

# TRAVAUX DE RECHERCHE

## MEMOIRE

Présenté devant l'Université Paris XII Val de Marne

Par

**Marie Cornu**

Chargée de recherches à l'Agence Française  
de Sécurité Sanitaire des Aliments

Pour l'obtention de l'

**HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES**

## **Modélisation d'incertitudes et de variabilités en microbiologie quantitative alimentaire**

soutenue publiquement le 16 novembre 2006 à Maisons Alfort

devant le jury composé de :

Marie Laure DELIGNETTE MULLER  
Jean-Christophe AUGUSTIN (rapporteur)  
Stéphane BRETAGNE  
Jean-Baptiste DENIS  
Eric PARENT (rapporteur)  
Jacques POURQUIE (rapporteur)  
Laurent ROSSO

Maître de conférences  
Maître de conférences  
Professeur  
Directeur de recherches  
Directeur de recherches  
Professeur  
Directeur du LERQAP



## Préambule

---

Depuis 1997, la modélisation du comportement microbien est au cœur de mes travaux de recherches. Ainsi, mon stage de dernière année à l'INA PG m'avait conduit à modéliser des cultures à haute densité cellulaire d'*Escherichia coli* en utilisant des réseaux de neurones. Mon stage de DEA et ma thèse m'ont ensuite permis d'approfondir la modélisation des dynamiques bactériennes, en me consacrant particulièrement au cas des cultures mixtes (mélange de deux populations bactériennes).

Depuis 2000, date de ma soutenance de thèse et de mon intégration à l'Afssa (Agence française de sécurité sanitaire des aliments), j'ai poursuivi ces travaux en les appliquant aux missions de l'agence de recherche, expertise et appui scientifique et technique, dans le domaine de l'évaluation des risques microbiens alimentaires.

Les cinq premières parties de ce document sont consacrées à un mémoire intitulé "modélisation d'incertitudes et de variabilités en microbiologie quantitative alimentaire", qui présente mes activités de recherche au cours de ces six dernières années au travers de ces deux concepts d'incertitude et de variabilité.

La bibliographie, en sixième partie, est constituée d'une liste de mes travaux (numérotés de 1 à 74, et référencés par leur numéro dans le mémoire), puis d'une liste de références bibliographiques autres (citées dans le mémoire comme (auteur, année)).

Le bilan ainsi établi est complété par une présentation de l'ensemble de mes activités sous la forme d'un curriculum détaillé dans la septième partie.

Enfin, la huitième partie rassemble une sélection de 12 publications se rapportant à mes activités de recherche.

# Table des matières

---

Préambule.....	3
Table des matières.....	4
<b>1. Contexte des travaux.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 La microbiologie quantitative alimentaire.....</b>	<b>7</b>
1.1.1 La microbiologie alimentaire.....	7
1.1.2 La microbiologie quantitative.....	7
<b>1.2 Incertitude, variabilité et concepts associés.....</b>	<b>7</b>
1.2.1 Variabilité.....	8
1.2.2 Incertitude.....	8
1.2.3 Probabilité et statistiques.....	9
<b>1.3 Modélisation d'incertitudes et de variabilités.....</b>	<b>9</b>
1.3.1 Modélisation de variabilités.....	9
1.3.2 Modélisation d'incertitudes.....	10
<b>2. Incertitudes et variabilités en microbiologie prévisionnelle.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Incertitude d'estimation des paramètres d'une courbe de croissance.....</b>	<b>13</b>
2.1.1 Cinétiques de croissance.....	13
2.1.2 Modèles primaires.....	14
2.1.3 Ajustement d'un modèle primaire à une cinétique de croissance et incertitude d'estimation.....	15
<b>2.2 Variabilité de <math>\mu_{max}</math>, taux de croissance maximal.....</b>	<b>16</b>
2.2.1 Variabilité des aptitudes de croissance au sein d'une espèce microbienne....	16
2.2.2 Modélisation de la croissance au cours de profils temps-température.....	16
2.2.3 Modélisation secondaire des effets de l'aliment (physico-chimie).....	18
<b>2.3 Variabilité des temps de latence (<i>lag</i>).....</b>	<b>19</b>
2.3.1 Temps de latence populationnels.....	19
2.3.2 Temps de latence cellulaires.....	19
<b>2.4 Variabilité de <math>N_{max}</math> et modélisation des interactions microbiennes.....</b>	<b>20</b>
2.4.1 $N_{max}$ et effet inoculum.....	20
2.4.2 Interactions microbiennes et effet Jameson.....	21
2.4.3 Modélisation de l'effet Jameson et effet sur la variabilité du $N_{max}$ .....	21
<b>2.5 Modélisation globale des incertitudes et variabilités de la croissance.....</b>	<b>23</b>
2.5.1 Applications à <i>L. monocytogenes</i> dans le lait cru.....	23
2.5.2 Applications à <i>L. monocytogenes</i> dans le saumon fumé.....	24
<b>2.6 Autres applications.....</b>	<b>25</b>
2.6.1 Modélisation d'opérations d'hygiène (nettoyage-désinfection).....	25
2.6.2 Modélisation de l'inactivation thermique.....	26
<b>3. Incertitudes et variabilités en microbiologie analytique.....</b>	<b>27</b>

<b>3.1</b>	<b>Méthodes de détection .....</b>	<b>27</b>
3.1.1	Principe et historique des méthodes de détection par enrichissement sélectif .....	27
3.1.2	Modélisation du processus d'enrichissement de <i>L. monocytogenes</i> .....	27
3.1.3	Incertitude d'échantillonnage .....	28
<b>3.2</b>	<b>Méthodes de dénombrement .....</b>	<b>29</b>
3.2.1	Principe des méthodes de dénombrement sur boîtes de Petri .....	29
3.2.2	Optimisation de méthode .....	30
3.2.3	Incertitude analytique .....	30
<b>4.</b>	<b>Incertitudes et variabilités en AQRM .....</b>	<b>31</b>
<b>4.1</b>	<b>Analyse des risques microbiens .....</b>	<b>31</b>
4.1.1	Définitions .....	31
4.1.2	Approche simulateur de l'incertitude et de la variabilité .....	32
<b>4.2</b>	<b>Modélisation du risque de listériose lié aux produits réfrigérés .....</b>	<b>33</b>
4.2.1	Champ de l'analyse .....	33
4.2.2	Munster au lait pasteurisé .....	33
4.2.3	Rillettes .....	33
4.2.4	Saumon fumé .....	34
<b>4.3</b>	<b>Modélisation du risque de salmonellose et de syndrome hémolytique urémique lié au steak haché congelé .....</b>	<b>35</b>
<b>5.</b>	<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>37</b>
<b>6.</b>	<b>Bibliographie .....</b>	<b>39</b>
<b>6.1</b>	<b>Liste des travaux .....</b>	<b>39</b>
6.1.1	Publications dans des périodiques internationaux avec comité de lecture.....	39
6.1.2	Publications dans des périodiques nationaux avec comité de lecture .....	41
6.1.3	Invitations dans des congrès nationaux et internationaux .....	41
6.1.4	Communications orales dans des congrès nationaux et internationaux .....	41
6.1.5	Communications affichées dans des congrès internationaux .....	43
6.1.6	Rapports de stages niveaux M2 rédigés ou encadrés .....	44
6.1.7	Thèses de doctorat rédigée, encadrées ou suivies .....	45
6.1.8	Rapports d'expertise .....	46
<b>6.2</b>	<b>Autres références bibliographiques.....</b>	<b>47</b>
<b>7.</b>	<b>Curriculum vitae détaillé.....</b>	<b>49</b>
<b>7.1</b>	<b>Curriculum vitae abrégé.....</b>	<b>49</b>
7.1.1	Etat civil .....	49
7.1.2	Coordonnées professionnelles : .....	49
7.1.3	Parcours professionnel.....	49
7.1.4	Parcours universitaire .....	49
<b>7.2</b>	<b>Programmes de recherche .....</b>	<b>50</b>
7.2.1	Afssa PR-2001-HA6 .....	50
7.2.2	Afssa PR-2001-HA7 .....	50
7.2.3	Afssa PR-2001-HA1 .....	50

7.2.4	AQS R02/04.....	50
7.2.5	OFIMER N° 069/04/C.....	50
7.2.6	ACTIA RA 05.9 .....	50
<b>7.3</b>	<b>Encadrement de la recherche.....</b>	<b>51</b>
7.3.1	Encadrement pré-doctoral .....	51
7.3.2	Encadrement, suivi et pilotage doctoral ; participation à des jurys de thèse... 51	
7.3.3	Encadrement post-doctoral.....	52
<b>7.4</b>	<b>Autres activités.....</b>	<b>52</b>
7.4.1	Activités d'expertise .....	52
7.4.2	Activités d'enseignement .....	52
7.4.3	Participation à des réseaux de recherche .....	52

## **8. Sélection de publications.....55**

<b>8.1</b>	<b>Annexe I: Reflections on the application of primary models to describe challenge tests conducted in/on food products .....</b>	<b>55</b>
<b>8.2</b>	<b>Annexe II : Time-temperature profiles of chilled ready-to-eat foods in school catering and probabilistic analysis of <i>Listeria monocytogenes</i> growth .....</b>	<b>57</b>
<b>8.3</b>	<b>Annexe III : Effect of temperature, water-phase salt and phenolic contents on <i>Listeria monocytogenes</i> growth rates on cold-smoked salmon and evaluation of secondary models .....</b>	<b>59</b>
<b>8.4</b>	<b>Annexe IV : Effect of the inoculum size on <i>Listeria monocytogenes</i> growth in solid media.....</b>	<b>61</b>
<b>8.5</b>	<b>Annexe V : Modelling the competitive growth of <i>Listeria monocytogenes</i> and food flora in situ.....</b>	<b>63</b>
<b>8.6</b>	<b>Annexe VI : Estimation of uncertainty and variability in bacterial growth using Bayesian inference. Application to <i>Listeria monocytogenes</i> .....</b>	<b>65</b>
<b>8.7</b>	<b>Annexe VII : Use of Bayesian modelling in risk assessment: Application to growth of <i>Listeria monocytogenes</i> and food flora in cold-smoked salmon .....</b>	<b>67</b>
<b>8.8</b>	<b>Annexe VIII : Prevalence and growth of <i>Listeria monocytogenes</i> in naturally-contaminated cold-smoked salmon .....</b>	<b>69</b>
<b>8.9</b>	<b>Annexe IX : Uncertainty distribution associated with estimating a proportion in microbial risk assessment .....</b>	<b>71</b>
<b>8.10</b>	<b>Annexe X : Experimental evaluation of different precision criteria applicable to microbiological counting methods.....</b>	<b>73</b>
<b>8.11</b>	<b>Annexe XI : Evaluation de l'exposition à <i>L. monocytogenes</i> ; exemple du calcul de la fréquence d'exposition liée aux rillettes.....</b>	<b>75</b>
<b>8.12</b>	<b>Annexe XII. Quantitative risk assessment of <i>Listeria monocytogenes</i> in French cold-smoked salmon. I. Quantitative exposure assessment.....</b>	<b>77</b>

# 1. Contexte des travaux

---

Après avoir présenté le champ d'application de ces travaux, la microbiologie quantitative alimentaire, *i.e.* l'application d'outils statistiques de description, d'inférence et de modélisation, aux données concernant les micro-organismes présents dans les aliments, je discuterai les concepts d'incertitude et de variabilité, dont la modélisation est la trame retenue pour ce mémoire.

## 1.1 La microbiologie quantitative alimentaire

### 1.1.1 La microbiologie alimentaire

On distingue généralement trois types de flores microbiennes dans un aliment : la flore technologique, *i.e.* les micro-organismes intentionnellement ajoutés dans un but technologique ou organoleptique, la flore d'altération, *i.e.* les micro-organismes naturellement ou accidentellement présents et pouvant entraîner une altération organoleptique du produit, et la flore pathogène, *i.e.* les micro-organismes accidentellement présents et pouvant entraîner un effet néfaste infectieux ou toxi-infectieux chez le consommateur. A titre d'exemple, on peut trouver sur un fromage à pâte molle croûte lavée (e.g. Munster): *Brevibacterium linens* (flore technologique), des moisissures (flore d'altération), éventuellement *Listeria monocytogenes* (flore pathogène)...

Mes incursions en microbiologie positive (étude des flores technologiques)<sup>(7, 45, 52, 63)</sup> ou hors des disciplines microbiologiques<sup>(16, 75)</sup> ont été limitées et ne seront pas abordées dans ce rapport qui se restreint à la microbiologie négative (étude des flores pathogènes et d'altération).

### 1.1.2 La microbiologie quantitative

Trois champs d'application particuliers peuvent être individualisés au sein de la microbiologie quantitative alimentaire : (i) la microbiologie prévisionnelle (modélisation, prévision, simulation de la croissance, de la survie et de l'inactivation microbiennes), (ii) la microbiologie analytique (évaluation et optimisation de méthodes de détection, de dénombrement et/ou de caractérisation de micro-organismes), et (iii) l'évaluation des risques microbiens (définie plus loin, cf. § 4.1) et plus particulièrement la démarche méthodologique d'AQRM, ou appréciation quantitative des risques microbiens.

Les concepts qui ont particulièrement retenu mon attention sont ceux d'incertitude et de variabilité, particulièrement rencontrés dans le champ de l'AQRM mais applicables à toutes les disciplines de la microbiologie alimentaire.

## 1.2 Incertitude, variabilité et concepts associés

*"Variability is a phenomenon in the physical world to be measured, analysed and where appropriate explained. By contrast, uncertainty is an aspect of knowledge".*  
Sir David Cox

### 1.2.1 Variabilité

La terminologie utilisée dans ce mémoire est celle largement retenue en analyse des risques environnementaux et alimentaires, telle que définie notamment par différents ouvrages de référence dans ces domaines (Cullen & Frey, 1999; Frey & Burmaster, 1999; Frey & Patil, 2002; Haas *et al.*, 1999; Vose, 2000). Selon ces sources, la variabilité représente l'hétérogénéité inter-individuelle, ou dispersion vraie, d'une grandeur dans une population ou d'un paramètre du système étudié. Elle est inhérente au système observé et ne peut être réduite qu'en modifiant ce système, mais pas par des observations supplémentaires. D'autres expressions peuvent être rencontrées pour désigner ce concept, e.g. "variabilité aléatoire", "incertitude aléatoire", "incertitude stochastique", "incertitude objective", ou "incertitude de type A", mais seul le terme "variabilité" sera utilisé dans ce mémoire.

Dans le domaine d'application des risques microbiens alimentaires, les sources de variabilité sont nombreuses :

- variabilité des micro-organismes (état physiologique ou stress, aptitudes de croissance des bactéries, pouvoir infectieux...);
- variabilité des aliments (flore microbienne, composition chimique, texture...) et des procédés (voies de contamination, environnement thermique...);
- variabilité des consommateurs (profils de consommation, comportements domestiques, immuno-compétence...).

### 1.2.2 Incertitude

*"Solum certum nihil esse certi".  
Plinie l'Ancien*

En adoptant la terminologie issue des ouvrages de référence déjà mentionnés (Cullen & Frey, 1999; Frey & Burmaster, 1999; Frey & Patil, 2002; Haas *et al.*, 1999; Vose, 2000), l'incertitude est définie comme le manque de connaissance (ou niveau d'ignorance) du modélisateur quant au système ou à un de ses paramètres. Elle n'est donc pas une propriété du système mais de l'état de connaissance du modélisateur. Elle peut être réduite par une acquisition de connaissance supplémentaire.

D'autres expressions peuvent être rencontrées pour désigner ce concept, e.g. "imprécision" <sup>(75)</sup>, "incertitude subjective", "incertitude épistémique", "ignorance partielle", ou "incertitude de type B", mais seul le terme "incertitude" sera utilisé dans ce mémoire.

Différentes terminologies de l'incertitude ont été proposées, on retiendra dans la suite du mémoire les sources d'incertitude suivantes (Cullen & Frey, 1999) :

- *Incertainitude de modélisation*. Le processus de modélisation, *i.e.* de représentation simplifiée de la réalité, pour faciliter l'analyse, la prédiction ou l'estimation d'un phénomène <sup>(61)</sup>, engendre par essence une distance entre la réalité et sa représentation simplifiée. Les incertitudes de modélisation sont fréquemment citées mais ont peu été quantifiées, vraisemblablement en raison de la difficulté à quantifier cette distance.
- *Incertainitude sur les paramètres*. L'incertitude sur les grandeurs (e.g. entrées, variables ou paramètres d'un modèle) est beaucoup plus souvent quantifiée. On distingue :
  - Incertitude de mesure (ou analytique) :
    - erreur aléatoire, ou inverse de la précision,
    - erreur systématique, ou biais ;
  - Incertitude d'échantillonnage ;

- Incertitude d'estimation.

Enfin, mentionnons l'expression "incertitude totale" (Vose, 2000), qui englobe les deux concepts de variabilité et d'incertitude tels que définis ci-dessus. D'autres termes peuvent être utilisés pour désigner cet ensemble incertitude+variabilité, tel "indéterminabilité" (Vose, 2000), ou même "incertitude" <sup>(75)</sup>, ce qui ne peut qu'ajouter à la confusion terminologique.

### 1.2.3 Probabilité et statistiques

Un aspect fondamental du traitement des incertitudes et variabilités a trait à l'utilisation de la notion de probabilité. Développée à partir du 17ème siècle avec une référence toute particulière aux jeux de hasard, la théorie des probabilités permet d'appréhender les processus dont la réalisation présente une certaine variabilité qui est le fruit du hasard (processus aléatoires) ou considéré comme tel. <sup>(75)</sup>

Deux visions complémentaires de la notion de probabilité co-existent.

L'approche fréquentiste, ou objectiviste, définit la probabilité d'un événement comme la valeur (unique) vers laquelle converge la fréquence d'observation de cet événement. L'exemple le plus simple, et le plus classique, est le dé à 6 faces non pipé. La probabilité d'obtenir "6" au cours d'un jet quelconque est égale à la fréquence d'obtention du "6" au cours d'une série infiniment longue de jets successifs. La transposition de cette définition à des situations réelles en estimation des risques est souvent difficile, car il est rarement possible de définir à quelle population (série infiniment longue de "jets") se rapporter (Morgan & Henrion, 1990). De cette approche découlent les statistiques inférentielles classiques, dans lesquelles toute estimation se fonde exclusivement sur l'observation de données. En absence de données, ou si les données disponibles ne sont pas pertinentes, cette approche ne permet pas de construire d'estimation.

L'approche bayésienne, ou subjectiviste, définit la probabilité d'un événement comme le degré de croyance (*degree of belief*) d'une personne quant à la survenue de cet événement. C'est donc une propriété de l'événement mais aussi du niveau de connaissance du modélisateur au moment de la modélisation. "La" probabilité d'un événement n'est unique que si tout le monde, à tout moment, a la même connaissance. Dans cette approche, le processus d'estimation repose à la fois sur la connaissance *a priori* du modélisateur (concernant par exemple le "support" du paramètre, i.e. l'intervalle à l'intérieur duquel il est certain que le paramètre se trouve) et sur les données observées s'il y a lieu.

## 1.3 Modélisation d'incertitudes et de variabilités

### 1.3.1 Modélisation de variabilités

La variabilité est généralement décrite soit par une distribution de fréquence (ou distribution empirique), soit par une distribution paramétrique, i.e. une loi de probabilité dont les paramètres ont été estimés (ajustement à une distribution empirique, procédure bayésienne...) ou fixés ("avis d'expert"...). A titre d'exemple, la figure 1 ci-après rassemble les représentations cumulatives de quatre distributions de températures dans des réfrigérateurs domestiques : deux distributions empiriques et deux distributions ajustées.

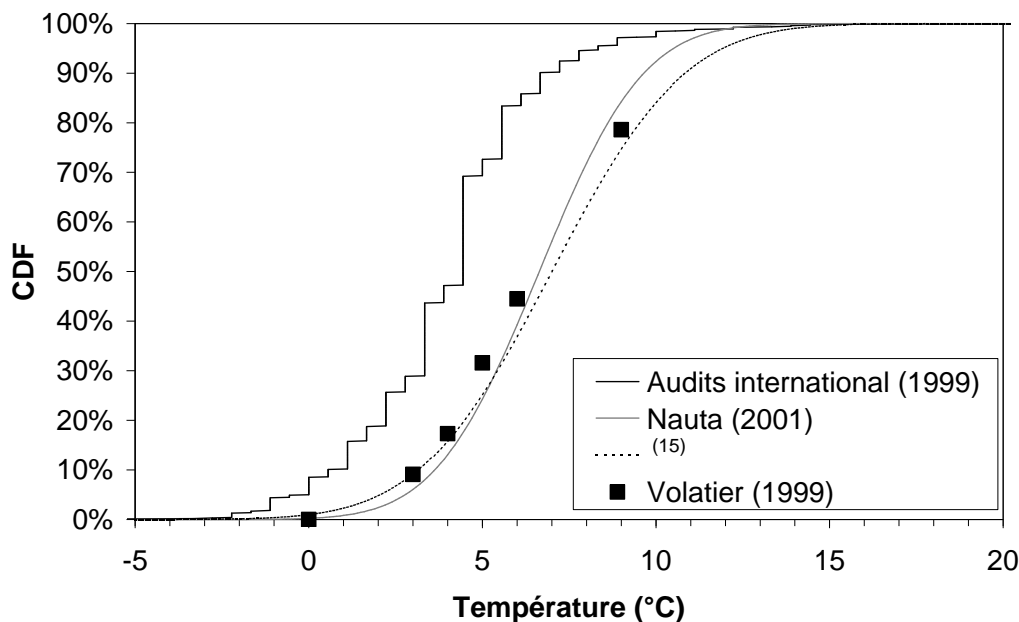


Figure 1 : 4 distributions cumulées de températures de réfrigérateurs domestiques.

\_ : distribution empirique de 939 températures moyennes sur 24h d'un aliment dans des réfrigérateurs aux USA (Audits international, 1999).

\_ : distribution paramétrique, Loi Normale (moyenne = 6.64°C, écart-type = 2.35°C), ajustée sur des relevés de température d'ambiance de réfrigérateurs ménagers issues de différentes sources européennes (Nauta, 2001)

.. : distribution paramétrique, Loi Normale (moyenne = 7°C, écart-type = 3°C), ajustée sur des températures moyennes sur la durée totale de conversation de saumon fumé dans des réfrigérateurs en France <sup>(15)</sup>

■ : distribution empirique de 780 relevés de température d'ambiance dans des réfrigérateurs en France au cours de l'enquête INCA (Volatier, 1999). Les résultats étaient présentés sous la forme d'un histogramme à 5 classes : "entre 0 et 3 °C", "4°C", "5°C", "6°C", "entre 7 et 9°C", "10°C ou plus"

Une approche alternative de la variabilité repose sur l'hypothèse que les différences sur un facteur à modéliser sont déterminées par les différences sur un autre facteur qui est soit contrôlé soit plus facilement observé. Ainsi, les statistiques inférentielles, telles que largement appliquées en microbiologie alimentaire, visent à comparer une caractéristique entre des sous-populations, ou à étudier l'effet de facteurs quantitatifs et/ou qualitatifs sur un effet observé. Quoique de telles analyses soient rarement associées au terme "variabilité", elles permettent néanmoins aussi d'approcher la dimension d'hétérogénéité au sein d'une population. Dans les grandes AQR internationales, ce type de traitement de la variabilité se retrouve par exemple sur une séparation de la population des consommateurs par âge ou sur une séparation des données de contamination par saisons (e.g. Christensen *et al.*, 2001).

### 1.3.2 Modélisation d'incertitudes

Les principaux outils statistiques utilisés en microbiologie alimentaire pour modéliser les incertitudes sont :

- les techniques de ré-échantillonnage dans les données acquises, et en particulier le bootstrap, utilisé pour ajouter une dimension d'incertitude d'échantillonnage à une distribution (empirique ou paramétrique) de variabilité sur un paramètre (Frey & Burmaster, 1999)
- les statistiques inférentielles fréquentistes, en particuliers celles liées à la maximisation de la vraisemblance (Frey & Burmaster, 1999 ; Haas *et al.*, 1999) ou l'analyse de variance à effets aléatoires (ISO, 1994 ; Christensen *et al.*, 2001) en particulier pour

les incertitudes d'estimation ou de mesure

- l'inférence bayésienne, dont l'utilisation en microbiologie alimentaire est récente (Barker *et al.*, 2000 ; Parsons *et al.*, 2005)
- les arbres de décision ou arbres de probabilité, permettant par exemple de considérer séparément et en parallèle plusieurs options de modélisation (FDA, 2003).



## 2. Incertitudes et variabilités en microbiologie prévisionnelle

Mes travaux dans le domaine de la microbiologie prévisionnelle ont porté majoritairement sur la croissance (cf. § 2.1. à 2.5), *i.e.* la division cellulaire, et plus récemment sur l'inactivation (cf. § 2.6), *i.e.* la mortalité cellulaire.

### 2.1 Incertitude d'estimation des paramètres d'une courbe de croissance

*"L'étude de la croissance d'une culture bactérienne ne constitue pas un thème spécialisé ou une branche de la recherche ; c'est la méthode de base de la microbiologie".*  
Jacques Monod

L'un des outils essentiels de la caractérisation de la croissance microbienne est l'établissement de cinétiques de croissance et leur modélisation par ajustement d'un modèle primaire.

#### 2.1.1 Cinétiques de croissance

En microbiologie alimentaire, il existe trois types principaux d'expérimentations pour suivre la croissance de micro-organismes :

- Les courbes de croissance en milieux de culture liquides (ou bouillons) inoculés,
- Les tests de croissance (ou challenge tests) en aliments inoculés,
- Les tests de vieillissement en aliments naturellement contaminés

La Figure 2 présente un exemple-type de cinétique bactérienne dans ces milieux non renouvelés. Cette cinétique « parfaite » peut être obtenue en pratique avec le 1<sup>er</sup> type de culture, en milieux de culture, mais reste très théorique pour les challenge tests ou *a fortiori* les tests de vieillissement <sup>(12)</sup>.

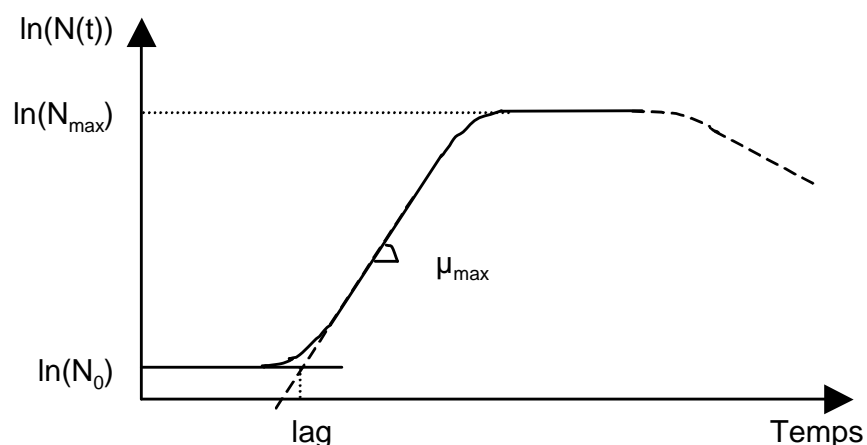


Figure 2 : Représentation schématique d'une cinétique de croissance bactérienne en batch.  $N(t)$  : population; *lag* : temps de latence ;  $\mu_{max}$  : taux de croissance maximal ;  $N_0$  : population initiale ; et  $N_{max}$  population maximale.

L'évolution de la population bactérienne, notée  $N(t)$ , peut être exprimée en nombre d'unités formant colonie par gramme, ufc/g, ou par millilitre, ufc/ml (dénombrements sur boîtes de Petri, cf. § 3.2.1) ou en unités d'absorbance (mesures turbidimétriques). Sans perte de généralité, on supposera par la suite que  $N(t)$  est exprimé en ufc/g et que le temps est exprimé

en heures.

### 2.1.2 Modèles primaires

La plupart des modèles primaires de la microbiologie prévisionnelle décrivent l'évolution de la dérivée du logarithme népérien de  $N(t)$ , ou taux de croissance instantané  $\mu(t)$ . Si on s'en tient à la croissance, les grandes phases décrites par ces modèles sont :

- la latence et l'accélération au cours desquelles  $\mu(t)$  augmente de 0 (ou  $\varepsilon$ ) à la valeur  $\mu_{max}$ ,
- la phase de croissance exponentielle, au cours de laquelle  $\mu(t) \approx \mu_{max}$
- le ralentissement et la phase stationnaire, au cours desquelles  $\mu(t)$  décroît de  $\mu_{max}$  à 0.

Ainsi, les modèles primaires peuvent s'écrire sous la forme :

$$\frac{1}{N(t)} \frac{dN(t)}{dt} = \frac{d}{dt} \ln(N(t)) = \mu(t) = \mu_{max} \times \alpha(t) \times f(t) \quad [1]$$

Avec  $N(t)$  : densité de population (ufc/g) ;  $\alpha(t)$  : fonction d'adaptation ;  $f(t)$  : fonction de freinage ;  $\mu_{max}$  : taux de croissance maximal ( $h^{-1}$ ).

Tel qu'introduit dans l'équation [1], le taux de croissance maximal,  $\mu_{max}$ , est donc la valeur du taux de croissance instantané si  $\alpha(t) = f(t) = 1$ . Cette définition est, sous certaines conditions, compatible avec la définition historique de  $\mu_{max}$ , la pente de  $\ln(N(t))$  en fonction de  $t$  au cours de la phase exponentielle (cf. Figure 1). Le taux de croissance maximal,  $\mu_{max}$ , peut ainsi également être expérimenté en  $\ln(\text{ufc/g}) \cdot h^{-1}$ . Il est parfois confondu avec la pente de  $\log(N(t))$  en fonction de  $t$  au cours de la phase exponentielle, exprimé en  $\log(\text{ufc/g}) \cdot h^{-1}$ , que nous avons proposé de noter  $V$  dans l'avis de l'Afssa du 9 mars 2005 <sup>(73)</sup>. Nous avons également recommandé l'usage d'un paramètre équivalent, moins ambigu, le temps de génération,  $tg$ , ou temps de doublement de la population au cours de la phase exponentielle :

$$tg = \frac{\ln(2)}{\mu_{max}} = \frac{\log(2)}{V} \quad [2]$$

La fonction  $\alpha(t)$  permet de décrire les premières phases d'accélération et varie de 0 ou  $\varepsilon$  (en début de croissance) à 1 (en fin de croissance).

La fonction  $\alpha$  la plus simple est une transition brutale :

$$\alpha(t) = \begin{cases} 0 & \text{si } t < lag \\ 1 & \text{si } t \geq lag \end{cases} \quad [3]$$

Avec  $lag$  : temps de latence (h).

Baranyi & Roberts (1994) ont proposé une fonction d'accélération continue, aujourd'hui largement utilisée :

$$\begin{cases} \alpha(t) = \frac{q(t)}{1 + q(t)} \\ \frac{1}{q(t)} \frac{dq(t)}{dt} = \mu_{max} \end{cases} \quad [4]$$

Avec  $q(t)$  : variable adimensionnelle représentant l'état physiologique des cellules, qui évoluerait exponentiellement à partir d'un état physiologique initial  $q_0$ .

Si nécessaire, ce modèle peut être reparamétré pour faire apparaître explicitement le

paramètre *lag* :

$$lag = \frac{1}{\mu_{max}} \ln \left( 1 + \frac{1}{q_0} \right) \quad [5]$$

La fonction  $f(t)$  permet de décrire le freinage et l'entrée en phase stationnaire. Elle varie de 1 (en début de croissance) à 0 (en fin de croissance). La plus utilisée est la fonction de freinage logistique [6], qui décrit une saturation de la population à un niveau maximal  $N_{max}$  (parfois appelé "capacité" du milieu). Ceci pourrait s'interpréter comme une limitation de la croissance par une ressource quelconque (substrat, espace...) dont l'épuisement correspondrait à l'arrêt de croissance.

$$f(t) = 1 - \frac{N(t)}{N_{max}} = \frac{N_{max} - N(t)}{N_{max}} \quad [6]$$

Avec  $N_{max}$  : population maximale (cfu.ml<sup>-1</sup> or cfu.g<sup>-1</sup>).

Si le substrat limitant est connu et qu'un suivi biochimique de sa concentration au cours du temps est disponible, il est également possible d'utiliser l'équation de freinage de Monod :

$$f(t) = \frac{S(t)}{K_S + S(t)} \quad [7]$$

Avec  $S(t)$  : concentration en substrat limitant et  $K_S$  constante de Monod.

Enfin, un freinage brutal peut être utilisé :

$$f(t) = \begin{cases} 1 & \text{si } N(t) < N_{max} \\ 0 & \text{si } N(t) = N_{max} \end{cases} \quad [8]$$

En combinant ces différentes fonctions d'accélération et de freinage, à l'aide de l'équation [1], on peut retrouver un grand nombre de modèles primaires utilisés en microbiologie prévisionnelle.

### 2.1.3 Ajustement d'un modèle primaire à une cinétique de croissance et incertitude d'estimation

L'ajustement d'un modèle primaire de croissance à une cinétique consiste en l'estimation des 4 paramètres :

- temps de latence (*lag*) ou paramètre équivalent (e.g. état physiologique initial,  $q_0$ , cf. équation [4]),
- taux de croissance maximal ( $\mu_{max}$ ) ou paramètre équivalent (e.g. temps de génération,  $tg$ ),
- population initiale ( $N_0$ )
- et population maximale ou capacité ( $N_{max}$  ou MPD).

Je m'étais déjà intéressée au cours de ma thèse <sup>(30, 61)</sup> aux techniques de régression non-linéaire permettant cet ajustement, en développant le programme Superfit, utilisant le critère classique de la minimisation des carrés des écarts (résidus).

Au cours de la thèse de Nicolas Miconnet <sup>(66)</sup>, nous avons prolongé cette réflexion sur l'ajustement d'un modèle primaire à une courbe de croissance pour l'appliquer au cas particulier des courbes de croissance obtenues à la surface d'un aliment, ou en profondeur

dans un aliment broyé, par tests de croissance, ou *challenge test*, *i.e.* suivi d'une contamination artificielle. Il est apparu que les propriétés statistiques de ces courbes étaient différentes des propriétés des courbes de croissance en bouillon, sur lesquelles avaient porté la plupart des travaux théoriques sur l'ajustement d'un modèle primaire. Nous avons démontré, sur la base de simulations, que le critère classique des moindres carrés était tout à fait pertinent dans le cas des courbes en bouillon, mais questionnable pour certaines courbes de croissance obtenues par *challenge test*, en particulier celles réalisées en surface, et que la régression robuste constituait une alternative prometteuse pour ces cas particuliers. Nous avons également développé une réflexion sur l'incertitude d'estimation des paramètres du modèle primaire et donc l'incertitude de modélisation d'une courbe de croissance. Ce travail a été initié à l'occasion du séjour de 3 mois dans notre unité d'Annemie Geeraerd, post-doctorante à l'université catholique de Leuven (Belgique) dans l'unité de Jan van Impe. Annemie Geeraerd a été associée, au-delà de son séjour en France, à la rédaction de la publication conjointe <sup>(12)</sup>, cf. **annexe I**.

## 2.2 Variabilité de $\mu_{max}$ , taux de croissance maximal

Le taux de croissance maximal ( $\mu_{max}$ ) d'une population dans un aliment dépend de nombreux facteurs, intrinsèques à la population considérée (effet espèce ou souche), intrinsèques à l'aliment considéré (physico-chimie) ou extrinsèques (température).

### 2.2.1 Variabilité des aptitudes de croissance au sein d'une espèce microbienne

Les modèles utilisés en microbiologie prévisionnelle sont souvent construits à partir de cinétiques réalisées avec une ou quelques souches, souvent issues de collections, pour des conditions environnementales données. Cette approche peut masquer une variabilité de comportement des souches au sein de l'espèce considérée. Ainsi, des variations mesurées entre les différentes souches d'une même espèce pourraient être supérieures aux variations entre plusieurs subcultures d'une même souche. Ces distinctions entre les souches sont regroupées sous le terme de "variabilité de croissance intraspécifique".

J'avais déjà été sensibilisée à ce sujet au cours de ma thèse <sup>(61)</sup>, au travers de la caractérisation de la variabilité de comportement en milieu de culture défini au sein de l'espèce *Escherichia coli* <sup>(1)</sup>, de la différenciation entre différents profils de *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (MRSA) <sup>(2)</sup>, et de la comparaison des aptitudes de croissance en milieux d'enrichissement sélectif de 2 espèces du genre *Listeria* (*monocytogenes* et *innocua*) <sup>(4)</sup>.

Au cours du stage de DEA de Sophie Peneau <sup>(55, 56)</sup>, nous avons appliqué cette approche à l'étude de la variabilité de croissance de *L. monocytogenes* en bouillons. Ces travaux ont été poursuivis puis étendus à la croissance en matrice alimentaire (saumon fumé) dans l'unité, sous la responsabilité d'Hélène Bergis <sup>(46)</sup>. Les résultats en saumon fumé ont été exploités dans un modèle décrit au § 2.5.3.

### 2.2.2 Modélisation de la croissance au cours de profils temps-température

La modélisation secondaire vise à expliciter l'effet des conditions environnementales sur un des paramètres du modèle primaire (en particulier le temps de latence et le taux de croissance). Les modèles secondaires utilisés dans mes travaux appartiennent tous à l'approche progressive qui consiste à étudier successivement chacun des facteurs environnementaux. La température étant un facteur particulièrement influent sur le taux de

croissance microbienne ( $\mu_{max}$ ), elle est toujours prise en compte en premier facteur.

Les modèles utilisés dans les travaux ci-après sont :

- le modèle des températures cardinales avec inflexion (Rosso *et al.*, 1993)

$$\mu_{max}(T) = \begin{cases} 0 & \text{si } T \leq T_{min} \text{ ou si } T \geq T_{max} \\ \frac{\mu_{opt}(T - T_{max})(T - T_{min})^2}{(T_{opt} - T_{min})(T_{opt} - T_{min})(T - T_{opt}) - (T_{opt} - T_{max})(T_{opt} + T_{min} - 2T)} & \text{sinon} \end{cases} \quad [9]$$

avec  $T_{min}$ ,  $T_{opt}$ ,  $T_{max}$ , les températures cardinales (minimale, optimale, et maximale) et  $\mu_{opt}$  le taux de croissance à la température optimale.

- le modèle racine carrée (Ratkowsky *et al.*, 1982 ; Zwietering *et al.*, 1996), utilisable aux températures sub-optimales, et donc en pratique aux températures de réfrigération :

$$\mu_{max}(T) = \begin{cases} 0 & \text{si } T \leq T_{min} \\ b^2(T - T_{min})^2 = \frac{\mu_{ref}(T - T_{min})^2}{(T_{ref} - T_{min})^2} & \text{si } T_{min} < T \ll T_{opt} \end{cases} \quad [10]$$

avec  $T_{min}$  la température minimale,  $b$  la pente de la racine carrée de  $\mu_{max}$  en fonction de la température et  $\mu_{ref}$  le taux de croissance à la température de référence  $T_{ref}$ .

Il est couramment admis que les températures cardinales ne dépendent que de l'espèce (ou de la souche), tandis que  $b$ ,  $\mu_{opt}$  ou  $\mu_{ref}$  sont des paramètres spécifiques à chaque couple espèce-environnement (physico-chimie de l'aliment).

J'ai proposé une reparamétrisation des modèles primaires et secondaires de microbiologie prévisionnelle, pour simuler rapidement la croissance au cours de la chaîne du froid<sup>(8, 23, 25)</sup>, par une intégration simple du profil temps-température, en séparant d'une part l'effet de l'aliment (de sa physico-chimie, etc.) et d'autre part l'effet intégré du temps et de la température. Ainsi, l'équation proposée permet de prédire un incrément de croissance par la multiplication d'un terme qui ne dépend que de l'espèce microbienne et de l'aliment (quel que soit le profil temps-température), et d'un terme, appelé score, qui ne dépend que de l'espèce microbienne et du profil temps-température (quel que soit l'aliment), cf. **annexe II**.

Cette paramétrisation a été appliquée par Philippe Rosset à la prévision de croissance de *L. monocytogenes* au cours de la préparation-distribution d'entrées froides en restauration collective scolaire, au cours de profils temps-températures enregistrés *in situ*<sup>(8, 25)</sup>, et à la croissance de *Salmonella* Typhimurium au cours de la préparation-distribution de steaks hachés congelés en restauration collective hospitalière, au cours de profils temps-températures enregistrés *in situ*<sup>(26)</sup>.

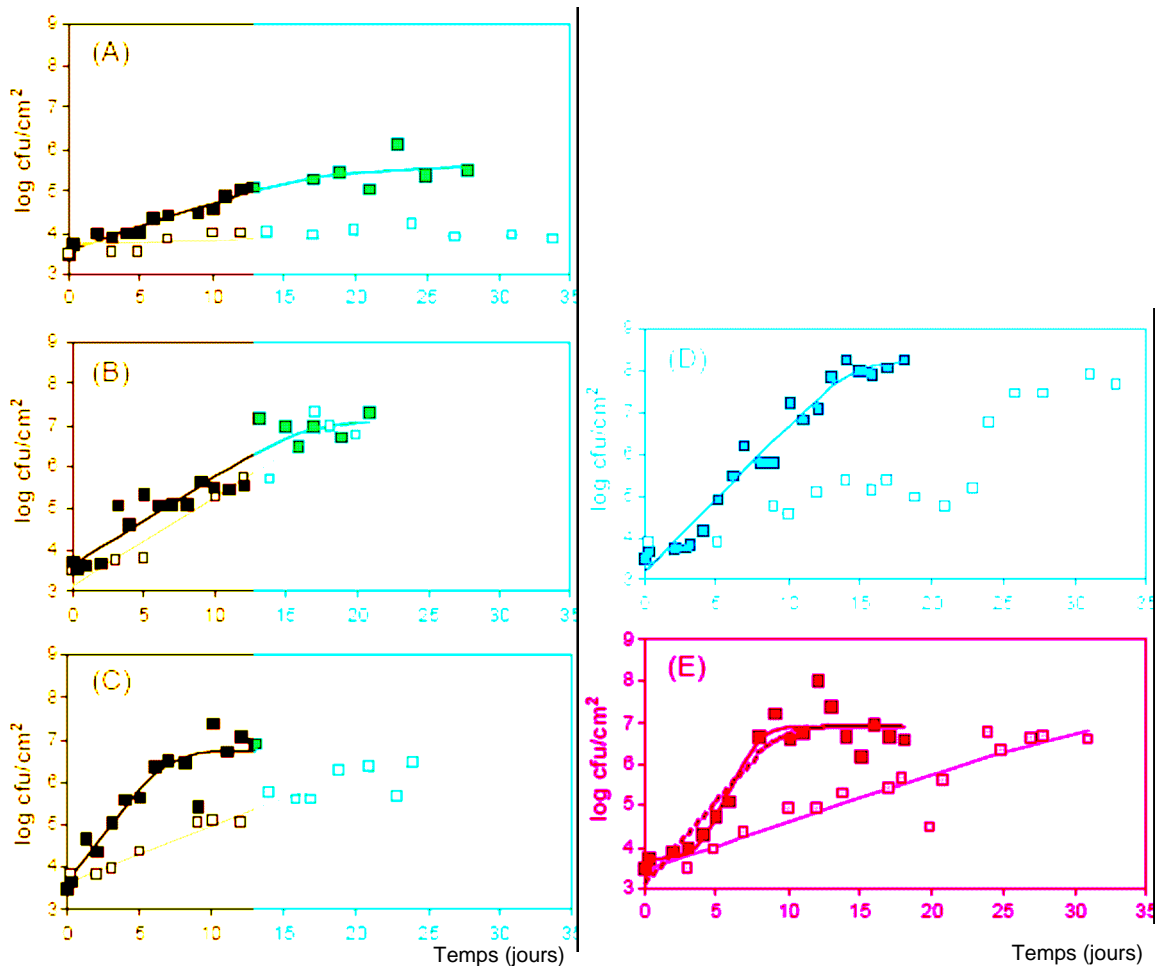
Sur le même principe, nous avons ensuite, avec Anne-Laure Afchain et Régis Pouillot, repris et développé cette paramétrisation pour la modélisation des profils temps-températures du saumon fumé de la sortie usine à la consommation<sup>(15, 20, 51, 57)</sup> et à leur intégration dans le modèle d'appréciation de l'exposition à *L. monocytogenes*<sup>(14, 21, 50)</sup>.

### 2.2.3 Modélisation secondaire des effets de l'aliment (physico-chimie)

Les modèles secondaires décrits ci-dessus ont été développés pour prendre en compte l'effet d'autres facteurs que la température, en particulier l'effet de la physico-chimie (pH,  $a_w$  ou activité de l'eau, concentration en inhibiteurs...). Il est donc possible de caractériser la variabilité du taux de croissance en fonction de la variabilité de la physico-chimie des aliments considérés.

J'ai étudié l'influence de la physico-chimie du saumon fumé sur les courbes de croissance de *L. monocytogenes* (*challenge tests*)<sup>(18, 36)</sup>. Dix challenge tests ont été réalisés dans cinq saumons fumés de physico-chimie différentes à deux températures (4°C et 8°C), cf. Figure 3, et les taux de croissance ont été estimés sur ces courbes ainsi que sur des courbes issues de la littérature (régression non linéaire classique de moindres carrés, et régression non linéaire classique robuste telle que proposée par Miconnet *et al.*<sup>(12)</sup>).

Figure 3 : Courbes de croissance de *L. monocytogenes* dans 5 lots de saumons fumés (A à E), à 4°C (carrés gris) et à 8°C (carrés noirs). Ajustement d'un modèle primaire (trait continu). Extrait de Cornu *et al.*<sup>(18)</sup>



Les taux de croissance ainsi estimés ont été utilisés pour évaluer différents modèles secondaires existants, tous fondés sur la physico-chimie <sup>(18)</sup>, cf. **annexe III**. La conclusion essentielle de ce travail était que la variabilité physico-chimique entre les produits ne suffisait pas à expliquer la variabilité (et/ou l'incertitude) des taux de croissance entre les produits à une même température, tel que cela avait initialement été envisagé <sup>(44)</sup>. Cette conclusion nous a amené à envisager un modèle secondaire décrivant de façon empirique l'effet de la variabilité inter-produits sur la croissance de *L. monocytogenes* dans le saumon fumé (ce modèle étant décrit au § 2.5.3.).

Par ailleurs, j'ai été associée à un travail plus large de Jean-Christophe Augustin sur la croissance de *L. monocytogenes* dans tous types d'environnements (bouillons et aliments). Il s'agissait de développer, comparer et valider des modèles secondaires prédisant le taux de croissance en fonction de la physico-chimie <sup>(13)</sup>.

## 2.3 Variabilité des temps de latence (*lag*)

Le temps de latence tel que défini ci-dessus (Figure 1, équations [3] et [4]) correspond à la durée observée de la phase de latence pour l'ensemble de la population présente. On parle alors de temps de latence populationnel, paramètre sur lequel ont porté la majorité des travaux sur la latence. Plus récemment, certaines équipes se sont intéressées aux temps de latence de chaque cellule présente dans la population, à leur dispersion (variabilité) et à l'impact de cette variabilité sur le temps de latence populationnel. On parle alors de temps de latence cellulaires.

### 2.3.1 Temps de latence populationnels

En collaboration avec Marie Laure Delignette-Muller <sup>(10, 37)</sup>, nous avons étudié l'impact du stress lié au changement de condition environnementale (plus précisément, dans notre étude, la température) entre préculture et culture sur les temps de latence en bouillon. Nous avons confirmé l'intérêt de la reparamétriser les modèles secondaires usuellement utilisés pour prédire le temps de latence en choisissant comme variable de réponse  $h_0 = \mu_{max} \cdot lag$  et comme variable de contrôle la différence entre la température de culture et la température de préculture. Cette étude de l'impact des conditions thermiques pré-incubatoires a été prolongée en collaboration avec mes collègues Hélène Bergis et Annie Beaufort. Ainsi, la croissance de *L. monocytogenes* a été suivie en froid positif (4°C et 8°C) dans des saumons fumés préalablement inoculés puis stockés en froid négatif (-18°C : congélation, ou -3°C : *chilling*).

Par ailleurs, j'ai été associée au travail de Nathalie Gnanou-Besse <sup>(19, 64)</sup> sur l'impact du niveau d'inoculation et de conditions sur les temps de latence sur une surface gélosée et en aliment (saumon fumé), cf. **annexe IV**. Les dénombrements de très faibles inoculum ont été autorisés grâce au développement d'une méthode très sensible (décrite au § 3.2.2.). Dans certaines conditions expérimentales, un allongement significatif du temps de latence populationnel pour les cinétiques à très faibles inoculum (<1 ufc/g) par rapport à des cinétiques à inoculum plus élevés été observé.

### 2.3.2 Temps de latence cellulaires

Une approche stochastique de la croissance microbienne, reposant sur la simulation du

comportement individuel de chacune des cellules contaminantes, a été proposée pour expliquer ces phénomènes. Ainsi, la latence d'une population microbienne dépend de la distribution statistique des latences individuelles des cellules la constituant. Cette distribution influence la valeur de la latence populationnelle mais également la phase d'accélération de la croissance dont la durée dépendra de la dispersion de la distribution (cf. Figure 6). Sur ce sujet, nous avons été associés au travail de thèse de Laurent Guillier.

Les stress engendrés par des chocs physico-chimiques rencontrés par les cellules microbiennes dans les environnements de production des industries agro-alimentaires ou lors des étapes des procédés de fabrication ont un impact plus ou moins grand sur les latences cellulaires de *L. monocytogenes*. Nous avons ainsi observé que la moyenne et l'écart-type des latences varient considérablement en fonction de l'état physiologique des cellules <sup>(47)</sup>.

## 2.4 Variabilité de $N_{max}$ et modélisation des interactions microbiennes

*"Mixed cultures are everywhere, except in some of our labs"*  
anonyme

De tous les paramètres de la courbe de croissance, le paramètre  $N_{max}$  ou MPD (niveau maximal de population en fin de culture) semble être le "parent pauvre" de la microbiologie prévisionnelle (beaucoup moins étudié que les paramètres *lag* et  $\mu_{max}$ ). L'étude de l'entrée en phase stationnaire semble pourtant essentielle pour l'amélioration de la pertinence des modèles prévisionnels en aliments solides, en particulier en présence de flores compétitrices. En effet les premiers modèles prévisionnels négligeaient l'effet des interactions microbiennes (compétition, inhibitions etc.). Or de nombreuses denrées alimentaires ne peuvent être assimilées à des milieux de culture stériles, car elles contiennent naturellement une microflore (d'altération en particulier), qui croît conjointement à la microflore pathogène.

### 2.4.1 $N_{max}$ et effet inoculum

Dans les travaux déjà cités de Nathalie Gnanou-Besse <sup>(19, 64)</sup> sur les courbes de croissance à très faibles inoculums, nous avons observé des effets significatifs de la taille de l'inoculum sur le  $N_{max}$ , dans la plupart des conditions environnementales. Ainsi, pour 3 des 4 conditions testées en surface de milieu gélosés, la population finale atteinte était d'autant plus élevée que l'inoculum était élevé (cf. Figure 2, § 2.3.1.). Cet effet peut facilement être expliqué par un effet "géométrique". En effet, aux inoculums les plus faibles, les cellules initialement déposées formaient des colonies isolées, toute la superficie du milieu n'étant pas envahie. Plus le nombre de cellules déposées était élevé, plus le nombre de colonies était élevé et donc plus la population totale finale (rapportée à la superficie de tout le milieu) était élevée. En revanche, dans la 4<sup>ème</sup> condition, un film liquide se formait au contact de la gélose, autorisant les cellules à former une nappe.

Le même effet inoculum sur le  $N_{max}$  a été observé en saumon fumé (cf. Figure 3). Dans le cas du saumon fumé A (cf. Figure 3a), l'effet "géométrique" défini ci-dessus semble être l'explication principale. En revanche, dans le saumon fumé B (cf. Figure 3b), même l'inoculum le plus élevé n'atteint pas les  $N_{max}$  observés dans le saumon fumé A ( $> 10^7$  ufc/g), ce qui semble être explicable par une compétition avec la flore annexe (cf. § 2.4.2).

## 2.4.2 Interactions microbiennes et effet Jameson

Au cours de mon DEA et de ma thèse, j'ai essentiellement étudié les interactions microbiennes en milieux liquides<sup>(1, 2, 3, 4, 32, 33, 40, 41, 53, 54, 61)</sup>. Ces travaux ont été contemporains d'autres investigations similaires des interactions microbiennes dans les principales équipes mondiales en microbiologie prévisionnelle, par exemple l'université de Leuven<sup>(62)</sup>.

Suite à mon arrivée à l'Afssa, j'ai appliqué ces recherches aux interactions en aliment. A partir d'une étude des courbes publiées dans la littérature, j'ai observé que la plupart des interactions in situ se limiteraient à une interruption précoce de la croissance de la flore minoritaire (en général la flore pathogène), simultanée à l'arrêt de croissance de la flore majoritaire (en général la flore d'altération). Il y aurait donc saturation à un niveau maximal de la flore totale (somme des deux flores), ce qui pourrait s'expliquer par une compétition pour une ressource limitante commune quelconque (substrat, espace...).

L'équipe australienne de Ross et McMeekin (Ross *et al.*, 2000) a proposé d'utiliser l'expression "effet Jameson" pour nommer l'arrêt simultané de croissance de toutes les flores dans un aliment (poisson fumé). Ross *et al.* (2000) attribuent l'invention de cette expression à Stephens *et al.* (1997), qui eux-même se référaient à Jameson (1962). Toutefois, Jameson (1962) et Stephens *et al.* (1997) s'intéressaient à l'enrichissement sélectif de *Salmonella* (et donc à la compétition *Salmonella* / flore annexe dans le bouillon d'enrichissement, avec arrêt simultané de croissance, cf. § 3.1.1.) et pas à la compétition entre flores dans un aliment solide. Cette expression effet Jameson est parfois reprise par les défenseurs des fromages au lait cru, mais n'a jamais été validée, à ma connaissance, pour ce type de produits, même s'il est vérifié que ces produits sont des écosystèmes complexes dans lesquels la microbiologie prévisionnelle rencontre ses limites (cf. § 4.3.2.).

## 2.4.3 Modélisation de l'effet Jameson et effet sur la variabilité du $N_{max}$

J'ai proposé une modélisation relativement simple, fondée sur le principe de l'entrée simultanée en phase stationnaire de toutes les flores présentes dans un environnement ou effet Jameson<sup>(3, 33, 35)</sup>. Ce travail est présenté dans l'**annexe V**.

Un modèle de croissance décrivant une interruption simultanée de la croissance de toutes les flores présentes et reposant sur cette simple hypothèse de compétition est apparu suffisant pour la plupart des courbes de croissance de *L. monocytogenes* en présence d'une flore annexe extraites de la littérature.

Notre objectif était de trouver un modèle général permettant de prévoir l'issue d'une culture mixte, en utilisant uniquement les paramètres de croissance usuellement déterminés en culture pure ( $lag_A$ ,  $\mu_{max A}$ ,  $N_{max A}$ ,  $lag_B$ ,  $\mu_{max B}$ ,  $N_{max B}$ ), ainsi que les conditions initiales de la culture mixte ( $N_A(0)$  et  $N_B(0)$ ). Notre modèle repose sur l'hypothèse que les décélérations des deux populations sont simultanées et résultent d'une compétition pour une ressource limitante commune.

J'ai proposé de remplacer la fonction de freinage logistique, équation [6], utilisant le rapport entre la densité de la population d'intérêt ( $N_i$ ) et son maximum ( $N_{max i}$ ), par une autre fonction de freinage logistique, utilisant un rapport entre la densité de la population totale ( $N_A+N_B$ ) et son maximum ( $N_{max tot}$ ). Cette densité maximale de la population totale ( $N_{max tot}$ ) peut être définie empiriquement comme une moyenne pondérée des deux densités de population

maximales.

Le modèle est ici présenté [11] sans fonction d'accélération, mais les accélérations brutale [2] et de Baranyi [3] pourraient être utilisées.

$$\begin{cases} \frac{1}{N_A(t)} \frac{dN_A(t)}{dt} = \mu_{\max A} \left( 1 - \frac{N_A(t) + N_B(t)}{N_{\max tot}} \right) \\ \frac{1}{N_B(t)} \frac{dN_B(t)}{dt} = \mu_{\max B} \left( 1 - \frac{N_A(t) + N_B(t)}{N_{\max tot}} \right) \end{cases} \quad [11]$$

Les hypothèses sous-tendant ce modèle sont les suivantes :

- pas d'effet d'une population sur les paramètres  $\mu_{\max}$  et  $lag$  de l'autre population,
- freinage simultané des deux populations,
- saturation du milieu à un niveau maximal total ( $N_{\max tot}$ ), ce qui pourrait être interprété comme une limitation de la croissance des deux populations par une ressource limitante commune (substrat, espace...), pour laquelle elles seraient en compétition.

Ces hypothèses sont illustrées à la Figure 4. Trois cinétiques de croissance ont été suivies : cinétique de la flore annexe dans de la viande de dinde non artificiellement contaminée ; cinétiques de la flore pathogène (*Listeria monocytogenes*) et de la flore totale (flore "annexe" + *L. monocytogenes*) dans la même denrée, artificiellement contaminée par *L. monocytogenes*. Le modèle [11] avec accélération brutale [23], a été ajusté simultanément à l'ensemble des données (cf. Figure 4), avec l'hypothèse que le comportement de la flore annexe en absence de *L. monocytogenes* est similaire à son comportement dans la denrée contaminée. Plus la population totale est proche de son maximum de décélération, plus la fonction de freinage  $f(t)$  diminue, plus les deux populations décèlent.

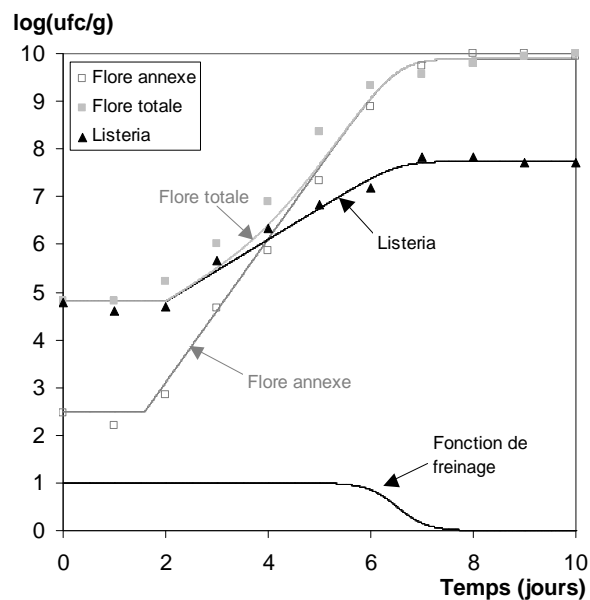


Figure 4. Cinétiques de croissance à 7°C de flore annexe dans de la viande de dinde non artificiellement contaminée ; de la flore pathogène (*L. monocytogenes*) et de la flore totale (flore "annexe" + *L. monocytogenes*) dans de la viande de dinde artificiellement contaminée par *L. monocytogenes*. Ajustement aux données expérimentales : cinétiques ajustées de la flore annexe, de *L. monocytogenes* et de la flore totale ; évolution de la fonction de freinage. Extrait de Cornu *et al.* <sup>(35)</sup>

Pour des denrées alimentaires telles que le lait cru, le saumon fumé ou la viande, dans lesquelles la croissance de la microflore non pathogène ne peut être négligée, la prévision de la croissance d'une flore pathogène, comme *L. monocytogenes*, se heurte au manque de modèles adaptés et simples permettant la prise en compte des interactions bactériennes. La fonction de freinage proposée ici repose sur une hypothèse simple (saturation à un niveau total), qui est apparue suffisante pour décrire la majorité des cas d'interactions observées. Ainsi, ce modèle permettrait de prévoir de manière satisfaisante - dans les cas d'interactions les plus simples - l'issue d'une culture mixte, uniquement à partir des caractéristiques de croissance en culture pure. Ces paramètres peuvent être mesurés expérimentalement mais pourraient également être issus des modèles secondaires de la microbiologie prévisionnelle. Les applications de cette modélisation sont multiples, dans tous les domaines de la microbiologie quantitative.

Au niveau international, d'autres équipes commencent à prendre en compte cet effet Jameson, outre l'équipe de Ross et Mc Meekin déjà nommée. Gimenez & Dalgaard (2004) ont proposé un modèle assez proche de celui mentionné ci-dessus et l'ont validé sur *L. monocytogenes* et flore annexe dans du saumon fumé. Coleman *et al.* (2003) ont utilisé un modèle primaire similaire mais plus simple (avec freinage brutal, cf. équation [8], de toutes les flores simultanément) pour des simulations, de type analyse de risque, de la croissance de *L. monocytogenes*, *Salmonella* et *E. coli* O157:H7 dans de la viande de bœuf et de poulet, en présence de flores annexes. Les auteurs ne présentaient pas de validation au sens strict du modèle, même s'il est fondé sur des données expérimentales.

L'effet Jameson a été modélisé, par freinage brutal, dans la modélisation globale décrite au §2.5.2, ci-après.

## 2.5 Modélisation globale des incertitudes et variabilités de la croissance

Les paragraphes précédents ont permis de recenser différentes sources d'incertitude et de variabilités modélisées en microbiologie prévisionnelle. La variabilité représente l'hétérogénéité inter-individuelle, ou dispersion vraie, d'une grandeur dans une population<sup>(66)</sup>. La variabilité est inhérente au système observé et ne peut être réduite par des observations supplémentaires. L'incertitude provient du manque de connaissance du modélisateur<sup>(66)</sup>, elle n'est donc pas une propriété du système mais de l'état de connaissance du modélisateur. Ces concepts sont particulièrement étudiés dans le contexte de l'appréciation quantitative des risques mais s'appliquent à tous les champs de la microbiologie quantitative. Les travaux qui suivent proposent une démarche d'intégration globale.

### 2.5.1 Applications à *L. monocytogenes* dans le lait cru

J'ai été associée aux travaux de Régis Pouillot qui a proposé une démarche bayésienne d'estimation simultanée des paramètres d'un modèle primaire et d'un modèle secondaire, de leur variabilité et de leur incertitude. L'estimation des paramètres de croissance de *Listeria monocytogenes* en lait cru a été proposée comme application de cette méthodologie. Cette collaboration a fait l'objet de la publication<sup>(5)</sup> présentée dans l'**annexe VI**.

Le modèle de croissance utilisé était un modèle global intégrant en une étape le modèle primaire délai-rupture (cf. modèle [1] avec accélération brutale, équation [3], et freinage logistique, équation [5]) et le modèle secondaire CTMI de Rosso (équation [9]). Ainsi, les

principaux paramètres d'intérêt étaient les trois températures cardinales ( $T_{min}$ ,  $T_{opt}$ ,  $T_{max}$ ) de *L. monocytogenes*, et le taux de croissance optimal ( $\mu_{opt}$ ) de *Listeria monocytogenes* en lait cru à  $T_{opt}$ . Chacun de ces paramètres est supposé suivre une distribution de variabilité, modélisée par une loi normale, dont la moyenne est notée (M) et l'écart-type noté ( $\sigma$ ). La moyenne et l'écart-type (de variabilité) de chaque paramètre sont appelés hyperparamètres et sont caractérisés par une distribution d'incertitude. Des distributions d'incertitude *a priori* ont été proposées pour chaque hyperparamètre, en s'appuyant sur des modélisations antérieures et/ou des avis d'experts. La Figure 5 ci-après présente les résultats de cette analyse avec la distribution empirique des *a posteriori* (issus par inférence bayésienne des *a priori* et des données, résultats bruts de challenge tests de *L. monocytogenes* en lait cru) et l'ajustement de distributions paramétriques aux *a posteriori*.

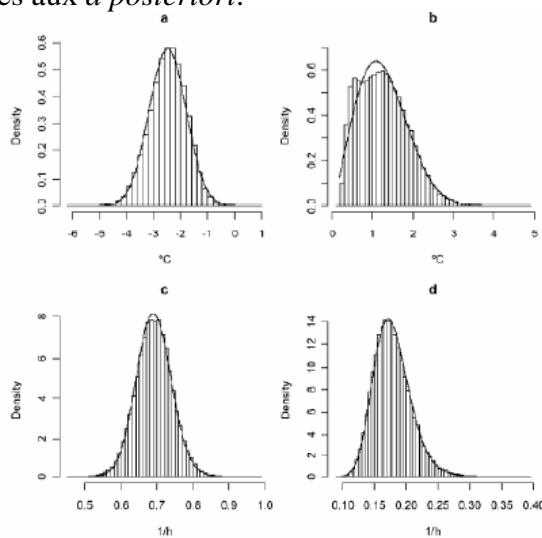


Figure 5. Distributions d'incertitude *a posteriori* sur (a)  $MT_{min}$  (moyenne des  $T_{min}$ , températures minimales des souches de *L. monocytogenes*), (a)  $\sigma T_{min}$  (écart-type inter-souches des  $T_{min}$ ), (c)  $M\mu_{opt}$  (moyenne des  $\mu_{opt}$ , taux de croissance de *L. monocytogenes* en lait à la température optimale, 37°C), (d)  $\sigma\mu_{opt}$  (écart-type des  $\mu_{opt}$ ). Histogrammes : distribution empirique. Traits continus : ajustement paramétrique. Extrait de Pouillot *et al.* <sup>(5)</sup>

### 2.5.2 Applications à *L. monocytogenes* dans le saumon fumé

Un des atouts de la modélisation bayésienne est de permettre très facilement une approche itérative. Ainsi, certains *a posteriori* de l'étude précédente <sup>(5)</sup> ont été utilisés comme *a priori* d'une modélisation de la croissance de *L. monocytogenes* en saumon fumé <sup>(17, 48)</sup>, présenté en **annexe VII**. Les données étaient les résultats bruts de challenge tests réalisés au laboratoire <sup>(18, 46)</sup> et de challenge tests issus de la littérature. De façon similaire à l'étude précédente, un modèle global a été construit, mais le modèle secondaire retenu était le modèle racine carrée, équation [10]. Ainsi de nouvelles distributions d'incertitude sur les hyperparamètres ont été obtenues, cf. Figure 6a. De plus, un modèle semblable a été construit pour simuler la croissance de la flore annexe (en particulier, une flore lactique d'altération). Ainsi, les prévisions de croissance de *L. monocytogenes* en conditions de terrain (populations initiales faibles) prennent en compte la compétition avec la flore du saumon fumé, par effet Jameson.

Cette modélisation a été validée par comparaison à des tests de vieillissement (suivi de *L. monocytogenes* dans des produits naturellement contaminés)<sup>(22)</sup>, cf. **annexe VIII** ; et utilisée pour l'évaluation des risques de listériose lié au saumon fumé, décrite au § 4.2.4.

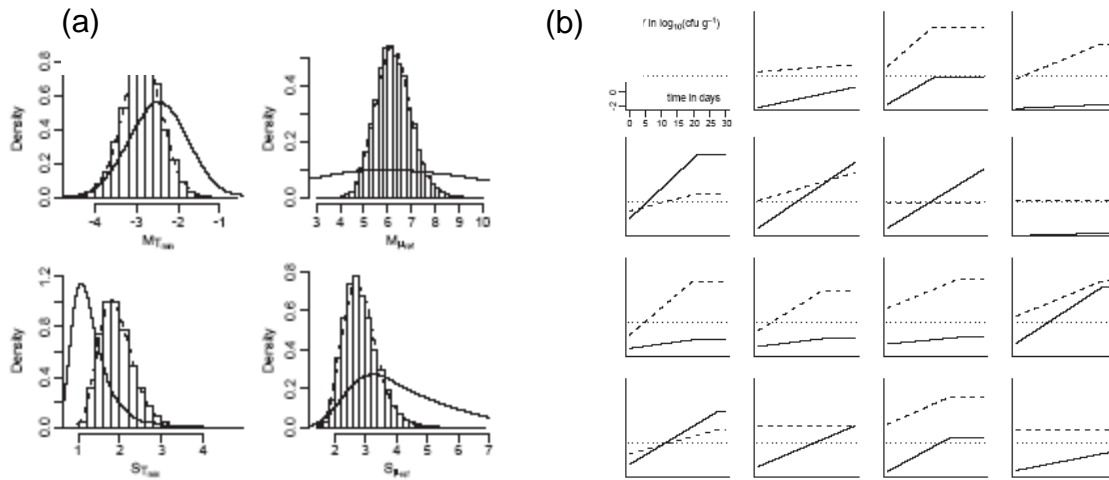


Figure 6. (a) Distributions d'incertitude *a priori* (traits continus) et *a posteriori* (histogramme : distribution empirique : traits pointillés : ajustement paramétrique) sur  $MT_{min}$  (cf. légende figure 5) en °C,  $T_{min}$  (cf. légende figure 5) en °C,  $\mu_{ref}$  (moyenne des taux de croissance de *L. monocytogenes* en saumon fumé à la température de référence, 25°C), (d)  $S_{ref}$  (écart-type inter-souches des températures minimales de *L. monocytogenes*). Histogrammes : distribution empirique. Traits continus : ajustement paramétrique. (b) Simulations de croissance de *L. monocytogenes* et de la flore annexe en saumon fumé. Extrait de Delignette-Muller *et al.* <sup>(17)</sup>

## 2.6 Autres applications

La microbiologie prévisionnelle ne s'applique pas uniquement à la modélisation de la croissance de bactéries dans des aliments. Elle concerne les différents types de dynamique des populations (croissance, mais aussi survie et inactivation) et peut être envisagée pour toute problématique d'écologie microbienne quel que soit l'environnement considéré, tel que les aliments comme développé ci-avant (ou cf. §2.6.2), mais aussi les ateliers (cf. §2.6.1), les sols et effluents <sup>(69)</sup> etc.

### 2.6.1 Modélisation d'opérations d'hygiène (nettoyage-désinfection)

Je collabore avec Brigitte Carpentier et Sophie Peneau, doctorante, pour étudier les courbes de croissance / décroissance de *Pseudomonas* sur les surfaces ouvertes (plans de travail, sols, tapis convoyeurs...) d'atelier agro-industriel (filère viande) au cours des cycles de production/nettoyage.

Les opérations de nettoyage et de désinfection pratiquées sur les surfaces ouvertes des ateliers entraînent une réduction de la flore mais n'éliminent pas la totalité des micro-organismes qui s'y trouvent. Les micro-organismes survivants à ces opérations forment une flore dite résidente souvent dominée par des bactéries du genre *Pseudomonas*, et pouvant abriter des pathogènes, dont *L. monocytogenes*. L'objectif de la thèse de Sophie Peneau <sup>(67)</sup> est d'appréhender les mécanismes qui conduisent à l'installation de cette flore résidente de *Pseudomonas*. Plus spécifiquement, cette flore est quantifiée en termes de flore cultivable et de flore non cultivable.

Des expériences en laboratoire ont permis de reproduire les conditions qui règnent dans des ateliers de transformation de viande bovine. Des éprouvettes en céramique ont été contaminées, une seule fois, par *Pseudomonas fluorescens* en présence d'exsudat de viande

stérilisé, incubées à 10°C et soumises quotidiennement à un nettoyage et une désinfection et à un nouvel encrassement par de l'exsudat de viande stérilisé. Cela entraîne une accumulation de cellules microbiennes cultivables qui atteint de l'ordre 4.7 log(ufc.cm<sup>2</sup>), pour la population cultivable, et 6.4 log (cellules viables.cm<sup>2</sup>), pour la population totale en une dizaine de jours. La quantité observée de cellules non cultivables ne peut pas s'expliquer par l'accumulation de cellules mortes, nous en avons donc déduit que les cellules non cultivables se divisent sur la surface sans que ces divisions ne puissent se poursuivre jusqu'à la formation de colonies visibles à l'œil nu sur une gélose.

Un modèle Monte Carlo, cf. § 4.1, a été construit pour décrire l'évolution de la charge microbienne cultivable et non cultivable en reproduisant des conditions de terrain. Nous pourrions ainsi tester différents scénarii de façon à pouvoir déterminer l'influence de différents facteurs (taille de l'inoculum, température de l'atelier, fréquence et intensité des opérations d'hygiène, etc.) sur la charge microbienne des surfaces. En particulier, il serait intéressant de rechercher à partir de quel inoculum ou en dessous de quelle efficacité des traitements de nettoyage-désinfection une accumulation de cellules est possible.

Ce travail est poursuivi et appliqué à un pathogène, au cours de la thèse de Nesrine Marouani<sup>(70)</sup>.

## 2.6.2 Modélisation de l'inactivation thermique

Les travaux de quantification de l'inactivation microbienne ont essentiellement porté sur les traitements thermiques industriels, dans des conditions très maîtrisées de couples temps-température. Les cuissons domestiques traditionnelles (poêle, four...) ont rarement fait l'objet de modélisations très détaillées, mais il est couramment admis que la destruction atteinte par une cuisson avant consommation est suffisante pour éliminer le danger. Néanmoins, cette hypothèse peut être remise en question dans le cas de produits consommés peu cuits à cœur, tel que le steak haché est couramment consommé en France.

Nous nous intéressons actuellement aux modalités de cuisson de steaks hachés de bœuf en restauration domestique et en restauration sociale hors foyer (cantines scolaires, hôpitaux) et à leurs conséquences sur l'inactivation thermique de *Salmonella* et d'*E. coli* O157:H7<sup>(60)</sup>, dans le cadre d'évaluations de risque développées au § 4.3.

### 3. Incertitudes et variabilités en microbiologie analytique

La microbiologie est une science définie par ses objets d'étude, les micro-organismes (bactéries, levures, moisissures...), mais aussi et surtout par ses techniques d'études, fondées sur les principes de l'isolement et de la culture pure <sup>(61)</sup>. La microbiologie analytique, c'est à dire l'ensemble des méthodes de détection, de quantification, ou caractérisation des micro-organismes, est donc à la base de la microbiologie.

#### 3.1 Méthodes de détection

##### 3.1.1 Principe et historique des méthodes de détection par enrichissement sélectif

Les méthodes de détection permettent d'analyser si le micro-organisme d'intérêt (ou cible) est présent, et sont généralement fondées sur le principe de l'enrichissement sélectif. La méthode de détection par enrichissement d'une population minoritaire au sein d'un écosystème a été initiée par les travaux de Winogradsky et de Beijerinck <sup>(61)</sup>.

A chaque population-cible correspond une méthode de dénombrement dont le mode opératoire peut être défini dans des normes. Le principe général reste néanmoins le même quels que soient l'aliment et la méthode, avec les étapes décrites ci-après.

- *Enrichissement* : cette étape consiste à ensemercer un milieu liquide nutritif sélectif avec une quantité d'aliment définie (la prise d'essai). Le mélange résultant est incubé dans des conditions permettant un développement suffisant de la population-cible. La sélectivité du milieu repose sur la présence d'une substance particulière comme seule source possible d'énergie, de carbone ou d'azote, ou d'un inhibiteur de croissance. La population-cible, capable d'utiliser la substance considérée, ou résistante à l'inhibiteur, ou la mieux adaptée aux conditions de culture, se trouve favorisée, de sorte qu'elle devient majoritaire. Il peut y avoir deux étapes d'enrichissement successives.
- *Isolement* : une goutte de la suspension ainsi obtenue est étalée en surface d'un milieu gélosé, sélectif et/ou différentiel (sur lequel la population-cible est identifiable) dans une boîte de Petri. Il peut y avoir deux milieux différents utilisés en parallèle.
- *Incubation* : les boîtes sont incubées dans des conditions permettant un développement suffisant de la population-cible
- *Lecture* : la confirmation de la présence sur chaque boîte (de chaque milieu après chaque enrichissement) est effectuée par des tests supplémentaires.
- *Expression des résultats* : présence ou absence dans la prise d'essai.

##### 3.1.2 Modélisation du processus d'enrichissement de *L. monocytogenes*

Au cours de ma thèse <sup>(61)</sup>, j'ai initié un travail sur le protocole de détection de *L. monocytogenes* par enrichissement sélectif.

*L. monocytogenes* et *L. innocua* sont deux espèces bactériennes physiologiquement proches et présentes dans les mêmes produits alimentaires, mais seule la première est pathogène pour l'homme. Or les méthodes de détection de *L. monocytogenes* reposent sur une ou deux étapes d'enrichissement en milieux sélectifs du genre *Listeria* (et non de l'espèce *monocytogenes*). Ainsi, la procédure de référence ISO 11290.1 (ISO, 1996a) consiste en deux enrichissements sélectifs successifs dans des milieux de culture (24h en bouillon Fraser demi, puis 48h en bouillon Fraser). A l'époque de mes travaux, et jusqu'en 2004 (ISO, 2004), il était préconisé au terme de chaque enrichissement d'ensemencer la suspension obtenue sur un milieu gélosé

de type Palcam et/ou Oxford, sur lequel le genre *Listeria* forme des colonies caractéristiques. Seules 5 colonies étaient choisies aléatoirement pour une identification complète (en particulier, distinction entre *L. monocytogenes* et *L. innocua*). Si les deux espèces sont présentes dans le même aliment et co-sélectionnées par la procédure, il est possible qu'au terme de chacun des deux enrichissements les 5 colonies choisies soient des *L. innocua*, auquel cas on conclut à tort à l'absence de *L. monocytogenes* dans le produit initial.

Au cours de ma thèse, j'ai étudié les interactions entre souches de *L. monocytogenes* et souches de *L. innocua* dans les bouillons d'enrichissement <sup>(4, 31, 42)</sup>. J'avais sur ce sujet développé une collaboration avec Martin Kalmokoff sur les bactériocines produites par le genre *Listeria*. Le fait que *L. innocua* puisse surpasser *L. monocytogenes* au cours d'une procédure d'enrichissement avait été bien établi. Mais il avait été attribué en général à une différence d'aptitude de croissance entre les deux espèces dans les milieux sélectifs. De ce point de vue, mes résultats venaient plutôt en contre-point de la littérature. En bouillon demi Fraser (jamais utilisé dans de telles expériences), il n'y a aucune différence entre les deux espèces. En bouillon Fraser, les *L. monocytogenes* ont certes en moyenne une croissance plus lentes que les *L. innocua*, mais la variabilité inter-espèces n'est pas significative devant la variabilité intra-espèce. J'ai donc montré qu'il est possible, mais pas systématique, que *L. monocytogenes* soit surpassée par *L. innocua*. En revanche, j'ai validé l'hypothèse d'un effet inhibiteur de *L. innocua* sur *L. monocytogenes*, qui avait rarement été évoquée.

A mon arrivée à l'Afssa, j'ai complété cette étude en y intégrant une estimation de l'impact des ces interactions sur le risque de faux-négatifs et donc sur la sensibilité de la méthode <sup>(34)</sup>.

L'objectif de cette étude était d'évaluer cette sensibilité en faisant appel aux modèles de croissance bactérienne (développés dans le domaine de la microbiologie prévisionnelle, cf. partie 3) et à des simulations Monte Carlo (notamment utilisés en AQR, cf. partie 4). Ces simulations ont permis de prendre en compte la variabilité des paramètres ; les distributions ayant été ajustées à partir de résultats préliminaires. En prenant en compte uniquement l'effet des compétitions, la sensibilité de la méthode est estimée à 69% en fin d'enrichissement 1, à 61% en fin d'enrichissement 2 et à 74% pour l'ensemble de la méthode de recherche (soit 26% de faux négatifs). En prenant également en compte l'inhibition par bactériocines et par phages, la sensibilité pour l'ensemble de la méthode de recherche est estimée à 24%.

Par la suite, Nathalie Gnanou-Besse a poursuivi ces travaux et cette collaboration avec Martin Kalmokoff, ce qui a permis de confirmer expérimentalement les résultats antérieurs <sup>(64)</sup>. Les concepts développés sur le sujet ont également été repris par Antoine Vimont, dans le cadre de ces travaux <sup>(68)</sup> sur l'optimisation de l'enrichissement sélectif d'*E. coli* O157:H7 (et autres sérotypes d'*E. coli* producteurs de shiga-toxines).

### 3.1.3 Incertitude d'échantillonnage

Les méthodes de détection permettent de détecter la présence d'une flore cible dans une prise d'essai prélevée sur une unité de produit et renseignent uniquement sur la prise d'essai analysée. Néanmoins, l'analyse étant destructive, l'intérêt de la méthode n'est pas tant de connaître le statut de l'objet analysé, mais d'utiliser le résultat pour inférer sur le pourcentage d'unités contaminés dans une population plus large, e.g. le lot en contrôle de routine, ou l'ensemble des unités produites ou consommées.

Quelle que soit la méthode de détection utilisée, et quelle que soit son incertitude analytique, une autre dimension d'incertitude est à considérer lors de l'exploitation de résultats de type présence/absence : l'incertitude d'échantillonnage et son impact sur l'incertitude d'estimation du pourcentage de contaminés. Nous avons proposé deux critères d'évaluation pour comparer, par simulations, quatre méthodes de construction exprimant l'incertitude d'échantillonnage<sup>(9, 38, 66)</sup>, cf. cf. **annexe IX**. Le premier critère proposé, noté  $C_1$ , est l'espérance de l'erreur quadratique moyenne de la distribution d'incertitude et exprime donc la proximité entre la moyenne de la distribution d'incertitude et la valeur vraie. De façon similaire, le deuxième critère proposé, noté  $C_2$ , exprime la proximité entre la médiane de la distribution d'incertitude et la valeur vraie. Plus les critères prennent des valeurs faibles, meilleure est la méthode.

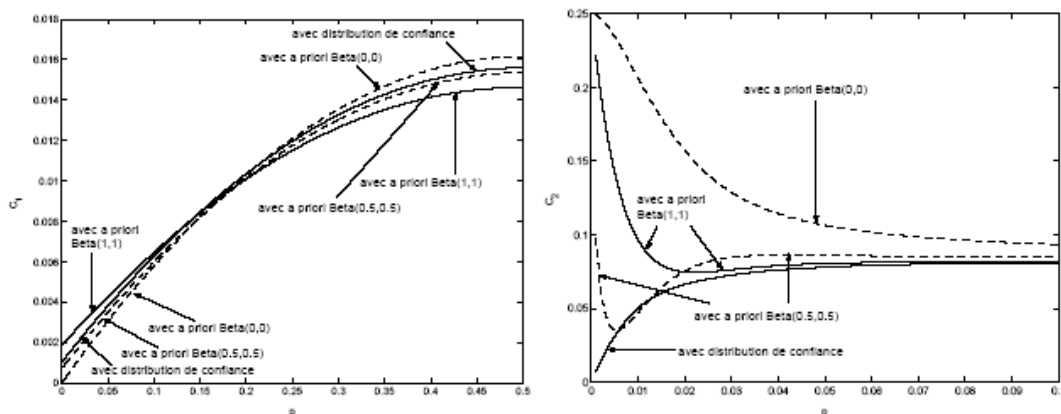


Figure 7. Résultats de la comparaison par simulations de 4 méthodes exprimant l'incertitude d'échantillonnage, en fonction de  $p$ , valeur vraie de la proportion à estimer, au travers de 2 critères  $C_1$ , sur la moyenne, et  $C_2$ , sur la médiane. Par symétrie, les résultats pour  $p$  entre 0.5 et 1 peuvent être obtenus en remplaçant  $p$  par  $1-p$ . Pour le critère  $C_2$ , les résultats des 4 méthodes sont équivalents pour  $p$  compris entre 0.1 et 0.9. Extrait de Miconnet et al.<sup>(38)</sup>

Nous avons ainsi démontré (cf. Figure 7) que l'approche largement recommandée et utilisée en AQR (Vose, 2000), *i.e.* la construction d'une loi Beta par inférence bayésienne avec un a priori uniforme entre 0 et 100%, équivalent à la loi Beta (1,1), pouvait être biaisée, particulièrement dans le cas de très faibles prévalences. En revanche, nous avons recommandé une approche similaire, l'utilisation de l'a priori Beta (0.5,0.5), tout aussi simple d'utilisation.

Une approche plus originale (Schweder & Hjort, 2002), dite par "distributions de confiance", donnait des résultats proches mais semble moins applicable, car moins facile à implémenter.

Cette méthode bayésienne avec l'a priori Beta (0.5,0.5) a été appliquée aux résultats de prévalence de *L. monocytogenes* en saumon fumé<sup>(21, 22, 39, 46)</sup>.

## 3.2 Méthodes de dénombrement

### 3.2.1 Principe des méthodes de dénombrement sur boîtes de Petri

Le dénombrement microbien consiste à déterminer le taux de contamination d'un aliment par un micro-organisme ou un groupe de micro-organismes cible. A chaque cible correspond une méthode de dénombrement dont le mode opératoire peut être défini dans des normes. Le principe général reste le même quels que soient l'aliment et la méthode, avec les étapes décrites ci-après.

- *Préparation de l'échantillon à analyser* : cette étape consiste à prélever la quantité

d'aliment désirée (la prise d'essai), à la mélanger à un diluant et à rendre l'ensemble homogène. On obtient ainsi la suspension-mère.

- *Dilutions successives* : cette étape permet de diluer la suspension-mère jusqu'à obtenir une concentration microbienne exploitable.
- *Ensemencement des boîtes de Petri* : un volume défini de la suspension mère et/ou des dilutions *ad hoc* sont déposées dans ou sur un milieu gélosé nutritif, en boîtes de Petri.
- *Incubation* : les boîtes sont incubées à une température idéale de développement pendant une durée suffisante.
- *Lecture* : chaque cellule déposée forme un amas (ou colonie) ; le nombre de colonies par boîte est dénombré ; on suppose par la suite qu'il y avait une "unité" de micro-organisme ayant formé chaque colonie.
- *Expression des résultats* : le taux de contamination de l'aliment est exprimé en nombre d'unités formant colonie par gramme (ufc/g) ou par millilitre (ufc/ml) d'aliment .

### 3.2.2 Optimisation de méthode

Nathalie Gnanou-Besse <sup>(6, 64)</sup> a mis au point une méthode de dénombrement de *L. monocytogenes* dans le saumon fumé, dont le seuil théorique de quantification a été abaissé à 0.2 ufc/g (versus 10 ou 100 ufc/g avec la méthode normalisée ISO 11290.2 (ISO, 1996a)), grâce au recours à la filtration de la suspension-mère. Par rapport au schéma défini ci-dessus, les dilutions successives sont remplacées par des filtrations de volumes croissants de la suspension, mère sur des membranes, qui sont ensuite déposées à la surface de milieu gélosé nutritif en boîtes de Petri. J'ai été amenée à collaborer avec Bertrand Lombard pour l'évaluation des caractéristiques de cette méthode. Cette méthode a ensuite été appliquée <sup>(22, 49)</sup> cf. **annexe VIII**, pour une enquête sur les niveaux de contamination en *L. monocytogenes* dans le saumon fumé "sortie usine" afin de caractériser le niveau initial de notre chaîne alimentaire dans les calculs d'exposition dans l' AQR présentée au § 4.2.

### 3.2.3 Incertitude analytique

Il y a toutefois peu de différences entre les causes d'incertitude analytique de cette méthode spécifique par filtration, et les méthodes plus classiques, décrites au §3.2.1, et telle que j'ai pu les étudier avec Bertrand Lombard. Dans le cadre de sa thèse de doctorat sur l'exploitation des essais inter-laboratoires <sup>(65)</sup>, nous avons comparé différentes méthodes de calcul (robustes ou non) de reproductibilité intra- et inter-laboratoires de la méthode classique de dénombrement, à partir des résultats d'un essai inter-laboratoires. Nous avons également remis en question la pertinence de la transformation systématique des données en logarithme décimal <sup>(11)</sup>, cf. **annexe X**. En effet, sur l'exemple traité, dans lesquels des aliments modèles avaient été contaminés artificiellement à des taux remarquablement homogènes, les résultats expérimentaux étaient plus proches de la normalité que de la log-normalité. L'intérêt des statistiques robustes pour estimer les critères de répétabilité et de reproductibilité a été souligné, et illustré avec l'exemple choisi.

Par ailleurs, nous avons ensemble coordonné différentes études pour l'ISO sur l'incertitude analytique des dénombrements sur boîtes de Petri. Nous avons rédigé les protocoles et je me suis chargée de collecter les résultats et d'encadrer le stage de Claudette Ah-Soon <sup>(58)</sup> au cours duquel nous avons traité les résultats, par des analyses de variance à effets aléatoires (ISO, 1994). Nous avons montré qu'une part parfois majoritaire de l'incertitude de mesure était liée à la nature physique de l'aliment analysé (liquide, poudre, ou solide plus ou moins homogène). Ce travail a conduit à la rédaction d'une spécification technique ISO (ISO, 2006).

## 4. Incertitudes et variabilités en AQRM

Mon expérience à l'Afssa, tant en recherche, au travers de différents projets, qu'en expertise, au cours de ma participation au comité d'experts spécialisés en microbiologie et à différents groupes de travail, m'a permis de me consacrer largement au thème de l'évaluation des risques, et plus particulièrement aux méthodes de l'appréciation quantitative des risques microbiens (AQRM).

### 4.1 Analyse des risques microbiens

#### 4.1.1 Définitions

La terminologie adoptée dans ce texte est celle du Codex Alimentarius <sup>(24, 29)</sup>. Le terme "danger alimentaire" désigne un agent biologique, chimique ou physique (ici un micro-organisme) susceptible d'être présent dans la denrée alimentaire considérée et d'avoir un effet néfaste sur le consommateur. Le terme "risque" intègre à la fois des informations sur la probabilité de l'effet néfaste et sur sa gravité, du fait de la présence d'un ou de plusieurs dangers dans un aliment.

L'analyse des risques (*risk analysis*) comprend la phase d'évaluation – ou appréciation – des risques (*risk assessment*), mais aussi les phases de gestion des risques (*risk management*) et de communication sur les risques (*risk communication*), cf. Figure 8a. La séparation fonctionnelle entre l'évaluation des risques et la gestion des risques permet de garantir l'impartialité du processus d'évaluation des risques. Cependant, certaines interactions sont nécessaires entre les évaluateurs et les gestionnaires des risques pour garantir une évaluation exhaustive des risques.

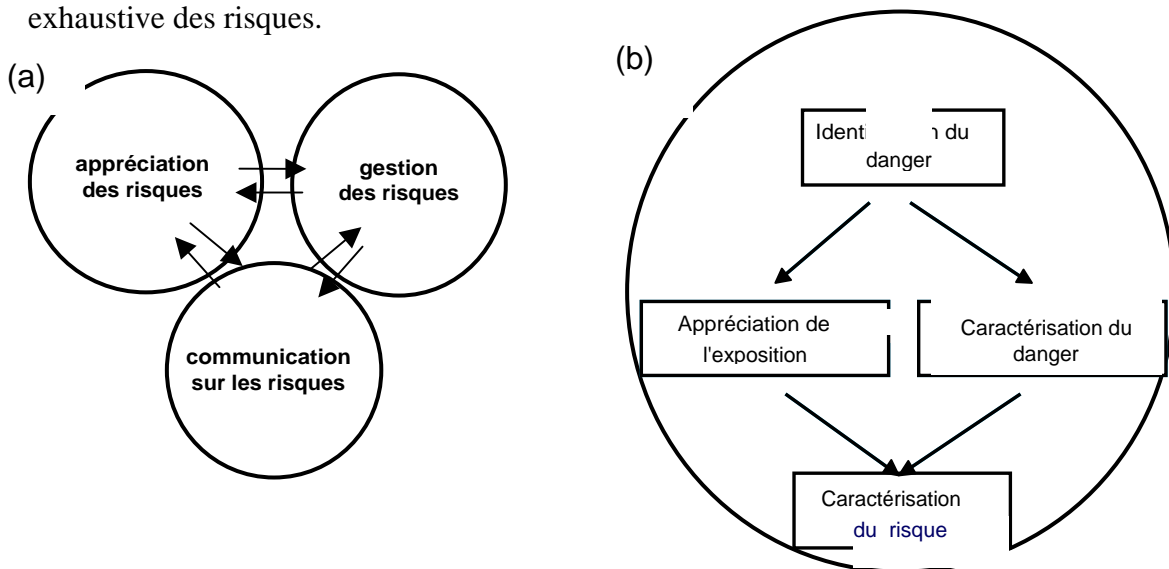


Figure 8. (a) : Représentation schématique de l'analyse de risque avec les phases d'appréciation des risques (*risk assessment*), de gestion des risques (*risk management*) et de communication sur les risques (*risk communication*). (b) : Représentation schématique de l'appréciation de risques divisée en quatre parties : l'identification des dangers (*hazard identification*), l'appréciation de l'exposition (*exposure assessment*), la caractérisation des dangers (*hazard characterization*) et la caractérisation des risques (*risk characterisation*). Extrait de Cornu et al. <sup>(24)</sup>

L'appréciation ou évaluation des risques, phase scientifique de l'analyse des risques, est elle-même classiquement divisée en quatre parties, cf. Figure 8b : l'identification des dangers (*hazard identification*), l'évaluation de l'exposition (*exposure assessment*), la caractérisation

des dangers (*hazard characterization*) et la caractérisation des risques (*risk characterization*).

L'identification des dangers est une phase préalable d'étude du danger. Elle a pour but d'identifier les micro-organismes ou toxines en rapport avec les aliments. Cette identification est essentiellement un processus qualitatif. Les informations sur les dangers peuvent provenir de documentations scientifiques, de bases de données (industrie alimentaire, agences gouvernementales, organisations internationales), ainsi qu'en sollicitant des avis d'experts. Les informations pertinentes comprennent des données dans des domaines tels que : études cliniques, études et surveillance épidémiologiques, études sur les animaux en laboratoire, enquêtes sur les caractéristiques des micro-organismes, interaction entre les micro-organismes et leur environnement ainsi que des études sur des micro-organismes et des situations analogues.

L'évaluation de l'exposition détermine le niveau de présence des pathogènes ou des toxines microbiologiques (compte tenu des divers degrés d'incertitude) ainsi que la probabilité de leur apparition dans les aliments au moment de la consommation. L'évaluation de l'exposition doit donc décrire la chaîne alimentaire depuis un stade initial choisi par le modélisateur (e.g. production primaire, production secondaire, distribution) jusqu'à la consommation. La majorité des événements à modéliser dans ce processus peuvent être répertoriés en 6 catégories : croissance du danger (développement microbien), inactivation du danger (mortalité microbienne), mélange, partition, retrait (élimination de certaines unités) et (re)contamination <sup>(72)</sup>.

La caractérisation des dangers fournit une description qualitative ou quantitative de la gravité et de la durée des effets adverses pouvant résulter de l'ingestion d'un micro-organisme ou de ses toxines présents dans un aliment. Une évaluation de la relation dose-réponse devrait être effectuée si les données sont disponibles. Cette relation décrit la probabilité d'infection voire de maladie en fonction de la dose ingérée, c'est-à-dire de l'exposition.

Enfin, la caractérisation des risques consiste à intégrer le résultat des 3 étapes précédentes en effectuant une estimation qualitative ou quantitative de la probabilité et de la gravité des effets adverses susceptibles de se produire dans une population donnée. Ce résultat doit prendre en compte les facteurs d'incertitudes associés au résultat final.

#### 4.1.2 Approche simulatoire de l'incertitude et de la variabilité

Un modèle d'évaluation de l'exposition permet donc d'estimer une contamination finale ou une exposition à partir d'un grand nombre d'entrées. Ces entrées décrivent la "vie" du produit de la manière la plus exhaustive possible : paramètres de contamination au point initial (production primaire ou secondaire), paramètres relatifs à la croissance et la mortalité microbiennes dans le produit, voire le grammage de la ration consommée. Un modèle de caractérisation des risques permet d'estimer un risque à partir des mêmes paramètres d'entrée, ainsi que des paramètres caractérisant la relation dose-réponse.

Ces estimations peuvent être ponctuelles : à chaque entrée est attribuée une valeur unique (par exemple la moyenne la plus probable ou la pire), et une seule valeur est alors obtenue en sortie. Néanmoins, ces estimations ponctuelles ne couvrent pas l'intégralité des possibilités, elles ne prennent en compte ni la variabilité, inhérente au système observé, qui représente l'hétérogénéité inter-individuelle, ou dispersion vraie, d'une grandeur dans une population <sup>(28, 66)</sup>, ni l'incertitude inhérente à l'état de connaissance du modélisateur <sup>(28, 66)</sup>. Il est donc

recommandé de caractériser chaque entrée par une simple, ou double, distribution, en caractérisant l'incertitude et/ou la variabilité. Les simulations probabilistes par Monte Carlo (tirages aléatoires) permettent ensuite de propager l'incertitude et la variabilité des entrées vers la ou les sorties du modèle.

## 4.2 Modélisation du risque de listériose lié aux produits réfrigérés

Depuis mon arrivée à l'Afssa, une partie importante de mon activité de recherche a été consacrée au projet LmPR, visant la construction d'une démarche interdisciplinaire de description du processus sanitaire modulant l'exposition au danger *L. monocytogenes* dans les produits réfrigérés <sup>(24, 43, 50)</sup>.

### 4.2.1 Champ de l'analyse

Ce projet était appliqué à trois produits alimentaires industriels, produits en France, commercialisés conditionnés en France en libre service : le Munster au lait pasteurisé, les rillettes du Mans pur porc (charcuterie cuite) et le saumon fumé à froid. Pour ces trois produits, la source la plus probable de *L. monocytogenes* dans les produits contaminés est une contamination par l'environnement en cours de process. En raison de la complexité de la modélisation de cet événement, il a été choisi, pour les trois produits, que le stade initial pour la description de la chaîne alimentaire soit la "sortie usine". Tous les produits étant commercialisés en conditionnements étanches, l'éventualité d'une recontamination ultérieure au stade initial a été exclu. D'autre part il a été admis que tous ces produits étaient consommés en l'état, sans cuisson avant consommation, l'inactivation thermique n'a donc pas été modélisée. Le seul événement microbien décrit était donc la croissance microbienne.

### 4.2.2 Munster au lait pasteurisé

L'étude de cas s'est heurtée à différents obstacles :

- une prévalence en *L. monocytogenes* faible (3 produits positifs sur 212 testés, soit 1,4% IC95 [0,3% - 4,1%]) et en diminution ; les expérimentations sur des produits naturellement contaminés (notamment le dénombrement de la contamination sortie usine et les tests de vieillissement) ne peuvent donc pas (facilement) être réalisés sur des produits prélevés aléatoirement "sortie usine" ou à la distribution ;
- de très grandes difficultés, voire une impossibilité, à accéder à des données ou observations industrielles (qui aurait pu pallier le manque de produits naturellement contaminés) ;
- la non-validation, à ce jour, les méthodes et les modèles classiques de la microbiologie prévisionnelle pour prédire le comportement de *L. monocytogenes* sur une croûte lavée d'un fromage à pâte molle affiné, au cours de sa vie commerciale (tandis que le comportement au cours de l'affinage semble correctement prédit).

Les conditions nécessaires à la construction d'un modèle d'AQR ne nous semblaient donc pas réunies.

### 4.2.3 Rillettes

L'étude de cas sur les rillettes s'est déroulée dans des circonstances très différentes puisqu'elle a été réalisée en collaboration avec la filière. En utilisant les informations acquises

sur la prévalence et la fréquence de consommation, et l'incertitude d'échantillonnage associée, nous avons l'incertitude sur le nombre annuel d'expositions à *L. monocytogenes* lié aux rillettes en France, une exposition étant définie comme une consommation de rillettes contaminées (cf. **annexe XI**)<sup>(27)</sup>.

Devant la différence évidente entre le nombre prédit d'expositions, environ 850 000 par an (en ne retenant que les médianes d'incertitude), et le nombre de listérioses (toutes causes confondues) annuel en France (environ 200), la confusion éventuelle entre exposition et maladie n'est plus possible. En effet, la probabilité d'avoir une listériose suite à une exposition n'est pas égale à 1, elle dépend fortement d'une part de la condition physiologique du consommateur exposé et d'autre part du niveau de contamination de l'aliment consommé. Cette relation est exprimée par la loi dose-réponse.

Cette modélisation du risque a été amorcée dans le cas des rillettes<sup>(59)</sup> mais mieux développée dans le cas du saumon fumé, exposé ci-après.

#### 4.2.4 Saumon fumé

Pour le saumon fumé, les données nécessaires ont pu être acquises expérimentalement, ce qui a permis une modélisation plus précise et plus exhaustive. La plupart des données et modèles ayant été intégrés dans cette modélisation ont été présentés dans les parties précédentes (§ 2.2, 2.4, 2.5, 3.1, 3.2), les autres acquisitions concernant les profils temps-températures du saumon fumé de la sortie usine à la consommation<sup>(15)</sup> et les données de consommation (Volatier, 1999). L'exposition à *L. monocytogenes* lors d'une consommation de saumon fumé (contaminée ou quelconque) a été estimée et différents scénarii ont été comparés, cf. Tableau 2.

	Moyenne	Fractiles de variabilité	
		50%	99%
<b>Exposition (log ufc) lors d'une consommation de saumon fumé contaminé</b>			
Modèle de référence	2,9 [2,2 ; 3,6]	2,5 [1,9 ; 3,2]	8,7 [7,3 ; 9,6]
Scénario : durée de vie max. = 15j	2,7 [2,1 ; 3,4]	2,4 [1,8 ; 3,1]	7,8 [6,3 ; 9,0]
Scénario : meubles de vente à 4°C (fixe)	2,6 [2,0 ; 3,3]	2,2 [1,7 ; 2,9]	8,4 [6,8 ; 9,4]
Scénario : réfrigérateurs à 4°C (fixe)	2,3 [1,81 ; 3,0]	2,1 [1,6 ; 2,6]	7,5 [5,9 ; 8,8]
Scénario : durée de vie max. après achat = 7j	2,7 [2,1 ; 3,4]	2,4 [1,9 ; 3,1]	7,9 [6,3 ; 9,1]
Scénario : contamination max. initiale = 1ufc/g	2,7 [2,1 ; 3,5]	2,4 [1,8 ; 3,0]	8,6 [7,17 ; 9,5]
<b>Exposition (log ufc) lors d'une consommation de saumon fumé</b>			
Modèle de référence	0,326 [0,217, 0,480]	0	5,7 [4,3 ; 7,4]
Scénario : durée de vie max. = 15j	0,310 [0,206, 0,456]	0	5,3 [4,1 ; 6,7]
Scénario : meubles de vente à 4°C (fixe)	0,297 [0,197, 0,437]	0	5,2 [4,0 ; 6,8]
Scénario : réfrigérateurs à 4°C (fixe)	0,270 [0,179, 0,398]	0	4,6 [3,61 ; 6,0]
Scénario : durée de vie max. après achat = 7j	0,311 [0,206, 0,456]	0	5,2 [4,09 ; 6,7]
Scénario : contamination max. initiale = 1ufc/g	0,314 [0,207, 0,463]	0	5,5 [4,2 ; 7,2]
Scénario : prévalence divisée par 2	0,163 [0,108, 0,240]	0	4,5 [3,4 ; 5,9]

Tableau 2 : Estimation et fractiles d'incertitude [2,5% ; 95%] sur la moyenne et les fractiles de variabilité (50% et 99%) des niveaux d'expositions à *L. monocytogenes* suite à la consommation de saumon fumé contaminé ou quelconque.

Les paramètres sur lesquels faire porter les scénarii ont été choisis d'après l'analyse de sensibilité du modèle (résultats non présentés) et les valeurs alternatives ont été choisies comme *a priori* atteignables.

Ces éléments permettent de quantifier l'impact de potentielles mesures de gestion de risque. Ainsi, l'amélioration de la maîtrise de la chaîne du froid (limitation des durées et/ou des températures) dans les maillons commerciaux et surtout domestiques apparaît essentielle pour réduire l'exposition à *L. monocytogenes* et par suite le risque de listériose.

La réflexion méthodologique et les résultats concernant l'exposition sont présentés dans un article soumis <sup>(21)</sup>, cf. **annexe XII**. Un 2ème article axé sur les résultats en termes de risque est en préparation.

Enfin, un rapport du projet LmPR, rassemblant notamment une quinzaine de publications préparées dans le cadre du projet, sera édité et présenté publiquement le 29 novembre 2006.

### **4.3 Modélisation du risque de salmonellose et de syndrome hémolytique urémique lié au steak haché congelé**

Dans le domaine des risques alimentaires microbiens, la conservation et la préparation de la denrée avant consommation, constituent une étape vraisemblablement clé mais à ce jour peu ou mal caractérisée. Le projet décrit ci-avant a particulièrement montré l'impact de la durée et de la température de la conservation domestique réfrigérée sur le risque de listériose.

Nous étudions le versant préparation, et en particulier cuisson, de cette étape au travers d'une étude de cas sur le steak haché, couramment consommé peu cuit à cœur en France, et qui a été mis en cause comme agent transmetteur de *Salmonella* et *E. coli* O157:H7. Par exemple, les résultats de trois investigations d'épidémies de salmonellose en France de 1998 à 2000 mettaient en évidence l'implication de la viande hachée de bœuf insuffisamment cuite. De plus, une étude réalisée par Le Réseau National de la Santé Publique en 1996 a permis de montrer que la consommation de viande hachée de bœuf non cuite à cœur constituait un facteur de risque de survenue des infections à *Salmonella* Typhimurium chez l'enfant de moins de 15 ans. Plus récemment, à savoir en 2005, 69 personnes, en majorité des enfants de 2 à 9 ans, ont été infectés par des souches de *E. coli* O157:H7 et 18 d'entre elles ont développé un syndrome hémolytique et urémique. Elles avaient consommé des steaks hachés contaminés par O157:H7.

Il nous est donc apparu essentiel de caractériser l'impact de la cuisson des steaks hachés sur les risques microbiens. Je suis associée à un groupe de travail sur *E. coli* O157:H7 et l'unité de recherche à laquelle j'appartiens prépare un projet sur *Salmonella* Typhimurium. Un des objectifs du projet sera d'évaluer l'impact sur les risques microbiens d'une action de sensibilisation / communication.



## 5. Conclusion et perspectives

---

Les concepts d'incertitude et de variabilité, qui pourraient *a priori* sembler éloignés des préoccupations des microbiologistes, occupent une place majeure dans les enjeux de la microbiologie alimentaire actuelle. Les applications présentées dans ce mémoire en illustrent quelques exemples : cerner et exprimer la qualité des données acquises (incertitude analytique), appliquer les modèles prévisionnels, souvent développés dans des conditions expérimentales simples, à des écosystèmes alimentaires complexes et en quantifier les limites (incertitude de modélisation), appréhender la diversité du monde biologique, des micro-organismes aux consommateurs (variabilité), et enfin évaluer l'impact relatif de ces différentes sources d'incertitude et de variabilité dans les prévisions du comportement microbien et de ces conséquences, dont le risque alimentaire.

Cela apparaît aujourd'hui particulièrement d'actualité dans le nouveau contexte réglementaire du paquet hygiène. Ainsi, le règlement européen 2073/2005 (article III paragraphe 2 et annexe II) sur les critères applicables aux denrées alimentaires accorde une importance inédite aux études scientifiques sur le développement et la survie des micro-organismes (et tout particulièrement de *Listeria monocytogenes*) dans les aliments et attire explicitement l'attention sur la " variabilité inhérente au produit, aux micro-organismes en question ainsi qu'aux conditions de transformation et d'entreposage." C'est une étape décisive dans l'essor de la microbiologie quantitative alimentaire, née il y a une quinzaine d'années. Le laboratoire auquel j'appartiens, le Lerqap, devra au cours de sa mandature 2006-2010 en tant que Laboratoire Communautaire de Référence pour *Listeria monocytogenes* formuler à l'intention des pays membres des recommandations à ces sujets.

Cette importance grandissante de la microbiologie quantitative dans le contexte agro-alimentaire industriel et réglementaire nous incite à rendre disponibles et accessibles pour les acteurs de la sécurité des aliments les outils, des plus simples aux plus sophistiqués, développés en recherche. Cette diffusion ne doit pas s'effectuer au détriment de la prudence d'interprétation nécessaire, les lacunes et limites (ou incertitudes) de ces outils devant être, dans la mesure du possible, quantifiées ou, au moins, exprimées. Ceci motivera naturellement des développements méthodologiques permettant de les réduire.

Cette évolution rapide de la microbiologie quantitative requiert des compétences méthodologiques très diverses, de la physiologie bactérienne à l'inférence bayésienne, de la technologie alimentaire à la régression non linéaire... Ma position, à l'interface entre microbiologie et modélisation, sans être spécialiste d'aucun de ces sujets, me permet de faciliter les échanges et de promouvoir ces trois défis de la microbiologie quantitative : la diffusion, la caractérisation, et l'amélioration des outils.



## 6. Bibliographie

---

### 6.1 Liste des travaux

#### 6.1.1 Publications dans des périodiques internationaux avec comité de lecture

1. **Cornu M.**, Delignette-Muller M.L., Flandrois J.P. (1999)  
"Characterization by modeling of unexpected growth physiology of *Escherichia coli* O157:H7".  
*Applied and Environmental Microbiology*. 65(12): 5322-5327.
2. Laurent F., Lelièvre H., **Cornu M.**, Vandenesch F., Carret G., Etienne J., Flandrois J.P. (2001)  
"Fitness and competitive growth advantage of new gentamicin-susceptible MRSA clones spreading in French hospitals".  
*Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 47(3):277-283.
3. **Cornu M.** (2001).  
"Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and food flora *in situ*."  
*Acta Horticulturae*. 566 :151-157. **Annexe V.**
4. **Cornu M.**, Kalmokoff M.L., Flandrois J.P. (2002).  
"Modeling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths".  
*International Journal of Food Microbiology*. 73(2-3):261-274.
5. Pouillot R., Albert I., **Cornu M.**, Denis J.B. (2003).  
"Estimation of uncertainty and variability in bacterial growth using Bayesian inference. Application to *Listeria monocytogenes*."  
*International Journal of Food Microbiology*. 81(2):87-104. **Annexe VI.**
6. Gnanou Besse N., Audinet N., Beaufort A., Colin P., **Cornu M.**, Lombard B. (2004).  
"A contribution to the improvement of *Listeria monocytogenes* enumeration method in smoked salmon"  
*International Journal of Food Microbiology*. 91:119-127.
7. Bouchez J.P., **Cornu M.**, Danzart M., Leveau J.Y., Duchiron F., Bouix M. (2004).  
"Physiological significance of the cytometric distribution of fluorescent yeasts after viability staining"  
*Biotechnology and Bioengineering*. 86:520-530.
8. Rosset P. , **Cornu M.**, Noël V., Morelli E., Poumeyrol G. (2004).  
"Time-temperature profiles of chilled ready-to-eat foods in school catering and probabilistic analysis of *Listeria monocytogenes* growth"  
*International Journal of Food Microbiology*. 96:49-59. **Annexe II.**
9. Miconnet N., **Cornu M.**, Beaufort A., Rosso L., Denis J.-B. (2005).  
"Uncertainty distribution associated with estimating a proportion in microbial risk assessment"  
*Risk Analysis*. 25:39-48. **Annexe IX.**

10. Delignette-Muller M.L., Baty F., **Cornu M.**, Bergis H. (2005)  
 "Modelling the effect of a temperature shift on the lag phase duration of *Listeria monocytogenes*".  
*International Journal of Food Microbiology*. 100:77-84.
11. Lombard B., **Cornu M.**, Lahellec C., Feinberg M. H. (2005)  
 "Experimental evaluation of different precision criteria applicable to microbiological counting methods"  
*Journal of AOAC International*. 88:830-41. **Annexe X**
12. Miconnet N., Geeraerd A., Van Impe J., Rosso L., **Cornu M.** (2005).  
 "Reflections on the application of primary models to describe challenge tests conducted in/on food products".  
*International Journal of Food Microbiology*. 104:161-177. **Annexe I.**
13. Augustin J.C., Zuliani V., **Cornu M.**, Guillier L. (2005).  
 "Growth rate and growth probability of *Listeria monocytogenes* in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions."  
*Journal of Applied Microbiology*. 99:1019-42.
14. **Cornu M.**, Beaufort A., and the steering committee of the research project (2005).  
 "Methodological developments in exposure assessment of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon."  
*Acta Horticulturae*. 674 :391-395.
15. Afchain A.L., **Cornu M.**, Derens E., Guilpart J. (2005)  
 "Statistical modelling of cold-smoked-salmon thermal profiles for risk assessment of *Listeria monocytogenes*":  
*Acta Horticulturae*. 674: 383-388.
16. Duflos G., Marcel Coin V, **Cornu M.**, Antinelli J.F., Malle P. (2005)  
 "Determination of volatile compounds to characterize fish spoilage using HS/MS and SPME-GC/MS analysis"  
*Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86: 600-611.
17. Delignette-Muller ML, **Cornu M.**, Pouillot R, Denis J.-B. (2006)  
 "Use of Bayesian modelling in risk assessment: Application to growth of *Listeria monocytogenes* and food flora in cold-smoked salmon."  
*International Journal of Food Microbiology*. 106: 195-208. **Annexe VII.**
18. **Cornu M.**, Beaufort A., Rudelle S., Laloux L., Bergis H., Miconnet N., Serot T., Delignette-Muller ML. (2006)  
 "Effect of temperature, water-phase salt and phenolic contents on *Listeria monocytogenes* growth rates on cold-smoked salmon and evaluation of secondary models."  
*International Journal of Food Microbiology*. 106: 159-168. **Annexe III.**
19. Gnanou Besse N., Audinet N., Barre L., Cauquil A., **Cornu M.**, Colin P. (2006)  
 "Effect of the inoculum size on *Listeria monocytogenes* growth in solid media"  
*International Journal of Food Microbiology*. 110: 43-51. **Annexe IV.**
20. Afchain A.L., **Cornu M.**, Derens E., Guilpart J. (en cours de révision)  
 "Time-temperature models and microbial growth models for chilled food products: a review."  
*Trends in food science and technology*.

21. Pouillot R., Miconnet N., Afchain A.L., Delignette-Muller M., Beaufort A., Rosso L., Denis J.B., **Cornu M.** (soumis)  
 "Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in French cold-smoked salmon. I. Quantitative exposure assessment."  
*Risk Analysis*. **Annexe XII**
22. Beaufort A., Rudelle S., Gnanou-Besse N., Toquin M.T., Kerouanton A., Bergis H., Salvat G., **Cornu M.** (soumis)  
 "Prevalence, characterization and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated cold smoked salmon."  
*Letters in Applied Microbiology*.

#### 6.1.2 Publications dans des périodiques nationaux avec comité de lecture

23. Rosset P., Beaufort A., **Cornu M.**, Poumeyrol G. (2002)  
 "La chaîne du froid en agro-alimentaire"  
*Cahiers de nutrition et de diététique*. 37: 124-130.
24. **Cornu M.**, Bergis H., Miconnet N., Delignette-Muller M.L., Beaufort A. (2003)  
 "Appréciation des risques microbiologiques : présentation générale et applications"  
*Revue générale du froid*. 1032:33-42.
25. Rosset P., Poumeyrol G., **Cornu M.**, Noël V., Morelli E. (2003)  
 "Intégration des profils temps-température et appréciation de la croissance microbienne. Exemple pratique d'application"  
*Revue Générale du Froid*. 1038:27-34.
26. **Cornu M.**, Rosset P. (2004).  
 "Appréciation quantitative de la croissance bactérienne potentielle issue de profils temps-température. Exemples d'application pour la croissance de *Salmonella* Typhimurium dans un steak haché"  
*Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*. 157:93-100.
27. **Cornu M.**, Damerdji Y., Beaufort A. (2006).  
 "Evaluation de l'exposition à *L. monocytogenes* : exemple du calcul de la fréquence d'exposition liée aux rillettes"  
*Bulletin épidémiologique de l'Afssa*. 18:4-5. **Annexe XI**.

#### 6.1.3 Invitations dans des congrès nationaux et internationaux

28. **Cornu M.**, Pouillot R. (2004)  
 "Taking into account variability and uncertainty in exposure assessment"  
 5th ASEPT International Conference: *Listeria monocytogenes* and Risk Analysis, Laval, 17-18 mars 2004. Communication orale invitée.
29. **Cornu M.**, Geeraerd A. (2005).  
 "Workshop: Predictive modelling as an essential tool in Risk Analysis."  
 MODEL-IT: International Symposium on the application of modelling as an innovative technology in the agri-food chain. Leuven, Belgique, mai-juin 2005.  
 Animation de l'atelier sur invitation des organisateurs.

#### 6.1.4 Communications orales dans des congrès nationaux et internationaux

30. **Cornu M.**, Vergu E., Charles-Bajard S., Flandrois J.P. (1999)

"Régression non-linéaire et cinétiques".

XIXème séminaire de la Société Française de Biologie Théorique, Saint-Flour, juin 1999.

31. **Cornu M.**, Flandrois J.P. (2000)  
"Modeling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths"  
Third International Conference on Predictive Modelling in Foods. Leuven, Belgique. septembre 2000.
32. **Laurent F.**, **Lelièvre H.**, **Cornu M.**, **Vandenesh F.**, **Carret G.**, **Etienne J.**, **Flandrois J.P.** (2000).  
"Association of competitive growth advantage and the spread in French hospitals of new methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clones with increasing susceptibility to gentamicin".  
Réunion du réseau "Biodiversité et Ecologie microbienne", Aussois, mai 2000.
33. **Cornu M.** (2001)  
"Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and food flora *in situ*".  
MODEL-IT: International Symposium on the application of modelling as an innovative technology in the agri-food chain. Massey, Nouvelle-Zélande, décembre 2001.
34. **Cornu M.**, Pouillot, R. (2001)  
"Evaluation de la sensibilité de la détection de *Listeria monocytogenes* en présence de *Listeria innocua*".  
Journées de Statistique : congrès de la SFdS. Nantes, mai 2001.
35. **Cornu M.**, Pouillot R., Delignette-Muller ML. (2002)  
"Modèle de compétition entre flore pathogène et flore annexe dans un aliment".  
Agrostat: 7èmes journées européennes Agro-Industries et méthodes statistiques, Lille, janvier 2002.
36. **Cornu M.**, Beaufort A., Rudelle S., Bergis H., Miconnet N., Serot T., Delignette-Muller ML. (2003)  
"Growth of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon. Comparison and validation of predictive models."  
Fourth International Conference on Predictive Modelling in Foods, Quimper, juin 2003.
37. **Delignette-Muller M.L.**, **Baty F.**, **Cornu M.**, **Bergis H.** (2003)  
"The effect of the temperature shift on the lag phase of *Listeria monocytogenes*".  
Fourth International Conference on Predictive Modelling in Foods, Quimper, juin 2003.
38. **Miconnet N.**, **Cornu M.**, **Denis JB.**, **Rosso L.** (2003)  
"Distribution d'incertitude d'une proportion".  
Journées de statistiques : congrès de la SFdS, Lyon, juin 2003.
39. **Kerouanton-Le Gall A.**, **Marault M.**, **Beaufort A.**, **Cornu M.**, **Rudelle S.**, **Brisabois A.** (2003).  
"Détection et caractérisation moléculaire de souches de *Listeria monocytogenes* isolées de saumon fumé en France."  
Colloque de la Société Française de Microbiologie, Paris, novembre 2003.

### 6.1.5 Communications affichées dans des congrès internationaux

40. **Cornu M.**, Delignette-Muller M.L., Flandrois J.P. (1999)  
"Unexpected growth physiology of *Escherichia coli* O157:H7 in minimal synthetic medium".  
Food Micro 99: Seventeenth International Conference of the International Committee on Food Microbiology and Hygiene. Veldhoven, Pays-Bas, 13-17 septembre 1999.
41. Laurent F., Lelièvre H., **Cornu M.**, Vandenesch F., Carret G., Etienne J., Flandrois J.P. (2000)  
"Spread in French hospitals of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* with increasing susceptibility to gentamicin and competitive growth advantage".  
100th general meeting of American Society of Microbiology. Los Angeles, USA, 21-25 mai 2000.
42. **Cornu M.** Kalmokoff ML. (2001)  
"Detection of *Listeria monocytogenes* in presence of *Listeria innocua*".  
ISOPOL XIV: International Symposium on Problems of Listeriosis. Mannheim, Allemagne, 13-16 mai 2001.
43. Beaufort A., Bergis H., Brisabois A., **Cornu M.**, Delignette M.L., Gnanou-Besse N., Laloux L., Malle P., Morelli E., Pouillot R., Ragimbeau C., Salvat G. (2002)  
"On-going project: towards an interdisciplinary description of the factors affecting exposure to *Listeria monocytogenes* in chilled products".  
COST Action 920 (Foodborne zoonoses: a co-ordinated foodchain approach), Working Group 3 (Quantitative risk assessment). First meeting: Exposure assessment of zoonotic foodborne pathogens. Bilthoven, Pays Bas, 7-8 Mars 2002.
44. Miconnet N., Delignette-Muller M.L., Rosso L., **Cornu M.** (2003)  
"Growth rate uncertainty and variability in quantitative risk assessment".  
Fourth International Conference on Predictive Modelling in Foods, Quimper, 15-19 juin 2003.
45. Bouchez J.P., **Cornu M.**, Danzart M., Leveau J.Y., Duchiron F., Bouix M. (2003).  
"Multicomponent analysis of cytometric histograms to predict yeast activity in alcoholic fermentation"  
Fourth International Conference on Predictive Modelling in Foods, Quimper, 15-19 juin 2003.
46. Bergis H., Beaufort A., **Cornu M.**, Rudelle S. (2004)  
"Variability of growth of *Listeria monocytogenes* in artificially contaminated cold-smoked salmon"  
5th ASEPT International Conference: *Listeria monocytogenes* and Risk Analysis, Laval, 17-18 mars 2004.
47. Guillier L., Bergis H., **Cornu M.**, Gnanou-Besse N., Guyonnet J.P. , Pardon P and Augustin J.C. (2004)  
"Influence of stress on individual lag time distributions of *Listeria monocytogenes*"  
5th ASEPT International Conference: *Listeria monocytogenes* and Risk Analysis, Laval, 17-18 mars 2004. Prix *ex-aequo* de la meilleure affiche.
48. Delignette-Muller M.L., **Cornu M.**, Pouillot R., Denis J.-B. (2004)  
"Use of Bayesian inference in risk assessment: application to *Listeria monocytogenes* growth in cold-smoked salmon".

COST Action 920 (Foodborne zoonoses: a co-ordinated foodchain approach), Working Group 3 (Quantitative risk assessment). Second meeting: Workshop on Data Needs in Risk Assessment. Pamplune, Espagne, 28-30 juin 2004.

49. Beaufort A., Rudelle S., Gnanou-Besse N., Toquin M.T., Bergis H., **Cornu M.** (2004)  
"Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon".  
ISOPOL XV: International Symposium on Problems of Listeriosis. Uppsala, Suède, 12-15 septembre 2004.
50. **Cornu M.**, Beaufort A., and the steering committee of the research project (2005).  
"Methodological developments in exposure assessment of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon."  
MODEL-IT: International Symposium on the application of modelling as an innovative technology in the agri-food chain. Leuven, Belgique, mai-juin 2005.
51. Afchain A.L., **Cornu M.**, Derens E., Guilpart J. (2005)  
"Statistical modelling of cold-smoked-salmon thermal profiles for risk assessment of *Listeria monocytogenes*":  
MODEL-IT: International Symposium on the application of modelling as an innovative technology in the agri-food chain. Leuven, Belgique, mai-juin 2005.

#### 6.1.6 Rapports de stages niveaux M2 rédigés ou encadrés

52. **Cornu M.** (1997). Encadrement : Winter J., Latrille E., Corrieu G.  
Rapport de stage d'ingénieur de l'INA PG. "Modélisation par réseaux de neurones d'un procédé biotechnologique"
53. **Cornu M.** (1998). Encadrement : Flandrois J.P. Co-encadrants : Delignette Muller M.L., Auger P., Bally R.  
Rapport bibliographique de DEA Analyse et Modélisation des Systèmes Biologiques (Université Lyon I). "Interactions bactériennes *in vitro*"
54. **Cornu M.** (1998). Encadrement : Flandrois J.P. Co-encadrants : Delignette Muller M.L., Auger P., Bally R.  
Rapport technique de DEA Analyse et Modélisation des Systèmes Biologiques (Université Lyon I). "Suivi et modélisation de cultures mixtes"
55. Peneau S. (2001). Encadrement : **Cornu M.** Co-encadrante : Leriche F.  
Rapport de stage d'ingénieur de l'ENITA Clermont Ferrand. "Etude préliminaire de la variabilité dynamique de *Listeria monocytogenes*".
56. Peneau S. (2001). Encadrement : **Cornu M.**  
Rapport de DEA Nutrition et Sciences des Aliments (Université Blaise Pascal).  
"Etude préliminaire de la variabilité de croissance de *Listeria monocytogenes*"
57. Courtial C. (2002). Encadrement : Derens C. Co-encadrants : Morelli E., **Cornu M.**, Gadonna P.  
Rapport de stage d'ingénieur de l'ISAB. "Maîtrise des températures au cours des circuits logistiques pour les produits réfrigérés".
58. Ah-Soon C. (2004). Encadrement : **Cornu M.** Co-encadrants : Lombard B., Hoang T.  
Rapport de DESS Mathématiques et Statistiques pour la Biologie (Paris V).  
"Incertitude de mesure en microbiologie quantitative des aliments".

59. Damerdjy Y. (2005). Encadrement : A. Beaufort. Co-encadrante : **Cornu M.**  
Rapport de M2Pro Qualité et sécurité des aliments (Paris VI). "Exposition à *Listeria monocytogenes* lors de la consommation de rillettes industrielles".
60. Lefort G. (2006). Encadrement : **Cornu M.**  
Rapport de stage d'ingénieur ENSIA-SIARC (Montpellier) en cours. Titre provisoire : "Evaluation et utilisation d'outils de microbiologie prévisionnelle".

#### 6.1.7 Thèses de doctorat rédigée, encadrées ou suivies

61. **Cornu M.** (2000). Directeur de thèse : Flandrois J.P. Jury de thèse : Atrache V., Béal C., Duby C., Flandrois J.P., Maire P., Pavé A., Pourquié J., Rosso L. Comité de pilotage interne à la société bioMérieux.  
"Dynamique des populations bactériennes en cultures mixtes"  
Thèse de doctorat soutenue en octobre 2000 (université Claude Bernard Lyon I, école doctorale E2M2).
62. Vereecken K. (2002). Directeur de thèse : Van Impe J. Membre du jury.  
"Predictive microbiology for multiple species systems: design and validation of a model for lactic acid induced interaction in complex media".  
Thèse de doctorat soutenue en décembre 2002 (université catholique de Leuven, Belgique).
63. Bouchez J.P. (2004). Directeur de thèse : Bouix M. Pas de comité de pilotage de thèse formel, mais participation informelle au suivi des travaux en dernière année de thèse.  
"L'étude de l'état métabolique des levures en fermentation alcoolique : mise au point de descripteurs pour une caractérisation rapide."  
Thèse de doctorat soutenue en juin 2004 (ENSIA, école doctorale ABIES).
64. Gnanou-Besse N. (2004). Directeur de thèse : Colin P. Membre du comité de pilotage de thèse.  
"Effet de la taille et de la composition de la population initiale sur la croissance de *Listeria monocytogenes*"  
Thèse de doctorat soutenue en décembre 2004 (université technologique de Compiègne)
65. Lombard N. (2004). Directeur de thèse : Feinberg M. Co-directeur : C. Lahellec. Pas de comité de pilotage de thèse formel, mais participation informelle au suivi des travaux en dernière année de thèse.  
"Les essais inter-laboratoires en microbiologie des aliments"  
Thèse de doctorat soutenue en décembre 2004 (INA PG, école doctorale ABIES).
66. Miconnet N. (2006). Directeur de thèse : Rosso L. Co-encadrement, membre du comité de pilotage et du jury.  
"Contributions méthodologiques à l'appréciation quantitative de l'exposition aux dangers microbiens alimentaires."  
Thèse de doctorat soutenue en janvier 2006 (université Paris VI, école doctorale SPSIB).
67. Penau S. (en cours). Directeur de thèse : Carpentier B. Membre du comité de pilotage.  
"Modélisation de l'évolution au cours du temps de la charge microbienne de surfaces ouvertes d'ateliers agroalimentaires"  
Thèse de doctorat en cours (université de Dijon). Soutenance prévue en 2007.
68. Vimont A. (en cours). Directeur de thèse : Delignette-Muller M.L.. Membre du comité

de pilotage. Participation prévue au jury, en qualité de rapporteur.

"Optimisation du protocole de détection des *E.coli* producteurs de shiga-toxines"

Thèse de doctorat en cours (université Claude Bernard Lyon I, école doctorale E2M2). Soutenance prévue en mars 2007.

69. Fremaux B. (en cours). Directeur de thèse : Vernozy Ch. Membre du comité de pilotage.

"Etude de la survie des *Escherichia coli* producteurs de shiga toxines dans les effluents d'élevage et dans le sol"

Thèse de doctorat en cours (université Claude Bernard Lyon I, école doctorale E2M2).

70. Marouani N. (en cours). Directeur de thèse : Carpentier B. Membre du comité de pilotage.

"Hiérarchisation des paramètres affectant la présence d'un micro-organisme pathogène sur les surfaces ouvertes des ateliers IAA"

Thèse de doctorat en cours (INA PG, école doctorale ABIES).

#### 6.1.8 Rapports d'expertise

71. AFSSA (composition du groupe de travail : B. Andral, F. Billaux, D. Bombe, A. BRISABOIS, V. Carlier, M. Catteau (coordinateur), P. Colin, **M. Cornu**, M.L. Delignette-Muller, F. Desmazeud, J.P. Flandrois, F. Gauchard, V. Goulet, J. Labadie, C. Lahellec, H. Loreal, P. Malle, D. Manfredi, C. Nguyen-The, P. Pardon, O. Pierre, M. Poumeyrol, J. Rocourt, G. Salvat, F. Stainier, V. Vaillant, J. Vaissaire, C. Vincent-Race) (2000). "Avis 2000-SA-0094 du 29 octobre 2001 sur la classification des aliments au regard du risque représenté par *Listeria monocytogenes* et les protocoles de tests de croissance". Version disponible sur Internet : <http://www.afssa.fr/ftp/afssa/basedoc/AVIS2001sa0094.pdf>

72. Commission européenne (composition du groupe de travail : **M. Cornu**, E. Gallagher, A. Havelaar, A. Henken, I. Knudsen (Chairman), R. Lindqvist, M. Nuti, B. Nørrung, F. O'Gara, P. Teufel, I. Vågsholm) (2003). "Risk assessment of food borne bacterial pathogens: Quantitative methodology relevant for human exposure assessment". Version disponible sur Internet : [http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/out308\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/out308_en.pdf)

73. AFSSA (composition du groupe de travail : M. Catteau, O. Cerf, P. Colin (coordinateur), **M. Cornu**, C. Danan, H. Prévost) (2005)  
"Avis 2003-SA-0362 du 9 mars 2005 sur la révision de l'avis 2000-SA-0094 sur la classification des aliments au regard du risque représenté par *Listeria monocytogenes* et les protocoles de tests de croissance". Version disponible sur Internet : <http://www.afssa.fr/Ftp/Afssa/29302-29303.pdf>

74. AFSSE-InVS (composition du groupe de travail : D. Bard, N. Bonvallot, R. Bonnard, O. Catelinois, **M. Cornu**, A. Cicolella, C. Daniau, C. Duboudin, P. Empereur-Bissonnet, P. Glorennec, D. Guyonnet, M. Hours, D. Laurier, M. Legeas, M. Mur, A. Pichard, S. Pontet, J.L. Volatier, D. Zmirou) (2005). "Estimation de l'impact sanitaire d'une pollution environnementale et évaluation quantitative des risques sanitaires". Version disponible sur internet : [http://www.invs.sante.fr/publications/2005/impact\\_sanitaire](http://www.invs.sante.fr/publications/2005/impact_sanitaire)

## 6.2 Autres références bibliographiques

Audits International, 1999. 1999 U.S. Cold Temperature Evaluation Design and Study Summary. Food Safety Risk Analysis Clearinghouse. [http://www.foodrisk.org/audits\\_international.htm](http://www.foodrisk.org/audits_international.htm)

Baranyi, J., Roberts, T.A., 1994, A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* 23, 277-294.

Barker G.C., Malakar P, Peck MW (2000). Thermal inactivation of bacterial spores: a Bayesian belief representation. In: Van Impe JFM, Bernaerts K, (eds). 3rd International Conference on Predictive Modelling in Foods. Leuven, Belgium: 92-4.

Christensen, B., Sommer, H., Rosenquist, H., Nielsen, N., 2001. Risk Assessment on *Campylobacter jejuni* in chicken products. Danish Veterinary and Food Administration, Ministry of Food Agriculture and Fisheries.

Coleman, M.E., Sandberg, S., Anderson, S.A., 2003, Impact of microbial ecology of meat and poultry products on predictions from exposure assessment scenarios for refrigerated storage. *Risk Anal.* 23, 215-228.

Cullen, A.C., Frey, H.C., 1999. Probabilistic techniques in exposure assessment. A handbook for dealing with variability and uncertainty in models and inputs. Plenum publishing corporation, New York, 335 p.

FDA, 2003. Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *L. monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. <http://www.foodsafety.gov/~dms/Lmr2-toc.html>

Frey, H.C., Burmaster, D.E., 1999, Methods for characterizing variability and uncertainty: comparison of bootstrap simulation and likelihood-based approaches. *Risk Anal* 19, 109-130.

Frey, H.C., Patil, S.R., 2002, Identification and review of sensitivity analysis methods. *Risk Anal* 22, 553-578.

Gimenez, B., Dalgaard, P., 2004, Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and spoilage micro-organisms in cold-smoked salmon. *J. Appl. Microbiol.* 96, 96-109.

Haas, C.N., Rose, J.B., Gerba, C.P., 1999, Quantitative microbial risk assessment. John Wiley & sons, New York, 449 p.

ISO, 1994. Norme ISO 5725-3 Exactitude des résultats et méthodes de mesure. Genève

ISO, 1996a. Norme ISO 11290-1:1996. Microbiologie des aliments -- Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* -- Partie 1: Méthode de recherche. Genève.

ISO, 1996b. Norme ISO 11290-2:1996. Microbiologie des aliments -- Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* -- Partie 2 : Méthode de dénombrement. Genève.

ISO, 2004. Amendement ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004. Modification des milieux d'isolement, de la recherche de l'hémolyse et introduction de données de fidélité. Genève

ISO, 2006. Spécification technique ISO TS 19036: 2006. Microbiologie des aliments -- Lignes directrices pour l'estimation de l'incertitude de mesure pour les déterminations quantitatives. Genève.

Jameson, J.E., 1962, A discussion of the dynamics of *Salmonella* enrichment. *J. Hyg.* 60,

193-207.

Morgan, M.G., Henrion, M., 1990, Uncertainty. A guide to dealing with uncertainty in quantitative risk and policy analysis. Cambridge University Press, Cambridge.

Nauta, M.J., 2001, A modular process risk model structure for quantitative microbiological risk assessment and its application in an exposure assessment of *Bacillus cereus* in a REPFED. RIVM report 149106 007. Janvier 2001.  
<http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/149106007.pdf>

Parsons, D.J., Orton, T.G., D'Souza, J., Moore, A., Jones, R., Dodd, C.E., 2005, A comparison of three modelling approaches for quantitative risk assessment using the case study of *Salmonella* spp. in poultry meat. *Int J Food Microbiol.* 98, 35-51.

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

Ross, T., Dalgaard, P., Tienungoon, S., 2000, Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *Int. J. Food Microbiol.* 62, 231-245.

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.

Schweder, T., Hjort, N.L., 2002, Confidence and likelihood. *Scand. J. Stat.* 59, 309-332.

Stephens, P.J., Joynson, J.A., Davies, K.W., Holbrook, R., Lappin-Scott, H.M., Humphrey, T.J., 1997, The use of an automated growth analyser to measure recovery times of single heat-injured *Salmonella* cells. *J. Appl. Microbiol.* 83, 445-455.

Volatier, J.L., 1999. Enquête individuelle et nationale sur les consommations alimentaires (INCA). Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa), Editions Tec et Doc,.

Vose, D., 2000. Risk Analysis, a quantitative guide, 2<sup>nd</sup> ed. Wiley and Sons, Chichester, pp. 418.

Zwietering, M.H., de Wit, J.C., Notermans, S., 1996. Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurised milk at the point of consumption. *Int. J. Food Microbiol.* 30, 55-70

## 7. Curriculum vitae détaillé

---

### 7.1 Curriculum vitae abrégé

#### 7.1.1 Etat civil

Marie Cornu, épouse Simon-Cornu. 31 ans (née le 28.12.74). Mariée, 1 enfant (né le 20.07.05).

#### 7.1.2 Coordonnées professionnelles :

Afssa Lerqap MQER  
23 avenue du Général de Gaulle  
94706 Maisons Alfort Cedex  
Tél : 01 49 77 26 44  
Fax : 01 49 77 26 40  
Mel : m.simon-cornu@afssa.fr

#### 7.1.3 Parcours professionnel

- Depuis 2001** **Chargée de recherche** 2ème classe à l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (Afssa), Maisons Alfort. Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur la Qualité des Aliments et sur les Procédés agro-alimentaires (Lerqap). Unité Microbiologie Quantitative et Estimation des Risques (MQER).
- 2000-2001** **Scientifique contractuelle**. Afssa, Maisons Alfort. Même laboratoire (ancienne dénomination : Laboratoire d'études et de recherches pour l'alimentation collective). Même unité (ancienne dénomination : Technologie et qualité des aliments).
- 1998-2000** **Moniteur** de l'Université Lyon I. Chargée de TD en statistiques et algèbre linéaire en DEUG B 2<sup>ème</sup> année.
- 1997-2000** **DEA puis doctorat**. Unité Biométrie et Biologie Evolutive, UMR 5558 CNRS - Université Lyon I. Equipe "Dynamique des populations bactériennes" Faculté de médecine Lyon-Sud, Oullins. Collaboration avec bioMérieux, Marcy-l'Etoile.
- 1997** **Stage d'ingénieur**. Laboratoire de Génie et de Microbiologie des Procédés Alimentaires, INRA, Grignon. Equipe "Instrumentation, modélisation et automatisation des bioprocédés". Collaboration avec Roussel Uclaf, Romainville.

#### 7.1.4 Parcours universitaire

- 2003-2004** **Cnam (Conservatoire national des arts et métiers), Paris. Chaire de statistique**. U.V. "Statistique mathématique", "Analyse de données" et "Statistique approfondie"
- 2000** **Doctorat, Université Claude Bernard Lyon I**  
Ecole doctorale E2M2 (Evolution, écosystèmes, microbiologie, modélisation).  
Thèse : "Dynamique des populations bactériennes en cultures mixtes" <sup>(61)</sup>
- 1998** **Diplôme d'études approfondies, Université Claude Bernard Lyon I / INA PG**  
DEA "Analyse et modélisation des systèmes biologiques"  
Mémoire : "Suivi et modélisation de cultures mixtes" <sup>(53-54)</sup>
- 1997** **Ingénieur agronome, Institut national agronomique Paris-Grignon (INA PG)**  
DAA "Microbiologie et génétique des microorganismes"  
Mémoire : "Modélisation par réseaux de neurones d'un procédé biotechnologique" <sup>(52)</sup>

## 7.2 Programmes de recherche

Seules les activités postérieures à la soutenance de thèse sont présentées.

### 7.2.1 Afssa PR-2001-HA6

A mon arrivée à l'Afssa, Annie Beaufort et moi avons répondu à l'appel d'offres de 2000 de l'Afssa puis nous avons, entre 2001 et 2004, coordonné et animé un projet de recherche intitulé "Construction d'une démarche interdisciplinaire de description du processus sanitaire modulant l'exposition au danger *L. monocytogenes* dans les produits réfrigérés" (désigné par le sigle LmPR pour "*L. monocytogenes* dans les produits réfrigérés"). Ce projet multidisciplinaire appliqué à trois matrices alimentaires (saumon fumé, Munster, rillettes) rassemblait une dizaine d'équipes scientifiques (Afssa, Ecole Vétérinaire de Lyon, Cemagref, INRA). J'ai participé directement ou ai été impliquée plus indirectement dans la quasi-totalité des travaux effectués dans le cadre de ce projet (<sup>6, 9, 10, 12, 14-15, 17-18, 20-22, 24, 36-39, 43-44, 46, 48-51, 55-57, 59, 66</sup>).

### 7.2.2 Afssa PR-2001-HA7

Suite au même appel d'offres, j'ai contribué à la modélisation de l'évolution au cours du temps de la charge microbienne de surfaces ouvertes d'ateliers agroalimentaires <sup>(67)</sup> dans le projet "Écologie et physiologie de *L. monocytogenes* dans les sites industriels et devenir dans l'aliment", coordonné par Brigitte Carpentier.

### 7.2.3 Afssa PR-2001-HA1

Enfin, toujours suite à l'appel d'offres, j'ai participé au projet " Evaluation des dangers microbiologiques de préparations froides servies en restauration collective" coordonné par Gérard Poumeyrol. Je suis intervenue en appui statistique pour la planification de l'échantillonnage (suivis de températures d'entrées froides en restauration scolaire) et j'ai contribué à la modélisation des profils thermiques et à leur couplage avec des modèles simples de microbiologie prévisionnelle, permettant de prédire la croissance de *L. monocytogenes*, avec une caractérisation probabiliste de la variabilité <sup>(8, 25)</sup>.

### 7.2.4 AQS R02/04

J'ai été impliquée dans un projet coordonné par Jean-Christophe Augustin et financé par un programme Aliment Qualité Sécurité, portant sur la caractérisation de la dispersion des latences individuelles de cellules de *Listeria monocytogenes*, le développement de modèles prévisionnels prenant en compte cette dispersion, et leur validation *in situ* <sup>(19, 47, 64)</sup>.

### 7.2.5 OFIMER N° 069/04/C

Je suis associée au projet "Application du chilling au saumon fumé : incidence sur le développement de *Listeria monocytogenes*, de la flore annexe et sur les qualités sensorielles", financé par l'OFIMER, portant sur l'incidence du chilling (conservation du saumon fumé à une température négative mais supérieure au point de congélation) sur la conservation ultérieure du produit en froid positif.

### 7.2.6 ACTIA RA 05.9

Je représente le laboratoire dans le projet "Amélioration méthodologique d'un outil de gestion du risque sanitaire : le challenge-test aliment" financé par l'ACTIA, coordonné par Valérie Stahl et portant sur l'optimisation des protocoles de contamination artificielle d'aliments et de suivi de croissance des micro-organismes inoculés.

## 7.3 Encadrement de la recherche

### 7.3.1 Encadrement pré-doctoral

2001 : Encadrement de Sophie Peneau, simultanément inscrite en dernière année d'école d'ingénieur (ENITA Clermont Ferrand) et en DEA Nutrition et Sciences des Aliments (Université Blaise Pascal). Dans le cadre du projet LmPR (cf. § 7.2.1), mise au point technique de protocoles de suivi de croissance turbidimétriques de croissance de *L. monocytogenes* en bouillon et étude préliminaire de la variabilité inter-souches du taux de croissance en bouillon, à température fixe réfrigérée <sup>(55-56)</sup>. Participation au jury de soutenance.

2002 : Co-encadrement de Cécile Courtial, en stage de dernière année d'école d'ingénieur (ISAB Beauvais). Dans le cadre du projet LmPR (cf. § 7.2.1), caractérisation des circuits logistiques et des profils temps-températures de saumons fumés de la sortie usine à la distribution <sup>(57)</sup>. Stage réalisé en collaboration entre le Cemagref (Antony) et l'Afssa. Participation au jury de soutenance.

2004 : Encadrement de Claudette Ah-Soon, en stage de DESS Mathématiques et Statistiques pour la Biologie (Paris V). Exploitation d'un essai inter-laboratoires international (ISO), sur l'incertitude de mesure associé aux dénombrements classique (ensemencement sur milieux gélosés de suspensions diluées) <sup>(58)</sup>. Participation au jury de soutenance.

2005 : Co-encadrement de Yasmine Damerджи, en stage de M2Pro Qualité et sécurité des aliments (Paris VI). Dans le cadre du projet LmPR (cf. § 7.2.1), caractérisation des circuits logistiques et des profils temps-températures de saumons fumés de la sortie usine à la distribution <sup>(59)</sup>. Stage réalisé en collaboration avec le CTSCCV.

2006 : Encadrement de Gladys Lefort, en stage de dernière année d'école d'ingénieur (ENSIA SIARC, Montpellier). Participation à l'évaluation du système Sym'Previus (modules de calculs de microbiologie prévisionnelle, bases de données de contaminations naturelles et artificielles). Comparaison avec d'autres outils de microbiologie prévisionnelle et bases de données. Validation des prévisions par des outils de microbiologie prévisionnelle de la destruction thermique de *Salmonella* et d'*E. coli* O157:H7 au cours de la cuisson de steaks hachés <sup>(60)</sup>.

### 7.3.2 Encadrement, suivi et pilotage doctoral ; participation à des jurys de thèse.

2001-2006 : Co-encadrement de la thèse de doctorat <sup>(66)</sup> de Nicolas Miconnet (université Paris VI) dirigée par Laurent Rosso. Dans le cadre du projet LmPR (cf. § 7.2.1), réflexions méthodologiques et développements d'outils statistiques et informatiques pour l'analyse des données d'entrée d'un modèle d'appréciation quantitative des risques, la caractérisation et la propagation des incertitudes et variabilités de ces données. Ajustement robuste d'un modèle primaire aux données d'un challenge test. Incertitude d'échantillonnage sur l'estimation d'une proportion (prévalence). Participation au comité de pilotage. Membre du jury de soutenance.

2002: Membre du jury de soutenance de la thèse de doctorat <sup>(62)</sup> de Kareen Vereecken (université catholique de Leuven), dirigée par Pr. Jan van Impe.

Depuis 2003 : Participation à 5 comités de pilotage de thèse <sup>(64, 67-70)</sup>, suivi informel des travaux de 2 autres thèses <sup>(63, 65)</sup>.

### 7.3.3 Encadrement post-doctoral

2003 : Accueil pour un séjour de 3 mois (printemps 2003) d'une scientifique de l'université catholique de Leuven, Annemie Geeraerd, post-doctorante de l'unité BioTeC de Jan van Impe. Echanges sur la microbiologie prévisionnelle et son utilisation en évaluation des risques dans le contexte du projet LmPR (cf. § 7.2.1). Réflexions sur l'ajustement de modèles primaires et secondaires.

2003-2005 : Suivi des travaux d'Anne-Laure Afchain, post-doctorante au Cemagref. Formation aux domaines de la microbiologie prévisionnelle et de l'évaluation des risques alimentaires. Collaboration sur la modélisation des profils thermiques des saumons fumés et le couplage avec la modélisation de la croissance de *L. monocytogenes*

## 7.4 Autres activités

### 7.4.1 Activités d'expertise

2003-2006 : Experte au Comité d'Experts Spécialisé en microbiologie de l'Afssa.

Membre de quatre groupes de travail (deux groupes Afssa, un groupe Afsse-InVS, un groupe commission européenne) <sup>(71-74)</sup>.

Expert privé à la commission européenne sur l'incertitude analytique en microbiologie alimentaire.

Rapporteur (*referee*) occasionnel pour les périodiques *Food microbiology*, *International journal of food microbiology*, *Risk analysis*, *Food and Chemical Toxicology*.

### 7.4.2 Activités d'enseignement

2006 : Interventions dans un cours de l'Institut Pasteur de Paris "Analyse des risques et Sécurité des Aliments" (1 intervention de 3h et une intervention d'1heure dans un cours de 2 semaines).

2005 : Organisation d'une formation interne à l'Afssa sur l'appréciation quantitative des risques alimentaires (interventions d'une journée).

2002-2005 : Formations à des étudiants de deuxième cycle et troisième cycle (ISAB Beauvais) sur l'évaluation des risques microbiologiques (2 sessions de 3h par an).

2000-2005 : Formations à des étudiants de deuxième et troisième cycle (Ecole Vétérinaire d'Alfort, ENSIA Massy, ISAB Beauvais, IUT Auch, DESS Paris VI, Master Européen) sur la microbiologie prévisionnelle (en moyenne 5 sessions de 3h par an).

2000-2002 : Formation de doctorants de l'école doctorale E2M2 (Lyon) à la régression non-linéaire, dans le cadre d'un module "modélisation en biologie", (1 session de 2,5 jours par an).

### 7.4.3 Participation à des réseaux de recherche

Membre du réseau d'excellence Med Vet Net, sur les zoonoses alimentaires. Participation active à 3 work packages.

Membre de l'action COST 920, sur les zoonoses alimentaires. Représentante française dans un groupe de travail sur l'appréciation quantitative des risques microbiens.

Participation régulière au groupe ABARI (approches bayésiennes en analyse des risques), animé par Isabelle Albert (INRA [Met@risk](#)).