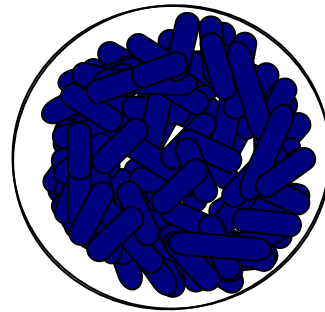
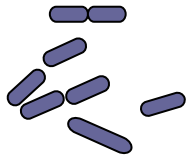
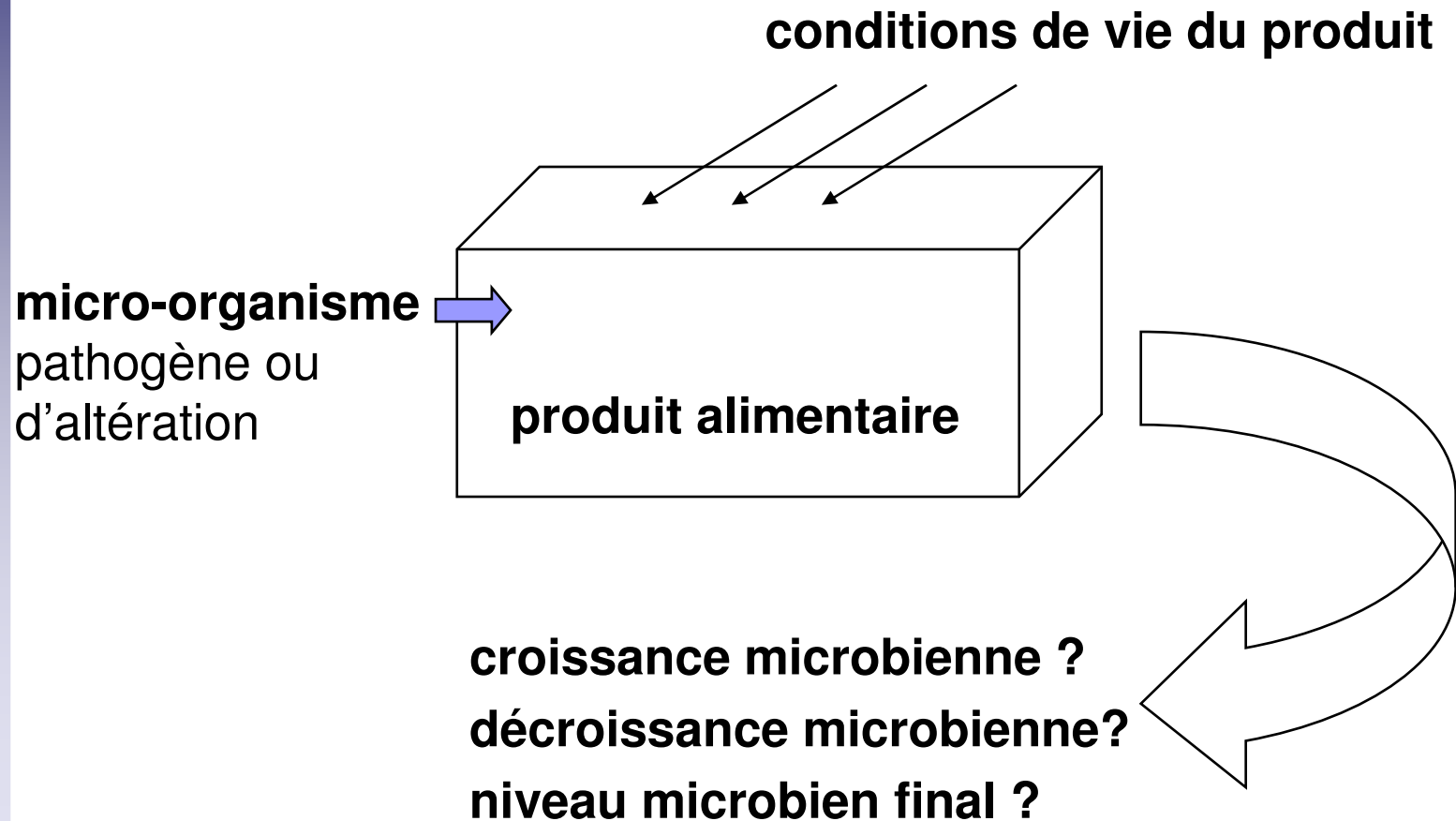


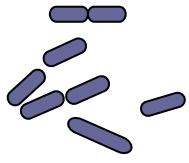
Modélisation du développement microbien dans un aliment et application à l'appréciation quantitative des risques





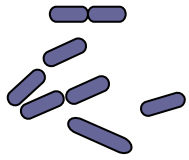
Objectifs de la microbiologie prévisionnelle





Historique

- **Années 1920**
modèles simples d'inactivation thermique
- **Années 1980**
nombreux modèles de croissance et de décroissance (naissance de la “**Microbiologie Prévisionnelle**”)
- **Années 1990**
utilisation de ces modèles en appréciation des risques



Niveaux de modélisation

■ Niveau primaire

Evolution du nombre de micro-organismes en fonction du temps

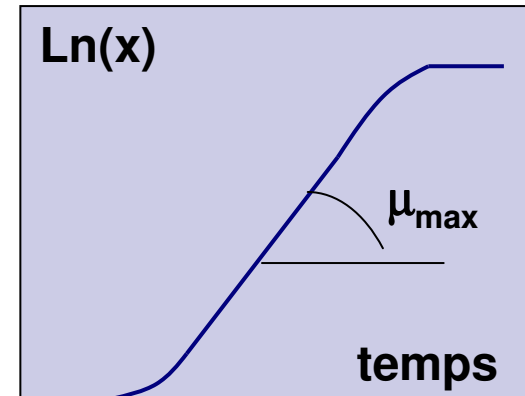
$$x = f(t, \theta) + \varepsilon_t$$

■ Niveau secondaire

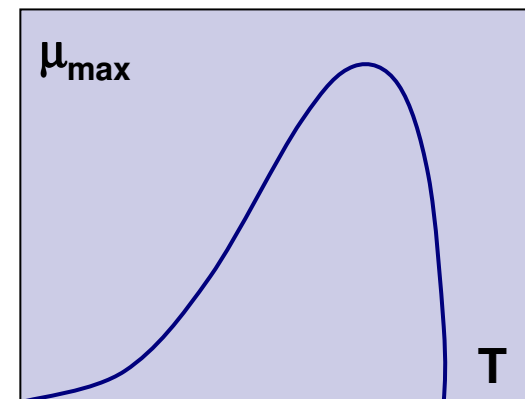
Effet des facteurs environnementaux sur les paramètres des modèles primaires

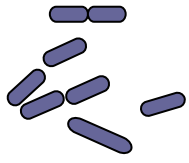
$$\theta = g(T, \text{pH}, \dots) + \varepsilon$$

Exemple



Exemple





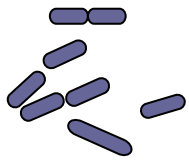
1. Modélisation primaire de la croissance

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

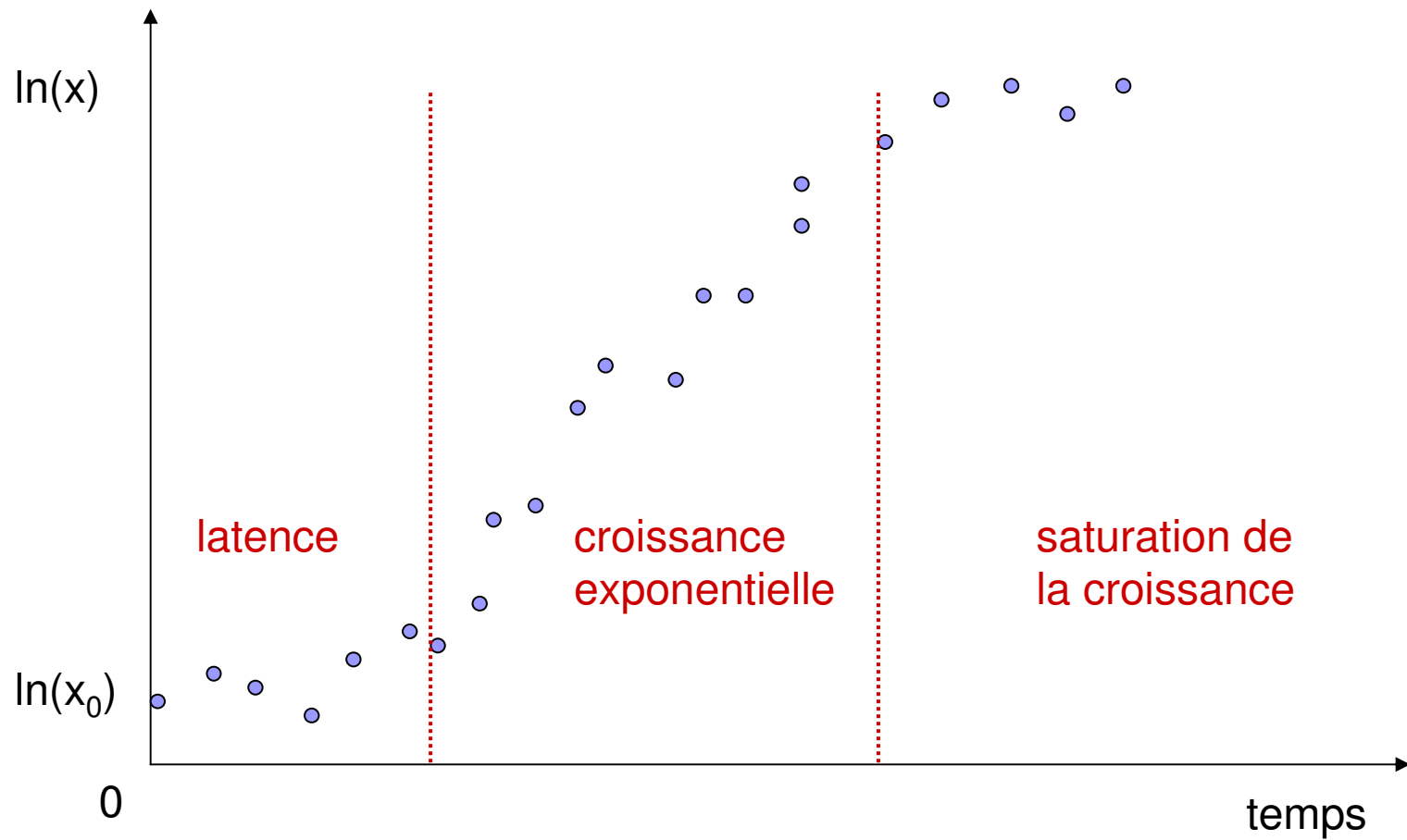
x : concentration en cellules

t : temps

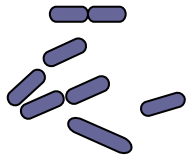
θ : paramètres de croissance



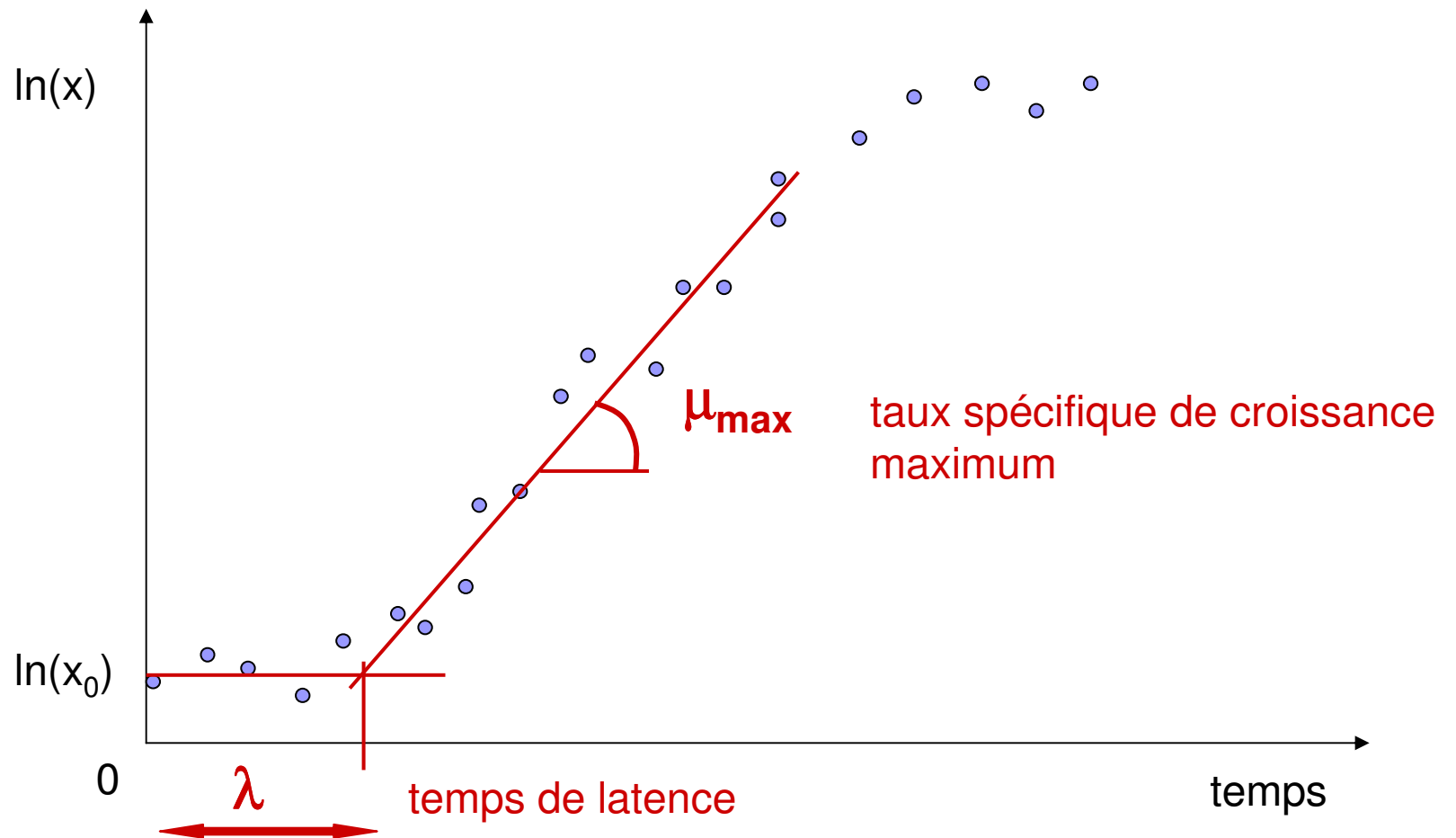
Exemple de cinétique

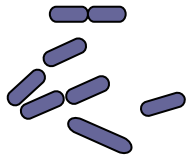


obtenue par dénombrement sur boîte de Petri

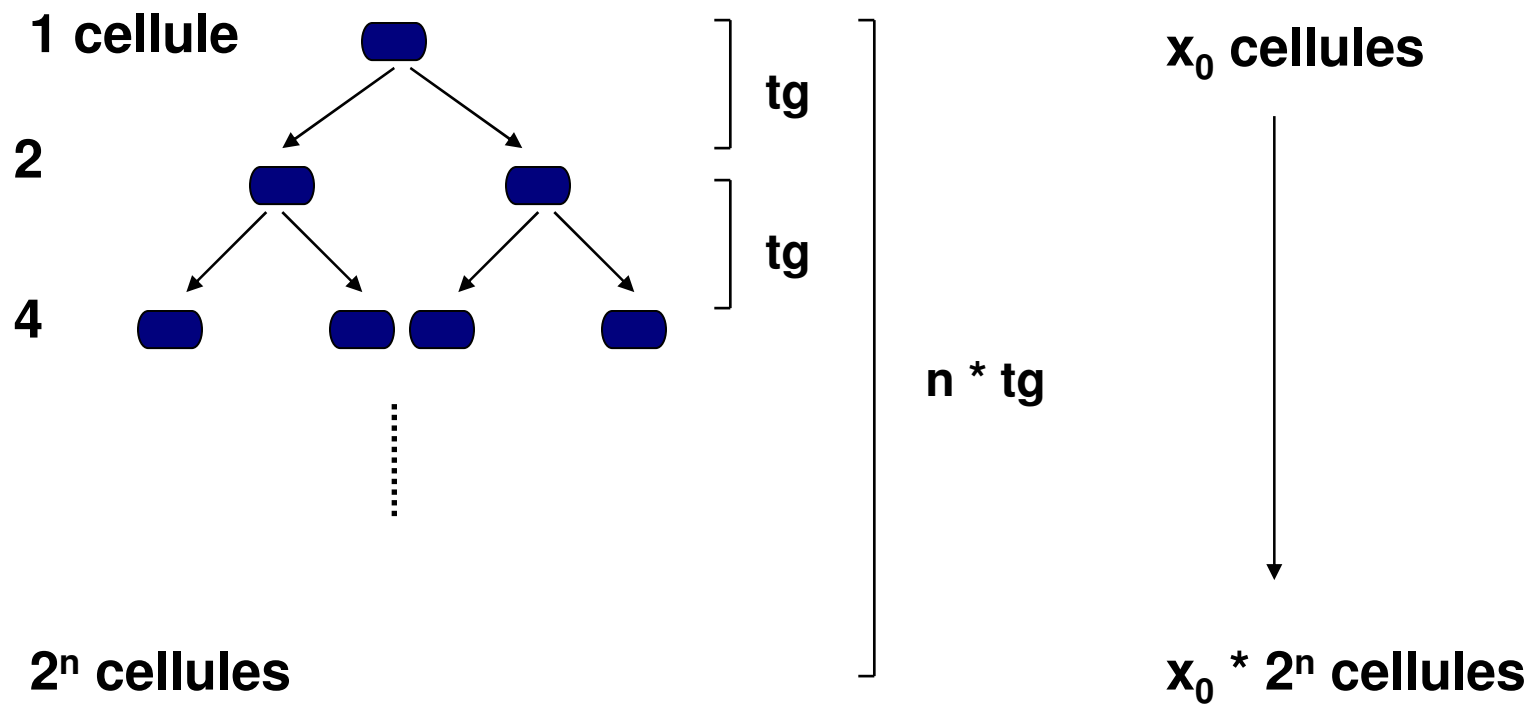


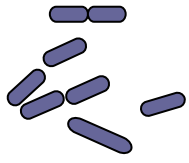
Paramètres de croissance





Hypothèses de la croissance exponentielle





Le modèle de croissance exponentielle

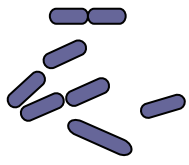
$$\begin{aligned}\text{après } n * t_g : \quad x &= x_0 * 2^n \\ &= x_0 * 2^{(t-t_0) / t_g} \\ &= x_0 * \exp(\ln(2) * (t-t_0) / t_g)\end{aligned}$$

$$\text{le modèle : } x = x_0 \exp[\mu_{\max} (t - t_0)]$$

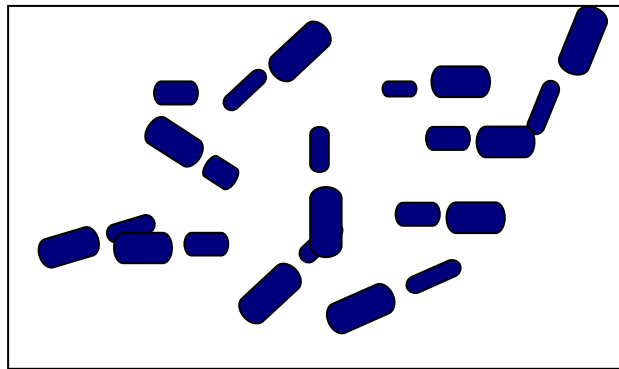
$$\text{avec } \mu_{\max} = \ln(2)/t_g$$

formulation différentielle:

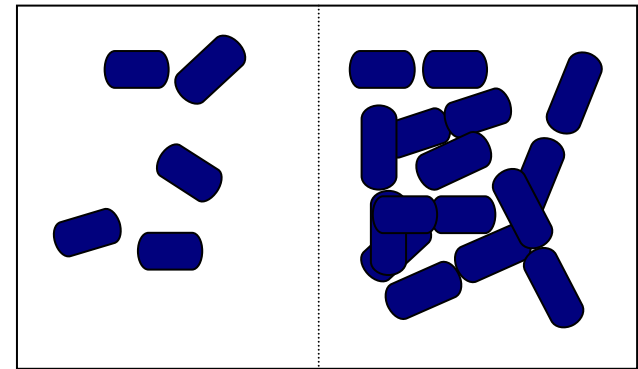
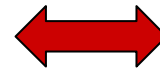
$$\frac{dx}{xdt} = \mu_{\max}$$



Hypothèses biologiques de la latence

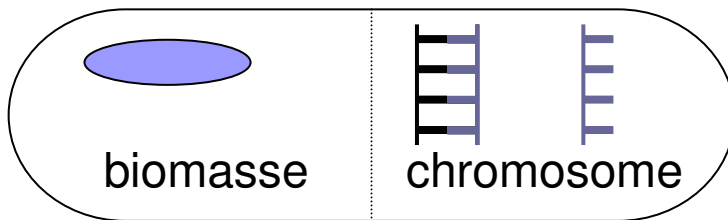


Baranyi 1994

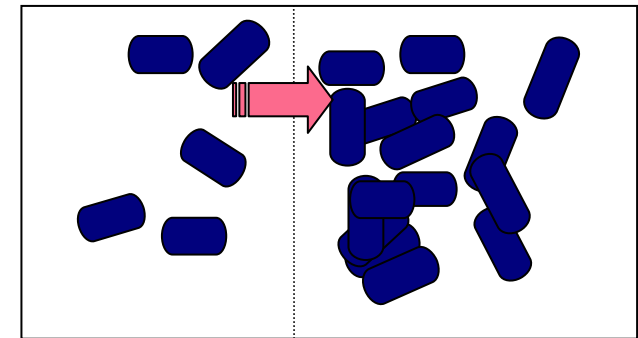
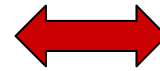


McKellar 1997

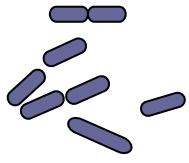
Equivalences
mathématiques



Hills 1994



Baranyi 1998



Formulation unifiée de divers modèles

$$\frac{dx}{xdt} = \mu_{\max} \alpha(t) f(x) \quad \text{avec } x(t=0) = x_0$$

- Modèle de Baranyi 1994 (\leftrightarrow McKellar)

$$\alpha(t) = \frac{q(t)}{1+q(t)} \quad \text{avec } \frac{dq}{dt} = \mu_{\max} q \quad \text{et } q(t=0) = q_0 = \frac{1}{\exp(\mu_{\max} \lambda) - 1}$$

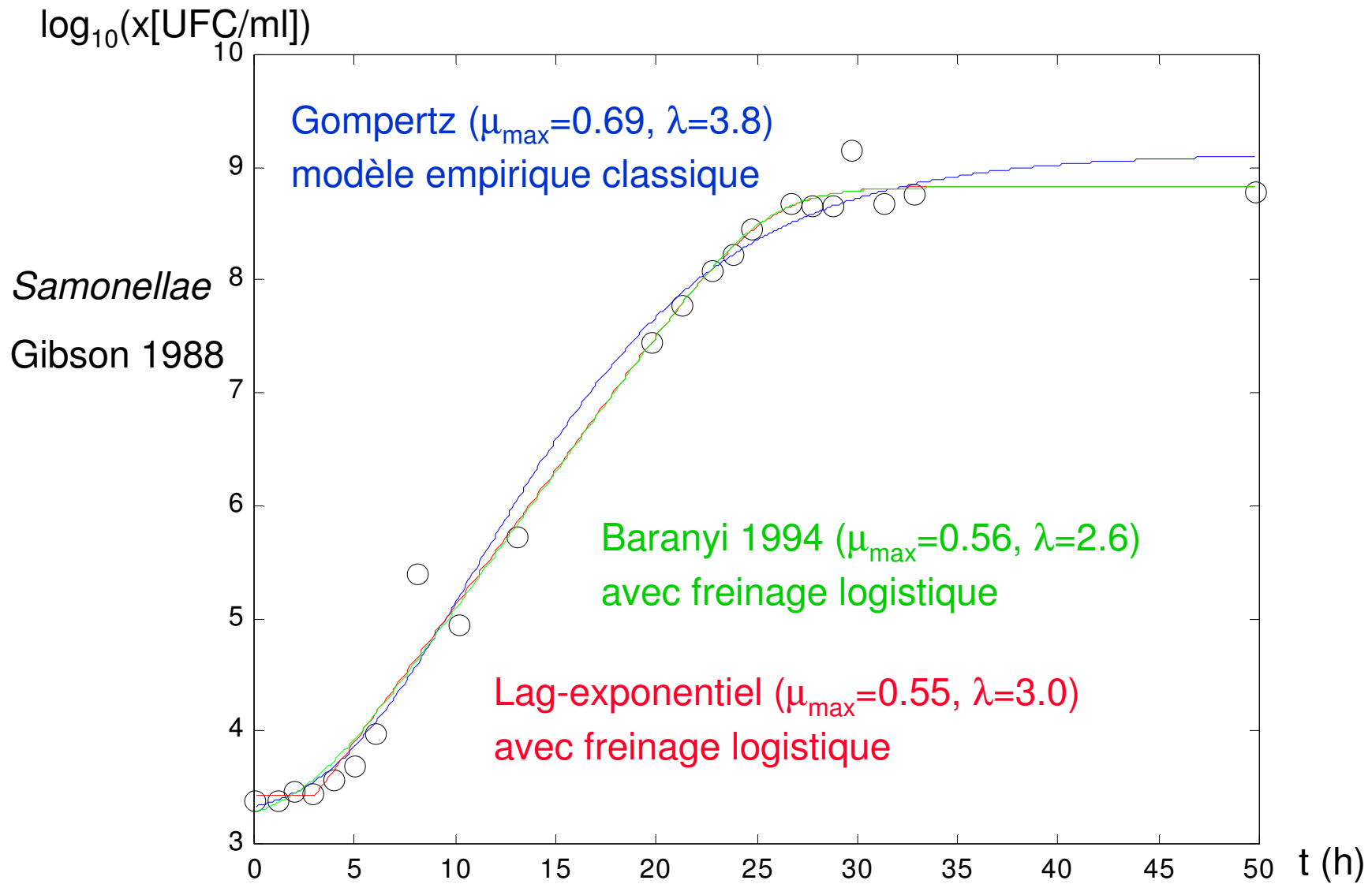
- Modèle de Hills (\leftrightarrow Baranyi 1998)

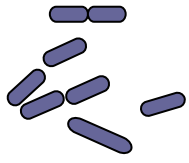
$$\alpha(t) = \frac{\mu_{\max}}{e^{\mu_{\max} \lambda} - 1} \left(\frac{m-x}{x} \right) \quad \text{avec } \frac{dm}{dt} = \mu_{\max} m \quad \text{et } m(t=0) = x_0$$

- Modèle Lag-exponentiel

$$\alpha(t) = \begin{cases} 0 & (t \leq \lambda) \\ 1 & (t > \lambda) \end{cases}$$

Ajustement de 3 modèles





Conclusions

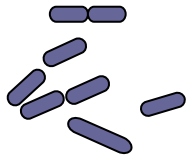
- Divers modèles primaires de croissance

- empiriques ou basés sur des hypothèses biologiques diverses
- ajustant correctement les données
- permettant d'estimer μ_{\max} et λ si les données sont suffisantes

mais avec des différences entre modèles

- Perspectives

- Nouvelles méthodes de suivi de la croissance
- Que se passe-t-il au niveau de la cellule?

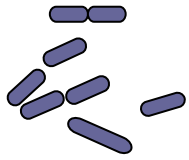


2. Modélisation secondaire de la croissance

$$\theta = g(T, \text{pH}, \dots) + \varepsilon$$

θ : paramètres de croissance

$$\mu_{\max} \text{ (ou } \mathbf{tg}), \lambda$$



Deux types d'approches

- **Modélisation par ajustement de surfaces de réponse**

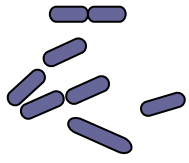
prise en compte simultanée des facteurs environnementaux d'intérêt

- plan d'expériences
- ajustement d'un modèle polynomial

- **Approche progressive ou modulaire**

prise en compte des facteurs un à un puis construction d'un modèle global

Exemple d'approche progressive



Modèle « racine carrée »

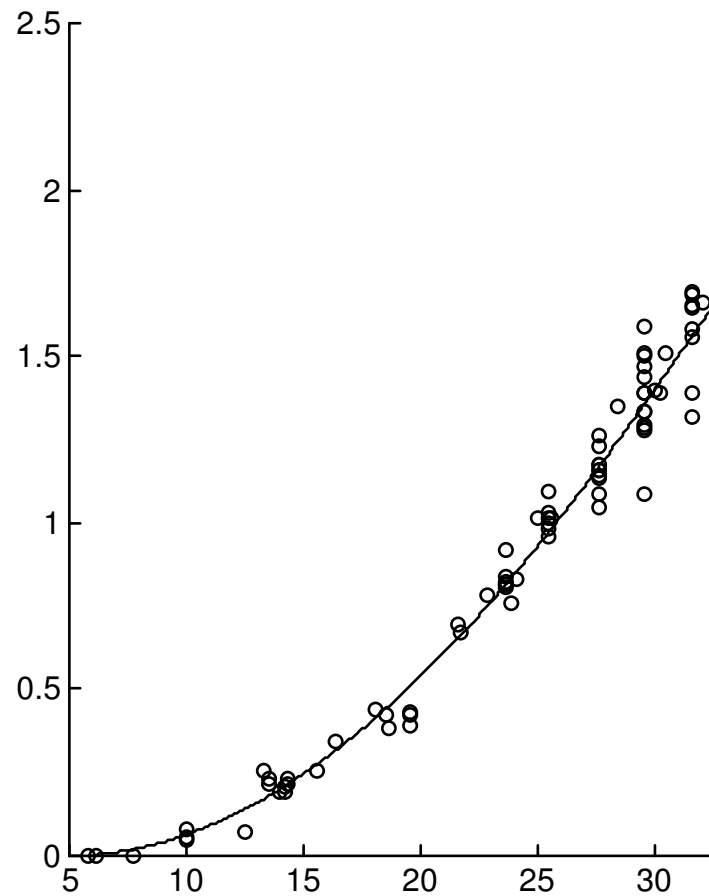
- Ratkowsky *et al.*, 1982
- **augmentation linéaire de $\sqrt{\mu_{\max}}$ avec la température**

$$\sqrt{\mu_{\max}} = b * (T - T_{\min})$$

T_{\min} : température minimale de croissance

Modèle « racine carrée »
valable à basses températures

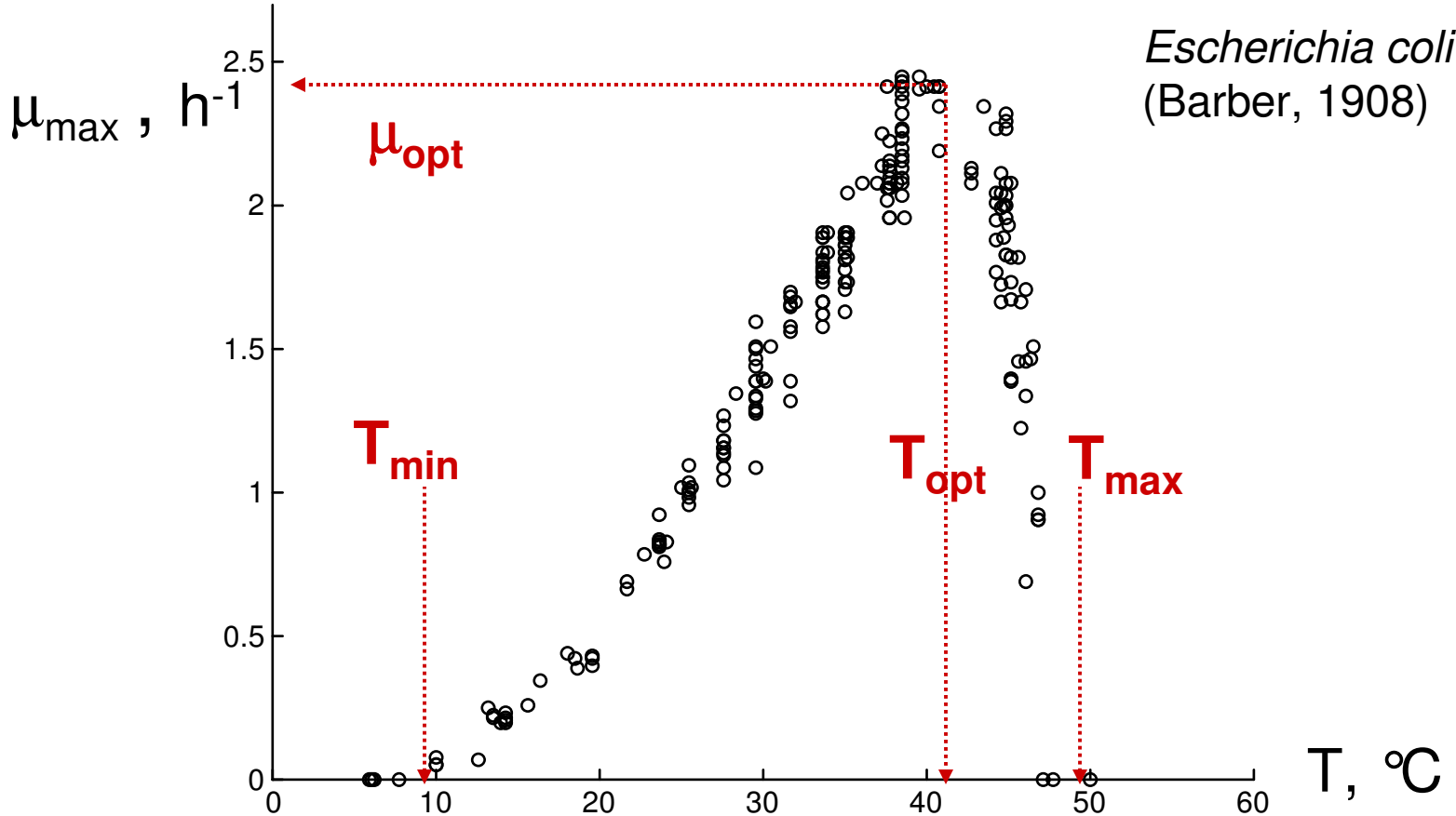
μ_{\max} , h^{-1}

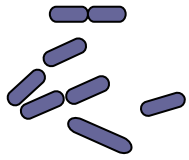


Escherichia coli
(Barber, 1908)

T , $^{\circ}C$

Tendance sur une gamme de température plus étendue





Modèle CTMI (Rosso *et al.*, 1993)

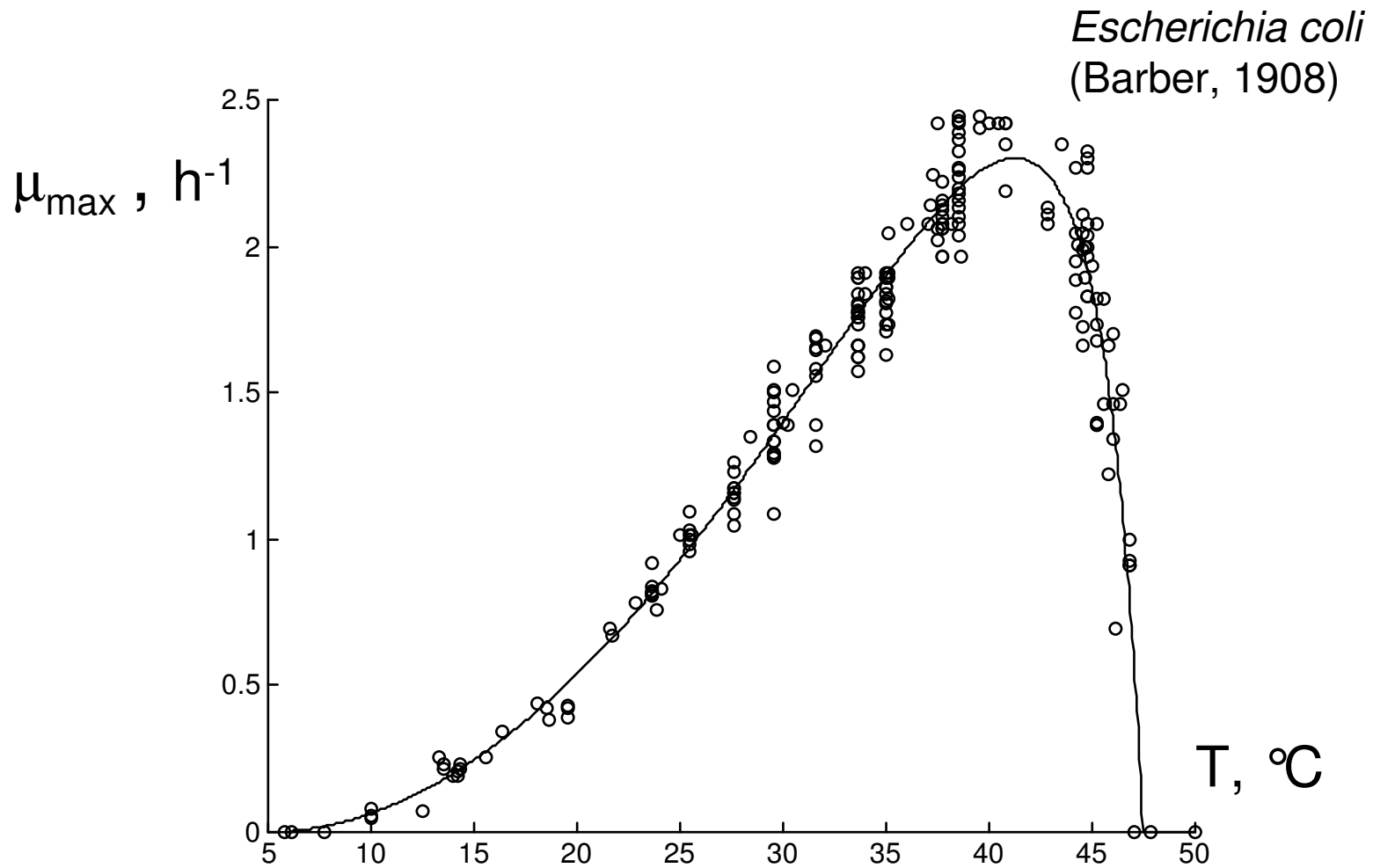
pour $T_{\min} < T < T_{\max}$, $\mu_{\max}(T) = \mu_{\text{opt}} \gamma(T)$

$$\gamma(T) = \frac{(T - T_{\max})(T - T_{\min})^2}{(T_{\text{opt}} - T_{\min}) [(T_{\text{opt}} - T_{\min})(T - T_{\text{opt}}) - (T_{\text{opt}} - T_{\max})(T_{\text{opt}} + T_{\min} - 2T)]}$$

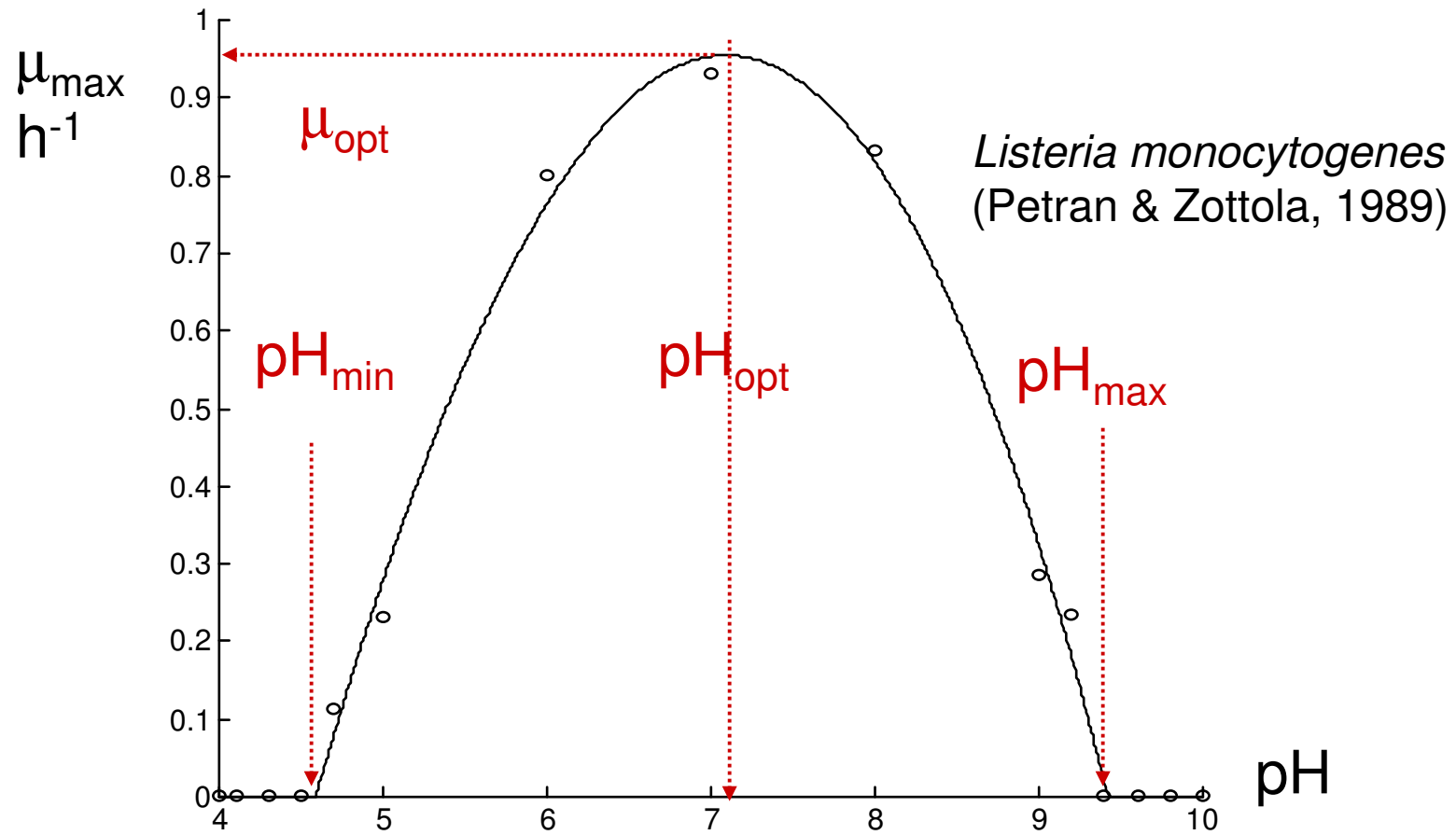
- bon ajustement aux données pour différentes espèces
- seulement 4 paramètres, chacun ayant une signification biologique
- corrélation biologique entre les températures cardinales

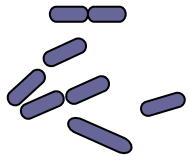
$$T_{\max} = 1.1 T_{\text{opt}} + 3 + \varepsilon \quad (r^2 = 97\%) \quad \text{et} \quad T_{\min} = T_{\text{opt}} - 33 + \varepsilon \quad (r^2 = 89\%)$$

Ajustement du modèle CTMI



Effet du pH





Modèle CTPM (Rosso *et al.*, 1995)

- Modèle pH

pour $\text{pH}_{\min} < \text{pH} < \text{pH}_{\max}$

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

$$\text{avec } \gamma(\text{pH}) = \frac{(\text{pH} - \text{pH}_{\min})(\text{pH} - \text{pH}_{\max})}{(\text{pH} - \text{pH}_{\min})(\text{pH} - \text{pH}_{\max}) - (\text{pH} - \text{pH}_{\text{opt}})^2}$$

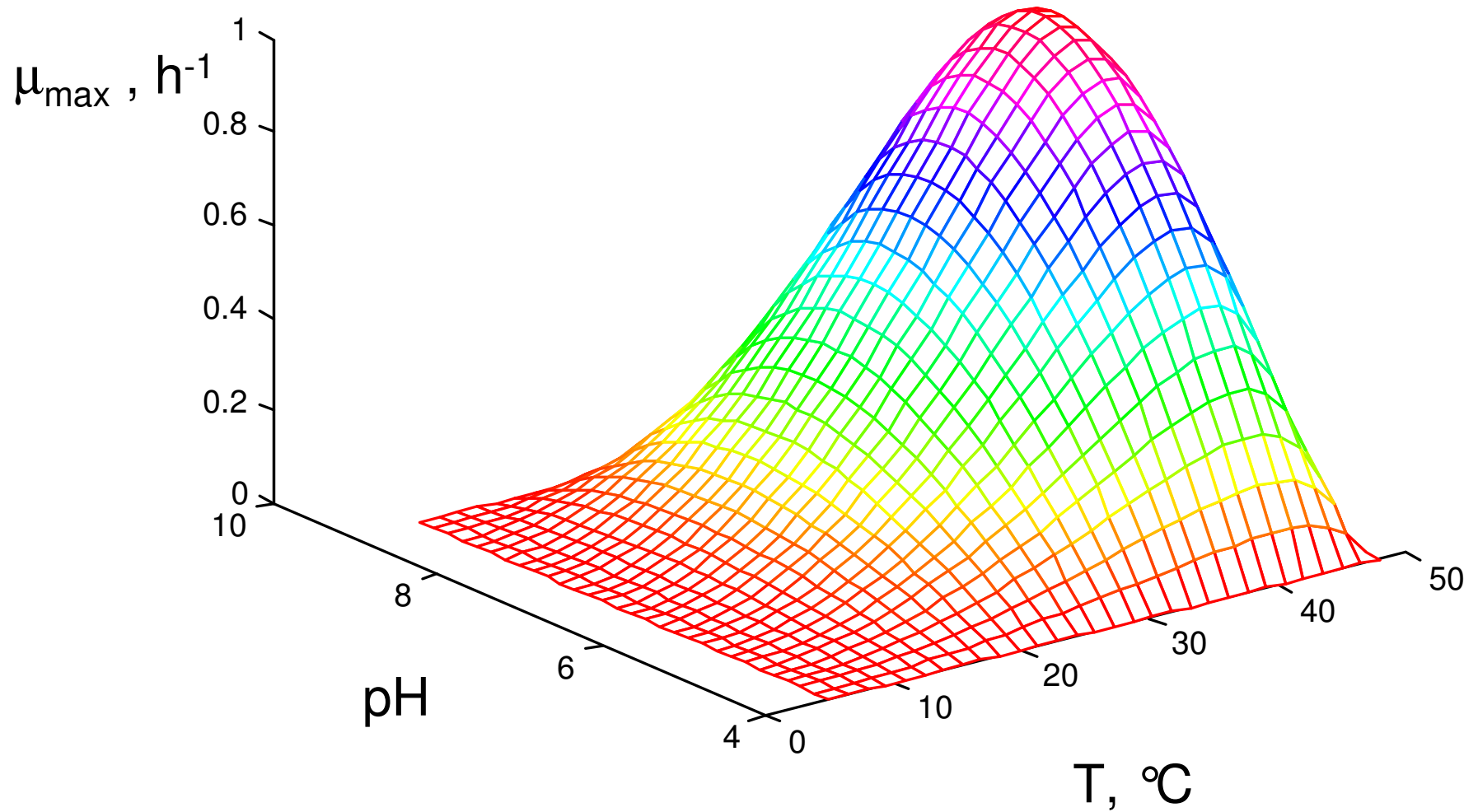
- Modèle global

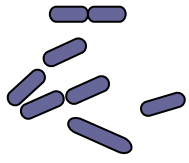
utilisant le “gamma concept” (Zwietering *et al.*, 1992)

$$\mu_{\max}(T, \text{pH}) = \mu_{\text{opt}} \gamma(T) \gamma(\text{pH})$$

→ bon ajustement aux données avec un modèle à 7 paramètres

Visualisation du modèle global





Prise en compte d'autres facteurs?

- Modèle a_w

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

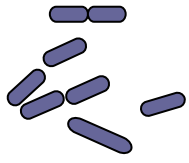
$$\text{avec } \gamma(a_w) = (a_w - a_{w\text{min}}) / (1 - a_{w\text{min}})$$

- Modèle global

$$\mu_{\max}(T, \text{pH}, a_w) = \mu_{\text{opt}} \gamma(T) \gamma(\text{pH}) \gamma(a_w)$$

→ mais prise en compte d'interactions
entre facteurs parfois nécessaire

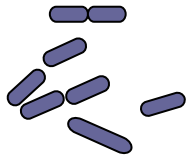
Augustin et Carlier, 2000; Le Marc *et al.*, 2002



Et le temps de latence ?

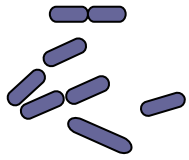
Paramètre difficile à modéliser

effet sur λ du passé des cellules bactériennes
(notamment de la température de pré-
incubation dans les expériences de
laboratoire)



2 approches classiques

- Modélisation indépendante de μ_{\max} et λ
malheureusement souvent en partant de conditions de préculture suboptimales pour modéliser λ
 - conditions irréalistes
 - pouvant conduire à surestimer λ
- Modélisation de λ en fonction de μ_{\max} en supposant μ_{\max} λ constant pour un état physiologique initial donné
 $\mu_{\max} \lambda$: « work to be done » pendant la latence

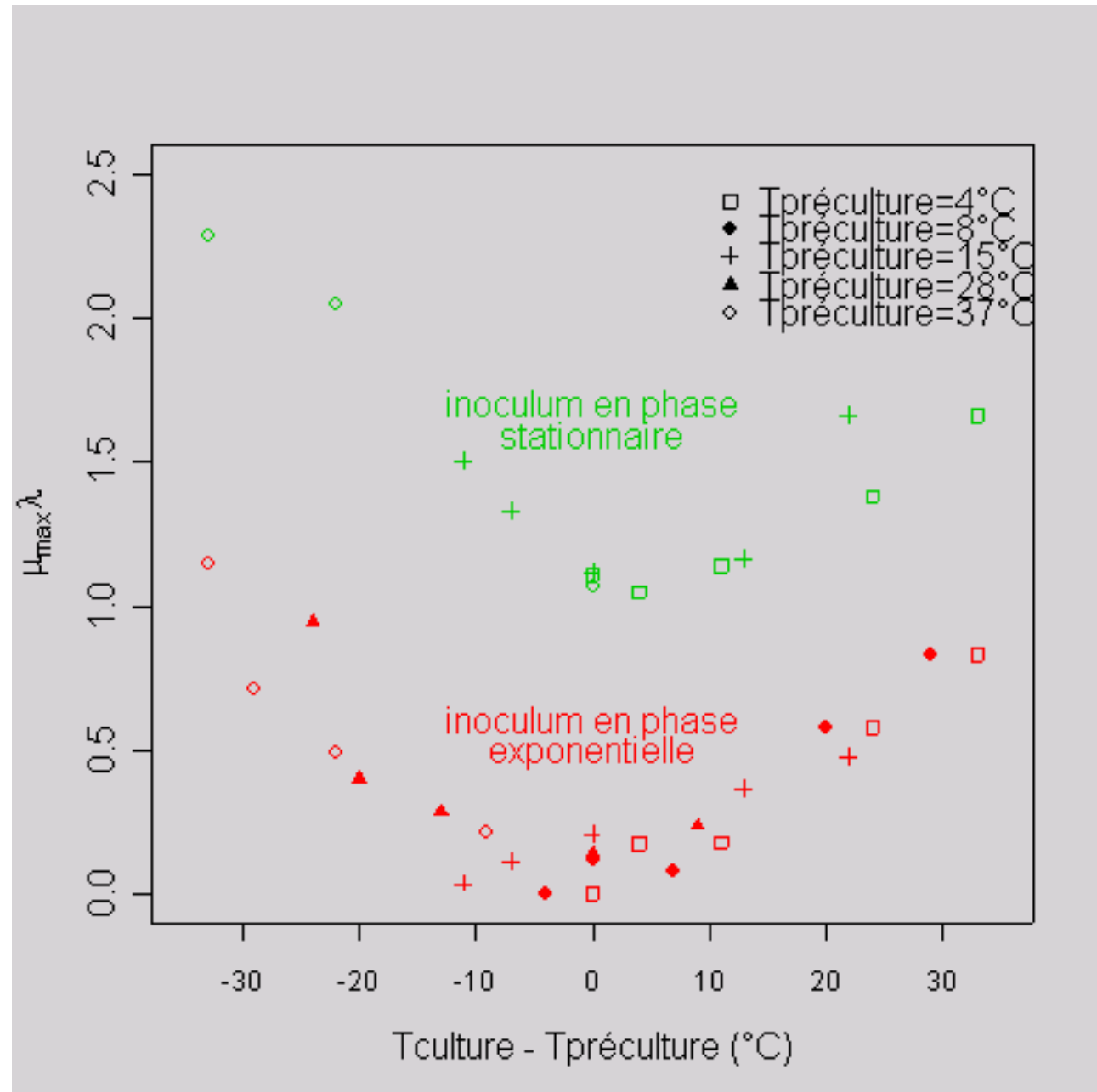


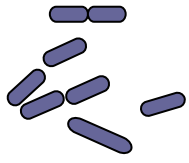
μ_{\max} λ est-il constant ?

- Uniquement en 1^{ère} approximation dans les travaux publiés
- Travaux publiés biaisés
conditions de préculture constantes et souvent suboptimales
- Comparaison des 2 approches de modélisation de λ
aucune des 2 approches ne convient mieux à tous les jeux de données
→ nécessité de développer une approche intermédiaire

Exemple d'effet d'un changement de température sur $\mu_{\max} \lambda$

Listeria monocytogenes
(Delignette-Muller
et al., 2004)

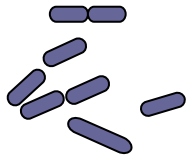




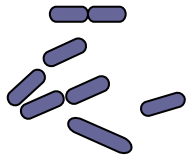
Conclusions

- Modèles disponibles et validés en prévision sur l'aliment pour μ_{\max}

- Prévision de λ beaucoup plus difficile
 - peu de données réalistes
 - modèles inadaptés
 - encore de nombreux travaux à réaliser !

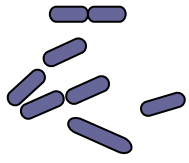


3. Applications des modèles



Une aide pour

- estimer les DLC ou DLUO
- développer de nouveaux produits microbiologiquement stables
- évaluer les implications d'un incident survenu au cours du procédé
- mettre en place une démarche HACCP
- évaluer l'exposition dans le cadre de l'évaluation des risques

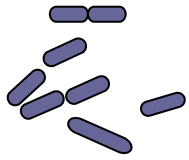


Outils dérivés

- Logiciels de simulation
- Systèmes experts
- Indicateurs temps température
 - physiques ou chimiques
 - électroniques
 - Biologiques

Outils à utiliser prudemment !

Averti notamment de l'incertitude des prévisions

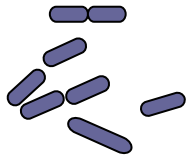


Un exemple d'application

inspiré de

« Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurised milk at the point of consumption »

Zwietering *et al.*, 1996



Choix des modèles et paramètres

- Modèle secondaire: racine carrée

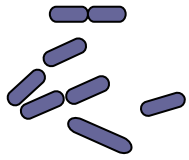
$$\sqrt{\mu} = b (T - T_{\min})$$

- données de la littérature : $T_{\min} = 0^{\circ}\text{C}$ (psychrophiles)
- cinétique à 30°C dans du lait pasteurisé : $\mu_{30} = 1.13 \text{ h}^{-1}$
- ⇒ $b = \sqrt{\mu_{30}} / 30 = 0.0354$

- Modèle primaire: exponentiel ($\lambda=0$, pire cas)

$$\log_{10}x = \log_{10}x_0 + \mu/\ln(10) * t$$

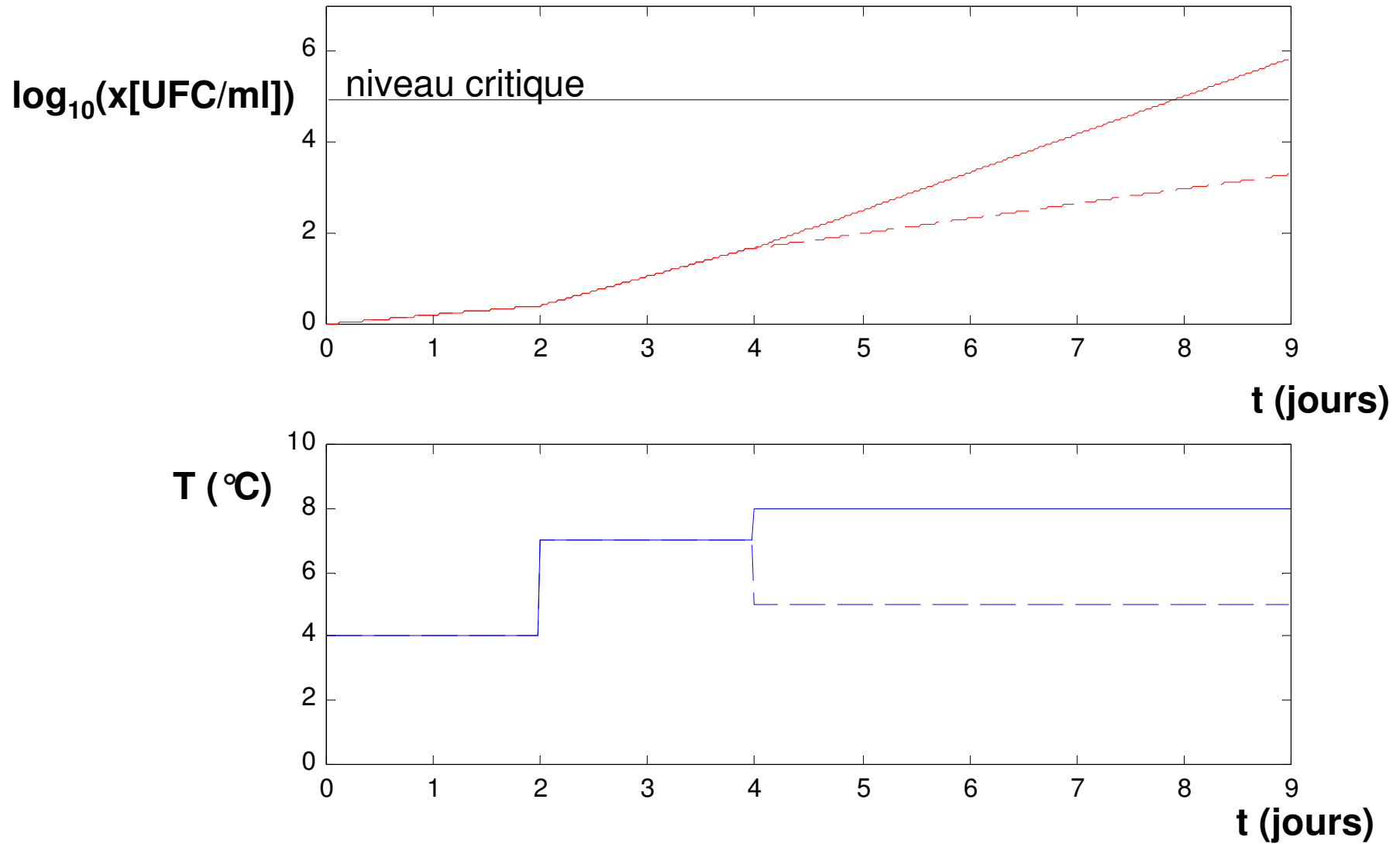
- Contamination initiale: 1 UFC/ml (pire cas)

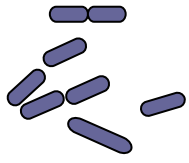


Une simulation

Phase	T°C	temps (jours)	μ (h ⁻¹)	$\log_{10}X$
usine	4	2	0.0201	0.42
distributeur	7	2	0.0614	1.70
consommateur	8	5	0.0802	5.84

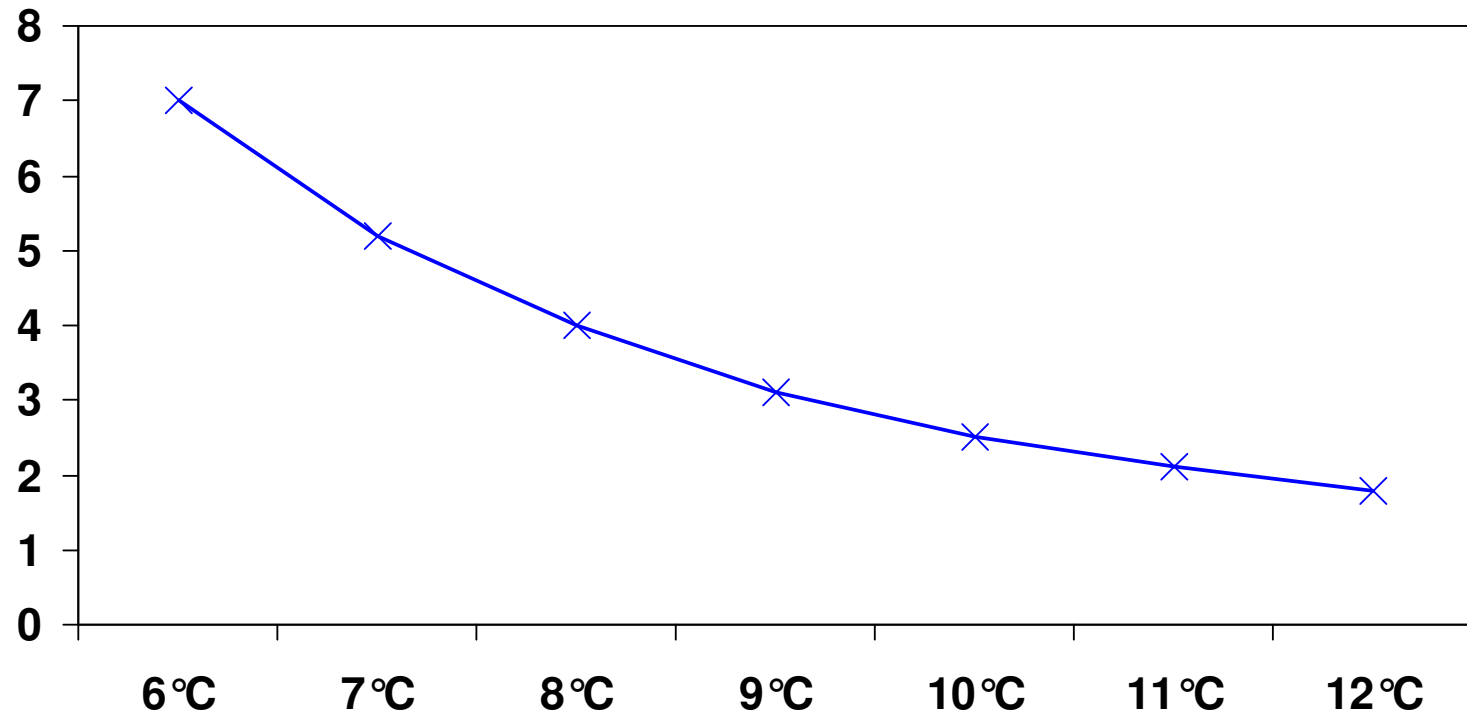
2 simulations à différentes T° de conservation



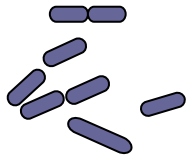


Effet de la température de conservation

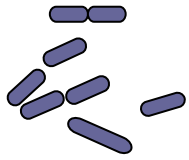
temps (jours) donnant un niveau 10^5 UFC/ml



Température de conservation chez le consommateur



4. Utilisation des modèles dans l'appréciation quantitative des risques



L'appréciation quantitative des risques

- Identification des dangers



- Caractérisation des dangers
(loi dose-réponse)

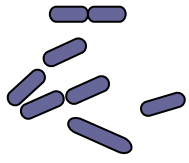
microbiologie
prévisionnelle



- **Appréciation de l'exposition**

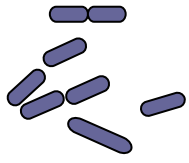


- Caractérisation des risques



Quelques définitions

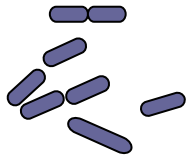
- Danger (**hazard**) : « agent biologique, chimique ou physique présent dans un aliment, ou état de cet aliment pouvant avoir un effet nocif. »
- Risque (**risk**) : « estimation de la probabilité que se produise un effet néfaste, pondéré en fonction de sa gravité, qui pourrait résulter de la présence d'un danger dans un aliment. »



Etude d'un cas simplifié

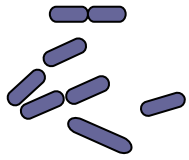
***Bacillus cereus* dans du lait pasteurisé**

(inspiré de Notermans *et al.*, 1997)



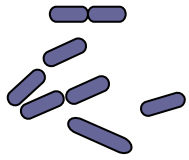
Identification des dangers

- *Bacillus cereus* : pathogène reconnu
 - cause diagnostiquée de nombreuses infections d'origine alimentaire
- Contaminant potentiel du lait
 - capacité rapide de sporulation ⇒ survie dans l'environnement
 - contamination par les fèces et le sol
- Développement possible au cours des procédés
 - résistance des spores à la pasteurisation
 - développement de certaines souches à basses températures



Caractérisation des dangers

- Données épidémiologiques recueillies
(concentrations en *Bacillus cereus* dans l'aliment responsable de l'infection)
 - syndrome diarrhéique : 10^3 à 10^8 ufc ml⁻¹ (médiane à 10^7)
 - syndrome émétique : 10^4 à 10^{10} ufc ml⁻¹ (médiane à 10^7)
 - Expériences réalisées sur des volontaires sains : non concluantes
 - Seuil d'acceptabilité en Europe : 10^4 - 10^5 ufc ml⁻¹
- ⇒ Evaluation vraiment très grossière de la loi dose-réponse



Appréciation de l'exposition

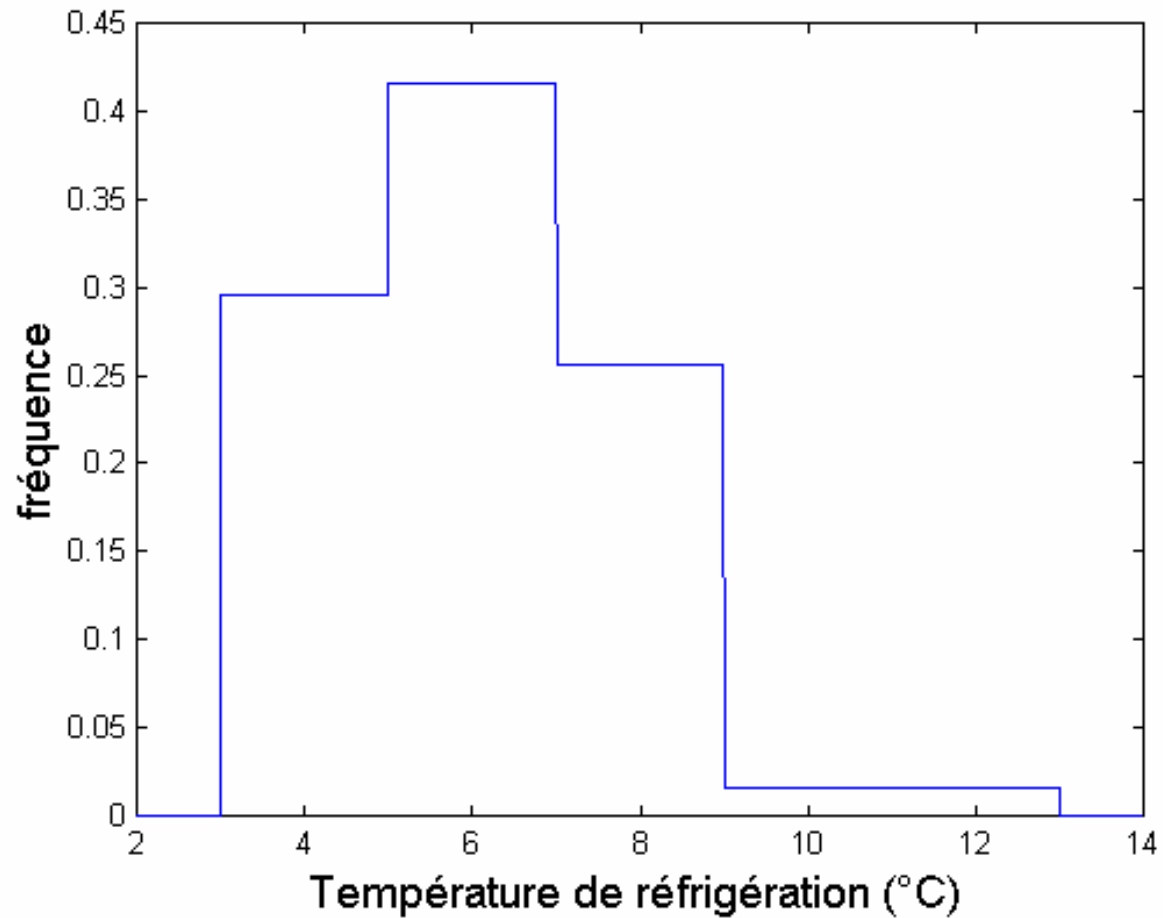
Niveaux de contamination observés dans des briques de lait un jour après la pasteurisation

(enquête hollandaise, Notermans *et al.*, 1997)

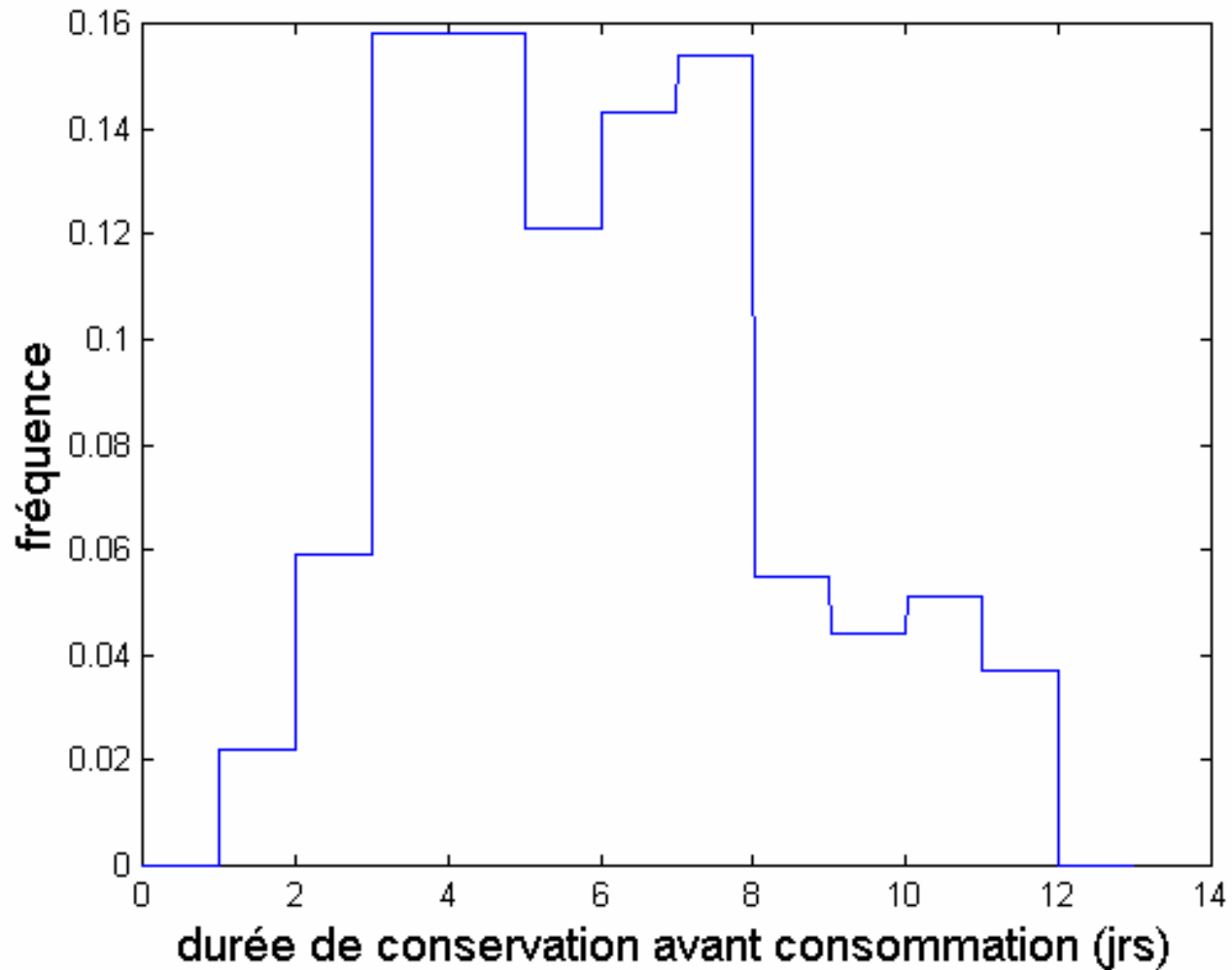
- moyenne en \log_{10} ufc ml⁻¹ : -1.04
- écart type en \log_{10} ufc ml⁻¹ : 0.57

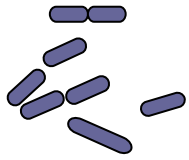
avec un effet saisonnier

Températures de conservation du produit observées
dans des réfrigérateurs domestiques (enquête
hollandaise, de Lezenne *et al.*, 1994)



Durées de conservation du produit avant consommation observées (enquête hollandaise, Notermans *et al.*, 1997)



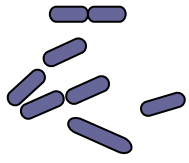


Modélisation de la croissance microbienne

Développement de la population
microbienne depuis la pasteurisation
jusqu'à la consommation

modèle de Zwietering *et al.*, 1996 (cf. exemple
précédent)

$$\log_{10} N = \log_{10} N_0 + \mu / \ln(10) * t$$
$$\text{avec } \mu = b^2 (T - T_{\min})^2 = 0.0354^2 * T^2 \text{ (h}^{-1}\text{)}$$
$$= 0.03 * T^2 \text{ (jr}^{-1}\text{)}$$



Caractérisation des risques

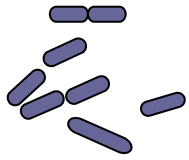
Résumé des paramètres à prendre en compte :

■ loi dose - réponse

- Niveau de *B. cereus* pathogène: N_p (en ufc ml⁻¹)

■ exposition

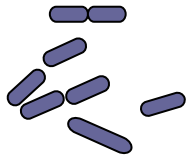
- Niveau de *B. cereus* après pasteurisation: N_0 (en ufc ml⁻¹)
- Température de conservation: T (en °C)
- Durée de conservation: d (en jours)



Méthode de calcul ?

Estimation du risque final = probabilité de développer un syndrome émétique ou diarrhéique lors d'une consommation de lait pasteurisé

- ❖ **Estimation dans le pire des cas**
en fixant les paramètres aux valeurs maximisant le risque
- ❖ **Estimation dans le cas le plus probable**
en fixant les paramètres aux valeurs les plus probables



Calcul dans le pire des cas

Niveau de *B. cereus* pathogène: $N_p = 10^3$ ufc ml⁻¹

Niveau de *B. cereus* après pasteurisation: $N_0 = 1$ ufc ml⁻¹

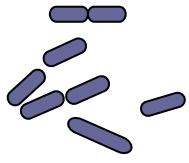
Température de conservation: $T = 13$ °C

- Calcul de la durée de conservation nécessaire pour atteindre N_p :

$$d_p = \log_{10}(N/N_0) * \ln(10) / \mu = 1.36 \text{ jrs}$$

risque de 98% d'après la distribution des durées de stockage observées

(TRES SURESTIME !!)



Calcul dans le cas le plus probable

Niveau de *B. cereus* pathogène: $N_p = 10^7$ ufc ml⁻¹

Niveau de *B. cereus* après pasteurisation: $N_0 = 0.1$ ufc ml⁻¹

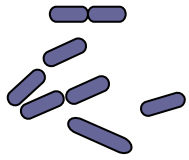
Température de conservation: $T = 6$ °C

- Calcul de la durée de conservation nécessaire pour atteindre N_p :

$$d_p = \log_{10}(N/N_0) * \ln(10) / \mu = 17.1 \text{ jrs}$$

risque nul

(TRES CERTAINEMENT SOUS-ESTIME !)



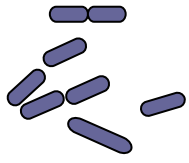
Cas le plus probable amélioré

avec prise en compte des différentes températures de réfrigération observées dans la population:

T (°C)	fréquence associée	d _p (jrs)	risque associé
4	0.296	38.4	0
6	0.416	17.1	0
8	0.256	9.6	0.088
10	0.016	6.1	0.341
12	0.016	4.3	0.605

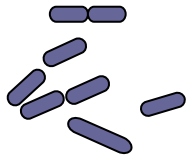
risque global =
 $0.256 \cdot 0.088 +$
 $0.016 \cdot 0.341 +$
 $0.016 \cdot 0.605 =$
3.8%

MAIS non prise en compte des variabilités sur N_0 et N_p



Critique de l'approche

- ❖ il est difficile de prendre en compte toutes les sources d'incertitude et de variabilité
- ❖ une estimation unique du risque est donnée sans indication de son imprécision
 - interprétation délicate du résultat numérique
- ❖ il est difficile de mettre en évidence les facteurs les plus influents



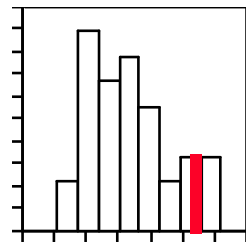
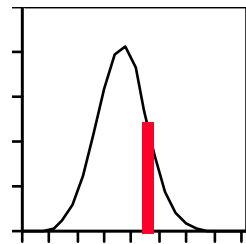
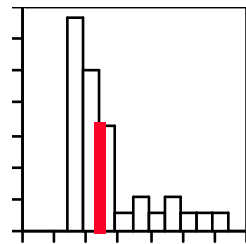
Utilisation du Monte Carlo

Méthode de simulation par échantillonnage permettant

- la prise en compte de toutes **les sources de variabilité et d'incertitude**
- l'évaluation de l'incertitude sur le risque estimé
- la génération d'une analyse de sensibilité du risque final à chaque paramètre

Schéma d'un Monte Carlo 1 D

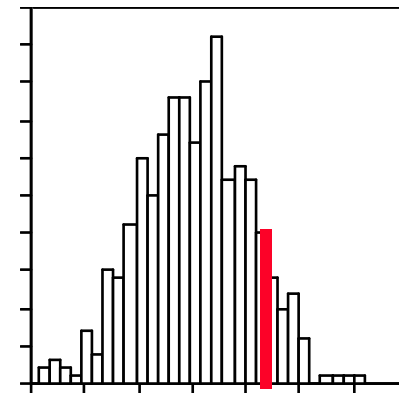
**distributions en fréquences
des paramètres**



**N tirages
aléatoires pour
chaque
paramètre**

(avec par ex. $N = 10\ 000$)

**distribution en
fréquences du risque
de maladie**



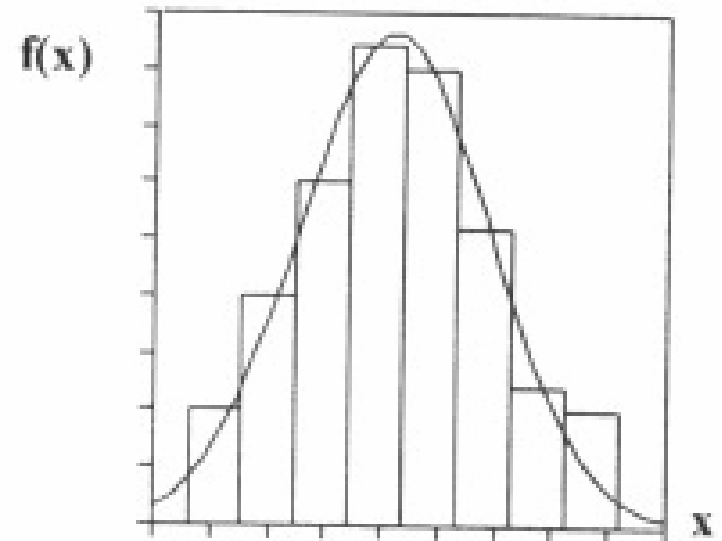
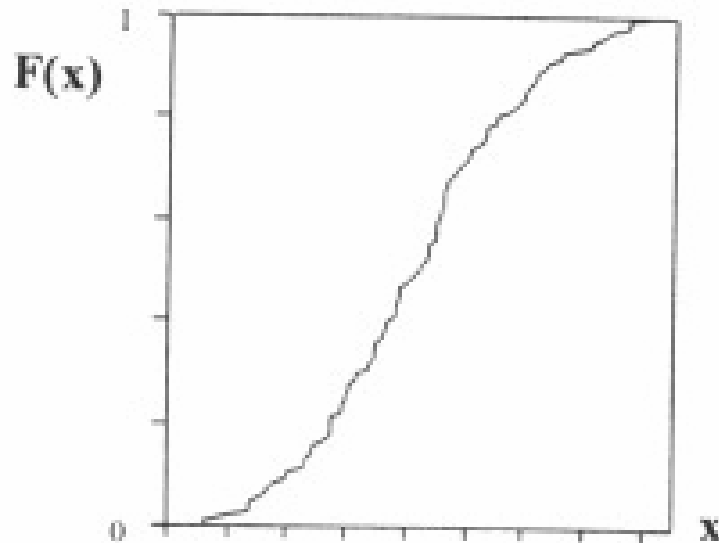
$\ln(\text{proba}(\text{maladie}))$

Définition de la distribution pour un paramètre lorsque l'on dispose de données observées

Utilisation directe de la courbe des fréquences cumulées observées

ou

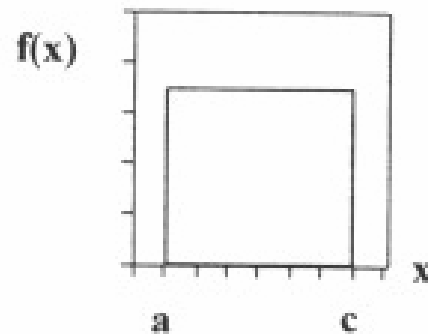
Ajustement d'une loi théorique adaptée aux données observées



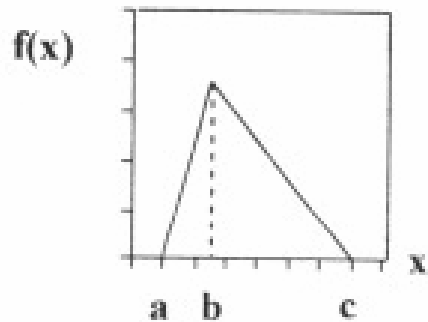
Définition de la distribution pour un paramètre lorsque l'on ne dispose que d'une opinion d'expert

lois simples mais de forme peu naturelle

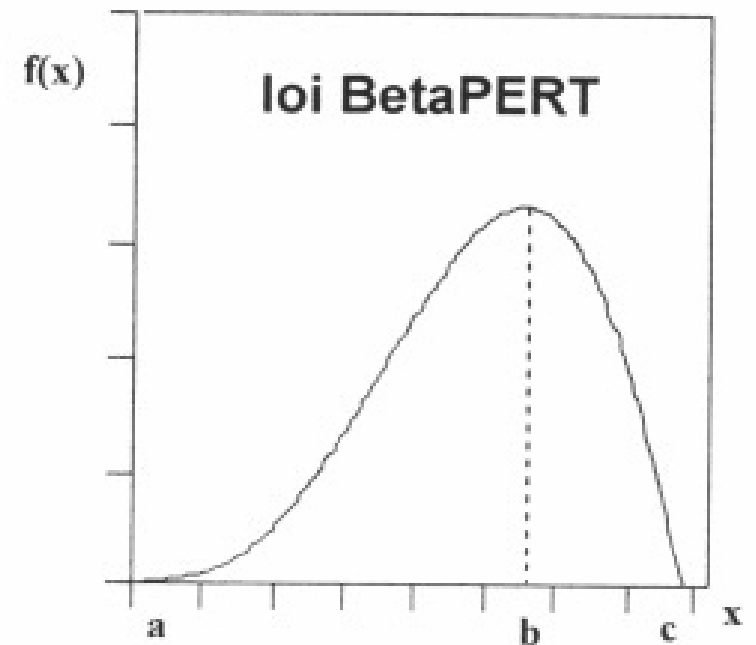
loi uniforme

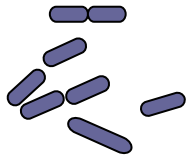


loi triangulaire



lois plus complexes mais de forme plus naturelle

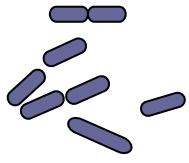




Application à notre exemple simplifié

Prise en compte des sources de variabilité

- choix d'un modèle classique pour la loi dose réponse : modèle log-normal prenant en compte une variabilité sur N_p ($\log_{10}(N_p) \sim \mathcal{N}(\mu=7; \sigma=1.5)$) (valeurs fictives)
- choix des distributions sur les paramètres de l'exposition: utilisation des distributions observées pour T et d et d'une loi log-normale décrite à partir des données observées pour N_0 ($N_0 \sim \mathcal{N}(\mu=-1; \sigma=0.6)$)



Application à notre exemple simplifié

Prise en compte de l'incertitude liée à l'utilisation d'un modèle de croissance microbienne

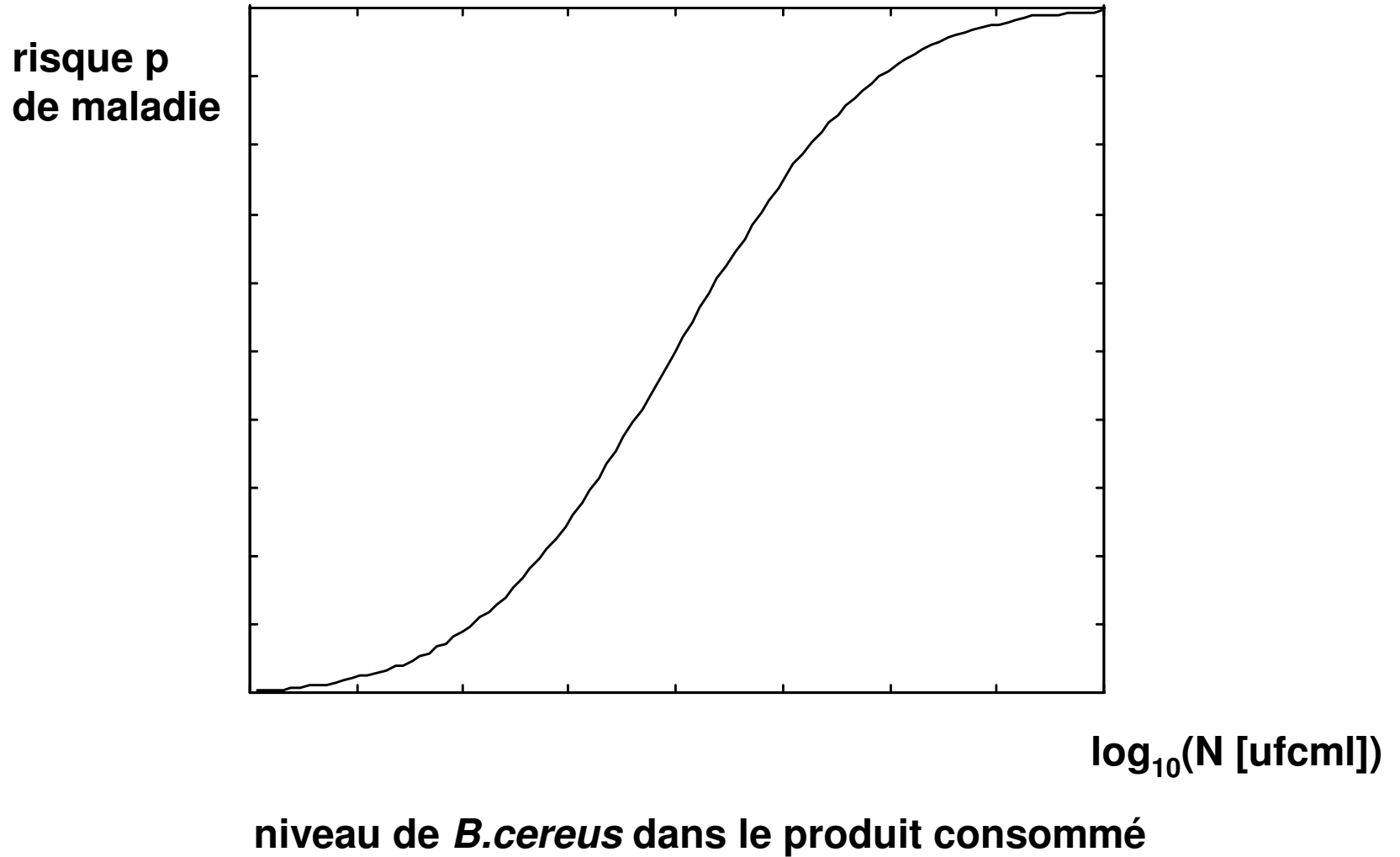
utilisation du modèle de Zwietering et al. (1996) avec prise en compte de l'incertitude sur la prédiction :

$$\mu = \mu_{\text{prédit}}(1 + \varepsilon)$$

$$\text{avec } \varepsilon \sim \mathcal{N}(\mu = -0.1; \sigma = 0.25)$$

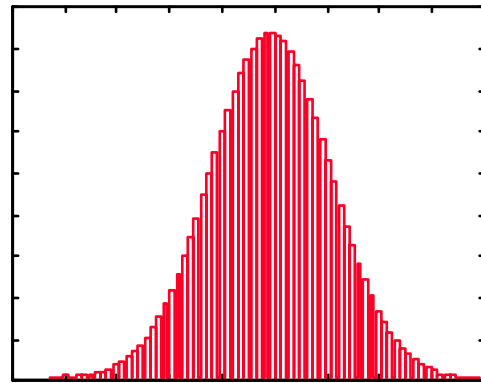
d'après données observées de validation des modèles en prédiction (Delignette-Muller *et al.*, 1995)

Graphe de la loi dose-réponse

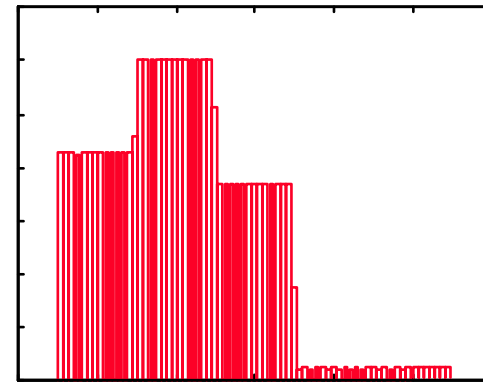


Histogrammes des valeurs des paramètres échantillonnées (pour 10 000 tirages)

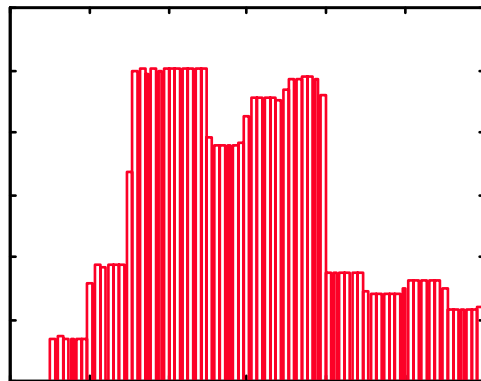
effectifs



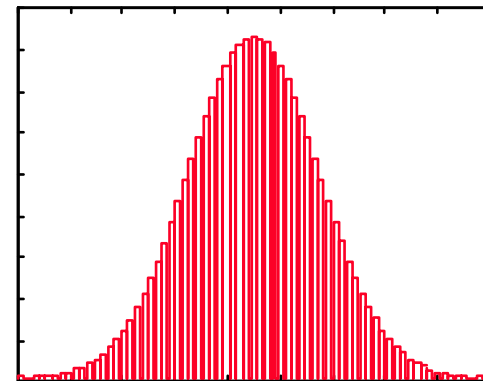
$\log_{10}(N_0)$



T



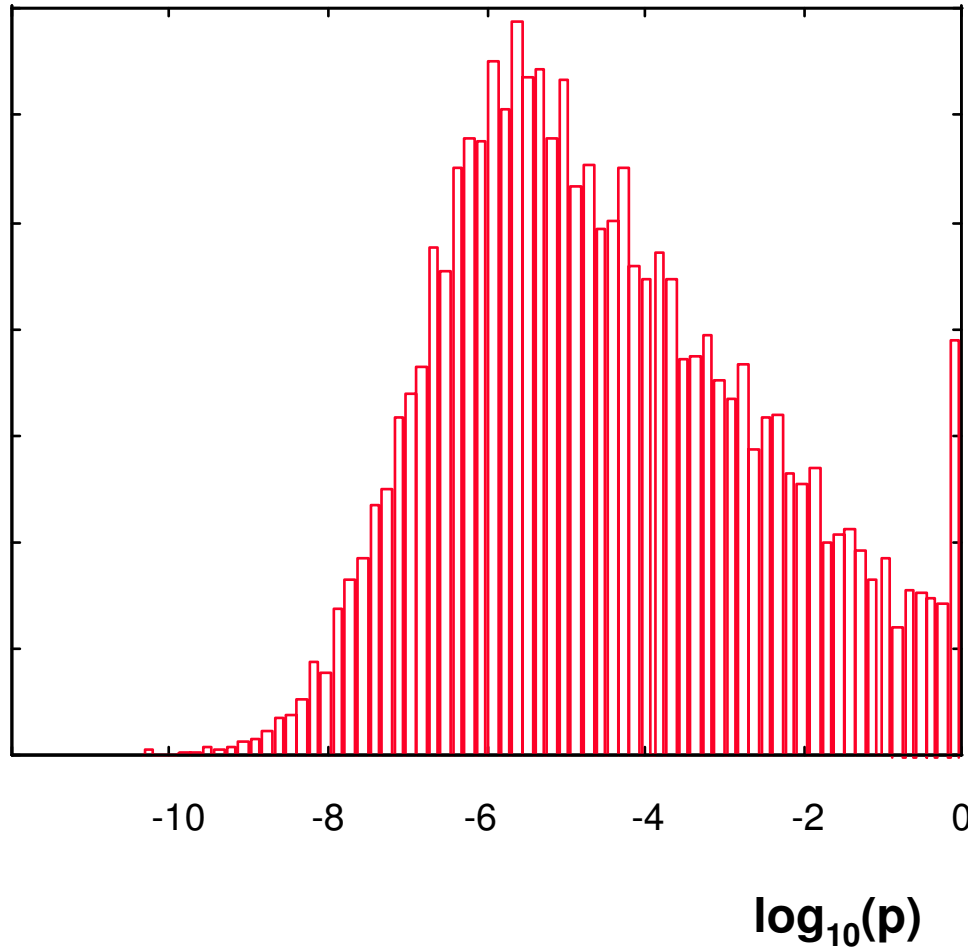
d



ϵ

Distribution en fréquences du risque d'effet pathogène (p)

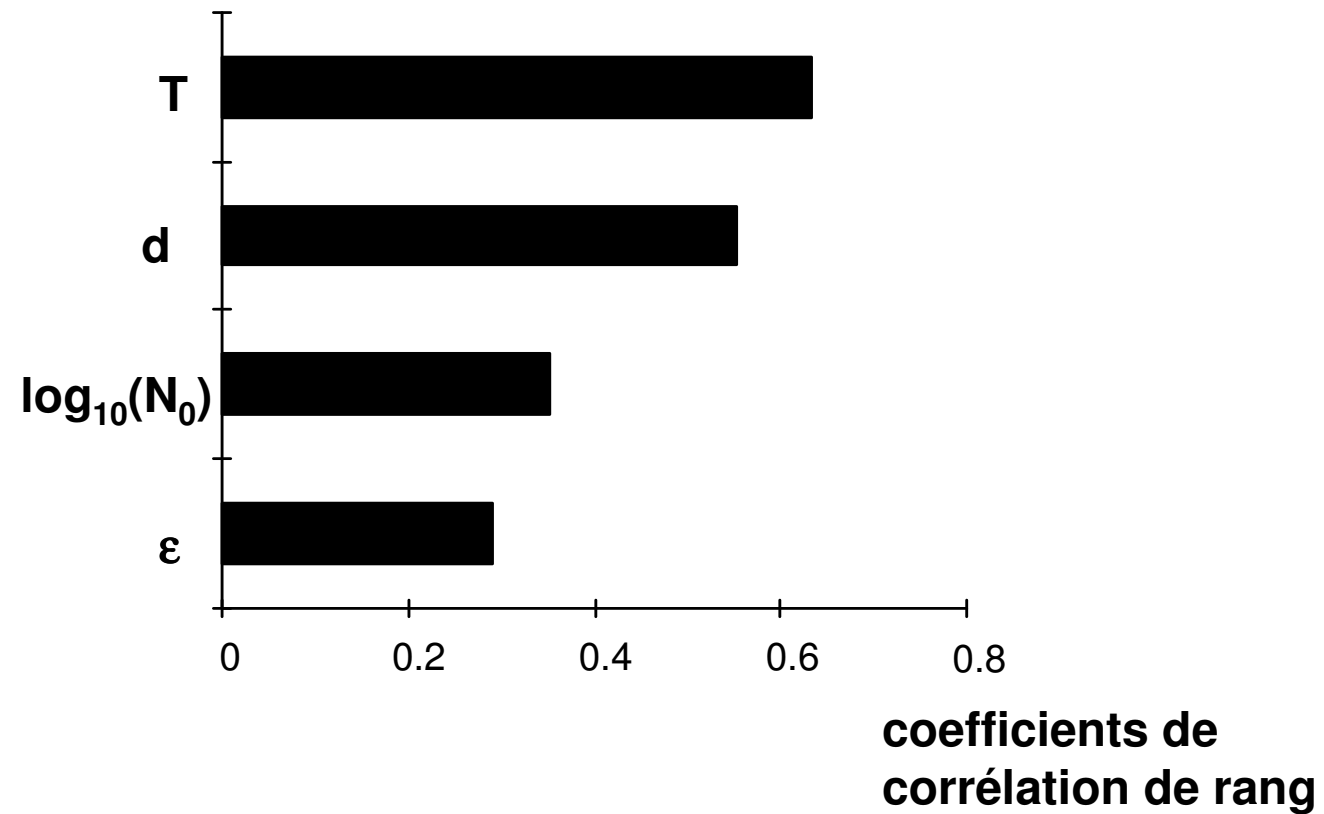
effectifs

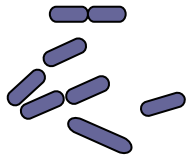


- Distribution du risque p s'étalant de 10^{-10} à 1 avec un mode à 10^{-6} - 10^{-5}
- Marge d'incertitude sur le risque non calculable : incertitude et variabilité mêlées

Analyse de sensibilité du risque p aux différents paramètres: "Tornado Chart"

Paramètres

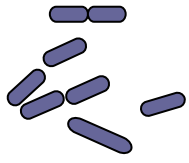




Critique du cas étudié

- Loi dose-réponse sans réel fondement biologique
- Scénario thermique très simpliste, sans prise en compte des variations thermiques (ex. : ruptures de la chaîne du froid)
- Modèle de croissance microbienne simplifié
- Distributions grossièrement définies
- Eventuelles corrélations entre paramètres non prises en compte

Analyse très grossière à affiner



Résultats sur un cas plus réaliste

**« Quantitative risk assessment for
Escherichia coli O157:H7 in ground
beef hamburgers »**

(d'après Cassin *et al.*, 1998)

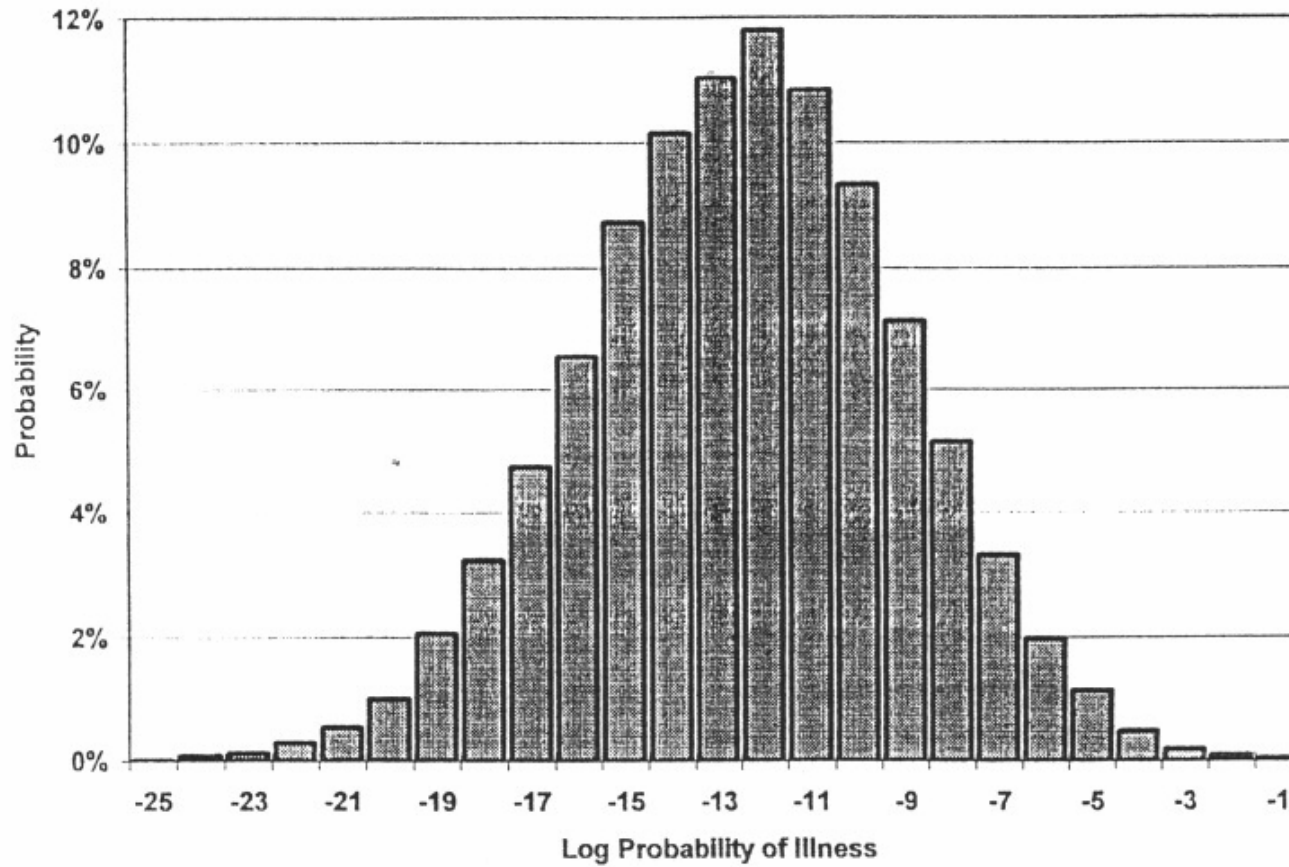


Fig. 4. Probability distribution for probability of illness from a single hamburger meal predicted by the *E. coli* O157:H7 Process Risk Model

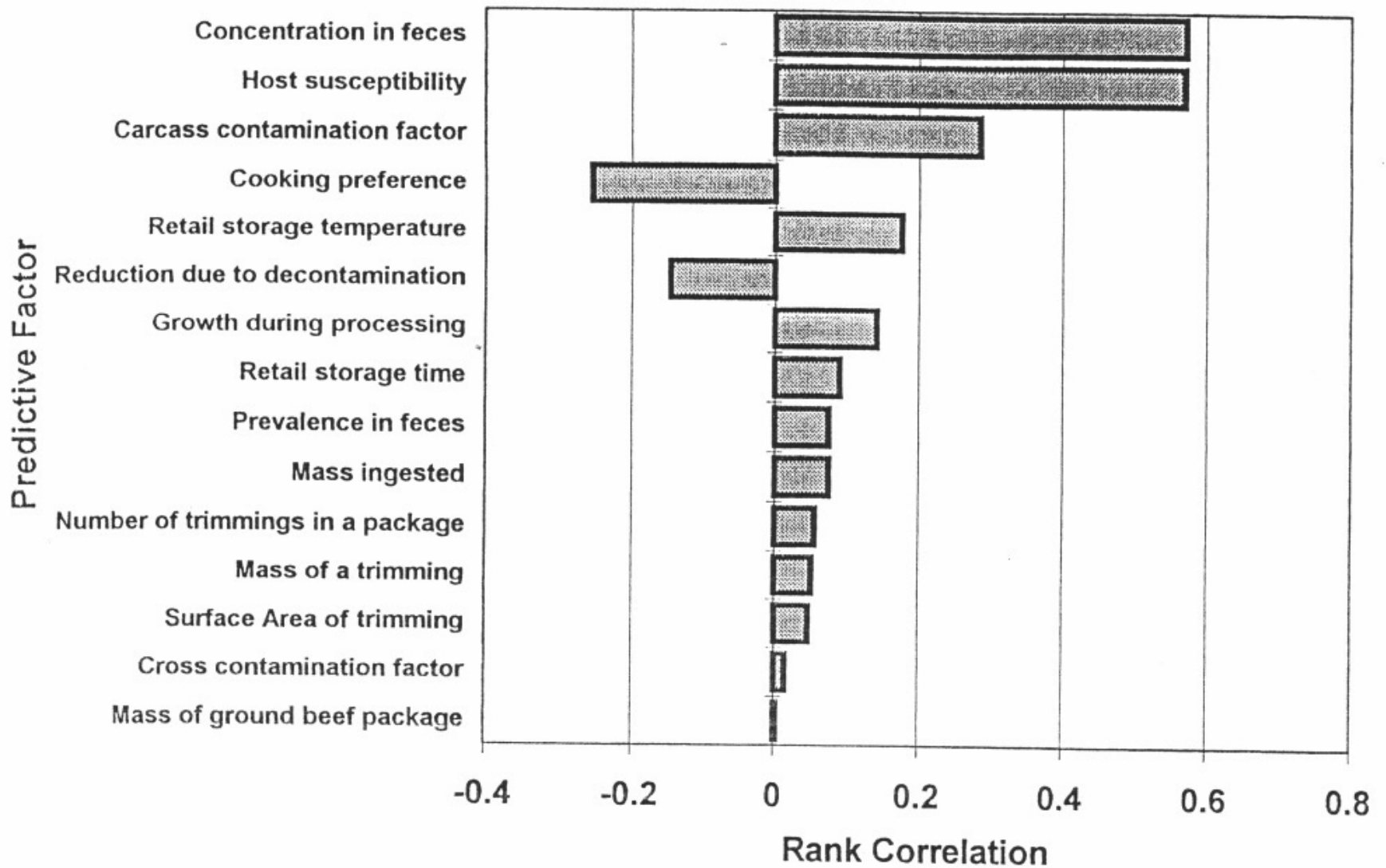


Fig. 5. Spearman rank correlation between the estimated probability of illness and the fifteen most important predictive factors of the Process Risk Model (PRM).

Etude de quelques scénarios de prévention

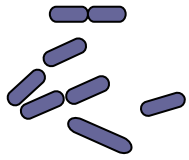
M.H. Cassin et al. / International Journal of Food Microbiology 41 (1998) 21–44

37

Table 7

Efficacy of hypothetical risk mitigation strategies: Percent reduction in predicted per meal illness from *E. coli* O157:H7 given assumed compliance (see text)

Strategy	Control variable	Predicted reduction in illness
1. Storage temperature control	Maximum storage temperature (T_s)	80%
2. Pre-slaughter screening	Concentration of <i>E. coli</i> O157:H7 in feces (C_p)	46%
3. Hamburger cooking. Consumer information program on cooking hamburgers	Cooking temperature (T_{CKG})	16%



Perspectives méthodologiques

Critique du Monte carlo 1D

- Incertitude et Variabilité traitées sur le même plan dans les simulations
- ⇒ Difficulté d'appréciation de l'incertitude sur le résultat final

Solution:

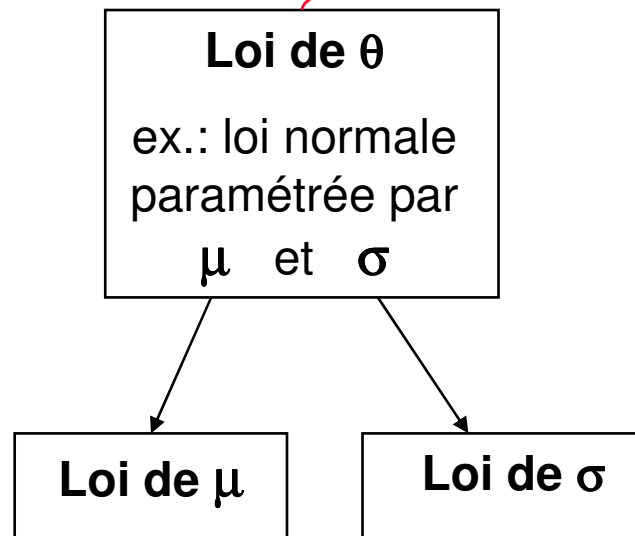
- **Modélisation à 2 niveaux**
(1/ variabilité, 2/ incertitude sur variabilité)
- **Simulations par Monte Carlo à 2 dimensions (2D)**

Principe du Monte Carlo 2D

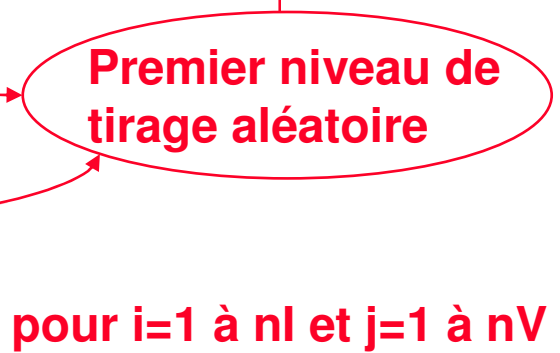
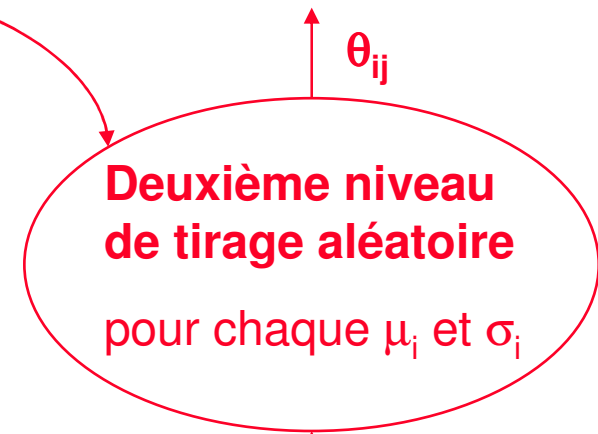
Modélisation

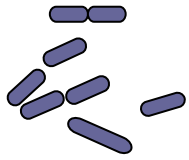
Variabilité sur le paramètre θ

Incertitude sur la variabilité du paramètre θ



Simulation

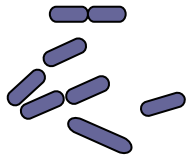




Caractérisation de l'incertitude

Méthodes utilisées

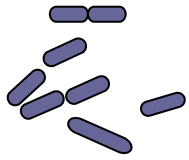
- Approche fréquentiste
bootstrap (méthode de rééchantillonnage sur les données)
- Approche bayésienne
prise en compte simultanée d'une information de type connaissance d'experts et de données expérimentales



Résultats des simulations

ni distributions en fréquences du risque (ou niveau d'exposition...)

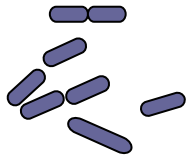
- Pour consulter un exemple concrêt:
Rapport AFSSA 2002: « Evaluation scientifique des risques associés à *Cryptosporidium sp.* »



Avantages et inconvénients du Monte Carlo 2D

- **Méthode plus lourde à mettre en œuvre**
- **Incertitude et variabilité parfois difficiles à séparer**
- **Résultats plus difficile à lire**

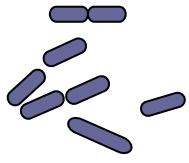
- **Démarche plus complète**
- **Réelle appréciation de l'incertitude sur le risque final**



Conclusions

L'appréciation quantitative du risque en microbiologie alimentaire :

- discipline jeune
- utilisation de simulations de type Monte Carlo avec problématiques méthodologiques en développement
- quelques difficultés spécifiques liées à la nature microbiologique du danger
- devrait constituer un outil pertinent pour mieux comprendre l'origine du risque microbiologique



CONCLUSION

- L'application de la microbiologie prévisionnelle à l'appréciation quantitative des risques nécessite des calculs lourds
- Heureusement, les ordinateurs continuent à travailler de plus en plus vite !