermédiaire des cinétiques d'évolution du pH et des concentrations d'acide organique.

Cette étude concernant les interactions microbiennes entre *Lc. lactis* et *Listeria* a été réalisée en collaboration entre l'ADRIA QUIMPER et l'IFR de Norwich dans le cadre du projet européen "PREMIUM" (FAIR CT 97-3129). D'autres cocultures *L. innocua / Lc. lactis* dans du lait, réalisées toujours dans le cadre du même projet, sont présentées au chapitre suivant.

4.5. Prévision du comportement de *L. innocua* aux hautes concentrations d'acide lactique

4.5.1. Croissance de L. innocua ATCC 33090 à pH 6

Dans le paragraphe 3.4, nous avons modélisé l'effet de l'acide lactique sur le taux de croissance de *L. innocua* ATCC 33090. La concentration maximale testée était de 138 mM. Dans certains aliments, elles peuvent atteindre des concentrations supérieures. Par conséquent, nous avons testé le modèle développé pour des concentrations plus fortes comprises entre 150 et 250 mM, à pH 6 et à 20°C.

A pH 6, dans la gamme de concentration d'acide testée, l'utilisation du modèle acide complet (équation [III.10]) n'est pas nécessaire. D'autre part, les conditions testées

se situent en dehors de la zone d'interaction définis par le module ξ . Les prévisions des modèles CT_RPM et $CT_RPM\xi$ sont donc identiques. Pour les conditions expérimentales testées, la qualité de prédiction est très satisfaisante (Figure IV.28).



Figure IV.28. Exemples de prévision de la croissance de *L. innocua* ATCC 33090 dans du BHIM à 20℃ en présence d'acide lactique.

4.5.2. Interface croissance/ non croissance de L. innocua DSM 20649 en présence d'acide lactique

L'effet de l'acide lactique sur *L. innocua* a été étudié par Houtsma *et al.* (1994, 1996) à 4, 10, 20 et 30°C. Les taux de croissance publiés à 20°C nous ont servi à estimer MIC_U et MIC_D pour la souche considérée (cf. paragraphe 3.3.4). L'objet de ce paragraphe est l'utilisation du modèle $CT_RPM\xi$ pour prédire l'interface croissance/ non croissance de la souche DSM 20649 aux fortes concentrations d'acide.

Nous avons vu que lorsque la totalité de la gamme d'acide permettant la croissance était à considérer, l'acide dissocié devait être pris en compte. Afin de faire apparaître la concentration d'acide dissocié dans la contribution des concentrations d'acide aux interactions ϕ_{acide} a été modifiée par rapport à l'équation [IV.7] précédemment proposée :

$$\varphi_{acide} = \left(\frac{[AH]}{MIC_{U}\left(1 - \frac{[A^{-}]}{MIC_{D}}\right)}\right)^{2}$$
[IV.21]

Pour la souche DSM 20649, aucune donnée n'est disponible à une température inférieure à 4°C et pour un pH inférieur à 5.5. Une estimation consistante des pH cardinaux et des températures cardinales n'est pas possible. Nous avons supposé les valeurs de ces paramètres proches des estimations de la souche ATCC 33090 (cf. la Fiche descriptive ci-dessous).

Fiche descriptive : *Listeria innocua* DSM 20649 Effet de la température : module CT_RM (paramètres de la souche *L. innocua* ATCC 33090, cf. paragraphe 3.1) Effet du pH : modèle CPM (paramètres de la souche *L. innocua* ATCC 33090, cf. paragraphe 3.2) Effet de l'acide lactique : Modèle complet (équation [III.9], *L. innocua* DSM 20649) $MIC_U = 7.9$ mM, $MIC_D = 1500$ mM (estimations pour la souche DSM 20649, cf. paragraphe 3.3.4)

Les concentrations minimales inhibitrices en fonction du pH et de la température ont été prédites suivant le modèle d'interaction proposé d'une part et sans considérer ces interactions d'autre part. Dans ce dernier cas, les concentrations minimales d'acide à l'inhibition sont obtenues suivant l'équation proposée par Eklund (1989, 1984) :

$$\begin{cases} \frac{[AH]}{MIC_U} + \frac{[A^-]}{MIC_D} = 1 \\ MIC_t = [AH] + [A^-] \end{cases}$$
[IV.22]

où MIC_t est la concentration d'acide total à l'inhibition

Les résultats sont présentés au Tableau 4.3. A 10 et 20°C, les prédictions du modèle d'interaction sont du côté de la sécurité mais restent proches des observations expérimentales. Ces résultats confirment ceux obtenus aux faibles concentrations d'acide : à partir des paramètres caractéristiques de la croissance (paramètres du module CT_RM , pH cardinaux, concentrations minimales inhibitrices d'acide), nous sommes en mesure d'estimer assez précisément les conditions permettant l'inhibition de *Listeria*.

S'il faut noter à 4°C une tendance du modèle à sure stimer les concentrations nécessaires à l'inhibition (notées MIC_t), l'utilisation du terme d'interaction permet de se rapprocher de la réalité expérimentale.

pН	T°(C)	Concentration la	Concentration la plus	<i>MIC</i> t prédite (mM)	<i>MIC</i> t prédite (mM)
		plus forte ayant	faible pour laquelle	Equation [IV.22]	Modèle CT _R PM
		permis la	aucune croissance n'a		
		croissance (mM)	été observée (mM)		
5.5	4	0	97	287	141
	10	200	217	287	191
	20	200	217	287	271
6	4	268	291	636	427
	10	446	485	636	508
	20	500	582	636	600
6.5	4	537	625	1046	851
	10	803	872	1046	935
	20	500	969	1046	1018
7.0	4	803	893	1317	1207
	10	982	1071	1317	1256
	20	1161	1250	1317	1312

Tableau	4.3.	Comparaison	des	prédictions	des	concentrations	minimales	d'acide	lactique
inhibant	la cro	oissance de L.	inno	<i>cua</i> (MIC₁) à ∈	différ	entes valeurs de	pH et de te	mpératu	re et des
observat	ions	expérimentale	s de l	Houtsma <i>et a</i>	a <i>l.</i> (19	96).			

4.6. Extension du modèle : prise en compte des effets de l'activité de l'eau dans le modèle d'interaction

Dans ce travail, nous nous sommes concentrés sur l'étude de la température, du pH et des acides organiques. D'autres facteurs environnementaux peuvent également influer sur la croissance bactérienne, en particulier l'activité de l'eau.

Notre propos est ici d'envisager une éventuelle extension du modèle d'interaction pour décrire les effets de l'a_w sur le taux de croissance de *Listeria*. Seul le cas de la souche *L. innocua* ATCC 33090 a été étudié. Comme pour les effets de la température, du pH et des acides organiques, la modélisation des effets de l'activité de l'eau s'est faite en deux étapes.

La première étape a consisté à décrire l'effet relatif de l' a_w à des valeurs de température et de pH favorables pour la croissance. La fonction relatant l'effet relatif de l' a_w sera introduite dans le modèle par agrégation.

Dans la seconde étape, nous proposerons une fonction ϕ_{aw} pour décrire la contribution de l'activité de l'eau aux interactions. Cette fonction sera introduite dans le module ξ .

Enfin le modèle obtenu a été testé sur des données n'ayant pas servi à l'estimation des paramètres.

4.6.1. Effet spécifique de l'aw sur le taux de croissance de L. innocua

L'effet de l'a_w (humectant : NaCl) sur le taux de croissance de la souche ATCC 33090 a été étudié au laboratoire à 20°C et pH 7. L es taux de croissance observés ont été ajustés à un modèle de type cardinal, similaire au modèle des pH cardinaux CPM (équation [I.22]), dans lequel valeur de a_{wmax} a été fixée à 1.

$$\theta(aw) = \frac{(aw - aw_{\min})(aw - 1)}{(aw - aw_{\min})(aw - 1) - (aw - aw_{opt})^2}$$
[IV.23]

La Figure IV.30 met en évidence une très bonne adéquation entre le modèle ajusté et les résultats expérimentaux ($R^2_{adj}=0.99$).



Figure IV.30. Ajustement du modèle cardinal [IV.22] aux taux de croissance observés à 20°C et pH 7 et graphe de normalité des résidus.

Tableau 4.4. A_w cardinales de la souche *L. innocua* ATCC 33090 estimées à 20°C et pH 7 (humectant : NaCl).

Humectant	a _{wmin}	a _{wopt}		
NaCl	0.907 [0.904-0.911]	0.993 [0.990-0.995]		

4.6.2. Extension du modèle d'interaction

L'activité de l'eau optimale est estimée à 0.993 ce qui très proche de l'activité de l'eau du milieu BHIM mesurée au laboratoire (a_w = 0.992). L'absence de contribution aux interactions d'un facteur qui est à son niveau optimal est une des hypothèses sous jacentes au modèle d'interaction développé (cf. paragraphe 4.2.2). L'a_w du

milieu utilisé étant très proche de l' aw_{opt} , ceci justifie le fait que nous ayons jusqu'à présent négligé l'effet de l'activité de l'eau dans notre modèle d'interaction.

La contribution de l'activité de l'eau aux interactions a été supposée pouvoir être décrite par la fonction suivante :

$$\varphi_{aw} = (1 - \theta(aw))^3 \qquad [IV.24]$$

Le modèle sans interaction intégrant l'effet de l'activité de l'eau suivant l'approche modulaire classique s'écrit :

$$\begin{cases} \mu_{\max} = \mu_{opt} \ \rho_{CT_{RM}}(T) \gamma(pH) \tau([acide]) \theta(aw) \\ lag = \frac{lag_{\min}}{\rho_{CT_{RM}}(T) \gamma(pH) \tau([acide]) \theta(aw)} \end{cases}$$
[IV.25]

Le modèle d'interaction associé s'écrit donc :

$$\begin{cases} \mu_{\max} = \mu_{opt} \ \rho_{CT_{R}M}(T) \ \gamma(pH) \tau([acide]) \theta(aw) \ \xi(T, pH, [acide], aw) \\ lag = \frac{lag_{\min}}{\rho_{CT_{R}M}(T) \gamma(pH) \tau([acide]) \ \theta(aw) \xi(T, pH, [acide], aw)} \end{cases}$$
[IV.26]

où ξ est le module d'interaction défini par l'équation [IV.14].

4.6.3. Prévision du comportement de L. innocua en fonction de la température et de l' a_w

Les modèles [IV.25] et [IV.26] ont été comparés à des résultats expérimentaux obtenus à pH 7 dans du BHIM pour des températures entre 5 et 15°C.

Nous retrouvons avec l'a_w des résultats de même nature que ceux obtenus pour les autres facteurs : l'activité de l'eau minimale autorisant la croissance de *Listeria* dépend de la température. A 5°C, *L. innocua* ATCC 33090 n'est pas capable de se développer à une a_w de 0.927 (11% NaCl w/w). A 15°C, cette souche peut se développer par contre jusqu'à des activités de l'eau de 0.914 (12.5% NaCl w/w). Le

modèle proposé décrit convenablement la frontière séparant à pH 7 la croissance de la non croissance (Figure IV.31).



Figure IV.31. Comparaison de l'interface croissance/ non croissance prédite de *L. innocua* ATCC 33090 en fonction de la température et l'activité de l'eau et données expérimentales (• : croissance, o : non croissance).

En se plaçant dans le domaine de croissance, la comparaison des prédictions et des observations montre que le modèle d'interaction permet d'améliorer la qualité de la prévision pour les conditions limites (Figure IV.32). L'erreur moyenne sur les taux de génération est de 58 % pour le modèle d'interaction et de 100% pour le modèle sans interaction. Les erreurs médianes sont de respectivement de 36% et de 52%.



Figure IV.32. Comparaison entre les racines carrées des taux de croissance observés et prédits par le modèle sans (équation [IV.25]) et avec terme d'interaction (équation [IV.26]) à différentes valeurs d'a_w et de température dans du BHIM ajusté à pH 7.

Les résultats mettent aussi en évidence une sous-estimation systématique du temps de latence (Figure IV.33).



Figure IV.33. Comparaison entre les logarithmes des temps de latence observés et prédits par le modèle d'interaction (équation[IV.26]).

Les prévisions du temps de latence sont basées sur l'hypothèse '' μ_{max} . *lag* =C^{te}". Les sous-estimations constatées remettent en cause cette hypothèse en présence de NaCl. Cette sous-estimation du temps de latence est d'autant plus sensible que les concentrations de NaCl sont fortes. A 5°C, les ciné tiques de *Listeria* sont correctement prédites pour des taux de 3.7 et 5.2 % de NaCl. A 7.6%, la croissance est surestimée, suite à la sous-estimation du temps de latence (une latence de 24 h est prédite alors que la latence observée est de 93 h ; Figure IV.34).



Figure IV.34. Comparaison des cinétiques observées dans du BHIM et prédites (équation [IV.25]) de *L. innocua* ATCC 33090 à 5℃ et pH 7 pour différents taux de N aCl.



Figure IV.34 (suite).

4.6.4. Prédiction de l'interface croissance/ non croissance de L.monocytogenes Scott A en fonction du pH et de l'a_w à 20 $^{\circ}$ en présence d'acide lactique

L'interface croissance/ non croissance de *L. monocytogenes* Scott A en présence de 50 mM d'acide lactique a été prédite en fonction du pH et de l'a_w. Les résultats du modèle $CT_RPM\xi$ ont été comparés aux observations expérimentales de Tienungoon *et al.* (2000).

Dans le modèle, la valeur d' a_{wmin} a été fixée à 0.92, valeur expérimentale rapportée par Farber *et al.* (1989) pour la souche Scott A. Les conditions de la simulation sont résumées dans la fiche descriptive ci-dessous.

Fiche d	escriptive : <i>L. monocytogenes</i> Scott A
Effet de	e la température : modèle CT _R M (cf. paragraphe 3.1)
Effet du	I pH : modèle CPM (cf. paragraphe 3.2)
Effet de	l'acide lactique :
$MIC_{U}=9$	0.3 mM (cf. paragraphe 3.4)
Effet de	l'a _w (humectant : NaCl) :
a _{wmin} = 0	.920 (Farber <i>et al.</i> , 1989) <i>a_{wopt}=</i> 0.993 (d'après les résultats du
paragra	phe 4.7.1)

Les résultats sont présentés sur la Figure IV.35. La condition à pH 5.45 et à une a_w de 0.938 pour laquelle aucune croissance n'a été reportée semble un point aberrant. Pour une seconde condition de non croissance (pH 5.4 et une a_w de 0.930), la différence entre le pH mesuré et le pH à l'interface est inférieure à 0.25 unité pH. Pour les autres conditions expérimentales, les prévisions peuvent être considérées comme satisfaisantes compte tenu du niveau d'information disponible : la valeur de a_{wmin} utilisée est une valeur expérimentale tirée de la littérature, a_{wopt} a été fixée arbitrairement d'après les résultats obtenus sur la souche *L. innocua* ATCC 33090.



Figure IV.35. Interface croissance/ non croissance (modèle $CT_RPM\xi$) de *L. monocytogenes* Scott A en fonction du pH et de l'a_w (humectant : NaCl) à 20°C en présence de 50 mM d'a cide lactique.

Ces résultats sont particulièrement importants car ils semblent démontrer que l'approche envisagée peut être utilisée avec succès lorsque quatre facteurs environnementaux sont à considérer (ici la température, le pH, la concentration d'acide lactique et l'activité de l'eau). Avant de conclure, il serait néanmoins nécessaire de tester d'autres situations que celle présentée ci dessus.

Des travaux ultérieurs seront menés à l'ADRIA visant à modéliser les effets combinés de l' a_w et des autres facteurs environnementaux sur le temps de latence. Dans le cadre de ce travail, l'étude sur les effets de l' a_w n'a pas été poursuivie.

4.7. Perspectives

4.7.1. Effet d'un mélange d'acide

Dans cette étude, l'effet des acides lactique, acétique et propionique a été étudié séparément. Or, dans les aliments les acides sont souvent présents en mélange. Il serait nécessaire de définir les conditions d'utilisation du modèle dans le cas d'une présence d'acides organiques en mélange.

4.7.2. Hypothèse de la constance du produit "µ_{max}. lag"

Dans les simulations présentées, les prédictions du temps de latence sont basées sur l'hypothèse " μ_{max} . *lag* =C^{te} ". Cette relation a le mérite de la simplicité. Nous avons vu qu'en présence de NaCl, cette relation n'était pas vérifiée (cf. paragraphe 4.6.3).

Même en l'absence de NaCl, certaines études remettent en question cette hypothèse, notamment près des limites de croissance (Delignette-Muller, 1998b et Robinson *et al.*, 1998). Ces auteurs ont notamment remarqué que le produit " μ_{max} . *lag*" était plus élevé près du pH minimal qu'à pH_{opt} .

Ceci entraînerait une sous estimation des temps de latence prédits dans certaines zones. Une conséquence serait un décalage entre une interface croissance/ non croissance prédite définie par l'équation $\mu_{max} = 0^+$ et une interface observée qui correspondrait à des temps de latence supérieurs à la durée de l'expérience.

Une possible sous estimation du *lag* entraîne des prévisions « fail safe» dans ces zones limites. Si les prévisions du modèle d'interaction permettent de toute façon de rapprocher les prévisions de la réalité expérimentale, il serait néanmoins souhaitable de mieux prendre en compte l'effet de l'environnement sur le produit " μ_{max} . *lag* = C^{te}".

4.7.3. Modélisation de la décroissance

Lorsque les conditions expérimentales ne permettent pas la croissance, des diminutions significatives de la population de *Listeria* sont parfois observées. Jusqu'à

présent, seule la croissance bactérienne ou la bactériostaticité est décrite par le modèle $CT_RPM\xi$. Il serait nécessaire de compléter notre démarche prédictive en intégrant ces phases de destruction.

4.8. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré que l'approche modulaire classique n'était pas satisfaisante pour décrire le comportement des microorganismes dans des zones limites de croissance et dans la zone de non croissance.

Un terme d'interaction a été développé afin de décrire l'interface croissance/ non croissance de *Listeria* et de corriger le biais observé entre les observations et les prédictions du modèle sans interaction.

L'intérêt de l'approche réside dans le fait que ce terme d'interaction ne consomme aucun paramètre supplémentaire puisqu'il emprunte les paramètres pré-existants dans le modèle modulaire classique.

Dans le chapitre 3, nous avons identifié ces paramètres sur des jeux de données indépendants en dehors de la zone d'interaction. Sans expériences supplémentaires, l'approche proposée a permis de décrire avec succès le comportement de différentes souches de *Listeria* dans le milieu BHIM, notamment dans des conditions variables de température et de pH.

Dans certaines situations, les paramètres du modèle n'étaient pas connus pour la souche considérée. Il a été cependant possible d'utiliser les paramètres estimés pour une souche différente dont le comportement est voisin.

Trois facteurs ont particulièrement été étudiés : température, pH, concentrations d'acide. Les résultats obtenus pour l'a_w laissent penser que l'approche développée dans ce chapitre pourrait être progressivement généralisée pour décrire les effets de nouveaux facteurs.

Prévisions du comportement de *Listeria* dans des matrices alimentaires et application à d'autres microorganismes

Nous disposons à ce stade d'un modèle général décrivant l'effet combiné des facteurs environnementaux sur les paramètres de croissance de Listeria. Ce chapitre s'attache à montrer, sur des exemples précis, la qualité de description et les limites du modèle dans la prédiction du comportement de Listeria dans des matrices alimentaires. Dans ce chapitre, la capacité prédictive de l'approche (développée pour Listeria) à décrire les effets des interactions entre facteurs environnementaux pour d'autres microorganismes a également été étudiée.

5.1. Prévisions du comportement de *Listeria* dans des matrices alimentaires

5.1.1. Méthode d'utilisation du modèle

Comme le modèle cardinal classique, le modèle $CT_RPM\xi$ fait preuve d'une certaine souplesse d'utilisation. Dans certains cas, l'utilisateur dispose de toutes les informations nécessaires à l'utilisation du modèle : paramètres cardinaux, température de rupture, concentrations minimales inhibitrices, courbes de référence en matrice alimentaire.

Dans d'autres situations, la connaissance des valeurs paramètres pour la souche étudiée est partielle. L'utilisation du modèle implique alors l'utilisation de paramètres obtenus pour d'autres souches de *Listeria* dont le comportement pourra être supposé proche. Une connaissance partielle peut parfois être suffisante. C'est aussi la situation qui risque d'engendrer les plus importantes erreurs de prédiction, surtout dans la zone d'interaction (ξ <1). Chaque situation a été résumée par une fiche descriptive. Y sont consignées les modèles, les valeurs des paramètres et la source des données utilisées.

5.1.2. Prise en compte de l' "effet matrice"

De nombreux auteurs ont remarqué que les microorganismes avaient des aptitudes de croissance différentes suivant les produits alimentaires (te Giffel *et al.*, 1999 ; Rosso, 1995b). Dans l'approche des modèles cardinaux, la prise en compte de la matrice se fait par l'intermédiaire du paramètre μ_{opt} .

Comme proposé par Rosso (1995b), ce paramètre a été estimé à partir de données de référence dans le produit. Certains produits contiennent naturellement des acides organiques, notamment de l'acide lactique : viande, poisson, fromage, etc ... Des corrections ont été apportées sur le calcul de μ_{opt} et de lag_{min} afin de tenir compte de ces concentrations.

Dans certains produits, certains facteurs ne sont pas pris en compte dans le modèle développé, comme le pourcentage de matière grasse par exemple. Ce facteur sera pris en compte par l'intermédiaire du μ_{opt} . Néanmoins, d'éventuelles interactions entre ce facteur et les autres facteurs en limite de croissance ne seront pas pris en compte dans la prévision. Dans ces cas, le taux de croissance peut être surestimé par les prévisions des modèles.

5.1.3. Prévision du comportement de Listeria dans des produits laitiers

5.1.3.1. Prévision des cinétiques de L. innocua ATCC 33090 dans du lait supplémenté en acide lactique

Nous avons étudié le comportement de *L. innocua* ATCC 33090 dans du lait UHT supplémenté par 35 mM d'acide lactique (pH obtenu : 5.15).

Les valeurs de μ_{opt} et de *lag_{min}* ont été déduites de courbes de références acquises au laboratoire dans du lait UHT à 37°C. Les prévisions du modèle d'interaction sont conformes à la réalité expérimentale (Figure V.1) et démontrent la bonne capacité prédictive du modèle dans du lait fermenté.





Figure V.1. Prévision de la croissance de *L. innocua* ATCC 33090 dans du lait UHT supplémenté par 35 mM d'acide lactique (pH résultant : 5.15) à différentes températures. Comparaison avec les dénombrements expérimentaux à 4.2 (\blacksquare), 10.0 (\diamondsuit) et 20.1 °C (\blacklozenge).

5.1.3.2. Interface entre croissance/ croissance de Listeria monocytogenes NCTC 5348 dans du lait écrémé supplémenté en lactate

Murphy *et al.* (1996, 1997) ont étudié les effets combinés du lactate (0-2% w/v), du pH (5.1, 5.6 et 6.3) et de la température (3, 6, 9 et 15° C) sur les aptitudes de croissance de *L. monocytogenes* NCTC 5348.

Les auteurs ont remarqué que les effets inhibiteurs du lactate étaient plus prononcés à bas pH et à faible température. Notre objectif est de comparer les observations expérimentales des auteurs et les prédictions de notre modèle d'interface. Les paramètres estimés pour la souche Scott A ont été utilisés pour la simulation. L'effet des concentrations d'acide dissocié [A⁻] n'a pas été pris en compte dans la prévision.

Les interfaces croissance/ non croissance théoriques en fonction des concentrations en lactate et de la température à pH 5.1, 5.6, 6.3 sont présentées Figure V.2.

A 15 et à 9°C, les interfaces prédites sont en adéquation avec les observations expérimentales. A 3 et 6°C, les prédictions du modè le CTPM ξ sont « fail safe » puisque pour certaines conditions expérimentales se situant dans la zone prédite de croissance, une absence de croissance est rapportée.



Figure V.2. Interface croissance/ non croissance de *L. monocytogenes* NCTC 5348 en fonction du pH et des concentrations en lactate à différentes températures. L'interface est comparée aux observations expérimentales de Murphy *et al.* (1997) : croissance (•) ou non croissance (o).

5.1.3.3. Prévision du comportement de L. innocua dans du lait en présence d'une flore lactique

Des cocultures de *L. innocua* ATCC 33090 avec *Lc. lactis* SL 05 dans du lait (stérilisé ou pasteurisé) à 20 et 25°C ont été réalisées dans le cadre du projet européen PREMIUM par l'Institut Pasteur de Lille. Les conditions de pré-culture et de dénombrement des micro-organismes sont identiques à celles présentées dans le chapitre 2. La fréquence des mesures de pH pendant les expériences ne permet pas de décrire l'évolution du pH à l'aide de fonctions « spline ». En conséquence, les mesures de pH ont été ajustées au modèle de Weibull (équation [II.14]). Une courbe de titration pH = $f([H^+]_{ajouté})$ réalisée à l'ADRIA a été utilisée pour déduire les concentrations d'acide lactique des cinétiques ajustées de pH. La comparaison entre les courbes simulées et les cinétiques observées est présentée sur la Figure V.3.



Figure V.3. Cinétiques de croissance de *L. innocua*, observées pendant une fermentation lactique (\bullet) et prédites par le modèle CT_RPM ξ . Les mesures de pH (\diamond) ont été ajustées au modèle de Weibull (trait pointillé).

Comme souligné plus haut, le modèle de Weibull est ajusté sur un nombre limité de points. Certains exemples d'ajustement peuvent laisser penser que la vitesse d'acidification est sous estimée par la courbe ajustée. Même dans ces conditions, les résultats montrent une description correcte du comportement de *Listeria* dans du lait en coculture avec une flore lactique. Si une surestimation du taux de contamination maximal est constatée, elle reste inférieure à 1 log₁₀ UFC/ml dans tous les cas de figure.

5.1.3.4. Prévision du comportement de L. monocytogenes Scott A dans du lait cru

La valeur de μ_{opt} au lait cru est déduite d'un taux de croissance de référence obtenu à 25°C à partir d'un inoculum en phase stationnaire (Bajard, 1996b). Les valeurs des paramètres utilisées pour la prévision sont celles estimées pour la souche Scott A (paragraphe 3.1 et 3.2)

Fiche descriptive : *L. monocytogenes* Scott A dans du lait cru $\mu_{opt}=0.75 \text{ h}^{-1}$; calculé d'après une valeur mesurée à 25°C (Bajar d, 1996b)

Le pH du lait cru (6.8) est proche du pH optimal de *L. monocytogenes* Scott A. Dans la gamme de température étudiée (3-20°C), le terme d'interaction ξ est égal à 1. Autrement dit, les modèles CT_RPM et CT_RPM ξ conduisent aux mêmes prédictions de temps de génération.

La comparaison entre les temps de génération observés et prédits est présentée au Tableau 5.1. Des différences entre les prévisions et les observations apparaissent aux faibles températures.

En milieu de culture semi-synthétique, la croissance de *L. monocytogenes* Scott A a été observée à des températures négatives. Cependant, dans du lait cru, Bajard (1996b) n'a pu mettre en évidence de croissance significative pour des températures inférieures à 3°C. Cette différence de comportement peut être attribuée à des interactions entre facteurs environnementaux ou entre facteurs environnementaux et la flore naturelle du lait.

	Temps de génération (h)				
T(℃)	observé	prédit			
		CT _R PM			
3	108.3	38.7			
5	37.9	26.1			
6	51.7	22.0			
7	19.7	18.8			
8	17.5	16.2			
9	15.1	14.2			
10	11.1	11.2			
11	12.8	8.6			
13	7.3	5.5			
14	5.9	4.6			
15	6.9	3.9			
20	2.1	2.1			

Tableau 5.1. Temps de génération de *L. monocytogenes* Scott A observés dans du lait cru (Bajard, 1996b) et prédits par le modèle CT_RPM.



Figure V.4. Comparaison des racines carrées des taux de croissance observés et prédits dans du lait cru.

Un facteur comme la matière grasse n'est pas pris en compte dans notre modèle d'interaction. Il peut pourtant interagir avec la température, permettant l'inhibition de *Listeria*. Il n'est donc pas surprenant d'observer une sous-estimation du temps de génération aux très faibles températures.

5.1.4. Prévision du comportement de L. monocytogenes dans des produits carnés

Grau et Vanderline (1993) ont étudié les paramètres de croissance de *Listeria monocytogenes* Murray B dans une viande maigre. Nous nous sommes intéressés aux paramètres de croissance (temps de génération et temps de latence) publiés pour des températures inférieures à 8°C.

En l'absence d'informations spécifiques sur cette souche, nous avons utilisé les paramètres de croissance de la souche Scott A. Ce choix est basé sur l'analogie du comportement entre ces 2 souches mise en évidence par les travaux de Sandrine Bajard (1996b).

Fiche descriptive : *L. monocytogenes* Murray B

Effet de la température : modèle CT_RM

Paramètres de la souche Scott A (cf. paragraphe 3.1)

Effet du pH et de l'acide lactique : pH cardinaux et CMI d'acide non dissocié :

paramètres de la souche Scott A (cf. paragraphe 3.2 et 3.3)

 μ_{opt} et *lag_{min}* dans la viande de bœuf :

 μ_{opt} =1.64 h⁻¹ ; *lag_{min}*=0.7 h d'après la moyenne de 2 valeurs expérimentales à 30°C et pH 6.1 (Grau et Vanderline, 1993)

Pour la viande de bœuf (muscle), une concentration d'acide lactique de 9 g/ kg soit 100 mM est rapportée dans la littérature (Y. Dacosta, 1997). Cette valeur pour la concentration d'acide lactique a été utilisée pour les simulations.

Le Tableau 5.2 met en évidence une bonne correspondance entre les temps de génération prédits et observés. On peut cependant noter une sous estimation du temps de latence dans la zone d'interaction.

Tableau 5.2. Comparaison des temps de génération et des temps de latence prédits par les modèles CT_RPM et $CT_RPM\xi$ et observés par Grau et Vanderline (1993) pour *L. monocytogenes* Murray B dans de la viande de bœuf maigre.

		Temps de latence (h)			Temps de génération (h)			
pН	T(℃)	observé	prédit		observé	pr	édit	
•			CT _R PM	CT _R PMξ		CT _R PM	CT _R PΜξ	
5.61	0.0	NG	120.4	187.7	NC	70.0	108.3	
5.55	2.5	298.7	62.3	81.8	40.3	35.6	47.2	
5.60	2.4	338.4	60.7	72.2	40.5	35.0	41.6	
5.56	5.1	96.4	35.5	37.5	18.4	20.5	21.5	
5.51	5.5	106.7	34.9	39.0	22.1	20.1	22.5	
6.06	0.0	85.5	91.8	91.8	56.4	53.0	53.0	
6.09	2.4	30.3	45.0	45.0	23.7	26.0	26.0	
6.09	4.8	12.4	26.4	26.7	12.7	15.4	15.4	
6.68	0.0	60.5	79.5	79.5	46.2	45.9	45.9	
6.66	2.4	22.5	39.4	39.4	19.8	22.8	22.8	

(NC): non croissance.

5.1.5. Prévision de la croissance de L. innocua dans du saumon

Les cinétiques présentées dans ce paragraphe sont tirées d'une précédente étude réalisée à l'ADRIA dans le cadre du projet européen FAIR CT 96-1066 (« Novel Combinations of natural antimicrobial systems for the improvement of quality of agro-industrial products »).

Le modèle $CT_RPM\xi$ a été utilisé pour prédire la croissance de *L. innocua* 17765 dans du saumon à différentes températures et concentrations de lactate de sodium (NaL). La croissance a été étudiée au laboratoire en l'absence ou à de très faibles concentrations de NaCl (inférieures ou égales à 1% w/w).

Le saumon ayant servi comme milieu de base à l'expérimentation a été broyé et ionisé à 5 kgray. Pour chaque condition, 600 g de saumon ont été préparés. Les facteurs physiologiques sont modulés par l'addition de NaCl et de lactate de sodium. Le pH a été ajusté avec de l'acide HCl N. Le saumon a ensuite été réparti en sachets de 25 g scellés et mis sous vide. Les cultures de *Listeria* ont été suivies pendant environ 30 jours à différentes températures.

Pour la simulation, nous avons considéré que le lactate de sodium avait les mêmes effets inhibiteurs que l'acide lactique. Par ailleurs, l'acide lactique est

présent dans le muscle du saumon à un niveau d'environ 100 mM (Tienungoon *et al.*, 2000). La concentration d'acide utilisée pour la simulation est la somme de cette concentration initiale et de la concentration de lactate ajoutée. Ces concentrations peuvent atteindre 300 mM et il est dans ce cas préférable d'utiliser le modèle acide complet (équation [III.10]). L'activité de l'eau a été prédite en fonction des concentrations en sel en utilisant une table $a_{w \text{ saumon}} = f$ (%NaCl). Les valeurs de μ_{opt} et de *lag_{min}* ont été déduites d'une courbe de référence à 37°C réalisée à l'ADRIA par Laurence Escaïch dans son étude sur l'effet du système antimicrobien NaL/NaCl sur la croissance de *Listeria*.

Fiche descriptive : *L. innocua* 17765 dans du saumon

Effet de la température : modèle CT_RM ; paramètres estimés pour *L. innocua* ATCC33090 (cf. paragraphe 3.1)

Effet du pH : modèle CPM ; paramètres estimés pour *L .innocua* ATCC 33090 (cf. paragraphe 3.2)

Effet de l'aw (humectant sel) :modèle cardinal (équation [IV.23]) ; paramètres estimés pour *L. innocua* ATCC 33090

Effet de l'acide lactique : modèle complet paramètres estimés pour *L. innocua* DSM 24060 (cf. paragraphe 3.3.4) $MIC_U = 7.5 \text{ mM}, MIC_D = 1500 \text{ mM}$

 μ_{opt} et lag_{min} dans le saumon : d'après une courbe de référence à 37°C $\mu_{opt}=0.94 \text{ h}^{-1}$; lag_{min}=0.9 h, x_{max}=10⁸ UFC/g (laboratoire ADRIA)

Les prévisions des cinétiques de croissance sont conformes aux attentes de l'utilisateur (Figure V.6).

Nous avons vu au chapitre 3 que plus le pH est bas, plus l'effet inhibiteur des acides est important. Comme le pH du saumon est proche de la neutralité (pH 6.2), l'ajout de lactate de sodium dans des gammes inférieures à 1.5% ne permet pas l'inhibition complète de *Listeria* à 4.6°C.

Lorsque le pH du saumon est ajusté à une valeur plus faible par ahout de HCI (pH 5.6), l'effet du lactate est plus marqué. Dans les mêmes conditions de température, une inhibition complète de la croissance de *Listeria* est observée (Figure V.7).



Figure V.6. Prévision des cinétiques de croissance de *L. innocua* 17765 dans du saumon à différentes températures, à différents taux de NaL pour des taux de NaCl inférieurs ou égaux à 1%.



Figure V.7. Prévision des cinétiques de croissance de *L. innocua* 17765 dans du saumon à 4.6°C, à 1.5% NaL et à deux valeurs de pH : 6.20 et 5.60.

5.2. Application à d'autres microorganismes

5.2.1. Modèles de croissance

Afin d'évaluer la capacité prédictive de l'approche d'interaction développée, nous avons utilisé plusieurs jeux de données tirés de la littérature concernant *E. coli* et *Y. enterocolitica*.

L'effet relatif de la température sur μ_{max} n'a pas été modélisé par le module CT_RM mais par le module classique des températures cardinales CTM (équation [I.22]). La contribution de la température aux interactions s'écrit alors :

$$\varphi_T(T) = \left(1 - \sqrt{\rho(T)}\right)^2$$
[V.1]

au lieu de :

$$\varphi_T(T) = \left(1 - \sqrt{\rho_{CT_{RM}}(T)}\right)^2$$
[IV.7]

Sauf cas spécifique, les autres modules correspondent à ceux proposés pour *Listeria* dans le chapitre précédent. Deux modèles ont été utilisés en prédiction :

le modèle CTPM (sans interactions) :

$$\mu_{\max} = \mu_{opt} \rho(T) \gamma(pH) \tau([acide])$$
[V.2]

le modèle CTPMξ (avec terme d' interaction) :

$$\mu_{\max} = \mu_{opt} \rho(T) \gamma(pH) \tau([AH]) \xi(T, pH, [acide])$$
[V.3]

Pour chaque situation étudiée, ont été précisées dans une fiche descriptive les fonctions utilisées pour modéliser l'effet de chaque facteur et les valeurs des paramètres des modèles.

5.2.2. Prévision du comportement de E. coli

5.2.2.1. Modélisation de l'interface croissance/ non croissance d'E. coli M.23

Presser *et al.* (1997,1998) ont établi un modèle de croissance modulaire (de type racine carrée) et un modèle de probabilité de croissance pour une souche non pathogène d'*Escherichia coli* : *E. coli* M23.

La plupart des modèles pH proposés dans la littérature supposent une relation linéaire entre μ_{max} et le pH dans la zone suboptimale. Dans la zone suboptimale de pH, les auteurs ont mis en évidence un comportement spécifique de la souche M 23 : μ_{max} varie linéairement avec la concentration en protons [H⁺] plutôt qu'avec le pH. Les auteurs ont donc proposé un nouveau module pour décrire le comportement de cette souche :

$$\gamma(pH) = 1 - 10^{(pH_{\min} - pH)}$$
 [V.4]

[V.5]

Le modèle de probabilité de croissance proposé par Presser et al. (1998) s'écrit :

$$\ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = a_o + a_1 \ln(T - T_{\min}) + a_2 \ln\left(1 - 10^{(pH_{\min} - pH)}\right) + a_3 \ln(aw - aw_{min}) + a_4 \ln\left(1 - \frac{[AH]}{MIC_U}\right) + a_5 \ln\left(1 - \frac{[A]}{MIC_D}\right)$$

où *p* est la probabilité de croissance (*a_i*) _{i=1...5} sont les coefficients du modèle

 a_{wmin} , T_{min} , pH_{min} , C_U et C_D sont les valeurs estimées du modèle de croissance

Afin d'estimer les paramètres $(a_i)_{i=1,...,5}$, les auteurs ont testé environ 600 conditions expérimentales (avec en moyenne 3 répétitions) dans un milieu de culture semisynthétique. Notre objectif a été de comparer les résultats du modèle d'interaction développé aux observations expérimentales publiées pour *E. coli* M 23 ainsi qu'aux prévisions du modèle de probabilité de croissance.

Les conditions de la simulation sont détaillées dans la fiche descriptive ci dessous. Les températures cardinales d'*E. coli* M23 ont été estimées par Salter *et al.* (1998). Pour décrire l'effet du pH, le module proposé par Presser *et al.* a été préféré au modèle cardinal CPM (équation [I.22]), ceci afin de tenir compte du comportement spécifique mis en évidence pour cette souche.

Fiche descriptive : E. coli M 23

Effet de la température: modèle CTM T_{min} =4.2°C; T_{opt} = 40.3°C; T_{max} =47.6°C (paramètres souche M23, Salter *et al.*, 1998)

Effet du pH: $\gamma(pH) = 1 - 10^{(pH_{\min}-pH)}$ (Presser *et al.*, 1997)

pH_{min}=3.90 (Presser *et al.*, 1997)

Effet de l'acide lactique non dissocié $MIC_{U}=10.7 \text{ mM}$ (Presser *et al.*, 1997)

L'activité de l'eau n'a pas été prise en compte dans les simulations du modèle [V.3] : seules les données expérimentales obtenues en absence de NaCl ont été considérées. Pour ces conditions, l'a_w est très proche de 1 (Presser *et al.*, 1997) et l'on peut considérer que l'a_w est optimale pour la croissance de *E. coli*. Une valeur de 0.995 a été utilisée dans le modèle de probabilité [V.5].

L'interface croissance/ non croissance prédite par le modèle [V.5] a été comparée à la courbe d'isoréponse p=0.1 du modèle de probabilité. Les résultats des comparaisons à 10, 15 et 20°C sont présentées Figur e V.8. Le modèle d'interface permet de décrire de façon précise la frontière séparant la croissance de la non croissance. A 10°C, pour toutes les concentrations d'acide lactique testées, l'interface théorique sépare le pH le plus faible permettant une croissance du pH maximal pour lequel aucune croissance n'a été observée.



Figure V.8. Comparaison de l'interface de croissance observée et prédite par le modèle de probabilité de croissance (p=0.1, trait pointillé) et le modèle [V.3] (trait plein) à différentes températures.• : pH minimal ayant permis une croissance. o : pH maximal n'ayant pas permis une croissance. Contrairement au modèle de probabilité, les données expérimentales n'ont pas servi à l'ajustement du modèle d'interaction [V.3].

Dans quelques cas, il y a discordance entre l'interface prédite et les observations expérimentales. En absence d'acide lactique, des croissances significatives ont été observées à 10, 15 et 20°C à des niveaux de pH où a ucune croissance n'est prédite. Des croissances ont notamment été observées à pH 3.60 alors que le pH_{min} estimé est de 3.90. Il est ainsi possible que la valeur de pH_{min} soit légèrement surestimée. Mis à part ces conditions, les différences entre prédictions et observations sont faibles : l'écart maximal observé entre l'interface théorique et une observation mal prédite est inférieure à 0.2 unité pH.

Bien que les deux modèles soient de nature très différente, l'interface prédite (modèle CTPM ξ) est très proche des courbes d'isoréponse *p*=0.1 du modèle de probabilité (niveau de probabilité pour lequel Presser *et al.*, 1998 considèrent la croissance comme fortement improbable). A 15°C, les deux courbes sont même quasiment confondues.

Notons que pour estimer les cinq nouveaux paramètres $(a_i)_{i=1,...,5}$ sans signification biologique du modèle de probabilité, environ 600 expériences ont été nécessaires. Le modèle d'interface développé dans ce travail présente l'avantage de donner à l'utilisateur une estimation précise de la frontière séparant la croissance de la non croissance à partir d'une expérimentation minimale. Dans le cas d'*E. coli* M 23, les estimations tirées de la littérature de 5 paramètres caractéristiques (T_{min} , T_{opt} , T_{max} , pH_{min} et MIC_U) se sont révélées suffisantes pour décrire l'interface.

5.2.2.2. Prévision de la croissance de E. coli 0157:H7 en fonction de la température et du pH dans un milieu de culture

Les effets de la température et du pH sur les paramètres de croissance de *E. coli* 0157:H7 ont été étudiés sur deux jeux de données publiés par Buchanan *et al.* (1992) et Rajkowski et Marmer (1995). Pour l'effet de la température, les paramètres de la souche M23 ont été utilisés. En effet, Salter *et al.* (1998) ont montré que les températures cardinales de *E. coli* M 23 pouvaient être utilisées avec succès pour décrire l'effet de la température sur d'autres souches de *E. coli*, en particulier *E. coli* 0157:H7.

En ce qui concerne l'effet du pH, il convient de déterminer le modèle le plus approprié à décrire l'effet du pH sur *E. coli* 0157:H7 : le modèle cardinal CPM ou la fonction proposée par Presser *et al.* (1997) pour *E. coli* M 23 basée sur l'hypothèse d'une relation linéaire entre $[H^+]$ et μ_{max} .

A ce stade, nous avons donc deux modèles candidats :

- a. le modèle intégrant le module CPM proposé par Rosso et al. (1995)
- *b* le modèle intégrant le module pH développé par Presser *et al.* (1997)

Pour les deux modèles, les valeurs de μ_{opt} dans du BHI ont été calculées d'après une valeur de référence à 28°C publiée par Rajkowski et Marmer (1995).

Les taux de croissance à 12, 19, 28 et 37°C prédits par les modèles *a* et *b* ont été comparés aux données publiées par Buchanan *et al.* (1992). Alors qu'à 12, 19 et 37°C, on note une baisse du taux de croissance à pH 4.5, cette évolution observée n'est pas décrite par le modèle *b* (Figure V.9). Par contre à 28°C et pH 4.5, le modè le *b* permet une meilleure prédiction du taux de croissance observé par Buchanan *et al.* que le modèle *a*. Cette dernière condition pourrait être un point aberrant puisque le taux de croissance observé à 37°C pour le même pH (Rosso, 1995b).

La comparaison des racines carrées des taux de croissance observés et prédits met en évidence une meilleure capacité prédictive du modèle *a*. C'est donc ce modèle qui a été utilisé dans la suite.



Figure V.9. Evolution du taux de croissance de *E. coli* 0157:H7 en fonction du pH à différentes températures tels que prédits par les modèles *a* et *b*. Comparaison avec les taux de croissance observés par Buchanan *et al.* (1992) à 37° (\blacksquare), 28° (o), 19° (+), 12° (\blacklozenge).



Figure V.10 .Comparaison des racines carrées des taux de croissance observés par Buchanan *et al.* (1992) et prédits par les modèles $a(\bullet)$ et $b(\Box)$.

Les temps de génération de *E. coli* 0157:H7 prédits en fonction de la température et du pH ont été ont été comparés aux résultats expérimentaux de Rajkowski et Marmer (1995).



Les temps de génération observés et calculés en utilisant le modèle CTPM et CTPM ξ sont présentés au Tableau 5.3. Comme dans le cas de *Listeria*, le modèle CTPM sous-estime le temps de génération dans les conditions limites pour la croissance. Le modèle CTPM ξ permet des estimations correctes du temps de génération.
Température	рН	Temps de génération	Temps de généra	ation prédit (h)
(3°)		observé (h) CTPM		СТРМξ
8	5	172.7	36.5	282
10	5	26.9	15.7	28.1
12	5	8.4	8.7	10.6
19	5	1.8	2.5	2.5
8	6	23.1	22.0	22.0
10	6	11.7	9.5	9.5
12	6	3.3	5.3	5.3
19	6	1.1	1.5	1.5
4	7	NC	NC	NC
8	7	19.4	19.5	19.5

Tableau 5.3. Comparaison des temps de génération d'*E. coli* 0157:H7 observés (Rajkowski et Marmer, 1995) et calculés suivant les modèle CTPM et CTPMξ.

(NC): non croissance.

5.2.2.3. Prévision du comportement de E. coli dans du yoghourt doux

Dans la littérature, peu de données sont disponibles en ce qui concerne l'effet de l'acide lactique sur *E. coli*, dans des produits alimentaires et en limite de croissance. Dans sa thèse, L. Rosso (1995b) présente cependant des cinétiques de *E. coli* pendant la fabrication d'un yoghourt doux.

La fermentation se fait tout d'abord à 37°C. Après passage en chambre à 10°C, une inhibition complète de *E. coli* est observée.

Rosso (1995b) a montré que le modèle CTPM permet de décrire de façon satisfaisante les cinétiques en posant pH_{min} (en présence d'acide lactique) égal à 4.5. Cependant, pendant la phase à 10°C, une légère croissance est prédite par le modèle CTPM. En fait, on assiste plutôt à une destruction de la population de *E. coli*.

Le modèle CTPM ξ a été utilisé pour prévoir le comportement d'*E. coli* pendant la fermentation. Il s'est agi pour nous de tester notre modèle acide (équation [II.12]) basée sur une approche différente de celle de L. Rosso (cf. paragraphes 1.3.5 et 3.3.6). Il s'est également agi de tester la capacité du terme d'interaction à décrire l'absence totale de croissance constatée après le passage en chambre à 10°C.

Les cinétiques ont été simulées en utilisant les profils de température et de pH publiés par L. Rosso. Les concentrations d'acide ont été déduites des cinétiques de pH en utilisant la courbe de titration pH = $f([H^+]_{ajoutée})$ dans du lait. La valeur de μ_{opt} est déduite d'un taux de croissance dans du lait pour *E. coli* publié par Buchanan (1991). Sur la base des observations de L. Rosso (1995b), le temps de latence minimum, lag_{min} a été fixé à zéro (la pré-incubation s'étant faite dans des conditions de température et de pH très proches des conditions prévalant au début d'incubation).

Fiche descriptive : <i>E. coli</i> dans du yoghourt doux	
Effet de la température: modèle CPM ; effet du pH modèle CPM	
<i>MIC_U</i> =10.7 mM (Presser <i>et al.</i> , 1997)	
μ_{opt} dans du lait:	
μ_{opt} =1.7 h ⁻¹ d'après une valeur de référence dans du lait à 22°C (Buchanar	າ, 1991)
<i>lag_{min}</i> = 0 h (d'après Rosso, 1995b)	

Les résultats montrent une bonne adéquation entre les simulations et les cinétiques observées (Figure V.11). En particulier, les prévisions décrivent bien l'absence de croissance d'*E. coli* après le passage à chambre à 10°C. Seule la destruction observée dans un cas n'est pas décrite par le modèle.



Figure V.11. Prévision de la croissance de *E. coli* dans un yoghourt doux en cours de fermentation soumis à des variations de température (--) et de pH (-.-). Comparaison entre la simulation du modèle (-) et les dénombrements observés (\bullet).

5.2.3. Prévision de l'interface croissance/ non croissance de Yersinia enterocolitica

Les valeurs cardinales utilisées pour Yersinia enterocolitica sont tirées de la littérature (cf. fiche descriptive ci dessous).

Fiche descriptive : Yersinia enterocolitica

Effet de la température : modèle CTM T_{min} = -4°C ; T_{opt} = 34°C ; T_{max} = 40.5°C (Rosso, 1995b) Effet du pH : modèle CPM pH_{min} = 4.0 (Adams *et al.*, 1991); pH_{opt} = 7.6 ; pH_{max} = 10.5 (Rosso, 1995b)

Les prédictions du modèle d'interaction ont été comparées aux observations de Brocklehurst et Lund (1990). Les pH minimaux prédits et observés à 4 températures (4, 7, 10 et 20°C) pour 3 souches sont répertoriés au Tableau 5.4. Les prédictions sont très proches des observations pour les souches BL 87/46 et YE 328. La différence entre le pH minimal prédit et le pH maximal pour lequel une croissance est observable est inférieur à 0.2 unité pH. Les différences sont plus marquées pour la souche BL 87/44. Cette souche semble avoir des aptitudes de croissance légèrement différentes: elle n'est pas capable de se développer pour des pH inférieurs à 4.28.

Tableau 5.4. Comparaison entre les prévisions des pH minimaux de croissance de Y. *enterocolitica* en fonction de la température et les observations expérimentales de Brocklehurst et Lund (1990, + : pH maximal pour lequel une croissance n'a été observée en 21 jours ; - pH minimal pour lequel aucune croissance n'a été constatée en 21 jours).

		Souche (séroty	BL 87/46 pe O:9)	Souche (sérotype	YE 328 O: 5, 27)	Souch 87/	ne BL 44
						(sérotyp	oe O:3)
Température (℃)	pH minimal prédit	+	-	+	-	+	-
20	4.08	4.20	4.09	4.18	3.95	4.36	4.28
10	4.34	4.36	4.28	4.26	4.18	4.50	4.36
7	4.51	4.73	4.50	4.36	4.26	4.83	4.73
4	4.70	4.62	4.50	4.62	4.48	4.80	4.65

5.3. Conclusion

Sur un certain nombre d'exemples précis, nous avons pu montrer que le modèle proposé permet de simuler de façon satisfaisante des cinétiques de croissance et des interfaces croissance/ non croissance de *Listeria* dans les produits alimentaires. Le modèle développé pour *Listeria monocytogenes* semble adapté pour décrire le comportement en limite de croissance d'autres micro-organismes pathogènes.

L'approche proposée apparaît relativement souple: elle s'adapte facilement à certaines anomalies apparaissant dans le comportement de certaines souches bactériennes (effet du pH sur *E. coli* M 23, effet de la température sur *Listeria*). Il suffit alors de modifier les fonctions décrivant l'effet relatif de la température ou du pH ; la structure générale du modèle restant elle inchangée. Dans un certain nombre de situations, l'approche a pu être utilisée grâce à une connaissance minimale des microorganismes. En particulier, les prévisions concernant *E. coli* sont obtenues uniquement à partir de résultats publiés de la littérature.

Le modèle proposé permet de décrire l'effet des interactions entre le pH, la température et les concentrations d'acide organique. Il ne prend pas en compte tous les facteurs (effet structure, matière grasse, conservateurs,...).Tous ces facteurs ne sont pris en compte dans le modèle que globalement, par l'intermédiaire du paramètre μ_{opt} . Une éventuelle contribution de ces facteurs aux interactions n'est donc pas prise en compte. La principale conséquence est une possible surestimation de la croissance bactérienne dans les zones limites. On a cependant pu montrer que le modèle permet de rapprocher de façon significative les prévisions de la réalité expérimentale.

Conclusion

A l'ère monofactorielle des débuts de la microbiologie prévisionnelle (prise en compte de la seule température), a succédé dans les années 1990 une ère multifactorielle scindant les chercheurs en deux écoles : les tenants de l'approche classique polynomiale et ceux de l'approche modulaire. Les modèles modulaires semblent s'imposer en raison de leur robustesse nettement plus satisfaisante, de leur parcimonie et de la suppression progressive de tous les paramètres dépourvus de sens biologique dont les fameux modèles cardinaux constituent l'aboutissement. Les modèles polynomiaux ne doivent leur survie qu'à leur principal atout mais qui est de taille : contrairement aux modèles modulaires classiques, ils prennent en compte les interactions entre facteurs.

Dans cette étude, nous avons développé un modèle de croissance décrivant les effets de la température, du pH, de la concentration en acide organique et de leurs interactions sur les aptitudes de croissance de *Listeria*. Une méthode classiquement utilisée en microbiologie prévisionnelle consiste à dissocier la prévision de la croissance des microorganismes (modèle cinétique) et la description de la frontière entre croissance et non croissance. Ce travail, comme ceux d'Augustin *et al.* (2000), permet de relier l'approche cinétique à la modélisation de l'interface croissance/ non croissance.

L'hypothèse d'une absence d'interaction entre les facteurs (hypothèse sur laquelle sont basés les modèles modulaires) est apparue valide dans la majeure partie du domaine permettant la croissance des microorganismes. Cependant, en bordure de l'interface croissance/ non croissance, une zone qui d'un point de vue cinétique reste souvent peu explorée par les chercheurs, les modèles modulaires « classiques » se sont révélés inaptes à décrire la croissance des micro-organismes.

Un terme correctif a par conséquent été proposé pour corriger le biais entre observations et prédictions dans la zone d'interaction et pour modéliser l'interface croissance/ non croissance. Le modèle d'interaction développé a été préféré au modèle CTPMI qui, confronté aux résultats obtenus au laboratoire, tend à surestimer les effets des interactions (y compris pour des conditions où les modèles modulaires sans interaction sont suffisants pour décrire les aptitudes de croissance de *Listeria*).

Un des atouts du modèle développé réside dans le fait qu'il n'est défini que par des paramètres ayant une signification biologique simple (valeurs cardinales, concentrations minimales inhibitrices). Par rapport aux modèles cardinaux sans interaction, son utilisation ne nécessite pas d'expérimentation supplémentaire.

Les paramètres du modèle estimés dans cette étude permettent dès à présent de décrire le comportement de certaines souches de *Listeria* dans des produits alimentaires. Les données nécessaires à l'acquisition des paramètres pouvant être acquis de façon automatisée (par exemple par turbidimétrie), les éventuels comportements spécifiques de certaines souches de *Listeria* et leur effet sur le paramétrage pourraient donc être pris en compte rapidement en minimisant les coûts expérimentaux. Il est également tout à fait envisageable d'étendre le modèle à d'autres microorganismes en estimant les paramètres du modèle d'une façon similaire.

Un autre atout du modèle est son caractère évolutif. Les résultats obtenus concernant l'a_w laissent penser que le modèle d'interaction proposé peut être étendu pour décrire les effets d'autres facteurs que la température, le pH et les concentrations d'acide. En particulier, certains facteurs présentant un intérêt pour l'industrie agroalimentaire comme les concentrations de conservateurs naturels, la pression partielle en dioxyde de carbone ou les concentrations de fumée devront être intégrés au modèle.

Le modèle développé peut constituer un outil permettant d'aider à l'expertise par l'optimisation de l'expérimentation. Les situations limites de croissance sont souvent celles rencontrées dans l'industrie agroalimentaire. La prise en compte des interactions permet de quantifier l'effet de variations d'un ou de plusieurs facteurs dans ces zones limites. Le modèle peut également permettre d'étayer une argumentation par rapport au choix d'une DLC par exemple.

Certains facteurs (pH, concentrations d'inhibiteurs,...) peuvent varier suivant les lots ou même dans un même produit. Une perspective importante d'amélioration des prévisions concerne l'effet structure. De nombreux auteurs ont remarqué le caractère abrupt de l'interface séparant, dans un milieu liquide homogène, les conditions autorisant la croissance des conditions de non croissance. Dans des milieux non homogènes, les microorganismes peuvent trouver localement des conditions favorables pour leur croissance alors que les conditions moyennes du produit ne permettent pas leur développement. Dans le cadre d'une analyse des dangers, II serait nécessaire de prendre en compte les gradients de température, de pH, la distribution de molécules inhibitrices (NaCl, acide organique) dans les produits.

Références bibliographiques

Adams, M.R., Little, C.L., Easter, M.C. 1991. Modelling the effect of pH, acidulant and temperature on the growth rate of *Yersinia enterocolitica*. J. Appl. Bacteriol., 71, 65-71.

Arino, S., Andolfo, S., Rosso L. 1998. Détermination ds températures cardinales de souches de levure par une méthode de gradient thermique dynamique. Poster, 5^{ème} congrès de la Société Française de Microbiologie. Lille, Avril 1998.

Augustin, J.C., Carlier V. 2000. Modelling the growth rate of *Listeria monocytogenes* with a multiplicative type model including interactions environmental between environmental factors. Int. J. Food Microbiol. 56, 53-70.

Augustin, J.C. 1999. Modélisation de la dynamique de croissance des populations de *Listeria monocytogenes* dans les aliments. Thèse de l'Université Claude Bernard de Lyon.

Bajard, S., Rosso, L., Fardel, G., Fandrois, J.P. 1996a. The particular behaviour of *Listeria monocytogenes* under sub-optimal conditions. Int. J. Food Microbiol. 29, 201-211.

Bajard, S. 1996b. Modélisation à visée prévisionnelle de la cinétique de croissance d'une population de *Listeria monocytogenes*. Thèse de doctorat (Université Claude Bernard-Lyon I).

Baranyi, J., Roberts, T.A., McClure, P.J. 1993a. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. Food Microbiol., 10, 43-59.

Baranyi, J., Roberts, T.A., McClure, P.J. 1993b. Some properties of a nonautonomous deterministic growth model describing the adjustment of the bacterial population to a new environment. I.M.A. J. Math. Appl. Med. Biol., 10, 293-299. Baranyi, J., Roberts, T.A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. Int. J. Food Microbiol., 23, 277-294.

Baranyi, J., Ross, T., McMeekin, T.A., Roberts., T.A. 1996. Effects of parametrization on the performance of empirical models used in 'predictive microbiology'. Food Microbiol. 13, 83-91.

Baranyi, J., Pin, C., Ross, T. 1999. Validating and comparing predictive models. Int. J. Food Microbiol. 48, 159-166.

Bates, D.M., Watts, D.G. 1988. Non linear regression analysis and its applications. Wiley, New York.

Beale, E.M.L. 1960. Confidence regions in non-linear estimations. J. Royal Stat. Soc., B22, 41-88.

Bernaerts, K., Versyck, K.J, Van Impe, J.F. 2000. On the design of optimal dynamic experiments for parameteer esimation of a Ratkowsky-type growth kinetics at suboptimal temperature. Int. J. Food Microbiol, 54, 27-38.

Breidt, F., Fleming, H.P. 1998. Modeling of the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and Lactococcus lactis in vegetable broth. Appl. Envinron. Microbiol., 64, 9, 3159-3165.

Brocklehurst, T.F., Lund, B.M., 1990. The influence of pH, temperature, and organic acids on the initiation of growth of *Yersinia enterocolitica*. J. Appl. Bacterol., 69, 390-397.

Buchanan, R.E. 1918. Lifes phases in a bacterial culture. Journal of Infectious Diseases, 23, 109-125.

Buchanan, R.L. 1991. Using spreadsheet software for predictive microbiology applications. J. Food Safety., 11, 123-124.

Buchanan, R.L., Klawitter, L.A. 1992. The effect of incubation temperature, initial pH, and sodium chloride on the growth kinetics of *Escherichia coli* 0157:H7. Food Microbiol., 9, 185-196.

Buchanan, R.L., Whiting, R.C., Damert, W.C. 1996. When is simple good enough. Comparison of the Baranyi, the Gompertz and three linear models for fitting bacterial growth curves. International Conference on Predictive Microbiology, Hobart.

Cheroutre-Vialette, M., Lebert, I., Hebraud, M., Labadie, J.C., Lebert, A. 1998. Effects of pH or a_w on the growth of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol., 42, 71-77.

Chorin, E. 1999. Etudes des bactéries lactiques inhibant la croissance de germes pathogènes en alimentation porcine, modélisations des interactions. Thèse de l'Université de Bretagne Occidentale.

Cole, M.B., Jones, M.V., Holyoak, C. 1990, The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. J. Appl. Bacteriol., 69, 63-72.

Cooper, K.E. 1963. The theory of antibiotic inhibition zones. *In* Analytical Microbiology. Academic Press, New York.

Dacosta, Y. 1997. L'acide lactique et les lactates. Editions ADRIA.

Delignette-Muller, M.L., Rosso, L., Flandrois, J.P. 1995. Accuracy of microbial growth predictionswith square roots and polynomial models. 1995. Int. J. Food Microbiol., 27, 139-146

Delignette-Muller, M.L. 1998a. La microbiologie prévisionnelle et ses méthodes. Revue Méd. Vét., 149, 2, 103-108.

Delignette-Muller, M.L. 1998b. Relation between the generation time and the lag time of the bacterial growth kinetics. Int. J. Food Microbiol., 43, 97-104.

Eklund, T. 1984, The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in the bacterial membrane vesicles. Int. J. Food Microbiol., 1, 179-185.

Eklund, T. 1989, Organic acids and esters. In : Mechanisms of action of food preservation procedures. G.W. Gould (Ed.), Elsevier Science Publishers Ltd., London.

Farber, J.M., Sanders, G.W., Dunfield, S., Prescott, R. 1989. The effect of various acidulants on the growth rate of *Listeria monocytogenes*. Lett. Appl Microbiol. 9, 181-183.

Geeraerd, A.H., Herremans, C.H, M.L., Cenes C., Van Impe J.F. 1998. Application of artificial neural networks as a non-linear technique to describe bacterial growth in chilled food products. Int. J. Food Microbiol. 44, 49-68.

George, S.M., Lund, B.M., Brocklehurst, T.F. 1988. The effect of pH and temperature on initiation of the growth of *Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol. 6, 153-156.

Grau, F.H., Vanderline, P.B. 1993. Aerobic growth of *Listeria monocytogenes* on beef lean and faty tissue : equations describing the effects of temperature and pH. J. Food Prot. 56, 96-101.

Houtsma, P.C., Kusters, B.J.M., De Wit, J.C., Rombouts, F.M., Zwietering, M.H. 1994. Modelling growth rates of *Listeria innocua* as a function of lactate concentration. Int. J. Food Microbiol., 24, 113-123.

Houtsma, P.C., Kant-Muermans, M.L., Rombouts, F.M., Zwietering, M.H. 1996. Model for the combined effects of temperature, pH and sodium lactate on growth rates of *Listeria innocua* in broth and bologna-type sausages. Appl. Environ. Microbiol., 62, 5, 1616-1622.

Hudson, D.J. 1966. Fitting segmented curves whose join points have to be estimated. American Statistical Association Journal. 61 : 1097-1129.

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

Lebreton, Millier. 1982. In Modèles dynamiques déterministes en biologie. Masson, Paris.

Murphy. P.M., Rea, M.C., Marchand E. 1997. Predicting bacterial growth in processed milk and dairy products, La microbiologie prévisionnelle appliquée à la

conservation des aliments réfrigérés. Compte rendu de la conférence n°1997/2 de la commission C2, 16-18 juin, Quimper, France.

Murphy. P.M., Rea, M.C., Harrington D. 1996. Development of a predictive model for growth of *Listeria monocytogenes* in a skim milk medium and validation studies in a range of dairy products, J. Appl. Bacteriol., 80, 557, 564.

Petran, R.L., Zolotta, E.A. 1989. A study of the factors affecting growth and recovery of *Listeria monocytogenes* Scott A.. J. Food Sci., 54, 458-460.

Presser, K.A., Ratkowsky, D.A., Ross, T. 1997. Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. Appl. Environ. Microbiol., 63, 6, 2355-2360.

Presser, K.A., Ross, T., Ratkowsky D.A. 1998. Modelling the growth limits (growth/ no growth interface) of *Escherichia coli* as a function of temperature, pH, lactic acid concentration, and water activity. Appl. Environ. Microbiol., 63, 6, 1773-1779.

Rajkowski, K.T., Marmer, B.S. 1995. *E. coli* 0157:H7 at fluctuating temperatures. J. Food Prot. 58, 13707-1314.

Ratkowsky, D.A., Olley, J., McMeekin, T.A., Ball, A. 1982. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. J. Bacteriol., 149, 1-5.

Ratkowsky, D.A., Lowry, R.K., McMeekin, T.A., Stokes, A.N., Chandler, R.E. 1983. Model for the bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. J. Bacteriol., 154, 1222-1226.

Ratkowsky, D.A., Ross, T. 1995. Modelling the bacterial growth-no growth interface. Lett. Appl. Microbiol., 20, 29-33.

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, R.A., Stokes, R.H. 1965. Electrolyte Solutions: The measurement and Interpretation of Conductance, Chemical Potential and Diffusions in solutions of Simple Electrolytes, 2nd Edition. London, England: Butterworths Publication Limited.

Ross, K.D. 1996. Indices of performances evaluation of predictive models in food microbiology. J. Appl. Bacteriol. 81, 501-508.

Rosso, L., Lobry, J.R., Flandrois, J.P. 1993. An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model. J. Theor. Biol., 162, 447-463.

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. Envinron. Microbiol., 61, 2, 610-616.

Rosso, L. 1995b. Modélisation et microbiologie prévisionnelle : Elaboration d'un nouvel outil pour l'agro-alimentaire. Thèse. Université Claude Bernard, Lyon I.

Rosso, L., Zuber, E., Pichat, C., Flandrois, J.P. 1997. Simple relationship between acid dissociation constant and minimal pH for microbial growth in laboratory medium. Int. J. Food Microbiol., 35, 75-81.

Rosso, L., Bajard, S., Flandrois, J.P. Lahellec, C., Fournaud, J., Veit, P. 1996. Differential growth of *Listeria monocytogenes* at 4 and 8℃: consequences for the shelf life of chilled products. J. Food Prot. 59, 944-949.

Rosso, L. 1998. Predictive microbiology: Validation of the models in the industrial context. COST 914 workshop. Validation of predictive models in wide range of european foods, 10-11 décembre Cordoba Espagne.

Salter, M.A., Ross, T., McMeekin T.A. 1998. Applicability of a model for non pathogenic *Escherichia coli* for predicting the growth of pathogenic *Escherichia coli*. J. Appl. Microbiol., 85, 357-364.

te Giffel, M.C., Zwietering., M.H. 1999. Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol., 46, 135-149.

Tienungoon, S., Ratkowsky, D.A, McMeekin, T.A., Ross, T. 2000. Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl and lactic acid. Appl. Environ. Microbiol., 66, 11, 4979-4987.

Van impe, J.F., Nicolaï, B.M., Schellekens, M., Martens, t., De Baerdemaeker, J. 1995. Predictive microbiology in a dynamic environment: a system theory approach. Int. J. Food Microbiol., 25, 227-249.

Walker, S.J., Archer, P., Banks, J.G. 1990. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. J. Appl. Bacteriol., 68, 157-162.

Wijtzes, T., McClure, P.J., Zwietering, M.H., Roberts, T.A. 1993. Modelling bacterial growth of *Listeria monocytogenes* as a function of water activity, pH and temperature. Int. J. Food Microbiol., 18, 139-149.

Wilson P., Wilson D., Waspe C., Hibberd D., Brocklehurst T. 2000. Application of buffering theory to food microbiology. 3rd Internationnal Conference on Predictive Modelling in Foods, 12-15 Septembre, Louvain, Belgique.

Young, K. M., Foegeding, P.M. 1993. Acetic, lactic, and citric acids and pH inhibition of *Listeria monocytogenes* Scott A and the effect of intracellular pH. J. Appl. Bacteriol. 74, 515-520.

Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Van't Riet, K. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. Appl. Environ. Microbiol., 56, 6, 1875-1881.

Zwietering, M.H., Wijtzes, T. de Wit, J.C., Van't Riet, K.1992. A decision support system for prediction of microbial spoilage in foods. J. Food Prot. 55, 973-979.

Articles et communications

Publications

Le Marc, Y., Huchet. V., Bourgeois, C.M., Guyonnet J.P., Mafart, P., Thuault, D. Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration (soumis à publication).

Chorin, E., Le Marc, Y., Tracol, C., Dominique Thuault, D., Bourgeois, C.M. Dynamic modelling of the interactions between *Lc. lactis* and *E. coli* K88 during the fermentation of a cereal feedstuff for pigs (soumis à publication)

Poster

Le Marc, Y., Lochardet A., Thuault D. 1998. Développement d'un modèle non linéaire de croissance de *Listeria* dans le saumon. Poster, 5^{ème} Congrès de la Société Française de Microbiologie. Lille, Avril 1998.

Communication

Le Marc, Y., Huchet. V., Bourgeois, C., Guyonnet J., Mafart, P., Thuault, D. 2000. Combined effects of temperature, pH and organic acids on the growth rate of *L.innocua*. 3rd Internationnal Conference on Predictive Modelling in Foods, 12-15 Septembre, Louvain, Belgique.

RESUME

Listeria monocytogenes a été reconnue comme une bactérie pathogène responsable de cas sporadiques d'infections alimentaires. La modélisation et la simulation de la croissance des micro-organismes est un point clé de l'analyse de risques en microbiologie alimentaire. Le but de notre travail a été d'améliorer la prévision des modèles de croissance dans les zones limites pour la croissance de *Listeria*.

Les effets combinés de la température, du pH et des acides organiques (acides lactique, acétique ou propionique) sur les paramètres de croissance de plusieurs souches de *Listeria* ont été étudiés. Un modèle de croissance modulaire, basé sur une hypothèse d'absence d'interaction entre les facteurs environnementaux a d'abord été développé.

Le modèle a été étendu par l'inclusion d'un nouveau module décrivant l'effet des interactions entre les facteurs en limite de croissance. Le modèle d'interaction a été testé dans des milieux semi-synthétiques et en matrice alimentaire en conditions constantes ou variables (température, pH, concentration d'acide organique). L'approche proposée permet une bonne description de la frontière séparant la croissance de la non croissance.

Mots clés : *Listeria*, *E. coli*, microbiologie prévisionnelle, interface croissance/ non croissance, acides organiques

ABSTRACT

Listeria monocytogenes has been recognised as a foodborne pathogen responsible for episodic cases of food infections. Modelling and simulation of the bacterial growth is a key point in risk analysis in food microbiology. The aim of this study was to improve the ability of growth models to describe the behaviour of *Listeria* at the growth limits.

The combined effects of temperature, pH and organic acids (lactic, acetic and propionic acids) on the growth kinetics of some *Listeria* strains were studied. First, a multiplicative model was built assuming independent effects of all environmental factors.

Then, the model was expanded by the inclusion of a novel term describing the effects of interactions at the growth limits. The interaction model was tested in growth media or in food products under constant and variable conditions (temperature, pH, concentration of organic acid). The proposed approach allows an accurate description of the boundary between growth and no growth of *Listeria*.

Key words : Listeria, E. coli, predictive modelling, growth/ no growth interface, organic acids