



Appréciation quantitative des risques pour l'évaluation de mesures de maîtrise sanitaire dans une filière agro-alimentaire. Application à *Clostridium perfringens* en restauration hospitalière

Séverine Sevrin-Jaloustre

► To cite this version:

Séverine Sevrin-Jaloustre. Appréciation quantitative des risques pour l'évaluation de mesures de maîtrise sanitaire dans une filière agro-alimentaire. Application à *Clostridium perfringens* en restauration hospitalière. Sociologie. AgroParisTech, 2011. Français. NNT : 2011AGPT0059 . pastel-00781728

HAL Id: pastel-00781728

<https://pastel.hal.science/pastel-00781728>

Submitted on 28 Jan 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Doctorat ParisTech

THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech)

Spécialité : Sciences pour l'ingénieur

présentée et soutenue publiquement par

Séverine JALOUSTRE

le 24 octobre 2011

Appréciation quantitative des risques pour l'évaluation de mesures de maîtrise sanitaire dans une filière agro alimentaire. Application à *Clostridium perfringens* en restauration hospitalière.

Directeur de thèse : **Marie Laure DELIGNETTE MULLER**

Co-encadrement de la thèse : **Gérard POUMEYROL**

Jury

M. Marcel ZWIETERING, Professeur, Laboratory of Food Microbiology, Wageningen University

M. Jean Christophe AUGUSTIN, Maître de Conférences, ENVA

Mme Jeanne-Marie MEMBRE, Ingénieur, ONIRIS

M. Eric PARENT, Ingénieur, AgroParisTech

Mme. Marie Laure DELIGNETTE MULLER, Professeur, VetAgroSup, Université Lyon 1

M. Gérard POUMEYROL, Chef d'unité, MAHY, ANSES

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directrice de
thèse

Co-encadrant

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Mme Jeanne-Marie Membré d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et M. Eric Parent d'avoir accepté de présider ce jury.

Mes sincères remerciements vont aussi à M. le Professeur Marcel Zwietering et à Jean-Christophe Augustin qui ont accepté d'être les rapporteurs de ma thèse.

Je remercie tout particulièrement Marie Laure Delignette-Muller et Gérard Poumeyrol, qui ont accepté de diriger cette thèse. Ils ont fait preuve à mon égard d'une très grande disponibilité et leurs conseils, tout au long de ce travail, m'ont réellement permis d'avancer dans la réalisation de cette thèse et de progresser pour acquérir une certaine autonomie. Merci aussi pour votre soutien sans failles !

Merci aussi à tout le personnel de l'ANSES pour votre soutien avec une pensée toute particulière pour les informaticiens, qui m'ont souvent été d'un grand secours. Je tiens aussi à témoigner toute ma gratitude aux membres de l'unité MOB pour leur collaboration et à mes collègues de l'unité MAHY et de l'équipe HPR, avec qui je partagerai longtemps des souvenirs d'effluves de boeuf bourguignon et de goulash, mais aussi de PS, PC.....

De la même façon je tiens à remercier les membres du LBBE pour leur soutien et leurs nombreux conseils. Tout particulièrement ma gratitude va à mes collègues de l'équipe MEPS, qui ont su délaissé les daphnies pour me conseiller sur la modélisation du risque alimentaire.

Merci aussi aux membres du projet 'Quant'HACCP' pour leur collaboration, leur écoute et leurs conseils...

Enfin, je serais tout à fait ingrate si je n'associais pas à ces remerciements mes proches, parents et amis, dont le soutien m'a permis de mener à bien cette thèse malgré les obstacles rencontrés.

*A Chloé et Quentin, Daniel.... merci pour votre patience ! que de moments
à rattraper !*

*A Michèle... MERCI... tu as brillamment rempli ton contrat... je n'en
doutais pas*

Résumé - Abstract

Résumé

Dans ce travail, un modèle d'appréciation quantitative des risques microbiens a été développé pour proposer des mesures de maîtrise sanitaire et les relier à des métriques du risque. A partir d'observations réalisées dans un hôpital, nous avons pu caractériser le procédé de fabrication et de distribution de deux plats de boeuf en sauce, de manière à prédire l'évolution du danger *Clostridium perfringens* tout au long de ce procédé en utilisant les outils de la microbiologie prévisionnelle. Dans le modèle d'exposition, nous avons construit un modèle décrivant la germination puis la croissance de *Clostridium perfringens* pendant deux étapes du procédé, et un modèle décrivant la destruction thermique finale des cellules végétatives de *Clostridium perfringens*. Ensuite, pour estimer un risque de diarrhée liée à la consommation de ces plats, nous avons construit un modèle dose réponse.

De manière à pouvoir prédire la gamme des situations possibles, nous avons cherché à décrire, dans chacun des modèles, la variabilité de la réponse biologique modélisée en utilisant des données issues de méta analyse, obtenues dans des conditions variées. L'utilisation de l'inférence bayésienne sur des données issues de méta analyse nous a permis de décrire séparément variabilité et incertitude, suivant les recommandations des instances internationales.

Des simulations de Monte Carlo à deux dimensions sur l'ensemble du procédé nous ont ensuite permis d'estimer le risque moyen de maladie lié à la consommation des plats et d'estimer l'incertitude sur ce risque moyen. Ces

simulations nous ont aussi permis d'identifier deux étapes importantes pour la maîtrise du risque et de proposer, pour chacune de ces étapes, des mesures de maîtrise sanitaire, dont nous avons ensuite mesuré l'efficacité.

Mots clés : appréciation quantitative des risques, microbiologie prévisionnelle, efficacité des mesures de maîtrise sanitaire, incertitude, variabilité, méta analyse, inférence bayésienne.

Abstract

In this study, a quantitative risk assessment model was developed in order to propose control measures making it possible to reach some 'risk based' targets. A survey, carried out in an hospital, made it possible to describe a food chain, from raw material until consumption, of two beef-in-sauce products, such as to predict the evolution of *Clostridium perfringens* along the whole process using predictive microbiology tools. In the exposure assessment model, we described *Clostridium perfringens* germination, outgrowth and growth in a first model, applied on two process steps, and final thermal inactivation of *Clostridium perfringens* vegetative cells in a second model. Then, in order to estimate the risk of diarrhea after the consumption of the two products, we established a dose response model.

In order to predict in our model the full range of possible outcomes, we aimed at describing, in each proposed model, the variability on the modelled biological response using meta analysis data, obtained on various experimental conditions. Performing Bayesian inference on these published data, we separated variability and uncertainty, according to recommendations of international organizations.

Second order Monte Carlo simulations on the whole process made it possible to estimate the mean risk of diarrhea after to the consumption of the products and to estimate the uncertainty on this median risk. Based on these simulations, two key steps for food safety were then identified in the process, leading us to propose, for each step, control measures and to measure their efficacy.

Key words : quantitative risk assessment, predictive microbiology, efficacy of control measures, uncertainty, variability, meta analysis, Bayesian inference.

Laboratoires d'accueil

ANSES

Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (Anses), Laboratoire de Sécurité des Aliments, 23 av. du Gal de Gaulle, F-94706, Maisons-Alfort Cedex, France.

CNRS

Université de Lyon, F-69000, Lyon ; Université Lyon 1, CNRS, UMR5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, F-69622, Villeurbanne, France

Rapport Qualité

RAPPORT QUALITE POUR LE MEMOIRE DE THESE DE S. JALOUSTRE

« PROJET QH-VAL »

Depuis 1990, le laboratoire de sécurité des aliments de l'Anses a mis en place une démarche qualité. Il est accrédité par le COFRAC selon le référentiel NF EN ISO 17025 (portée disponible sur www.cofrac.fr) pour un ensemble de programmes « Essais » correspondant à ses activités d'analyse de contaminants biologiques et physico-chimiques dans les aliments. Depuis 2001, le laboratoire a entrepris une démarche de qualité en recherche et a suivi pour cela les recommandations de la commission AFNOR sur l'assurance qualité en recherche. Un système de management de la qualité en recherche a été mis en place au sein du laboratoire qui s'applique aux travaux de thèse. Un manuel qualité en recherche auquel les unités accueillant des doctorants doivent se référer est en vigueur. Des audits internes sont réalisés régulièrement auprès des unités par le service de management de la qualité du laboratoire. C'est dans ce contexte que le présent rapport qualité pour les travaux de thèse faisant l'objet de ce mémoire a été rédigé. Les audits et le rapport ci-dessous ne concernent que les travaux effectués à l'Anses, au laboratoire de sécurité des aliments de Maisons-Alfort.

Rédacteurs et auditeurs	Service de management de la Qualité : H. Lelièvre (responsable qualité des laboratoires), C. Cecconi et M. Poumeyrol (adjointes) Sous-direction en charge de la recherche au laboratoire : S. Dragacci
Audit Qualité	17 février 2010 ; auditeurs : C. Cecconi, M. Poumeyrol et S. Dragacci
Audit de traçabilité	15 février 2011 ; auditeurs : H. Lelièvre et S. Dragacci
Unité d'accueil	Unité MAHY-Maîtrise de l'hygiène, chef d'Unité Dr G. Poumeyrol (DR2) ANSES-Laboratoire de sécurité des aliments
Date début de thèse	Septembre 2008
Acronyme Thèse	QH-VAL
Titre Thèse	Construction d'une méthode de validation des mesures de maîtrise des risques sanitaires dans une filière agroalimentaire. Prise en compte de la variabilité et de l'incertitude à l'aide d'un modèle hiérarchique. <i>Ce sujet de recherche fait partie intégrante du projet de recherche ANR-Quant'HACCP</i>
Direction de thèse	ML. Delignette-Muller (Unité ModRiqBio, UMR CNRS/ENVL) ; co-direction : G. Poumeyrol (Anses, Unité MAHY)
Chef de travaux à l'Anses	G. Poumeyrol (Anses, Unité MAHY)
Ecole doctorale	ABIES-Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement et Santé (ED n° 0435, AgroParisTech)
Comité de pilotage	G. Poumeyrol (Anses, Unité MAHY), M. Cornu <i>puis remplacée par</i> L. Guillier (Anses, Unité EDB), C. Bonazi (UMR GENIAL, INRA AgroParisTech), E. Parent (Unité MORSE, ENGREF), S. Charles (Unité ModRiqBio, LBBE, UMR5558, CNRS), L. Giuliani (DGAL), M. Mas (ENSV), ML. Delignette-Muller (Unité ModRiqBio, UMR CNRS/ENVL)
Correspondant qualité de l'Unité	E. Morelli

Extrait de la charte des thèses de l'Anses : « Thèse et système de management de la qualité : Les travaux de thèse doivent s'intégrer dans le système de management de la qualité en recherche en place au sein de l'entité. Le management de la qualité en recherche permet de garantir la bonne conduite de la recherche et ainsi de donner confiance dans les résultats de la recherche.

A ce titre, le doctorant accepte d'effectuer ses expériences et manipulations conformément aux méthodes contenues dans le manuel qualité du laboratoire dont il a pris connaissance. Le doctorant accepte qu'un audit qualité ait lieu au cours de son travail ainsi qu'il y ait éventuellement un audit qualité à la fin de son travail, préliminaire à la rédaction du bilan qualité de la thèse par le responsable qualité de l'entité et qui devra accompagner son mémoire de thèse. D'autre part, le doctorant accepte qu'une fois par an ait lieu un bilan qualité de son travail dont les conclusions pourront comporter des suggestions d'amélioration.

L'entité d'accueil du doctorant s'engage à prendre en charge et assurer la formation qualité de l'étudiant et à mettre à sa disposition toute la documentation qualité dont il a besoin. »

Initiation du doctorant à l'assurance qualité

La doctorante a été formée à l'assurance qualité antérieurement à son arrivée à l'Anses ; elle a été correspondante qualité dans une Direction des services vétérinaires. La doctorante n'a pas utilisé le manuel qualité en recherche (MQ R) du laboratoire mais connaît les attendus d'une démarche d'assurance qualité en recherche.

Présentation par la doctorante de son projet de recherche (objectifs, hypothèses de travail)

La doctorante a présenté l'état d'avancement de ses travaux de thèse au regard du programme initial de travail. Le sujet de recherche consiste en la modélisation mathématique du comportement microbien (*C. perfringens*) en fonction de paramètres susceptibles de faire évoluer sa croissance le long de la chaîne d'élaboration et de distribution d'aliments jusqu'aux consommateurs. L'objectif final est de modéliser l'impact de mesures de maîtrise des risques sanitaires préconisées. Les hypothèses sous-tendant le projet de recherche ont été formulées de façon détaillée et figurent également dans des documents écrits (fiche de définition du projet ; comptes-rendus des réunions de travail ; comptes-rendus expérimentaux).

Organisation de la documentation qualité

L'archivage de l'ensemble du dossier de recherche est effectué sur le réseau informatique de l'établissement et sur le site web interne au projet ANR « Quant'HACCP » (sites sécurisés). Les fichiers de données et des paramètres de la modélisation mathématique seront bloqués une fois le travail de recherche publié.

Gestion du projet

La réalisation de ce projet est très structurée car il fait partie intégrante d'un projet ANR « Quant'HACCP ». Il répond aux attendus d'une conduite en mode projet. La co-direction de thèse étant à Lyon (ML. Delignette), le suivi des travaux s'opère en partie à distance par des réunions téléphoniques précédées de la confection de dossiers d'avancement reprenant les questions de recherche précédemment posées, les résultats obtenus, la discussion-interprétation et les nouvelles questions de recherche qui en ressortent. Ces dossiers sont très bien tracés et conservés, ce qui constitue un excellent suivi de la démarche de recherche entreprise.

La valorisation du projet de recherche est avérée par une publication parue et trois en préparation, plusieurs communications orales et affichées.

Expérimentations et traçabilité

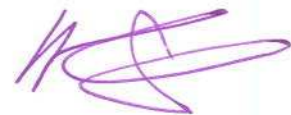
La recherche est individualisée en questions auxquelles correspondent le travail de réflexion conceptuel et le travail d'expérimentation : tout est consigné par écrit et un bilan est effectué par question. Les logiciels et les algorithmes utilisés pour les modélisations sont bien connus et éprouvés par l'équipe de la co-tutelle de thèse. Des propositions d'essais de cohérence pour valider de façon indirecte les constructions de modèles proposées sont appliquées : étude des scripts et épreuve des modèles dans deux langages (ou algorithmes) différents et vérification de leur emboîtement.

Certaines données entrantes utilisées dans le travail de modélisation proviennent de mesures de température effectuées par l'Anses. Un essai de traçabilité s'est révélé satisfaisant même si des améliorations seront à apporter par l'unité d'accueil. D'autres mesures de température sont récoltées auprès des opérateurs dans leurs propres conditions. D'autres données provenant de la littérature scientifique ont été utilisées après un tri raisonné parfaitement décrit. Des sources d'erreur ou impactant la construction du modèle ont été dans le mesure du possible identifiées et prises en compte (ex. : harmonisation des données de divers auteurs ; erreurs d'unité...)

Transfert des programmes sous Excel : la vérification de la cohérence entre les deux modèles a été réalisée et tracée. Des critères définissant la nature d'une cohérence considérée comme satisfaisante restent à définir. Enfin, la validation du modèle « croissance » est proposée par utilisation d'autres données en testant le modèle éprouvé par un modèle décrit dans la littérature.

EN CONCLUSION, L'EQUIPE DE MANAGEMENT DE LA QUALITE DU LABORATOIRE DE SECURITE DES ALIMENTS ATTESTE QUE LES TRAVAUX DE THESE MENES PAR S. JALOUSTRE SE SONT DEROULES EN APPLIQUANT LES ELEMENTS DU SYSTEME QUALITE DU LABORATOIRE. CECI PERMET D'AVOIR CONFIANCE DANS LA CONDUITE DU PROJET DE THESE ET DANS LA FIABILITE DES RESULTATS OBTENUS AU COURS DES EXPERIMENTATIONS.

Fait à Maisons-Alfort, le 30 juh 2011



H. Lelièvre

*Responsable du service Qualité
Anses-Laboratoire de sécurité des aliments
et laboratoire de santé animale*

* * * * *

Valorisation de la thèse

Article publié

Jaloustre, S., Cornu, M., Morelli, E., Noël, V., and Delignette-Muller, M. (2011). Bayesian modeling of *Clostridium perfringens* growth in beef-in-sauce products. *Food Microbiology* 28 : 311 - 320.

Article soumis

Jaloustre, S., Guillier, L., Morelli, E., Noël, V. and Delignette-Muller, M.L.. Modelling of *Clostridium perfringens* vegetative cell inactivation in beef-in-sauce products : a meta-analysis using mixed linear models. En révision à *International Journal of Food Microbiology*.

Articles en préparation

Jaloustre, S., Cornu, M., Prénom, C. and Bergis, H.. Prevalence and fate of *Clostridium perfringens* in beef-in-sauce prepared in hospital catering. Soumission à *Journal of Food Science*.

Jaloustre, S. and Delignette-Muller, M.L.. Bayesian modelling of *Clostridium perfringens* dose response. Soumission à *Risk Analysis*

Présentations orales en congrès internationaux

Modelling of *Clostridium perfringens* growth during cooling, refrigeration and reheating of beef-in-sauce products. Spore forming bacteria in food, June 2009, Quimper, France

Bayesian modelling of *Clostridium perfringens* growth in beef. 6th International Conference Predictive Modelling in Foods, September 2009, Washington, USA

A venir :

Efficiency of a reheating step to inactivate *Clostridium perfringens* vegetative cells : how to measure it ? 7th International Conference Predictive Modelling in Foods, September 2011, Dublin, Irlande

Poster en congrès international

Jaloustre, S., Guillier, L. and Delignette-Muller, M.L. (2010). Modelling of *Clostridium perfringens* vegetative cell inactivation in food products : a meta-analysis using mixed linear models. Food Micro 2010, 30 août-2 sept. 2010, Copenhagen

Table des matières

Termes et définitions	16
1 Contexte - Objectif de l'étude	17
1.1 Efficacité des mesures de maîtrise sanitaire	17
1.1.1 Contexte réglementaire	17
1.1.2 Contexte normatif : la norme ISO 22000	18
1.2 Appréciation quantitative des risques	20
1.2.1 Méthodologie de l'AQR	21
1.2.2 Métriques associées au risque	22
1.2.3 Sorties d'un modèle d'AQR	23
1.3 Variabilité et incertitude	26
1.4 Objectif - Etude de cas	29
1.4.1 <i>Clostridium perfringens</i>	30
1.4.2 Procédé de fabrication	32
1.4.3 Le projet Quant'HACCP	34
1.5 Organisation de la thèse	35
2 Modèle de germination croissance	37
2.1 Introduction	37
2.1.1 Les modèles de croissance	37
2.1.2 Estimation des paramètres des modèles de croissance de <i>Clostridium perfringens</i> : travaux publiés	42
2.2 Recueil des données publiées sur <i>Clostridium perfringens</i> . . .	44
2.3 Construction du (ou des) modèle(s)	48
2.3.1 Choix des modèles de croissance	48

2.3.2	Estimation des paramètres par inférence bayésienne en deux temps	49
2.4	Validation du modèle	62
2.5	Discussion - Conclusion	66
3	Modèle de destruction des cellules végétatives	71
3.1	Introduction	71
3.1.1	Les modèles de destruction	71
3.1.2	Estimation des paramètres des modèles de destruction thermique des cellules végétatives de <i>Clostridium perfringens</i> : travaux publiés	73
3.2	Recueil des données publiées sur <i>Clostridium perfringens</i> . . .	75
3.3	Construction du modèle	77
3.3.1	Choix des modèles de destruction	77
3.3.2	Estimation de paramètres individuels du modèle secondaire	78
3.3.3	Choix du modèle pour décrire l'ensemble des données .	81
3.4	Validation du modèle	92
3.5	Discussion	97
4	Modèle Dose Réponse	101
4.1	Introduction	101
4.1.1	Les hypothèses biologiques à la base des modèles dose réponse	101
4.1.2	Description de la variabilité dans les différents modèles dose réponse	102
4.1.3	Estimation des paramètres des modèles à partir de données	106
4.1.4	Prise en compte de la variabilité et de l'incertitude . .	108
4.1.5	Modèle publié sur <i>Clostridium perfringens</i>	110
4.2	Recueil des données publiées sur la dose réponse	111
4.2.1	Sélection des données	112
4.2.2	Estimation de la dose individuelle et de son incertitude	114

4.3	Construction des modèles	120
4.3.1	Choix du modèle dose réponse	120
4.3.2	Estimation des paramètres par inférence bayésienne . .	120
4.3.3	Comparaison des prédictions avec chaque modèle . . .	130
4.4	Discussion	131
5	Efficacité des mesures de maîtrise sanitaire	135
5.1	Détermination des étapes clés	137
5.1.1	Modélisation de la contamination initiale	137
5.1.2	Estimation du niveau de sécurité sanitaire	139
5.2	Echantillonnage de la température en sortie de cellule de re- froidissement rapide	145
5.2.1	Probabilité de sortie selon les stratégies	151
5.2.2	Risque selon les stratégies	165
5.3	Pilotage de la remise en température	170
5.3.1	Modèle thermique	174
5.3.2	Estimation des valeurs seuils de chaque mesure de maîtrise sanitaire	177
5.3.3	Comparaison des mesures de maîtrise	178
5.4	Discussion	182
6	Conclusion - Discussion	187
6.1	Réalisation des objectifs	187
6.1.1	Modèles microbiens et modèle dose réponse	187
6.1.2	Modélisation du procédé	189
6.1.3	Estimation du risque ‘actuel’ et identification des étapes clés	192
6.2	La méta analyse	193
6.3	Prise en compte de la variabilité	196
6.4	Inférence fréquentiste - Inférence bayésienne	199
6.5	Perspectives	202
	Appendices	231

A	Données de croissance de <i>Clostridium perfringens</i> en conditions isothermes	231
B	Données de croissance de <i>Clostridium perfringens</i> en conditions thermiques dynamiques	239
C	Données de destruction isotherme des cellules végétatives	241
D	Données de destruction en conditions thermiques dynamiques	245
E	Comparaison de toutes les combinaisons possibles d'effets	247
F	Données collectées pour le modèle dose réponse	249
G	Modélisation du procédé	255
H	Acquisition de nouveaux profils	261
I	Article sur la germination croissance de <i>Clostridium perfringens</i>	263

Termes et définitions

Critère de performance (CP) ou *Performance criterion* (PC) (*Codex Alimentarius*) effet recherché sur la fréquence et/ou concentration d'un ou des dangers présentés par un aliment à la suite de l'application d'une ou de plusieurs mesures de maîtrise dans le but de réaliser un OP ou un OSA, ou de contribuer à leur réalisation

Danger lié à la sécurité des denrées alimentaires (ISO 22000) agent biologique, chimique ou physique présent dans une denrée alimentaire ou état de cette denrée alimentaire pouvant entraîner un effet néfaste sur la santé

Degré approprié de protection de la santé (DPA) ou *Appropriate level of protection* (ALOP) (Accord SPS) niveau de protection considéré approprié par le Membre de l'OMC établissant une mesure sanitaire ou phytosanitaire pour protéger la santé et la vie des personnes et des animaux ou préserver les végétaux sur son territoire. Ce concept est aussi dénommé 'niveau acceptable de risque'

Mesure de maîtrise (ISO 22000) action ou activité à laquelle il est possible d'avoir recours pour prévenir ou éliminer un danger lié à la sécurité des denrées alimentaires ou pour le ramener à un niveau acceptable

Objectif de performance (OP) ou *Performance objective* (PO) (*Codex Alimentarius*) fréquence maximale et/ou concentration maximale d'un danger présenté par un aliment à une étape donnée de la chaîne alimentaire précédant la consommation et qui assure ou contribue à assurer la réalisation d'un OSA ou du DPA, comme il convient

Objectif de sécurité alimentaire (OSA) ou *Food safety objective*

(FSO) (*Codex Alimentarius*) fréquence maximale et/ou concentration maximale d'un danger présenté par un aliment au moment de sa consommation et qui assure ou contribue à assurer le degré approprié de protection de la santé (DPA)

Risque (ISO 22000) fonction de la probabilité d'un effet néfaste sur la santé et de la gravité de cet effet

Sécurité des denrées alimentaires (ISO 22000) concept impliquant qu'une denrée alimentaire ne causera pas de dommage au consommateur lorsqu'elle est préparée et/ou ingérée selon l'usage prévu

Toxi Infection Alimentaire Collective (TIAC) (DGAL - Direction Générale de l'Alimentation) apparition d'au moins deux cas groupés similaires d'une symptomatologie, en général gastro-intestinale, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire

Validation (ISO 22000) obtention de preuves démontrant que les mesures de maîtrise (...) sont en mesure d'être efficaces

Chapitre 1

Contexte - Objectif de l'étude

1.1 Efficacité des mesures de maîtrise sanitaire

1.1.1 Contexte réglementaire

Le contexte international impose aux professionnels de l'agro alimentaire, comme aux services de contrôle, de passer d'une obligation de moyens à une obligation de résultat.

La réglementation européenne, plus connue sous le nom de 'paquet hygiène' fixe au professionnel, a comme objectif, d'assurer la sécurité du consommateur. Le professionnel a la responsabilité d'identifier les dangers liés à son processus de fabrication et de les maîtriser au moyen de mesures dont il sera à même de prouver l'efficacité. Cela se traduit par la mise en place d'un plan de maîtrise sanitaire (PMS), basé sur des bonnes pratiques d'hygiène et parfois sur le suivi de points critiques pour la maîtrise ou CCP selon les principes de l'HACCP. Dans ce PMS, le professionnel valide les mesures de maîtrise retenues par l'apport de preuves. Il valide :

- les choix des dangers et des mesures de maîtrise par des références bibliographiques et/ou par son expérience,
- l'efficacité des mesures de maîtrise grâce à des procédures de vérification et un plan d'échantillonnage.

1.1.2 Contexte normatif : la norme ISO 22000

Egalement connue sous la dénomination 'Systèmes de management de la sécurité des denrées alimentaires - Exigences pour tout organisme appartenant à la chaîne alimentaire', la norme ISO 22000 définit des exigences conçues pour s'appliquer à tous les organismes de la chaîne alimentaire, indépendamment de leur taille et de leur complexité. Parmi ces exigences, la première est de 'planifier, mettre en oeuvre, exploiter et mettre à jour un système de management de la sécurité des denrées alimentaires destiné à fournir des produits qui, conformément à leur usage prévu, sont sûrs pour le consommateur.'

L'organisme doit garantir l'identification, l'évaluation et la maîtrise des dangers raisonnablement prévisibles. Pour ce faire, il doit planifier et développer les procédés nécessaires à la réalisation de produits sûrs. Dans une première étape, l'organisme doit, pour réaliser l'analyse des dangers, caractériser :

- le produit aux différentes étapes de sa fabrication, des matières premières au produit fini,
- l'usage prévu et raisonnablement prévisible du produit fini,
- le processus de fabrication du produit, en décrivant les étapes du procédé ainsi que les mesures de maîtrise.

Dans l'étape d'analyse des dangers, l'organisme doit procéder à :

- l'identification des dangers devant être maîtrisés dans le produit ou l'environnement,
- l'identification du niveau acceptable de danger dans le produit fini, défini pour chaque danger par l'autorité compétente et/ou par l'organisme si l'autorité compétente n'a pas fixé d'objectif concernant ce danger ou si l'organisme désire fixer un objectif plus ambitieux,
- l'évaluation des dangers afin de déterminer, pour chaque danger identifié, si son élimination ou sa réduction à des niveaux acceptables est essentielle pour la fabrication d'une denrée sûre et si sa maîtrise est nécessaire pour permettre d'atteindre les niveaux acceptables requis,
- la sélection et l'évaluation des mesures de maîtrise permettant de pré-

venir, d'éliminer ou de réduire les dangers identifiés à des niveaux acceptables définis.

Pour sélectionner les mesures de maîtrise liées à un procédé de fabrication et à un produit, un premier élément à prendre en compte peut être la contribution de chaque mesure de maîtrise à l'atteinte de l'objectif de maîtrise du danger : une mesure participant pour beaucoup à l'atteinte de cet objectif sera préférée à une mesure moins efficace.

De la même façon, un professionnel peut définir, pour son procédé, des mesures de maîtrise qui ont déjà été validées par ailleurs en vérifiant que les conditions de fabrication du produit ne diffèrent pas des conditions dans lesquelles ces mesures de maîtrise ont été précédemment validées. Enfin, d'autres éléments peuvent permettre de définir une priorité de validation comme, par exemple, l'effet néfaste sur la santé et d'éventuels antécédents : il semble important de privilégier les mesures de maîtrise permettant de maîtriser les dangers dont les effets sur la santé sont les plus graves et/ou dont la maîtrise n'a pas toujours été assurée dans l'entreprise. D'autres contraintes peuvent être aussi prises en compte, telles que la faisabilité scientifique et technique, les capacités de surveillance de la mesure de maîtrise... Il est important de définir des mesures de maîtrise applicables dans l'entreprise. Il est aussi important d'examiner la variabilité liée à la mesure de maîtrise et d'estimer l'impact de cette variabilité sur le statut sanitaire du produit.

Une fois les mesures de maîtrise sélectionnées et documentées, l'organisme doit valider que les mesures de maîtrise sélectionnées, seules ou combinées, permettent d'atteindre le niveau de maîtrise prévu des dangers. Les mesures de maîtrise ou leur combinaison doivent être modifiées et réévaluées quand le process de fabrication du produit change ou quand les résultats de la validation indiquent qu'au moins un des deux points n'est pas atteint.

Il existe un éventail de méthodes de validation (*Codex Alimentarius*, 2008), qui peuvent être utilisées individuellement ou en combinaison :

- le renvoi à la documentation scientifique ou technique, aux études antérieures de validation ou aux antécédents reconnus quant à l'effi-

cacité des mesures de maîtrise. Mais il faut vérifier dans ce cas que les conditions d'application de la mesure dans le process correspondent à celles précisées par la documentation utilisée.

- les essais scientifiques expérimentaux confirmant l'adéquation des mesures de maîtrise, en reproduisant en laboratoire les conditions de transformation des denrées. Il est nécessaire de vérifier alors que les essais reproduisent véritablement les paramètres et conditions propres à la transformation.
- la collecte de données dans des conditions opérationnelles normales de production alimentaire. Il est alors nécessaire de recueillir les données biologiques, chimiques ou physiques se rapportant au danger pendant une période spécifique et dans des conditions de production représentatives de l'ensemble de l'opération (y compris les périodes de pointe de production). Cet échantillonnage devrait se baser sur des techniques et méthodologies appropriées de manière à procéder aux analyses statistiques nécessaires.
- la modélisation mathématique. Les modèles de croissance et d'inactivation de pathogènes sont de bons exemples, tout comme les modèles d'appréciation quantitative des risques. Toutefois avant leur utilisation, il est nécessaire de procéder à la validation de ces modèles. Enfin, la validation des mesures de maîtrise basée sur la modélisation mathématique devrait tenir compte de l'incertitude sur les prévisions des modèles.

1.2 Appréciation quantitative des risques

L'appréciation quantitative des risques (AQR) est une démarche scientifique visant à quantifier un ou des risques et (surtout) l'influence de différents facteurs sur ce(s) risque(s). Cette démarche doit être réalisée par l'évaluateur des risques selon des principes d'indépendance et de transparence vis à vis du gestionnaire du risque.

Selon les principes énoncés dans le *Codex Alimentarius*, le gestionnaire du risque interroge l'évaluateur du risque sur une question bien définie, et l'évaluateur du risque utilise l'AQR pour fournir une réponse appropriée au

gestionnaire du risque. Elle respecte le principe d'indépendance de l'évaluation et de la gestion des risques, énoncé dans le Règlement CE 178/2002. De la même façon, cette étude ne porte que sur l'évaluation des risques et fournit au gestionnaire des risques les éléments dont il a besoin.

1.2.1 Méthodologie de l'AQR

La méthodologie d'AQR se décompose en quatre étapes successives :

1. l'identification du danger (*hazard identification*) : identification des agents pouvant causer des effets néfastes sur la santé et liés à certaines denrées ou certains groupes de denrées. Dans cette étude, on se limite aux dangers biologiques (micro organismes, toxines).
2. l'appréciation de l'exposition (*exposure assessment*) : appréciation de l'occurrence et de la concentration d'agent pathogène dans la denrée au moment de sa consommation. Cette étape fournit une estimation de la dose ingérée par les personnes exposées.
3. l'appréciation des effets (*hazard characterisation*) : appréciation des effets néfastes sur la santé résultant de l'ingestion d'une certaine quantité d'agent pathogène. Cette étape vise à construire des modèles dose réponse.
4. l'estimation du risque (*risk characterisation*) : estimation des risques liés à la consommation d'un aliment ou d'un groupe d'aliments au niveau d'une population spécifiée (c'est-à-dire estimation de la probabilité et de la gravité des effets adverses sur la santé). Cette étape s'appuie sur les trois premières.

Le développement d'une AQR utilise des modèles basés sur :

- la connaissance de la chaîne alimentaire décrite, et en particulier des procédés si les procédés sont inclus dans la modélisation (par exemple modèles de transferts de chaleur),
- la caractérisation du danger étudié, c'est-à-dire la description de son comportement dans les aliments (par exemple modèles de microbiologie prévisionnelle),

- la probabilité d'apparition de l'effet néfaste (modèles dose réponse).

Ces modèles s'appuient sur des données, ou à défaut des dires d'experts, relatifs :

- à la prévalence et aux niveaux de contamination du danger étudié (et, si nécessaire, des autres flores microbiennes) dans l'aliment étudié à différentes étapes (*a minima* à l'étape initiale de description de la chaîne alimentaire).
- aux paramètres physico-chimiques caractérisant l'aliment tout au long de la chaîne alimentaire décrite. Parmi ces paramètres, souvent appelés facteurs intrinsèques, on trouve classiquement le pH, l'*aw* et la composition du produit (teneur en sel par exemple).
- aux conditions environnementales dans lesquelles le produit évolue au cours de la chaîne alimentaire (profils thermiques de cuisson, de conservation...). Ces conditions, liées à l'environnement et non au produit, sont souvent appelées facteurs extrinsèques.
- à la consommation du produit. Il est important de pouvoir décrire dans un modèle les quantités de produit consommées par les individus exposés, mais aussi les modes de consommation de ce produit (cru/cuit, mode de cuisson...)
- à l'épidémiologie de l'effet néfaste étudié. Dans une population, certains facteurs, comme par exemple l'âge ou le statut du consommateur, peuvent influencer sur la répartition, la fréquence et la gravité des symptômes liés à une intoxication alimentaire.

1.2.2 Métriques associées au risque

Pour quantifier le risque tout au long de la chaîne alimentaire, des matières premières au risque final comme le montre la figure 1.1, le *Codex Alimentarius* a défini plusieurs métriques relatives au risque alimentaire :

- l'Objectif de Performance (OP ou PO), défini comme la contamination maximale d'un danger présenté par un aliment à une étape donnée de la chaîne alimentaire précédant la consommation et qui assure ou contribue à assurer un certain niveau de sécurité du consommateur.

On peut définir, pour une chaîne alimentaire, plusieurs objectifs de performance, qui seront décrits dans le modèle d'émission.

- l'Objectif de Sécurité Alimentaire (OSA ou FSO), défini comme la contamination maximale d'un danger présenté par un aliment au moment de sa consommation et qui assure ou contribue à assurer un certain niveau de sécurité du consommateur. Ce n'est pas la contamination du danger dans le produit en fin de durée de vie mais bien dans le produit quand il est dans l'assiette du consommateur, ce qui implique de modéliser les utilisations du produit par le consommateur, y compris les mauvaises utilisations raisonnablement prévisibles telles que la rupture de la chaîne du froid par exemple.
- le Degré Approprié de Protection de la santé (DPA ou ALOP), qui peut être défini comme le nombre de cas d'intoxications alimentaires tolérés sur une période donnée liés à un danger dans les conditions actuelles de maîtrise de la sécurité alimentaire. Un DPA peut être général, comme l'incidence actuelle de salmonelloses dans un pays par exemple, ou spécifique, comme l'incidence de cryptosporidioses dues à l'eau de boisson aux USA par exemple (FAO/WHO, 2006).

Ces différentes métriques peuvent être estimées dans des modèles d'AQR.

1.2.3 Sorties d'un modèle d'AQR

Une grande partie des modèles d'appréciation quantitative des risques microbiologiques alimentaires publiés à ce jour concernent des bactéries comme, par exemple, *Listeria monocytogenes* (Pouillot *et al.*, 2007, 2009), *Escherichia coli* O157 :H7 (Haas *et al.*, 2000 ; Teunis *et al.*, 2004 ; Strachan *et al.*, 2005 ; Delignette-Muller *et al.*, 2008), *Salmonella sp.* (Latimer *et al.*, 2001), *Campylobacter* (Rosenquist *et al.*, 2003 ; Nauta and Havelaar, 2008), *Bacillus cereus* (Notermans *et al.*, 1997, 1998), *Staphylococcus aureus* (Lindqvist *et al.*, 2002) et *Clostridium perfringens* (Crouch and Golden, 2005).

Tous les modèles ne décrivent pas la totalité d'une chaîne alimentaire et n'aboutissent pas à l'estimation d'un nombre de cas (Schlundt, 2000). Souvent seule une partie de la chaîne est décrite. Suivant les articles, les

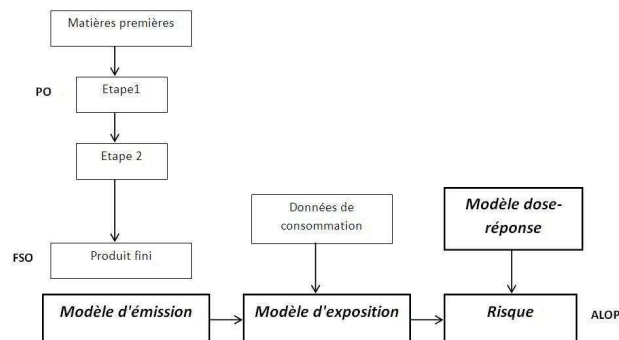


FIGURE 1.1 – Modèles utilisés en appréciation quantitative des risques. Le modèle d'émission vise à estimer une distribution de la concentration en cellules dans le plat au moment de sa consommation, le modèle d'exposition une distribution de la quantité de cellules ingérées par les consommateurs. Le modèle dose réponse permet d'estimer un risque en terme de nombre de cas d'intoxications alimentaires.

modèles d'AQR sont utilisés pour :

- estimer un risque d'effet néfaste. L'effet néfaste décrit par les auteurs peut être l'infection (Whiting and Buchanan, 1997 ; FAO/WHO, 2002), la maladie (Crouch and Golden, 2005), définie de façon plus ou moins précise. En 2008, Delignette-Muller *et al.* ont plus spécifiquement estimé le risque de Syndrome Hémolytique Urémique dû à *Escherichia coli* O157 :H7 chez les jeunes enfants.

Le risque d'effet néfaste est parfois estimé en risque relatif. A titre d'exemple, en 2004, les experts de la FAO ont estimé le risque de listériose dans la population pour une contamination de plats prêts à consommer inférieure ou égale à 1000 cfu.g^{-1} ou cfu.ml^{-1} . Ils ont ensuite estimé, pour cette même contamination, le risque relatif de listériose dans la population 'à risque' (enfants, personnes âgées, femmes enceintes et personnes immunodéprimées). Farber *et al.* (1996) et Bemrah *et al.* (1998) ont estimé le risque relatif de listériose relatif à la consommation de fromages dans la population 'à risque', tandis que Lindqvist and Westöo (2000) et Pouillot *et al.* (2007, 2009) ont estimé le risque de listériose lié à la consommation de saumon fumé.

Dans le cas du danger *Escherichia coli* O157 :H7, c'est souvent le risque de maladie lié à la consommation de steaks hachés qui est estimé (Marks *et al.*, 1998 ; Powell *et al.*, 2000).

- tester des scénarios et leur impact sur la qualité sanitaire du produit, voire sur le risque. Par exemple, en 1998, Cassin *et al.* ont estimé un risque de maladie lié à l'exposition à *Escherichia coli* O157 :H7 dans des steaks hachés. Puis ils ont testé l'effet de différents scénarios, concernant la température de stockage de ces steaks dans le magasin, l'augmentation du temps de cuisson des steaks chez les consommateurs, sur ce risque.
- lier les paramètres de pilotage d'un procédé et les métriques du risque. Dans leur étude sur *Salmonella sp.* en restauration collective, Bemrah *et al.* (2003) ont estimé l'impact du mode de cuisson (four ou sauteuse) sur le risque pur plusieurs niveaux de contamination initiale du produit. En 2011, Sosa Mejia *et al.* ont estimé différents P.O. nécessaires pour atteindre le FSO à différents points de la chaîne de production de plats prêts à réchauffer.
- mesurer l'efficacité de mesures de maîtrise sanitaire. En 2007, Membré *et al.* ont développé un modèle sur *Salmonella sp.* dans la volaille cuite. Ils ont établi un lien entre le FSO et un critère de performance concernant l'étape d'inactivation thermique et ont estimé une durée de traitement à 70°C permettant d'atteindre le FSO.
- identifier les sources de variabilité et d'incertitude ayant un impact important sur l'estimation du risque. Pour ce faire, les auteurs réalisent une analyse de sensibilité de ce risque aux diverses sources de variabilité et d'incertitude. En 2002, Lindqvist *et al.* ont cherché à estimer la proportion de fromages contaminés en *Staphylococcus aureus* en décrivant l'évolution de la contamination dans des fromages à base de lait cru. Ils ont ensuite réalisé une analyse de sensibilité de cette proportion de fromages aux diverses sources de variabilité et d'incertitude. En 2009, Pouillot *et al.* ont combiné un modèle d'exposition et un modèle dose réponse pour estimer le risque de listériose associé à la consommation de saumon fumé en France. Ils ont ensuite réalisé une

- analyse de variance pour évaluer l'impact des paramètres incertains sur le nombre de cas prédits par le modèle.
- imaginer de nouveaux procédés de fabrication permettant d'atteindre le même niveau de sécurité alimentaire, que le niveau acquis avec les procédés de fabrication connus. En 2002, Vaudagna *et al.* ont mesuré l'efficacité du mode de cuisson sous-vide à basse température de viande de boeuf sur la destruction thermique des spores de *Clostridium botulinum*.

1.3 Variabilité et incertitude

Revenons sur ces notions de variabilité et d'incertitude que nous venons d'évoquer. Si on considère, dans une population, un ensemble d'observations x dispersées. Il est important, dans un modèle d'appréciation quantitative des risques, de décrire la dispersion observée. Cette dispersion peut résulter de la variabilité et/ou de l'incertitude.

La variabilité est définie comme l'hétérogénéité naturelle des composantes du système à modéliser (Vose, 2000), comme par exemple le niveau de contamination d'une denrée, une température de cuisson à un stade de la chaîne alimentaire, la durée de conservation d'un produit... La variabilité est décrite par une distribution de valeurs. Certaines variabilités ne peuvent pas être réduites, comme les variabilités d'origine biologique (sensibilité des personnes à un agent pathogène, caractéristiques de souches microbiennes). Celles-ci doivent alors être décrites dans le modèle d'AQR. D'autres variabilités peuvent être réduites mais uniquement en modifiant le système (EPA, 1997) : par exemple, si on constate une forte variabilité du niveau de contamination d'une matière première, le professionnel peut être amené à abandonner certains fournisseurs ou à assainir la matière première par toute mesure de maîtrise appropriée.

La mesure de la variabilité est accompagnée d'incertitude. Cette incertitude est liée :

- aux méthodes de mesure : par exemple, l'existence d'un seuil de détection peut masquer la présence de l'agent pathogène.
- au plan d'échantillonnage : la taille de l'échantillon a des répercussions sur l'estimation de la prévalence d'un agent pathogène dans une denrée.
- au mode de collecte des données : en particulier, la collecte des données par questionnement d'individus génère de l'incertitude.

L'incertitude est définie comme le manque de connaissance ou le niveau d'ignorance du modélisateur sur les paramètres du modèle voire sur le modèle lui-même. En conséquence, l'acquisition de nouvelles données peut (parfois) permettre de réduire l'incertitude sur certains paramètres ou sur le modèle, sans modifier le système à modéliser.

Si, dans un modèle, on considère que la dispersion des observations x ne reflète que la variabilité, alors on peut décrire, dans un modèle probabiliste, cette dispersion par une distribution de variabilité de paramètre θ , considéré comme fixe. Mais dans la mesure où les données utilisées pour ajuster le modèle et estimer θ sont accompagnées d'incertitude, θ peut être considéré comme inconnu et décrit non plus par une valeur unique mais par une distribution de valeurs, appelée distribution d'incertitude dans un modèle hiérarchique (Pouillot, 2006). L'incertitude peut ainsi être décrite par une distribution des paramètres caractérisant la distribution de variabilité dans des modèles hiérarchiques.

Il est recommandé de prendre en compte séparément variabilité et incertitude (Nauta, 2000 ; *Codex Alimentarius*, 2003 ; FAO/WHO, 2006, 2008) afin de décrire la variabilité du risque et d'évaluer l'incertitude sur le risque estimé. Cette prise en compte séparée devrait être réalisée au cours du processus d'inférence pour estimer les paramètres d'un modèle comme pendant l'étape de simulation pour prédire un risque accompagné de son incertitude.

En inférence, l'approche bayésienne permet d'exprimer l'incertitude sur les paramètres d'un modèle. Si on considère une variable aléatoire dont la variabilité est décrite par la distribution $p(\theta)$, dans l'approche bayésienne l'incertitude sur le paramètre θ est décrite par une certaine loi, dite *a priori*, décrivant ce que l'on connaît du paramètre avant d'acquérir de nouvelles

données. Selon l'information disponible, la distribution *a priori* du paramètre θ est plus ou moins vague. L'acquisition de nouvelles données permet d'obtenir une nouvelle distribution, la distribution *a posteriori*, à partir de la distribution *a priori*, cette distribution *a posteriori* étant normalement plus informative que la distribution *a priori* (l'acquisition des nouvelles données est censée permettre d'augmenter la connaissance du paramètre θ) (Robert, 2001 ; Gelman *et al.*, 2004).

Il est parfois possible d'utiliser l'approche fréquentiste pour estimer l'incertitude en ayant recours au bootstrap (Efron and Tibshirani, 1993). Mais la complexité de certains modèles de microbiologie prévisionnelle rend souvent cette tâche difficile.

C'est pourquoi l'approche bayésienne a été de plus en plus utilisée pour estimer les paramètres de modèles d'AQR (Pouillot *et al.*, 2003 ; Ranta *et al.*, 2005 ; Barker *et al.*, 2005 ; Delignette-Muller *et al.*, 2006 ; Crépet *et al.*, 2006 ; Crépet, 2007).

Une fois les paramètres estimés par inférence bayésienne ou par inférence fréquentiste suivie de bootstrap, les simulations de Monte Carlo à deux dimensions, ou de second ordre (Vose, 2000 ; Pouillot *et al.*, 2007) permettent de dissocier la variabilité et l'incertitude. A chaque itération, un jeu de valeurs des paramètres incertains est tiré au sort dans les distributions d'incertitude et, pour ce jeu de valeurs, une distribution de variabilité des variables de sortie est obtenue. Cela permet d'obtenir une distribution de variabilité imbriquée dans la distribution d'incertitude. En résumant par des statistiques (percentiles, moyenne..) chaque distribution de variabilité obtenue avec chaque jeu de valeurs des paramètres incertains, on obtient une distribution d'incertitude de ces statistiques (Cullen and Frey, 1999 ; Pouillot *et al.*, 2007, 2009).

Dans un contexte où variabilité et incertitude doivent être prises en compte, les sorties d'un modèle (risque, FSO ou PO), issues de simulations de Monte Carlo, ne sont donc pas des valeurs uniques mais des distributions de valeurs, tenant compte de la variabilité et de l'incertitude. Des outils adaptés sont alors nécessaires pour décrire la variabilité à partir de données incertaines et pour établir une relation entre paramètres des mesures de maîtrise,

PO, FSO et ALOP. Le passage d'un PO à un FSO puis à un ALOP se fait donc en manipulant des distributions de valeurs et non des valeurs ponctuelles.

Pour la gestion du risque sanitaire, il convient pourtant de fixer des valeurs uniques d'ALOP, de FSO ou de PO. Le gestionnaire du risque doit fixer ces valeurs uniques à partir des distributions du risque, de la concentration en agent pathogène dans le produit au moment de sa consommation et à certains points de sa chaîne de production. Dès lors, quelle valeur choisir : un percentile élevé, la valeur maximale, la valeur moyenne ?

Un des intérêts des simulations de Monte Carlo à deux dimensions est qu'elles permettent d'estimer le poids de l'incertitude et de la variabilité dans la dispersion observée des résultats en estimant les ratios de variabilité et d'incertitude (Ozkaynak *et al.*, 2009).

Un ratio de variabilité élevé indique un fort impact de la variabilité des facteurs du modèle sur l'estimation du risque. Il est alors intéressant de mener une analyse de sensibilité aux sources de variabilité de manière à identifier quelles sources de variabilité en entrée du modèle ont le plus fort impact sur l'estimation du risque (Ellouze *et al.*, 2010).

Un ratio d'incertitude élevé peut indiquer la nécessité d'acquérir de nouvelles données pour estimer les paramètres du modèle. Dans ce cas, une analyse de sensibilité à l'incertitude permet d'identifier quelles sources d'incertitude ont l'impact le plus important sur l'estimation du risque.

1.4 Objectif - Etude de cas

L'objectif de cette étude est de relier les paramètres de pilotage d'un procédé de fabrication et de consommation d'un plat à un risque pour le consommateur en prenant en compte variabilité et incertitude. A l'aide d'un modèle complet d'AQR, il devient possible d'identifier des étapes clés du procédé de fabrication et de la distribution et de définir des mesures de maîtrise dont l'efficacité quant à l'atteinte de niveaux acceptables définis peut être mesurée.

Pour établir ce lien entre paramètres de pilotage et risque, il était intéressant de pouvoir caractériser le plus précisément possible le procédé de fabrication de la denrée ainsi que les étapes de sa distribution au consommateur sans avoir recours à des hypothèses ou des scénarios sur l'une ou l'autre de ces étapes. Aussi avons nous choisi de travailler sur la fabrication d'un plat en restauration hospitalière, nous permettant de collecter des informations précises sur l'ensemble du procédé, des matières premières jusqu'au consommateur. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à un danger connu en restauration collective (Crouch and Golden, 2005) : *Clostridium perfringens*, responsable en 2009 de 13.8% des foyers et de 20.2% des cas de Toxi Infections Alimentaires Collectives (TIAC) à agent étiologique connu survenues dans des collectivités (INVS, 2011).

1.4.1 *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens est une bactérie à Gram positif, sporulée, et anaérobie stricte mais aérotolérante. C'est une bactérie très ubiquitaire largement répandue dans l'environnement (sol, surfaces des végétaux). On la retrouve souvent dans les épices sous sa forme sporulée (Candlish *et al.*, 2001 ; Fujisawa *et al.*, 2001 ; Kalinowski *et al.*, 2003 ; Taormina *et al.*, 2003 ; Aguilera *et al.*, 2005 ; Sagoo *et al.*, 2009). Dans la viande, ce sont plutôt les formes végétatives qui ont été détectées (Strong *et al.*, 1963 ; Hall and Angelotti, 1965 ; Ladiges *et al.*, 1974 ; Bauer *et al.*, 1981 ; Taormina *et al.*, 2003).

Cette bactérie fabrique et sécrète de nombreuses toxines et enzymes hydrolytiques, parmi lesquelles deux toxines plus particulièrement intéressantes :

- la toxine α , potentiellement responsable d'hémolyse et de nécrose tissulaire,
- l'entérotoxine, synthétisée uniquement au cours de la sporulation et responsable d'intoxication alimentaire.

Selon les principales toxines produites, les souches de *C. perfringens* sont classées en 5 toxinotypes (McClane, 2005), parmi lesquels le type A, qui produit la toxine α et plus rarement l'entérotoxine, est particulièrement impliqué dans des épisodes de TIAC (Collie and McClane, 1998 ; Tanaka *et al.*, 2007 ;

Lahti *et al.*, 2007). Toutes les souches de type A ne provoquent pas d'intoxication alimentaire. Les souches de *C. perfringens* de type A impliquées dans ces TIAC produisent la toxine α et l'entérotoxine, ce qui représente 5% seulement des souches de type A (Kokai-Kun *et al.*, 1994 ; Daube *et al.*, 1996).

La thermorésistance des spores est très variable selon les souches, avec des estimations de temps de réduction décimale à 95°C allant de quelques minutes à plus d'une heure (Le Marc *et al.*, 2008). Dans leur étude de 2000, Sarker *et al.* ont montré un lien entre la thermorésistance des spores et la position du gène *cpe*, responsable de la production de l'entérotoxine, qui peut se trouver sur un chromosome ou un plasmide. D'après leur étude, les souches renfermant le gène *cpe* sur un chromosome sont notablement plus résistantes que celles renfermant ce même gène sur un plasmide.

Entre 10 et 53°C, les cellules végétatives sont capables de se multiplier. Placées dans des conditions optimales de température ($\simeq$ 40 à 45°C), de pH ($\simeq$ 6 à 7) et d'*aw* ($\geq$ 0.97), elles se multiplient très rapidement : dans ces conditions, le temps de doublement est de l'ordre de 7 minutes.

Les formes végétatives sont responsables des symptômes d'intoxication alimentaire. Leur sporulation dans l'intestin grêle va provoquer l'émission de l'entérotoxine, déclenchant, 6 à 24 heures suivant l'ingestion du plat contaminé :

- des diarrhées potentiellement violentes (diarrhées en 'chasse d'eau'),
- des maux de tête
- des nausées parfois
- de la fièvre parfois
- des vomissements plus rarement

Ces symptômes sont souvent relativement bénins et disparaissent spontanément en 2 à 3 jours. Toutefois, des mortalités ont été rapportées chez des personnes particulièrement fragiles (Mead *et al.*, 1999). Les personnes âgées, ainsi que les jeunes enfants, prenant leurs repas dans le cadre de restaurations collectives, développent des formes plus sévères de la maladie.

Les aliments impliqués dans les épisodes de TIAC à *Clostridium perfringens* sont souvent des préparations à base de viande, distribuées dans le cadre de la restauration collective, préparées à l'avance et préparées en grande quantité (Crouch and Golden, 2005). Dans ce cadre, la cuisson ne permet pas forcément de détruire toutes les spores présentes dans les matières premières. Au contraire, elle peut constituer un choc chaud capable d'activer ces spores et de les faire germer. De plus, l'ébullition permet un dégazage du produit, recréant des conditions anaérobies propices à la croissance des cellules végétatives, sans ré-oxygénation possible au contact de l'air ambiant du fait du grand volume de préparation. Dans ces conditions, un refroidissement particulièrement lent du produit peut provoquer une forte croissance de *Clostridium perfringens*.

1.4.2 Procédé de fabrication

Nous avons suivi, pendant un an, la fabrication de deux plats de boeuf en sauce, le boeuf bourguignon et la goulash, dans un hôpital parisien. Cette cuisine travaille en liaison froide, puisque 2 ou 3 jours de stockage réfrigéré séparent la préparation de ces plats de leur consommation.

Les matières premières subissent une première étape de cuisson avec un palier de 100°C pendant une heure dans une grande sauteuse. Puis la préparation est répartie dans des bacs multi portions en plastique jetable. Ces bacs sont ensuite operculés avant d'être portés sur un chariot, qui entre ensuite dans des cellules de refroidissement rapide.

Le pilotage de ces cellules de refroidissement est assuré grâce à une sonde thermique plantée dans un des bacs. Dès que cette sonde indique une température de 10°C, un signal sonore prévient l'opérateur, qui vérifie l'atteinte de cette température de 10°C en réalisant une mesure de température avec un thermomètre. Si ce thermomètre indique une température égale ou inférieure à 10°C, le chariot est sorti de la cellule de refroidissement rapide pour entrer en chambre froide. Dans le cas contraire, le refroidissement rapide continue, jusqu'à ce qu'une deuxième mesure, réalisée par l'opérateur, n'indique une température égale ou inférieure à 10°C.

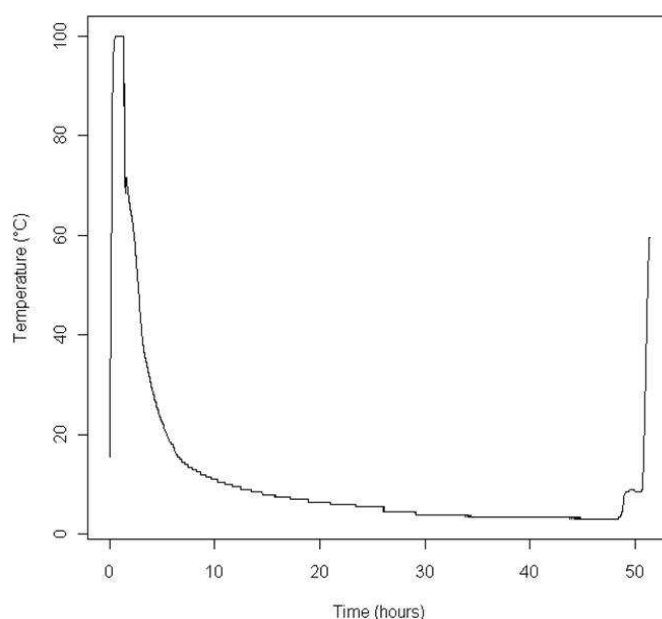


FIGURE 1.2 – Profil thermique correspondant au procédé de fabrication et de distribution de boeuf bourguignon et de goulash dans un hôpital parisien.

Après la phase de stockage à 4°C pendant 2 à 3 jours, les bacs multipor-tions sont partitionnés en assiettes, placées dans des chariots. Montés dans les services, ces chariots servent, dans un premier temps, à assurer le main-tien du plat à basse température puis à permettre sa remise en température avant sa distribution aux patients.

L'utilisation de vaisselle jetable et d'ustensiles et de matériel facilement nettoyables, ainsi que les pratiques des opérateurs, ont rapidement permis d'exclure une éventuelle contamination par l'environnement du plat en cours de fabrication ou de distribution. Dès lors, dans ce procédé de fabrication, la maîtrise du danger *Clostridium perfringens* est supposée ne reposer que sur la maîtrise de la température tout au long du procédé. Aussi des enregistrements continus de la température sur l'ensemble du procédé ont été réalisés pour caractériser au mieux le procédé. Un exemple de profil thermique est présenté dans la figure 1.2.

Des analyses ont montré la présence de cellules végétatives et de spores

de *Clostridium perfringens* dans les matières premières. Mais l'étape de cuisson est supposée détruire toutes les cellules végétatives présentes dans les matières premières. Ainsi la contamination finale du plat en cellules végétatives de *Clostridium perfringens* provient de la germination de spores présentes dans les matières premières ayant résisté à la cuisson.

Le modèle microbien complet décrivant le procédé peut être divisé en 3 modèles :

- un modèle de destruction des spores pendant la cuisson,
- un modèle de germination-croissance des cellules végétatives pendant le refroidissement rapide et la remontée en température,
- un modèle de destruction des cellules végétatives en fin de remontée en température et pendant la distribution aux patients.

1.4.3 Le projet Quant'HACCP

L'étude de cas '*Clostridium perfringens* en restauration hospitalière' s'inscrit dans le cadre du projet Quant'HACCP. Validé par l'Agence Nationale pour la Recherche, ce projet vise à quantifier l'impact des mesures de maîtrise sanitaire. Piloté par l'ANSES, il rassemble des équipes scientifiques dont les compétences sont complémentaires et des professionnels intervenant dans la collecte des informations nécessaires à la démarche, en particulier des informations concernant les process de fabrication et les données de la surveillance (valeurs des autocontrôles réalisés par les industriels...). De plus, le financement par l'ANR a permis d'élaborer un plan d'échantillonnage des produits finis et intermédiaires fourni et d'augmenter ainsi la taille de la banque de données disponibles en matière de contamination à différents stades du processus ou de la filière.

Ainsi, concernant l'étude de cas présentée, plusieurs équipes ont été impliquées dans la caractérisation du procédé :

- deux équipes de l'ANSES chargées, pour l'une, de collecter les données sur le terrain et, pour l'autre, de réaliser les analyses des matières premières, produits en cours de fabrication et produits finis prélevés *in situ*. Cette campagne de collecte de données a permis de rassem-

bler des données sur la contamination des matières premières, des produits en cours de fabrication et des produits finis, sur les pratiques des opérateurs, et sur les profils thermiques correspondant au process de fabrication et de distribution aux patients.

- des équipes de l'ANSES et du Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive (LBBE, UMR 5558) chargées de la modélisation microbienne,
- des équipes du CEMAGREF chargées de la modélisation thermique,
- une équipe de l'INRA responsable de la modélisation complète du procédé, intégrant modélisation thermique et microbienne et décrivant les processus stochastiques liés à la répartition de la contamination pendant les étapes de portionnement tout au long du procédé.

1.5 Organisation de la thèse

Dans le procédé étudié, la maîtrise du danger *Clostridium perfringens* passant uniquement par la maîtrise de la température, il était important de modéliser le comportement de cet agent pathogène sur tout ou une partie du procédé, et de le modéliser notamment au cours des étapes clés pour la maîtrise du danger, en reliant ce comportement au risque final pour le consommateur.

Considérant la grande variabilité de la thermorésistance des spores de *Clostridium perfringens* (Le Marc *et al.*, 2008), l'étape de cuisson peut entraîner la destruction de toutes les spores présentes dans les matières premières comme elle peut les laisser intactes voire les activer. Dès lors l'absence de spores à la fin de la cuisson ne peut pas être garantie et dans ces conditions :

- un refroidissement trop lent peut entraîner la germination des spores puis une croissance rapide des cellules végétatives jusqu'à des concentrations assez importantes.
- si un réchauffement bien conduit peut provoquer l'inactivation des cellules végétatives, un réchauffement insuffisant peut, au contraire, participer à la croissance des cellules végétatives.

C'est pourquoi nous nous sommes focalisés sur le modèle dose réponse et sur deux modèles microbiens, les modèles de germination-croissance et de

destruction des cellules végétatives, choisis pour leur contribution au risque final.

Pour estimer les paramètres de chacun des trois modèles en prenant en compte les sources possibles de variabilité, nous avons utilisé des données publiées dans différentes études. Une fois construit, chaque modèle a été validé en utilisant encore une fois des données publiées. Puis les trois modèles ont été utilisés

- pour prédire le risque d'intoxication alimentaire à *Clostridium perfringens*,
- pour identifier les mesures de maîtrise sanitaire,
- pour mesurer leur efficacité.

Dans ce manuscrit, les étapes de construction et de validation des modèles ont été séparées de l'étape d'utilisation des modèles. Les trois premiers chapitres décrivent, pour chaque modèle, les étapes de collecte des données, d'estimation des paramètres et de validation du modèle. La quatrième partie décrit l'utilisation de ces modèles sur le procédé étudié.

Chapitre 2

Modèle de germination croissance

2.1 Introduction

L'objectif était de décrire la germination puis la croissance de *Clostridium perfringens* dans des conditions thermiques dynamiques, correspondant au process de fabrication des plats préparés à l'hôpital. Pour ce faire, des modèles ont été sélectionnés parmi les modèles décrits dans la littérature.

2.1.1 Les modèles de croissance

Modèles primaires

Les modèles primaires décrivent l'évolution de la population microbienne au cours du temps dans des conditions stables (température, pH, aw...). Classiquement, on distingue trois phases :

- la phase initiale de latence, caractérisée par le temps de latence λ durant laquelle aucune croissance n'est observée. Cette latence correspond à une phase d'adaptation de la population microbienne aux conditions intrinsèques du milieu (pH, aw) et extrinsèques (température). Aussi la durée de cette phase apparaît-elle liée aux conditions de culture pré-inoculatoires, c'est-à-dire avant l'inoculation des bactéries dans le

milieu où leur croissance est suivie (Membré *et al.*, 1999 ; Whiting and Bagi, 2002 ; Swinnen *et al.*, 2004). Cette phase a un impact très important sur l'estimation d'une croissance finale. Il est donc important de bien la décrire.

- la phase de croissance exponentielle, au cours de laquelle la population microbienne se multiplie rapidement. Cette phase est souvent caractérisée par μ_{max} , le taux de croissance maximum, qui dépend, entre autres, des conditions intrinsèques du milieu (pH, aw) et extrinsèques (température).
- la phase stationnaire, pendant laquelle, la population microbienne ayant atteint sa concentration maximale, ou seuil de saturation, sa croissance est stoppée.

Parmi les modèles primaires proposés dans la littérature, plusieurs ont été utilisés pour décrire la croissance de *Clostridium perfringens* :

- le modèle de Gompertz (Gibson *et al.*, 1988 ; Zwietering *et al.*, 1990) utilisé par Huang (2003) et Smith *et al.* (2004). Ce modèle fait partie des modèles empiriques, dans la mesure où, dans ce modèle, la description de la phase de latence ne repose sur aucune hypothèse biologique. Ce modèle surestime le taux de croissance optimum dans le milieu, défini comme le taux de croissance maximum dans les conditions optimales (McKellar and Lu, 2004 ; Baty and Delignette-Muller, 2004). De plus, il est difficile à utiliser en conditions thermiques dynamiques. (Van Impe *et al.*, 1992 ; Whiting and Cygnarowicz-Provost, 1992 ; Dalgaard, 1995 ; van Gerwen et Zwietering, 1998 ; Membré *et al.*, 1999)
- le modèle logistique (Juneja *et al.*, 1999) utilisé par Sanchez-Plata *et al.* (2005), difficile à utiliser en conditions dynamiques.
- le modèle exponentiel (de Jong *et al.*, 2005), qui, comme son nom l'indique, ne décrit que la phase de croissance exponentielle sans latence,
- le modèle linéaire à compartiments (Huang, 2004), dont il est difficile d'estimer les paramètres et qu'il est difficile d'utiliser en conditions dynamiques,
- le modèle de Baranyi (Baranyi and Roberts, 1994) utilisé par Le Marc

et al. (2008). Ce modèle décrit toutes les phases : la latence grâce à une fonction d'ajustement, la croissance et la phase de freinage avant la phase stationnaire grâce à une fonction de freinage. Ce modèle peut en outre être utilisé en conditions dynamiques (Baranyi *et al.*, 1995; Alavi *et al.*, 1999; Bovill *et al.*, 2000, 2001).

Pour prédire la croissance de *Clostridium perfringens*, nous avons besoin d'un modèle qu'il soit possible d'utiliser en conditions thermiques dynamiques et qui décrive bien la phase de latence, surtout en conditions dynamiques. Pour ces différentes raisons, le modèle primaire de Baranyi avec freinage brutal a été retenu.

La latence correspond à une période d'adaptation de l'inoculum à son nouvel environnement de croissance. La durée de cette période dépend de la nature du milieu d'accueil et de l'état physiologique des cellules inoculées. Souvent, il s'agit de cellules végétatives inoculées dans un nouveau milieu. Dans le cas de *Clostridium perfringens*, dont la croissance est observée en utilisant des spores germant à la suite d'un choc chaud, deux étapes préliminaires viennent s'ajouter : la germination des spores et l'outgrowth, avant l'adaptation des cellules végétatives issues de cette germination. En pratique, il est difficile de différencier ces trois étapes et aucun modèle de microbiologie prévisionnelle ne décrit la germination des spores et l'outgrowth séparément de la latence. Aussi ces trois étapes sont-elles regroupées dans la phase de 'germination-outgrowth-latence' ou gol, décrite comme la latence dans le modèle de Baranyi.

Dans ce modèle, le gol est modélisé par la quantité h_0 , 'work to be done' (Baranyi and Roberts, 1995; Robinson *et al.*, 1998) ou travail à fournir par la cellule pour s'adapter à son milieu et entrer en phase de division, variant entre 0 pour les cellules prêtes à se multiplier et $+\infty$ pour les cellules qui doivent fournir un très gros travail d'adaptation préalable. En conditions expérimentales constantes, h_0 est égale au produit $\mu_{max} \times \lambda$ avec μ_{max} le taux de croissance maximum spécifique et λ le temps de latence (Baranyi and Roberts, 1995). Le modèle de Baranyi peut être utilisé sous sa forme différentielle (Eq. 2.1), par exemple pour prédire une croissance dans des conditions thermiques dynamiques, ou sous sa forme analytique (Eq. 2.2),

pour décrire des données obtenues dans des conditions isothermes.

Dans le modèle utilisé par Le Marc *et al.* (2008), le gol est modélisé par la quantité α_0 avec $\alpha_0 = \exp(-h_0)$, α_0 variant entre 0 et 1 (quand $\alpha_0 \simeq 1$ la bactérie est prête à se diviser).

Définition 2.1.1 (Modèle de Baranyi avec freinage brutal)

Forme différentielle

Soient y la concentration bactérienne à l'échelle $\log_{10}$, q une quantité sans dimension décrivant l'état physiologique de la population microbienne, t le temps et h_0 le 'work to be done' de la population microbienne et $\mu_{max}(t)$ le taux de croissance dans le milieu

$$\begin{cases} \frac{dy}{dt} = \frac{\mu_{max}(t)}{\ln(10)} \times \frac{q(t)}{1+q(t)} \times f(y) & \text{avec } f(y) = \begin{cases} 1 & (y \leq y_{max}) \\ 0 & (y > y_{max}) \end{cases} \\ \frac{dq}{dt} = \mu_{max}(t) \times q(t) & \text{avec } q(t=0) = q_0 = \frac{1}{\exp(h_0 - 1)} \end{cases} \quad (2.1)$$

Forme analytique

Soient y_0 et y_{max} les concentrations bactériennes initiale et maximale à l'échelle $\log_{10}$, $y(t)$ la concentration à l'échelle $\log_{10}$ à l'instant t . Soient h_0 le 'work to be done' de la population microbienne et μ_{max} le taux de croissance dans le milieu

$$y(t) = \min\left(y_0 + \frac{\mu_{max} \times t}{\ln(10)} + \log_{10}[e^{-\mu_{max} \times t} \times (1 - e^{-h_0}) + e^{-h_0}], y_{max}\right) \quad (2.2)$$

Le modèle secondaire

Le modèle secondaire décrit l'influence des conditions extrinsèques (température) et/ou intrinsèques (pH et/ou aw du milieu) sur le taux de croissance μ_{max} . Plusieurs modèles décrivant le seul effet de la température sur le taux de croissance de *Clostridium perfringens* ont été publiés :

- le modèle Square Root (Ratkowsky *et al.*, 1982) utilisé par Amezcuita *et al.* (2005), dont les paramètres sont T_{min} , la température minimale de croissance, et b , un coefficient sans signification biologique.

- le modèle de Ratkowsky (Ratkowsky *et al.*, 1983) utilisé par Juneja *et al.* (1994b, 1999), dont les paramètres sont T_{min} et T_{max} , les températures minimale et maximale de croissance, et b et c , deux coefficients sans signification biologique.
- le modèle des températures cardinales de Rosso (Rosso *et al.*, 1995) utilisé par de Jong *et al.* (2005), dont les paramètres ont une signification biologique (T_{min} , T_{opt} et T_{max} les températures minimale, optimale et maximale de croissance et le taux optimum de croissance dans le produit, μ_{opt} , qui dépend des caractéristiques physico-chimiques du produit) (Eq. 2.3).

La signification biologique de tous les paramètres du modèle des températures cardinales de Rosso est un atout, entre autres, pour l'inférence bayésienne dans la mesure où cela permet de synthétiser les connaissances sur les paramètres dans des distributions *a priori*. Ceci nous a conduit à choisir ce modèle secondaire.

Définition 2.1.2 (Modèle des températures cardinales de Rosso)

Soient $\mu_{max}(T)$ le taux de croissance dans le milieu à la température T , μ_{opt} le taux de croissance optimum dans le milieu (taux de croissance maximum dans le milieu à la température optimale T_{opt}), T_{min} , T_{opt} et T_{max} les températures minimale, optimale et maximale de croissance

$$\mu_{max}(T) = \frac{\mu_{opt}(T - T_{min})^2(T - T_{max})}{(T_{opt} - T_{min})[(T_{opt} - T_{min})(T - T_{opt}) - (T_{opt} - T_{max})(T_{opt} + T_{min} - 2T)]} \quad (2.3)$$

En 2004, Swinnen *et al.* ont montré que le temps de latence, λ , dépendait non seulement des conditions du milieu de croissance mais aussi de la température du milieu pré-inoculatoire. D'autres auteurs ont supposé que la quantité $h_0 = \mu_{max} \times \lambda$ ne dépendait pas des conditions du milieu de croissance mais des conditions du milieu pré-inoculatoire. Dans ce cas, pour des conditions pré-inoculatoires fixées, la quantité h_0 est fixe, ce qui permet d'estimer λ à partir de la valeur de μ_{max} prédite par le modèle secondaire (Augustin and Carlier, 2000; Pinon *et al.*, 2004). Mais en fait, cette quantité h_0 varie pour des conditions pré-inoculatoires fixées (Mellefont and Ross, 2003;

Delignette-Muller *et al.*, 2005 ; Mellefont *et al.*, 2005). Aussi, la valeur de λ , estimée à partir de μ_{max} et de la quantité h_0 considérée comme fixe, ne peut être considérée que comme une approximation de la valeur réelle (Delignette-Muller, 1998 ; Pin *et al.*, 2002). Néanmoins, dans le cas de *Clostridium perfringens*, les conditions pré-inoculatoires, qui correspondent aux conditions de réalisation du choc chaud destiné à activer les spores, varient très peu d’une étude à une autre, comme dans chaque étude. Aussi avons-nous jugé que la quantité h_0 variait peu pour ces conditions pré-inoculatoires et que nous pouvions estimer la valeur de λ à partir de μ_{max} et de la quantité h_0 .

2.1.2 Estimation des paramètres des modèles de croissance de *Clostridium perfringens* : travaux publiés

De nombreuses études ont été publiées sur la croissance de *Clostridium perfringens* dans différents milieux de croissance et différentes matrices alimentaires, parmi lesquelles les études de Blankenship *et al.* (1988), Huang (2003, 2004), Amezcuita *et al.* (2005), de Jong *et al.* (2005), Juneja *et al.* (2008) et Le Marc *et al.* (2008). Dans certaines de ces études, les auteurs ont estimé les paramètres d’un modèle primaire et d’un modèle secondaire ne décrivant que l’effet de la température sur μ_{max} en utilisant des données collectées en conditions isothermes. Puis ils ont validé le modèle de croissance en utilisant des données collectées dans des conditions thermiques dynamiques. Seuls Le Marc *et al.* (2008) ont cherché à décrire en plus l’effet de facteurs intrinsèques (propriétés physico-chimiques des milieux de croissance ou des matrices alimentaires) sur le taux de croissance dans un modèle secondaire.

Pour estimer les paramètres de leurs modèles de croissance, tous les auteurs ont utilisé des données personnelles, à l’exception de Le Marc *et al.* (2008), qui ont utilisé des données publiées à la fois pour estimer les paramètres de leur modèle et pour le valider.

Dans toutes ces études, les auteurs ont estimé séparément les paramètres des modèles primaire et secondaire

- en estimant d’abord les paramètres du modèle primaire à partir de cinétiques de croissance sous forme de données de dénombrement pour différentes températures constantes.
- en ajustant ensuite un modèle secondaire sur les taux de croissance μ_{max} estimés à partir de chaque cinétique de croissance.

En réalisant cette estimation en deux étapes distinctes, cette méthode ne tient pas compte de la précision de chaque estimation de taux de croissance réalisée pendant la première étape. Ainsi, par exemple, un taux de croissance estimé à partir de 3 points expérimentaux de dénombrement et un autre taux de croissance estimé à partir de 10 points expérimentaux de dénombrement participent de la même façon à l’estimation des paramètres du modèle secondaire, pour des niveaux de précision assez différents. C’est pourquoi il est statistiquement préférable d’estimer de manière simultanée les paramètres des modèles primaire et secondaire à partir d’un jeu de données complet, comme cela a été proposé par de nombreux auteurs (Bréand *et al.*, 1999; Pouillot *et al.*, 2003; Bernaerts *et al.*, 2005; Delignette-Muller *et al.*, 2006).

Enfin, les modèles publiés (Blankenship *et al.*, 1988; Huang, 2003, 2004; Amezquita *et al.*, 2005; de Jong *et al.*, 2005; Juneja *et al.*, 2008; Le Marc *et al.*, 2008) prédisaient des croissances déterministes, ne prenant en compte aucune source de variabilité ni d’incertitude. Dès lors, ces modèles publiés pouvaient difficilement être utilisés en appréciation quantitative des risques (Nauta, 2002) puisqu’ils ne décrivaient pas l’ensemble des croissances possibles pour un scénario thermique donné. A cet égard, l’inférence bayésienne a déjà montré son utilité pour modéliser séparément variabilité et incertitude dans des modèles d’appréciation des risques (Pouillot *et al.*, 2003; Delignette-Muller *et al.*, 2006; Crépet *et al.*, 2009).

L’objectif de cette étude était de modéliser la germination puis la croissance de *Clostridium perfringens* en conditions thermiques dynamiques en prenant en compte les sources potentielles de variabilité et d’incertitude, dans le respect des prescriptions de la FAO (*Code de Alimentarius*, 1999; FAO/WHO, 2006, 2008). C’est pourquoi nous avons utilisé des données issues de méta analyse et obtenues dans des conditions expérimentales aussi variées que

possible. L'estimation des paramètres des modèles primaire et secondaire a été réalisée simultanément grâce aux techniques d'inférence bayésienne. Le modèle a ensuite été validé en utilisant des données publiées obtenues dans des conditions thermiques dynamiques.

2.2 Recueil des données publiées sur *Clostridium perfringens*

L'objectif de ce recueil était d'obtenir des données permettant d'estimer les paramètres d'un modèle qui prédit la croissance de *Clostridium perfringens* dans les trois produits identifiés (la viande et les deux sauces). Des mesures de pH réalisées tout au long du procédé de fabrication et de distribution, le suivi des pratiques des personnels (ajout d'ingrédients...) nous ont permis de supposer que les caractéristiques physico-chimiques de ces trois produits n'évoluent pas ou très peu au cours du procédé. C'est pourquoi les données publiées collectées proviennent de produits similaires dont la composition et/ou les caractéristiques physico-chimiques n'ont pas été modifiées. Ainsi, quand dans certaines publications (Juneja and Marmer, 1996) les auteurs ont testé l'effet d'un de ces paramètres sur la croissance de *Clostridium perfringens*, seules les cinétiques correspondant au produit non modifié ont été utilisées.

Les données qui ont pu être collectées correspondent à des données observées :

- sur des milieux différents (6 milieux de croissance et 5 produits alimentaires) car ces données sont susceptibles d'apporter de l'information sur certaines propriétés comme les températures cardinales, supposées indépendantes du produit. Du fait que ces données proviennent de méta-analyse, certains produits et milieux sont très peu représentés par rapport à d'autres.
- avec des souches seules mais aussi des cocktails de souches différents d'une étude à l'autre (tableaux A.1 pour les données brutes et A.2 pour les paramètres, en annexes). Les souches utilisées ne sont pas uni-

formément réparties entre les produits. D'une étude à une autre, non seulement le produit change mais aussi la (ou les) souche(s) utilisée(s), ce qui peut entraîner des confusions entre les effets dûs à la souche et ceux dûs au produit. Devant l'impossibilité de dissocier effet souche et effet produit et dans l'optique de prédire la croissance de *Clostridium perfringens* dans trois produits dont la contamination est, en pratique, inconnue en terme de souches, nous avons choisi de négliger la variabilité entre souches.

- dans des conditions isothermes. Toutes les cinétiques récoltées sont obtenues à des températures constantes entre 13 et 51°C, dans la limite des conditions de maîtrise de la métrologie (certaines données ont été acquises dans les années 1980).
- après un choc chaud qui ne correspond pas à la cuisson des deux plats. La croissance de *Clostridium perfringens* a été, dans la majorité des études, suivie à partir de spores subissant un choc chaud destiné à les activer. Classiquement, ce choc chaud est de 75°C (80°C dans certaines publications) pendant 20 minutes. Il est supposé activer toutes les spores sans les détruire mais on trouve peu de données permettant de faire réellement le lien entre une contamination initiale en spores et une concentration en cellules végétatives après le choc chaud.

De manière générale, peu d'informations sont disponibles sur l'efficacité de ce choc chaud 'classique' sur la germination des spores et les chocs chauds correspondant à des conditions plus réalistes de cuisson sont encore moins documentés. Devant l'impossibilité de modéliser l'évolution de la germination au cours du choc chaud pour établir un lien entre contamination initiale en spores et concentration en cellules végétatives immédiatement après le choc chaud, nous nous sommes placés dans l'hypothèse sécuritaire d'une germination de toutes les spores présentes dans les matières premières.

- dans des conditions anaérobies ou aérobies. *Clostridium perfringens* est une bactérie anaérobie mais pas anaérobie stricte. Des croissances moins rapides ont été observées en présence d'air (Juneja *et al.*, 1994a, 1994b). Dans notre fichier de données, pour chaque courbe ce facteur

a été relevé et codé en variable qualitative binaire : sv (sous vide) pour les croissances observées en conditions anaérobies, c'est-à-dire dans des sacs scellés, et sa (sous air) pour les croissances observées en conditions aérobies, c'est-à-dire le plus souvent dans des mêlées de produit sans sac.

Mais des études (Smith *et al.*, 2004) ont montré que certains sacs utilisés lors d'expériences pour créer des conditions anaérobies étaient perméables à l'oxygène, n'assurant pas pleinement l'anaérobiose. A l'inverse, lorsqu'on utilise une grande quantité de viande, préalablement bouillie (donc appauvrie en oxygène) et avec un fort inoculum, même sans sac, au coeur des morceaux, les conditions anaérobies peuvent être recrées.

De ce fait, le codage binaire sv/sa dans notre fichier, basé surtout sur l'utilisation ou non de sacs, paraît inexploitable. De plus, pendant le procédé étudié, la mûlée bout pendant plus d'une heure, on peut donc imaginer un passage de conditions aérobies vers des conditions anaérobies. Nous avons donc décidé d'utiliser sans distinction toutes les données obtenues sous vide et sous air.

D'une étude à une autre, plusieurs facteurs variaient : les souches utilisées, le milieu de croissance ou le produit alimentaire, la nature du choc chaud... Dès lors, il était difficile d'expliquer les variations entre études par l'effet d'un facteur en particulier. Entre autres, l'effet de la souche sur les températures cardinales et le taux optimum de croissance n'a pas pu être modélisé par manque de données obtenues sur des souches seules tout autre facteur ne variant pas par ailleurs.

Collectées en utilisant des bases de données électroniques (COMBASE, SymPrevius..) et à partir d'articles, nos données étaient de deux types :

- des données brutes, présentées sous la forme de dénombrements (en $\log_{10}cfu.g^{-1}$ ou $\log_{10}cfu.ml^{-1}$) à intervalles réguliers (en heures) à une température constante (tableau A.3 en annexes).
- des estimations des paramètres des modèles primaires de croissance, présentés sous la forme de taux spécifiques maximum de croissance (en

h^{-1}), de temps de latence (en h), de temps de génération (en h) à une certaine température (tableau A.4 en annexes). Pour estimer ces paramètres, les auteurs utilisent différents modèles (modèle de Gompertz (Labbé and Huang, 1995), de Baranyi (Juneja *et al.*, 2008)..) dont certains peuvent notamment induire une surestimation du taux de croissance (Whiting and Cygnarowicz, 1992; Dalgaard, 1995; Membré *et al.*, 1999; McKellar and Knight, 2000; Baty and Delignette-Muller, 2004). Le choix du modèle utilisé pour estimer les paramètres est donc un facteur important qui peut jouer sur la fiabilité des estimations.

Ces paramètres sont estimés plus ou moins précisément selon le nombre de points récoltés sur la courbe. En l'absence des données brutes, ce nombre de points nous est inconnu et nous ne pouvons pas apprécier la précision de chaque estimation que nous utilisons.

D'autre part, dans certaines publications, l'estimation de ces paramètres se fait après l'identification de points 'anormaux' sur les courbes de croissance, identifiés comme des *outliers*. Selon les auteurs et selon 'l'anomalie', soit l'*outlier* soit le jeu de données correspondant à la courbe de croissance sont supprimés sans critère d'exclusion objectif.

De manière plus générale, sur ces deux types de données, nous avons aussi pu relever des problèmes de reproductibilité de l'expérience. A titre d'exemple, dans la figure 2.1, les estimations des taux maximum spécifiques de croissance peuvent différer de manière importante d'un réplicat à l'autre. Ainsi les taux estimés à 43°C par Juneja *et al.* (2008) sont de $4.65 h^{-1}$ pour un réplicat et $6.53 h^{-1}$ pour l'autre.

Ainsi, nous disposons de deux types de données : des données brutes, plus fiables mais peu nombreuses (25 cinétiques sur le boeuf par exemple), et des paramètres, données plus nombreuses mais moins fiables.

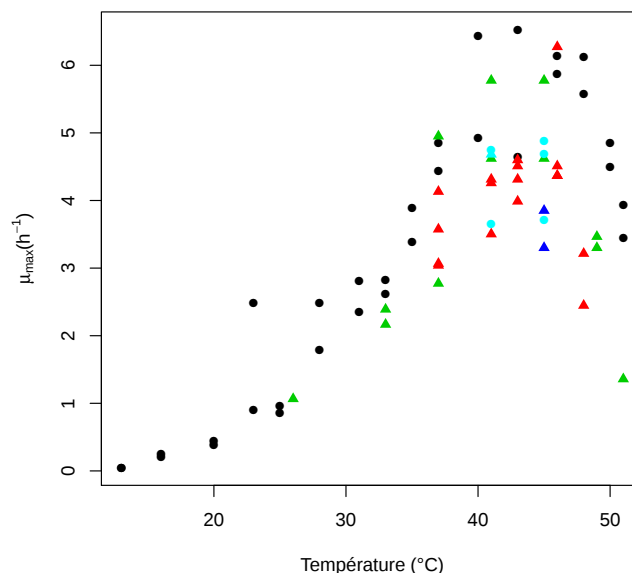


FIGURE 2.1 – Taux maximum spécifiques de croissance collectés dans la littérature dans le boeuf dans des conditions aérobies (‘sous air’, représentés par des triangles sur le graphe) et anaérobies (‘sous vide’, représentés par des ronds). La couleur des points représente l’étude (Schroder and Busta, 1971; Willardsen *et al.*, 1978; Willardsen *et al.*, 1979; Labbé and Huang, 1995; Juneja *et al.*, 2008).

2.3 Construction du (ou des) modèle(s)

2.3.1 Choix des modèles de croissance

Pour modéliser la croissance de *Clostridium perfringens* à température constante, nous avons choisi le modèle primaire défini par Baranyi et Roberts (1994) et utilisé par le Marc *et al.* (2008) (voir la section 2.1.1). Etant donné que parmi les cinétiques collectées dans les données brutes, certaines n’ont été suivies que pendant les phases de latence et de croissance exponentielle sans atteinte du plateau correspondant à la phase stationnaire, nous avons utilisé le modèle de Baranyi avec freinage brutal (Eq. 2.2), c’est-à-dire en définissant le seuil de saturation à l’aide du dernier point observé.

Dans le procédé de fabrication des 2 plats étudiés, le seul paramètre qui varie au cours du temps est la température. Nous n'avons donc modélisé que l'effet de la température sur μ_{max} , en utilisant le modèle des températures cardinales décrit par Rosso *et al.* (1995). Il est généralement considéré que les températures cardinales (T_{min} , T_{opt} et T_{max}) dépendent uniquement de l'espèce ou de la souche microbienne (Pinon *et al.*, 2004). Il est donc possible d'estimer ces températures à partir de données obtenues sur différents milieux. La variabilité inter-souche de ces températures a été décrite par différents auteurs (Membré *et al.*, 2005 ; Delignette-Muller *et al.*, 2006 ; Afchain *et al.*, 2008, Le Marc *et al.*, 2008 ; Crépet *et al.*, 2009). Au contraire, le taux optimum de croissance ne dépend pas uniquement de la souche microbienne, il dépend aussi des caractéristiques intrinsèques du milieu de croissance. Mais étant donné que beaucoup de nos données collectées (données brutes et estimations de paramètres) ont été obtenues à partir de cocktails de souches et qu'il n'a pas été possible de séparer les effets liés à la souche des effets liés au milieu, il n'a pas été possible de décrire une éventuelle variabilité inter-souches sur les températures cardinales ni sur le taux optimum de croissance. C'est pourquoi nous avons défini uniquement un taux optimum de croissance par produit, $\mu_{opt-prod}$.

2.3.2 Estimation des paramètres par inférence bayésienne en deux temps

Pour estimer les paramètres du modèle de croissance de *Clostridium perfringens* dans la viande de boeuf (Eq. 2.2 et 2.3 couplées), soit T_{min} , T_{opt} , T_{max} et $\mu_{opt-beef}$, nous avons adopté une démarche bayésienne en deux temps :

- dans une première étape, considérant que les températures cardinales ne dépendent pas du produit ou du milieu de croissance, nous avons modélisé les données en taux de croissance collectées sur tous les produits et milieux de croissance pour obtenir par inférence bayésienne des distributions *a posteriori* des paramètres d'intérêt, T_{min} , T_{opt} , T_{max} , $\mu_{opt-beef}$, le taux optimum de croissance dans la viande de boeuf et les taux optimaux de croissance dans les autres milieux, non utilisés par

la suite.

- dans la deuxième étape, nous avons utilisé ces distributions *a posteriori* comme *a priori* du second modèle bayésien pour modéliser l'ensemble des données de dénombrement collectées sur la viande de boeuf et estimer les paramètres du modèle de croissance de *Clostridium perfringens* dans la viande de boeuf, T_{min} , T_{opt} , T_{max} , $\mu_{opt-beef}$ et h_0 .

Pour distinguer ces deux étapes d'inférence, par commodité, nous ferons référence à la première étape en parlant du modèle A et du modèle B pour la deuxième étape, même s'il s'agit d'estimer les paramètres du même modèle.

Première inférence : modèle A

Notre objectif était de décrire les taux de croissance reportés dans la littérature sur tous milieux et produits. Dans ce modèle, la totalité des données sous forme de paramètres, collectées sur tous milieux et produits sont utilisées dans l'inférence. Il compte 12 paramètres dont :

- 3 paramètres correspondant aux températures cardinales, identiques pour tous les produits et milieux de croissance,
- 8 paramètres correspondant aux 8 $\mu_{opt-prod}$. Nous avons défini un $\mu_{opt-prod}$ par produit ou milieu de croissance,
- $s_{\sqrt{\mu_{max}}}$, l'écart-type du terme d'erreur.

Le graphe acyclique dirigé de ce modèle est représenté dans la figure 2.2. Les liens entre les noeuds sont définis dans le tableau 2.1. $M_{\mu_{max},c}$ représente le taux maximum de croissance théorique pour la cinétique c à la température constante T_c . $\mu_{max,c}$ est le taux maximum de croissance observé sur cette même cinétique c . La transformation en racine carrée de $M_{\mu_{max},c}$ et $\mu_{max,c}$ nous a permis de normaliser les erreurs (Zwietering *et al.*, 1990 ; Schaffner, 1994) et $\sqrt{\mu_{max,c}}$ est supposé suivre la loi normale $N(\sqrt{M_{\mu_{max},c}}, s_{\sqrt{\mu_{max}}})$.

Les distributions *a priori* sont présentées dans le tableau 2.2. Des distributions *a priori* relativement informatives ont été définies d'après des données publiées, non utilisées dans les calculs (Blankenship *et al.*, 1988 ; Juneja *et al.*, 1994b ; Juneja and Marks, 2002 ; De Jong *et al.*, 2005 ; Le Marc *et al.*, 2008). Pour définir les distributions *a priori* de chaque $\mu_{opt-prod}$, nous avons

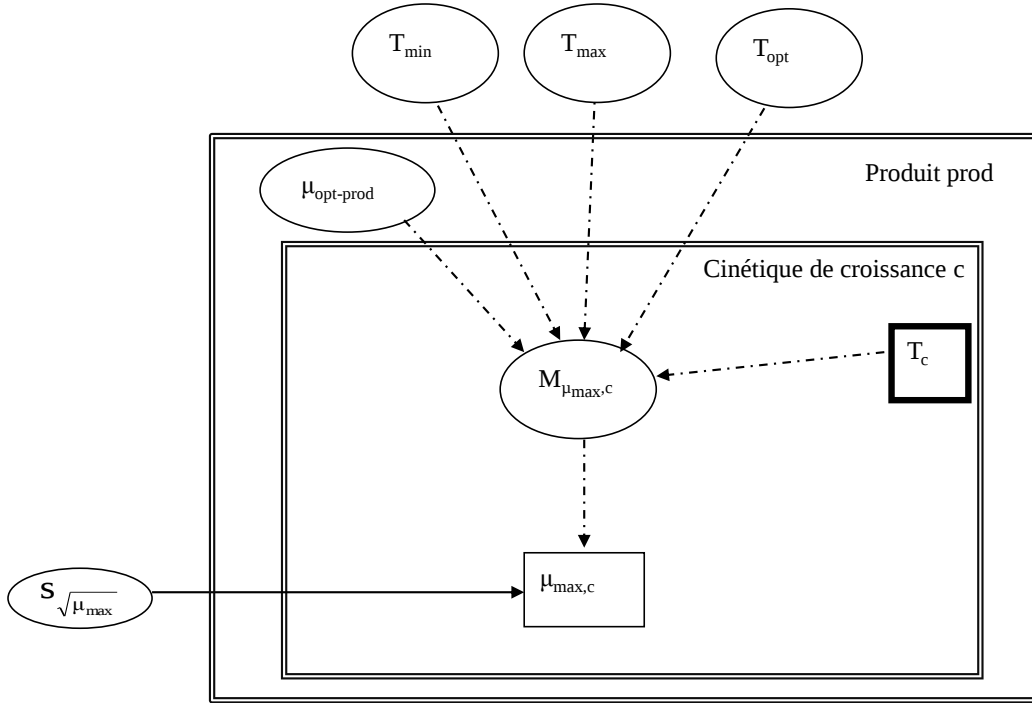


FIGURE 2.2 – Graphe acyclique dirigé du modèle A. Les liens logiques entre chaque noeud sont représentés par des flèches en pointillé, les liens stochastiques par des flèches pleines. Les liens entre noeuds sont décrits dans le tableau 2.1.

Noeud	Type	Définition
$M_{\mu_{max,c}} h^{-1}$	logique	$M_{\mu_{max,c}} = \frac{\mu_{opt-prod}(T_c - T_{min})^2(T_c - T_{max})}{(T_{opt} - T_{min})[(T_{opt} - T_{min})(T_c - T_{opt}) - (T_{opt} - T_{max})(T_{opt} + T_{min} - 2T_c)]}$
$\mu_{max,c} h^{-1}$	stochastique	$\sqrt{\mu_{max,c}} \sim N(\sqrt{M_{\mu_{max,c}}}, s_{\sqrt{\mu_{max,c}}})$

TABLE 2.1 – Définition des liens entre les noeuds du modèle A.

utilisé des taux maximum de croissance publiés, obtenus à des températures comprises entre 40 et 50°C dans différents milieux. Pour l'écart type $s_{\sqrt{\mu_{max}}}$, nous avons défini une distribution non informative.

Paramètre	Unité	Distribution	Source d'information
T_{min}	°C	$N(10, 2)$	Blankenship <i>et al.</i> , 1988 Juneja <i>et al.</i> , 2002 De Jong <i>et al.</i> , 2005 Le Marc <i>et al.</i> , 2008
T_{opt}	°C	$N(44, 2)$	De Jong <i>et al.</i> , 2005
T_{max}	°C	$N(52, 1.5)$	Blankenship <i>et al.</i> , 1988 Juneja <i>et al.</i> , 2002 De Jong <i>et al.</i> , 2005 Le Marc <i>et al.</i> , 2008
$\mu_{opt-prod}$ pour chaque produit	h^{-1}	$N(4.5, 1.8)$	Blankenship <i>et al.</i> , 1988 Juneja <i>et al.</i> , 2002 De Jong <i>et al.</i> , 2005 Le Marc <i>et al.</i> , 2008
$\tau_{\sqrt{\mu_{max}}} = \frac{1}{(s_{\sqrt{\mu_{max}}})^2}$		$Gamma(0.001, 0.001)$	Pas d'information

TABLE 2.2 – Définition des distributions *a priori* du modèle A. Les paramètres des lois normales sont la moyenne et l'écart type.

L'inférence a été réalisée en utilisant le logiciel JAGS (Plummer, 2009) et le package *rjags* du logiciel R (R Development Core Team, 2010). Après une première phase d'adaptation de 5.10^3 itérations, la phase d'inférence proprement dite a été conduite sur 3 chaînes MCMC indépendantes avec 5.10^5 itérations pour chaque chaîne. Nous n'avons retenu qu'une valeur sur 100, de sorte que, pour chaque chaîne MCMC, 5.10^3 valeurs de chaque paramètre ont été gardées. Le diagnostic de convergence a été réalisé en examinant visuellement les traces des chaînes MCMC et en étudiant les statistiques de convergence, définies par Brooks and Gelman (1997).

A l'issue de cette étape, nous avons obtenu les distributions *a posteriori* de tous les paramètres. Parmi ceux-ci, seuls T_{min} , T_{opt} , T_{max} et $\mu_{opt-beef}$ nous intéressaient pour la suite de l'étude. Aussi seuls les résultats obtenus sur ces paramètres d'intérêt sont présentés. Comme le montre la figure 2.3, les distributions *a posteriori* de T_{min} , T_{opt} , T_{max} et $\mu_{opt-beef}$ sont nettement plus resserrées que leurs distributions *a priori*. La distribution empirique de T_{min} reste plus large que les autres à cause du faible nombre de cinétiques collectées à faible température.

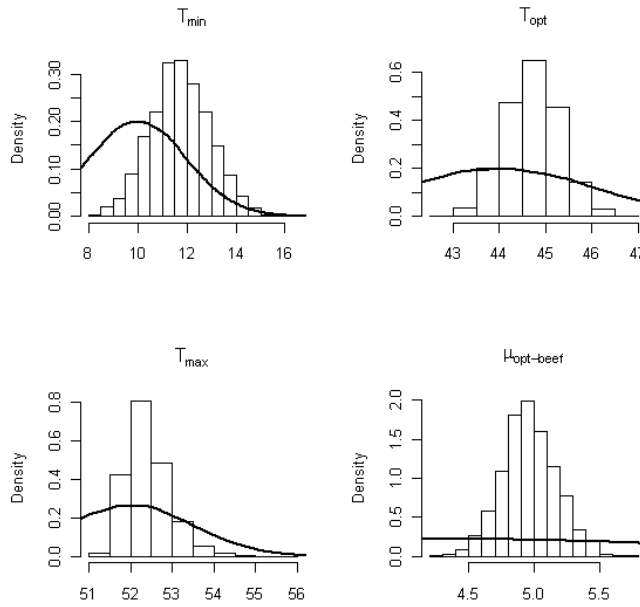


FIGURE 2.3 – Distributions *a priori* et *a posteriori* des paramètres T_{min} , T_{opt} , T_{max} et $\mu_{opt-beef}$ du modèle A. Les distributions *a priori* sont représentées par les courbes, les distributions des chaînes MCMC par les histogrammes.

Sur chaque distribution empirique nous avons ajusté une distribution normale. Les statistiques des distributions empiriques des paramètres d'intérêt ainsi que leurs distributions ajustées figurent dans le tableau 2.3.

Ces distributions ajustées ont servi de distributions *a priori* du modèle dans la deuxième étape d'inférence.

Paramètre	Unité	Distribution empirique			Distribution ajustée
		2.5 ^{ème} percentile	médiane	97.5 ^{ème} percentile	
T_{min}	°C	9.4	11.8	14.2	N(11.8,1.3)
T_{opt}	°C	43.5	44.7	45.8	N(44.7,0.6)
T_{max}	°C	51.6	52.4	53.7	N(52.4,0.5)
$\mu_{opt-beef}$	h^{-1}	4.5	5	5.4	N(5,0.2)

TABLE 2.3 – Statistiques empiriques des paramètres d'intérêt du modèle A et distributions ajustées. Les paramètres des lois normales sont la moyenne et l'écart type.

Deuxième inférence : modèle B

Dans cette étape, notre objectif était de décrire les données de dénombrement collectées uniquement dans la viande de boeuf. Dans cette étape, le modèle compte 7 à 8 paramètres dont :

- les 3 paramètres correspondant aux températures cardinales,
- le taux optimal de croissance dans la viande de boeuf,
- un à deux paramètres correspondant à la modélisation du gol,
- l'écart-type du terme d'erreur.

Pour décrire la phase de germination-latence, on utilise la quantité h_0 . Nous avons défini 3 modèles :

- le modèle ' h_0 fixe' (modèle B1), dans lequel nous avons considéré h_0 comme fixe d'une étude à une autre et d'une courbe à une autre, comme T_{min} , T_{opt} , T_{max} et $\mu_{opt-beef}$,
- le modèle ' h_0 variable entre études' (modèle B2). La variabilité de l'état physiologique d'une population microbienne a été démontrée (Augustin *et al.*, 2009). Aussi dans ce modèle, nous avons considéré h_0 comme variable d'une étude à l'autre du fait des variations entre protocoles expérimentaux et dans lequel h_0 est décrit par deux paramètres, μ_{lnh0} et s_{lnh0e} ,
- le modèle ' h_0 variable entre courbes' (modèle B3), dans lequel nous

avons considéré h_0 comme variable d'une courbe à l'autre à l'intérieur d'une même étude, pour prendre en compte d'éventuels facteurs entre courbes d'une même étude et dans lequel h_0 est décrit par deux paramètres, μ_{lnh0} et s_{lnh0c} .

Le graphe acyclique dirigé du modèle général est présenté dans la figure 2.4. Les liens entre les noeuds sont définis dans le tableau 2.4. Les index e , c et m représentent les trois niveaux hiérarchiques du modèle : l'étude, la courbe de croissance et la mesure individuelle. $M_{\mu_{max},c}$ est le taux maximum de croissance théorique pour la courbe de croissance c à la température constante T_c . $y_{0,c}$ et $y_{max,c}$ sont les concentrations initiale et maximale théoriques (en $\log_{10}$), elles sont estimées à partir de $Y_{0,c}$ et $Y_{end,c}$, les premiers et derniers dénombrements de la courbe de croissance c . $M_{y,m}$ est le dénombrement théorique (en $\log_{10}$) au temps t_m de la courbe de croissance c et Y_m est le dénombrement observé correspondant. Les paramètres $h_{0,e}$ et $h_{0,c}$ sont supposés suivre des lois log-normales de paramètres m_{lnh0} et s_{lnh0e} pour le premier et $ln(h_{0,e})$ et s_{lnh0c} pour le second. s_y est l'écart-type du terme d'erreur du modèle primaire.

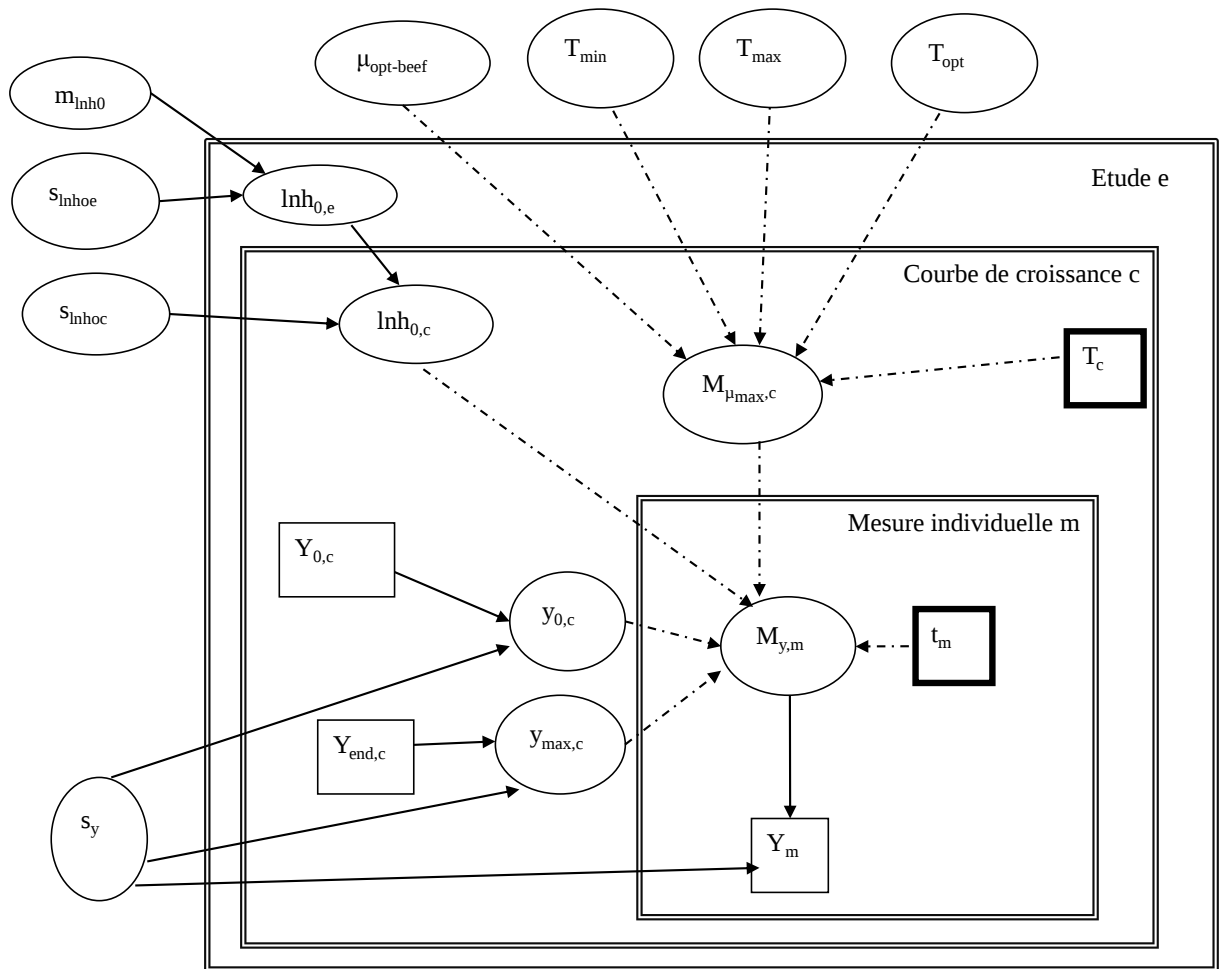


FIGURE 2.4 – Graphe acyclique dirigé général du modèle B. Les liens logiques entre chaque noeud sont représentés par des flèches en pointillé, les liens stochastiques par des flèches pleines. Les liens entre noeuds sont décrits dans le tableau 2.4.

Noeud	Unité	Type	Définition	Construction du (ou des) modèle(s)
Y_m	$log_{10}cfu.g^{-1}$	stochastique	$Y_m \sim N(M_{y,m}, s_y)$	
$M_{y,m}$	$log_{10}cfu.g^{-1}$	logique	$M_{y,m} = min(y_{0,c} + \frac{M_{\mu_{max},c} \times t_m}{ln(10)} + log_{10}[e^{-M_{\mu_{max},c} \times t_m} \times (1 - e^{-h_{0,c}}) + e^{-h_{0,c}}], y_{max,c})$	
$y_{max,c}$	$log_{10}cfu.g^{-1}$	stochastique	$y_{max,c} \sim N(Y_{end,c}, s_y)$	
$y_{0,c}$	$log_{10}cfu.g^{-1}$	stochastique	$y_{0,c} \sim N(Y_{0,c}, s_y)$	
$M_{\mu_{max},c}$	h^{-1}	logique	$M_{\mu_{max},c} = \frac{\mu_{opt-beef}(T_c-T_{min})^2(T_c-T_{max})}{(T_{opt}-T_{min})[(T_{opt}-T_{min})(T_c-T_{opt})-(T_{opt}-T_{max})(T_{opt}+T_{min}-2T_c)]}$	
$ln(h_{0,e})$ $ln(h_{0,c})$		logique (B1) ou stochastique (B2 et B3)	$ln(h_{0,e}) \sim N(m_{lnh0}, s_{lnh0e})$ $ln(h_{0,c}) \sim N(lnh_{0,e}, s_{lnh0c})$ Modèle B1 : $s_{lnh0e} = s_{lnh0c} = 0 \Rightarrow ln(h_{0,c}) = m_{lnh0}$ Modèle B2 : $s_{lnh0c} = 0 \Rightarrow ln(h_{0,e}) \sim N(m_{lnh0}, s_{lnh0e})$ Modèle B2 : $s_{lnh0e} = 0 \Rightarrow ln(h_{0,c}) \sim N(ln(h_{0,e}), s_{lnh0c})$	
TABLE 2.4 – Définition des liens entre les noeuds du modèle B : B1 (‘ h_0 fixe’), B2 (‘ h_0 variable entre études’) et B3 (‘ h_0 variable entre courbes’). Les paramètres des lois normales sont la moyenne et l’écart type.				

Les distributions *a priori* des paramètres sont présentés dans le tableau 2.5). Les distributions *a priori* des paramètres d'intérêt (T_{min} , T_{opt} , T_{max} et $\mu_{opt-beef}$) sont les distributions *a posteriori* du modèle A, obtenues après inférence bayésienne à partir des données en μ_{max} . La distribution *a priori* de m_{lnh0} a été définie en utilisant la relation $\alpha_0 = \exp(-h_0)$ avec les valeurs de α_0 estimées par Le Marc *et al.* (2008) à partir de données de dénombrement que nous n'avons pas utilisées pour l'inférence.

Pour les paramètres de précision correspondant à chaque écart type (s_{lnh0e} , s_{lnh0c} , s_y), des distributions *a priori* plates ont été définies.

Paramètre	Unité	Distribution	Source d'information
T_{min}	°C	$N(11.8, 1.3)$	Distribution <i>a posteriori</i> du modèle A
T_{opt}	°C	$N(44.7, 0.6)$	
T_{max}	°C	$N(52.4, 0.5)$	
$\mu_{opt-beef}$	h^{-1}	$N(5, 0.2)$	
m_{lnh0}		$N(1.95, 0.3)$	Le Marc <i>et al.</i> , 2008
$\tau_{lnh0e} = \frac{1}{(s_{lnh0e})^2}$ (B2)		$Gamma(0.001, 0.001)$	Pas d'information
$\tau_{lnh0c} = \frac{1}{(s_{lnh0c})^2}$ (B3)		$Gamma(0.001, 0.001)$	
$\tau_y = \frac{1}{(s_y)^2}$		$Gamma(0.001, 0.001)$	

TABLE 2.5 – Définition des distributions *a priori* du modèle B : B1 (h_0 fixe'), B2 (h_0 variable entre études') et B3 (h_0 variable entre courbes').

Comme lors de l'étape précédente, l'inférence a été réalisée en utilisant le logiciel JAGS (Plummer, 2009) et le package *rjags* du logiciel R (R Development Core Team, 2010). Après une première phase d'adaptation de 5.10^3 itérations, la phase d'inférence proprement dite a été conduite sur 3 chaînes MCMC indépendantes avec 5.10^5 itérations pour chaque chaîne, en ne retenant qu'une valeur sur 100, de sorte que, pour chaque chaîne MCMC, 5.10^3 valeurs de chaque paramètre ont été gardées. Le diagnostic de convergence a été réalisé en examinant visuellement les traces des chaînes MCMC et en étudiant les statistiques de convergence, définies par Brooks and Gelman (1997).

Comme le montrent les figures 2.5, 2.6 et 2.7, les distributions *a posteriori* sont toutes nettement plus resserrées que leurs priors, hormis pour T_{max} . Ceci est dû à l'absence de données collectées sur boeuf au-dessus de 50°C. Les estimations obtenues sont cohérentes avec les données publiées. En particulier, les valeurs de lnh_0 , μ_{lnh0} , s_{lnh0e} et s_{lnh0c} pour décrire l'état physiologique initial concordent avec les données publiées par le Marc *et al.* (2008). Enfin, l'écart type du terme d'erreur du modèle primaire, s_y , est significativement plus bas dans le modèle qui décrit une variabilité inter courbes de lnh_0 .

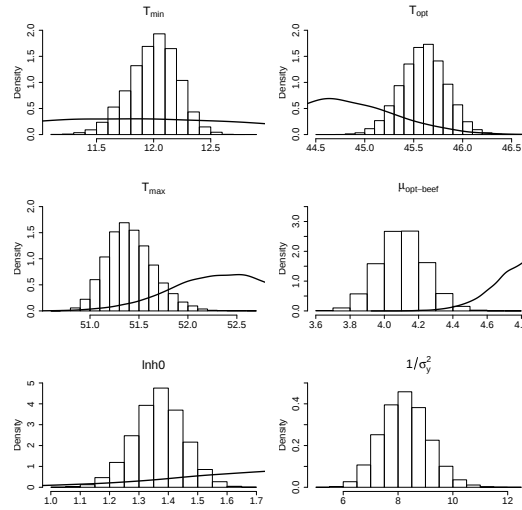


FIGURE 2.5 – Distributions *a priori* et chaînes MCMC des paramètres du modèle ' h_0 fixe'. Les distributions *a priori* sont représentées par les courbes, les chaînes MCMC par les histogrammes.

Les distributions *a posteriori* de $\mu_{opt-beef}$ du modèle B3 (' h_0 variable entre courbes') sont nettement plus resserrées que celles du modèle B1 (' h_0 fixe') mais on peut noter que les trois modèles donnent une estimation de cette distribution nettement plus basse que la distribution *a priori* de $\mu_{opt-beef}$, estimée d'après les données en μ_{max} dans le modèle A. Cela peut s'expliquer par le fait que certaines des valeurs de μ_{max} utilisées pour estimer $\mu_{opt-beef}$ dans le modèle A ont été estimées par leurs auteurs en utilisant le modèle de Gompertz, connu pour surestimer μ_{max} et par conséquent $\mu_{opt-beef}$.

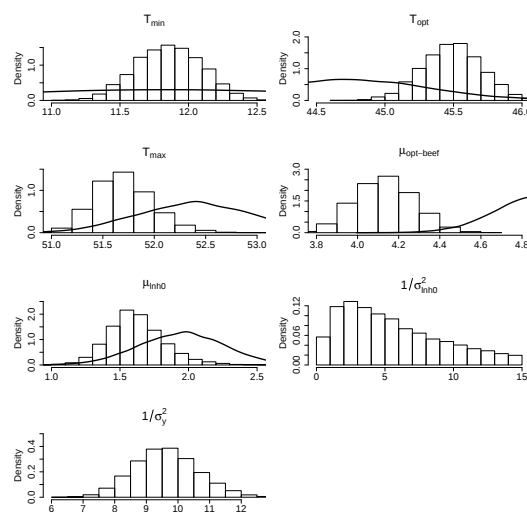


FIGURE 2.6 – Distributions *a priori* et chaînes MCMC des paramètres du modèle ‘ h_0 variable entre études’. Les distributions *a priori* sont représentées par les courbes, les chaînes MCMC par les histogrammes.

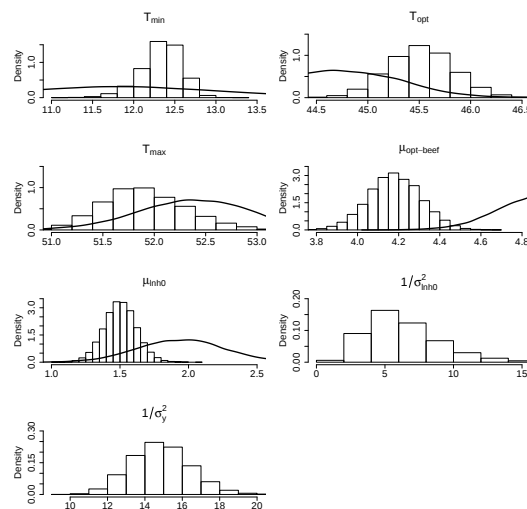


FIGURE 2.7 – Distributions *a priori* et chaînes MCMC des paramètres du modèle ‘ h_0 variable entre courbes’. Les distributions *a priori* sont représentées par les courbes, les chaînes MCMC par les histogrammes.

Le tableau 2.6 reprend les distributions *a posteriori* obtenues avec chaque modèle.

Paramètre	Unité	Modèle ' h_0 fixe'	Modèle ' h_0 variable entre études'	Modèle ' h_0 variable entre courbes'
T_{min}	$^{\circ}\text{C}$	12.2[11.7,12.7]	12.1[11.6,12.3]	12.7[12.2,13.1]
T_{opt}	$^{\circ}\text{C}$	46[45.2,46.5]	45.2[44.7,45.7]	45.4[44.6,46.2]
T_{max}	$^{\circ}\text{C}$	51.5[50.9,52.4]	52[51.4,52.8]	52.1[51.3,53]
$\mu_{opt-beef}$	h^{-1}	4.3[3.9,4.6]	4.2[3.9,4.5]	4.3[4,4.5]
lnh_0		1.4[1.2,1.5]		
m_{lnh_0}			1.8[1.4,2.2]	1.9[1.6,2.2]
s_{lnh_0e}			0.5[0.3,1.29]	
s_{lnh_0c}				0.75[0.56,0.82]
s_y	$log_{10}cfu.g^{-1}$	0.57[0.52,0.62]	0.42[0.39,0.46]	0.33[0.3,0.36]
DIC		433.3	288.1	169.8

TABLE 2.6 – Statistiques des chaînes MCMC obtenues avec les modèles B1 (h_0 fixe'), B2 (h_0 variable entre études') et B3 (h_0 variable entre courbes') et DIC des différents modèles. Les valeurs entre crochets représentent l'intervalle de crédibilité à 95%.

Pour comparer ces différents modèles, nous avons estimé les DIC de chacun (présentés dans tableau 2.6). Le DIC, ou *Deviance Information Criterion*, est une déviance pénalisée par le nombre de paramètres, développée spécialement pour comparer des modèles hiérarchiques (Spiegelhalter *et al.*, 2002). Nous avons aussi comparé l'aptitude de chaque modèle à décrire les données observées dans la figure 2.8. Dans cette figure, on compare la moyenne des valeurs prédites par chaque modèle et les valeurs observées. Pour cela, nous avons utilisé les valeurs de dénombrement $M_{y,m}$ générées dans les chaînes de Markov de chaque modèle. Nous avons calculé, pour chaque dénombrement du jeu de données, la moyenne des valeurs $M_{y,m}$ générées par le modèle et l'avons comparé graphiquement au dénombrement observé.

D'après la figure 2.8, le modèle qui décrit le mieux les données est le modèle ' h_0 variable entre courbes', ce qui est confirmé par les valeurs de DIC reportées dans le tableau 2.6. Pour autant, pour choisir définitivement

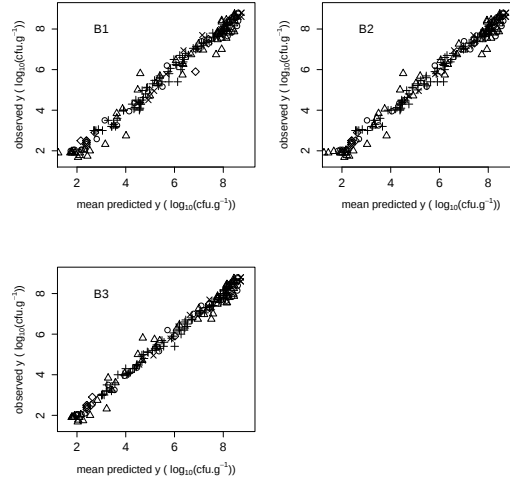


FIGURE 2.8 – Comparaison des valeurs observées et prédites par les modèles B1 (h_0 fixe'), B2 (h_0 variable entre études') et B3 (h_0 variable entre courbes'). En abscisse sont reportées les moyennes des $M_{y,m}$ générées dans les chaines de Markov de chaque modèle et en ordonnée les dénombrements observés dans la littérature.

le modèle, nous avons aussi vérifié la capacité de chaque modèle à prédire la croissance le long de profils thermiques dynamiques, en utilisant des données de validation publiées.

2.4 Validation du modèle

Nous avons collecté des données provenant de plusieurs études (Thippareddi *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004; Sanchez-Plata *et al.*, 2005; Juneja *et al.*, 2006a, 2006b; Juneja *et al.*, 2007; Le Marc *et al.*, 2008). Ces données de croissance ont été acquises

- à partir de profils thermiques dynamiques cette fois,
- dans de la viande de boeuf,
- à partir de spores ayant subi des chocs chauds 'classiques'.

Ces données sont de deux types :

- des données de dénombrement mesurées à des intervalles de temps réguliers,

- des résultats sous forme d’augmentation du nombre de cellules ou ‘*cell number increase*’, définie comme la différence entre les contaminations finale et initiale (en $\log_{10}cfu.g^{-1}$).

De manière à pouvoir utiliser toutes ces données, nous nous sommes intéressés à l’augmentation finale du nombre de cellules, que nous avons prédite en utilisant les profils thermiques publiés. Ces profils thermiques dynamiques correspondent tous à des phases de refroidissement exponentiel commençant à une température initiale T_0 (en °C) supérieure à T_{max} et finissant à une température finale T_f inférieure à T_{min} . Dans ce cas, l’augmentation du nombre de cellules ne dépend que de la vitesse de refroidissement, décrit par le taux de refroidissement exponentiel k (en h^{-1}). Pour chaque profil publié, décrit par les auteurs comme un temps requis pour faire atteindre au boeuf la température finale T_f à partir de T_0 , le taux de refroidissement exponentiel k a été estimé en utilisant l’équation 2.4 et en fixant la température asymptotique T_a à 0°C. Ainsi, à titre d’exemple, Sanchez-Plata *et al.* (2005) ont fait refroidir du boeuf de 54.5 à 7.2°C en 9 et 12 heures, ce que nous avons traduit en $k=0.225h^{-1}$ et $k=0.169h^{-1}$. A titre de comparaison, la réglementation française qui, dans l’annexe IV de l’arrêté du 21 décembre 2009 (relatif aux règles sanitaires applicables aux activités de commerce de détail, d’entreposage et de transport de produits d’origine animale et denrées alimentaires en contenant), impose un refroidissement de 63 à 10°C en 2 heures correspond à une valeur de k de $0.92h^{-1}$. Les données publiées collectées sont résumées en estimations de k et de l’augmentation du nombre de cellules dans le tableau B.1 en annexes.

Définition 2.4.1 (Modèle de refroidissement exponentiel)

Soient T_0 et T_a les températures initiale et asymptotique, T la température à l’instant t et k le taux de refroidissement exponentiel

$$T = T_a + (T_0 - T_a)\exp(-kt) \quad (2.4)$$

Plutôt que d’estimer, pour chaque profil thermique collecté, un intervalle de crédibilité sur l’accroissement prédit par chaque modèle, nous avons cherché à représenter la bande de crédibilité sur l’accroissement prédit par

chaque modèle en fonction du taux de refroidissement exponentiel k . Pour cela, nous avons fait varier k entre 0.095 et 0.367 h^{-1} , les valeurs minimale et maximale estimées sur l'ensemble du jeu de données de validation.

Pour chaque valeur de k dans cet intervalle, nous avons simulé le profil thermique correspondant à un refroidissement exponentiel de $T_0=T_{max}$ à $T_f=T_{min}$. Nous avons ensuite simulé pour chaque profil thermique la croissance de *Clostridium perfringens* et calculé l'augmentation du nombre de cellules avec chaque modèle en utilisant des techniques de Monte Carlo à une dimension :

- en tirant d'abord au sort un jeu de valeurs des paramètres incertains (T_{min} , T_{opt} , T_{max} et $\mu_{opt-beef}$ et les paramètres décrivant h_0) dans la distribution *a posteriori* jointe des paramètres estimée par inférence bayésienne,
- en tirant au sort, pour ce jeu de valeurs des paramètres incertains, une valeur de h_0 dans le cas des modèles B2 (' h_0 variable entre études') et B3 (' h_0 variable entre courbes'),
- en discrétisant le profil thermique par paliers de 1°C et en estimant, pour chacun de ces paliers, les paramètres du modèle primaire (Eq. 2.1 et 2.3)
- en simulant la croissance (Eq. 2.2) sur chaque palier de manière à estimer l'augmentation du nombre de cellules sur l'ensemble du profil. Pour ces simulations, nous avons fixé les concentrations initiale et maximale, y_0 et y_{max} , à 2 et 9 $\log_{10}cfu.g^{-1}$.

Cette technique a été répétée Nu fois. Ainsi pour chaque profil et chaque modèle, nous avons obtenu un intervalle de crédibilité à 50% et à 95% résultant de la variabilité de h_0 , quand elle était décrite dans le modèle, et de l'incertitude sur les paramètres du modèle. La juxtaposition de ces intervalles de crédibilité nous a permis d'obtenir deux bandes de crédibilité, l'une à 50% et l'autre à 95%, que nous avons comparées avec les prédictions déterministes du modèle publié par Le Marc *et al.* (2008). Les résultats des simulations sont reportés dans la figure 2.9.

Comme le montre la figure 2.9, les intervalles de crédibilité à 95% sur les prédictions par le modèle ' h_0 fixe' sont très étroits et centrés sur la prédiction

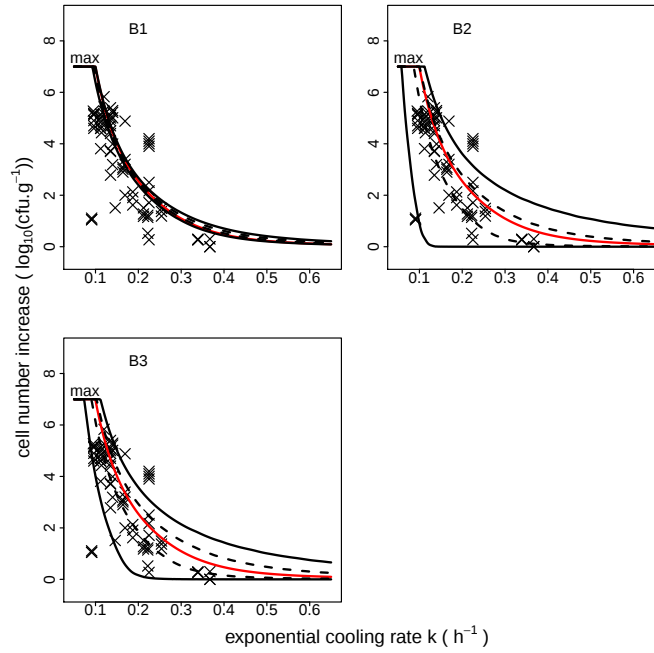


FIGURE 2.9 – Croissances observées et prédites après une phase de refroidissement exponentiel en fonction du taux de refroidissement exponentiel k . Les données collectées dans la littérature, et présentées dans le tableau B.1, sont représentées par des croix. Les croissances ont été prédites en utilisant les modèles B1 (h_0 fixe), B2 (h_0 variable entre études) et B3 (h_0 variable entre courbes). Les courbes pleines noires représentent les bornes des intervalles de crédibilité à 95% et les courbes noires pointillées les bornes des intervalles de crédibilité à 50%. La courbe pleine rouge représente la croissance prédite en utilisant le modèle publié par Le Marc *et al.* (2008) dans le logiciel *Perfringens Predictor*. Max correspond à la croissance maximale en partant d'une concentration initiale de $2 \log_{10} \text{cfu.g}^{-1}$ et en fixant la concentration maximale à $9 \log_{10} \text{cfu.g}^{-1}$.

déterministe du modèle publié par Le Marc *et al.* (2008). Mais ces prédictions ne reflètent pas la dispersion observée dans les données de validation et dans la mesure où les prédictions de croissance ne sont pas toujours supérieures aux croissances observées, ces deux modèles ne peuvent pas être considérés comme sécuritaires (du moins s'ils peuvent être considérés comme sécuritaires pour les refroidissements rapides, ils ne le sont pas pour des refroidissements relativement lents).

Les prédictions par les modèles décrivant une variabilité de h_0 sont décrites par des intervalles de crédibilité qui reflètent mieux la dispersion observée dans les données de validation. Le modèle B3 (h_0 variable entre courbes) décrit le mieux les données collectées dans la mesure où son intervalle de crédibilité à 95% comprend la majeure partie des croissances observées dans la littérature tout en restant relativement étroit.

2.5 Discussion - Conclusion

Nous avons proposé un modèle pour décrire la croissance de *Clostridium perfringens* dans la viande de boeuf. Pour en estimer les paramètres, nous avons utilisé les données publiées disponibles sous forme de données de dénombrement et de taux maximum spécifiques de croissance, correspondant à des cinétiques observées en conditions isothermes. Ce modèle est susceptible de prédire la croissance de *Clostridium perfringens* dans des conditions thermiques dynamiques.

Les simulations réalisées avec ce modèle montrent une grande variabilité prédite, due à la variabilité sur h_0 décrite entre courbes dans le processus d'inférence bayésienne et observée dans les données de validation. La variabilité de l'état physiologique initial de cellules végétatives, incubées dans un milieu puis inoculées dans un milieu différent, a déjà été décrite dans la littérature (Delignette-Muller *et al.*, 2005 ; Augustin *et al.*, 2009). Il est tout à fait plausible que la variabilité de l'état physiologique de cellules végétatives issues de la germination de spores soit aussi importante. Cette variabilité a d'ailleurs été observée sur *Clostridium botulinum* par Stringer *et al.* (2005, 2009) et par Webb *et al.* (2007). Il serait intéressant d'explorer cette variabilité et d'en identifier les causes.

L'exploration de cette variabilité nécessiterait une description de l'effet de la taille de l'inoculum sur la latence et de l'effet des conditions préincubatoires et du milieu de croissance sur la germination, ainsi que Smelt and Brul (2007) l'ont recommandé. En effet, les conditions préincubatoires (Levinson and Hyatt, 1964 ; Baranyi and Roberts, 1995 ; McKellar, 1997 ; Evans *et al.*, 1997), la composition du milieu de croissance (Doyle, 1989 ; Labbé and Chang, 1995 ;

Aran, 2001 ; Thippareddi *et al.*, 2003 ; Le Marc *et al.*, 2008) et la taille de l'inoculum (Smelt and Brul, 2007) ont été décrites comme des sources de variabilité de h_0 . Mais l'information disponible dans les études publiées dont nous avons utilisé les données était trop souvent manquante ou insuffisante pour nous permettre d'explorer de tels effets.

Dans nos tentatives pour explorer la variabilité de h_0 , nous avons ajusté le modèle de croissance sur un seul jeu de données de dénombrement provenant toutes de l'étude de Juneja *et al.* (1999). Ce jeu de données était constitué de 65 courbes de croissance observée sur du bouillon de culture TPGYDC, avec le même cocktail de souches soumis au même choc chaud classique (75 °C pendant 20 minutes). L'estimation des paramètres de ce modèle par inférence bayésienne en utilisant le modèle B3 (' h_0 variable entre courbes') a conduit à une valeur de s_{lnh0c} de 0.5. Cette valeur, supérieure à la valeur de 0.41 estimée sur la totalité du jeu de données brutes, montre à quel point la variabilité de h_0 peut être importante en dépit de conditions expérimentales semblant contrôlées. Il est donc important de tenir compte de cette variabilité et, tant que celle-ci ne peut pas être expliquée dans un modèle déterministe, elle devrait être décrite sous forme d'une distribution de valeurs.

Pour estimer les paramètres du modèle, nous n'avons pas utilisé l'ensemble des données de dénombrement que nous avons collectées dans la littérature car dans le fichier, 65 cinétiques proviennent d'une même étude réalisée sur le bouillon TPGYDC. En utilisant ces données pour estimer les paramètres du modèle de croissance, nous aurions donné beaucoup de poids à cette étude au détriment de la modélisation de la variabilité. Nous n'avons utilisé que les données récoltées sur la viande de boeuf.

Dans notre démarche en deux temps, nous avons obtenu d'abord, après inférence sur les données exprimées en valeurs de μ_{max} , une distribution *a posteriori* de $\mu_{opt-beef}$ dans le modèle A, utilisée par la suite comme distribution *a priori* des modèles B1, B2 et B3. Puis nous avons obtenu des distributions *a posteriori* des modèles B1, B2 et B3 encore plus resserrées après inférence sur les données de dénombrement. Mais les distributions *a*

priori et *a posteriori* des modèles B1, B2 et B3 ne se chevauchent pas ou peu. L'inférence sur données de dénombrement dans les modèles B1, B2 et B3 a conduit à une estimation de la distribution de $\mu_{opt-beef}$ nettement plus basse que l'inférence sur les μ_{max} dans le modèle A. Ceci peut être dû à une surestimation des μ_{max} , liée à la méthode et au modèle utilisés pour estimer ces μ_{max} .

Dans la construction du modèle retenu, il n'a pas été décrit de variabilité sur T_{min} , T_{opt} , T_{max} et $\mu_{opt-beef}$ par manque de données. Explorer la variabilité des températures cardinales et du taux optimum de croissance dans le boeuf nécessiterait l'acquisition de nouvelles données car actuellement les paramètres du modèle n'ont été estimés qu'à partir de 73 valeurs de μ_{max} et 25 courbes de croissance. Si on modélise sur ces données une variabilité sur T_{min} , T_{opt} , T_{max} et $\mu_{opt-beef}$, on risque fort de ne pas arriver à estimer correctement les paramètres.

Les données utilisées dans les deux jeux de données correspondent à des cinétiques observées, pour certaines, dans des conditions aérobies et, pour d'autres, dans des conditions anaérobies. La distinction réalisée au départ pour ce facteur dans les deux jeux de données est inexploitable. Si on veut étudier l'impact de ce facteur sur la croissance, il faudrait, dans un premier temps, investiguer plus finement les protocoles expérimentaux correspondant aux données utilisées pour coder correctement cette variable. Mais il faudrait aussi caractériser le procédé de fabrication étudié et déterminer si lors du refroidissement, après la cuisson et pendant la remontée en température tels qu'observés à l'hôpital, la croissance se fait dans des conditions aérobies et/ou anaérobies. En effet, on peut imaginer que la cuisson assez longue, et en sauteuse, se traduit par un appauvrissement du produit en oxygène, donc par une anaérobiose. Mais lors du refroidissement, pendant l'attente avant l'operculage, le produit est brassé et réparti dans les bacs multi portions. Durant cette étape, de l'oxygène peut se dissoudre dans le produit, se traduisant une certaine aérobiose, dont on ne peut pas savoir si elle touche tout le bac ou seulement une partie.

Les données utilisées correspondent à des croissances observées pour la plupart après un choc chaud 'classique', supposé faire germer toutes les spores. Dans notre modèle construit à partir de ces données, cela nous conduit à supposer que toutes les spores présentes dans la viande de boeuf germent. Ceci constitue l'hypothèse sécuritaire, qui maximise la croissance simulée à partir de la contamination initiale en spores.

Le procédé étudié ne correspond pas à ce type de choc chaud mais peu d'informations permettent de modéliser l'impact du type de choc chaud sur la germination des spores et la croissance de *Clostridium perfringens*. Aussi sans investigation supplémentaire, nous devons utiliser tel quel le modèle construit à partir des données collectées après un choc chaud 'classique' pour simuler la croissance de *Clostridium perfringens* après un choc chaud différent. Cependant *a priori* cela conduit à faire l'hypothèse que toutes les spores présentes dans le produit germent à l'issue de la cuisson, avec comme conséquence une surestimation de la croissance simulée.

Chapitre 3

Modèle de destruction des cellules végétatives

L'objectif était de décrire la destruction des cellules végétatives de *Clostridium perfringens* dans des conditions thermiques dynamiques, correspondant à la fin de la remise en température. Pour ce faire, des modèles ont été sélectionnés parmi les modèles décrits dans la littérature.

3.1 Introduction

3.1.1 Les modèles de destruction

En comparaison des modèles de croissance, peu de modèles de destruction ont été décrits. Dans les modèles primaires, on décrit souvent l'évolution du log de la concentration dans le temps pour une température fixe donnée. Parmi les modèles primaires décrits (Geeraerd *et al.*, 2005), un modèle est souvent utilisé, le modèle log-linéaire 'classique', présenté sous sa forme différentielle (Eq. 3.1) ou analytique (Eq. 3.2). Sous sa forme analytique, les paramètres de ce modèle sont N_0 la concentration initiale et D le temps de réduction décimale (temps nécessaire pour diviser N par 10).

Mais des cinétiques non linéaires ont aussi été reportées et différentes formes non linéaires, concaves ou coonvexes, ont été décrites. Pour expliquer ces différentes formes, des auteurs (Moats *et al.*, 1971 ; Stringer *et al.*, 2000)

ont distingué deux types de causes : les causes expérimentales, telles que la procédure de montée en température, la méthode de dénombrement par exemple, et la variabilité inhérente au procédé de destruction (variabilité de la thermorésistance dans une population bactérienne par exemple). Ces cinétiques non linéaires se traduisent par un épaulement en début de cinétique et/ou une queue en fin de cinétique. Elles peuvent être décrites dans des modèles linéaires à 2 ou 3 phases (Whiting, 1993 ; Bréand *et al.*, 1998) ou dans des modèles non linéaires, tels que le modèle de Weibull par exemple (Peleg and Cole, 1998 ; Mafart *et al.*, 2002 ; Albert and Mafart, 2005).

Pour modéliser la destruction des cellules végétatives de *Clostridium perfringens*, nous avons utilisé le modèle log-linéaire, classiquement utilisé et relativement simple, d'autant plus que notre objectif était de décrire cette destruction en conditions thermiques dynamiques. Pour ce faire, le modèle de Bigelow (Bigelow, 1921) est un modèle incontournable, qui décrit l'évolution de D , paramètre du modèle primaire de destruction, en fonction de la température (Eq. 3.3). Les paramètres de ce modèle sont D_{ref} , le temps de réduction décimale à la température de référence T_{ref} , et z la constante de thermorésistance. Il est à noter que, contrairement aux températures cardinales du modèle secondaire de Rosso, T_{ref} n'est pas estimée mais fixée par les auteurs, généralement dans l'intervalle des températures testées (van Asselt and Zwietering, 2006).

Définition 3.1.1 (Modèle de destruction thermique classique)

Modèle primaire log-linéaire (forme différentielle)

Forme différentielle

Soient N la concentration microbienne et $D(T)$ le temps de réduction décimale à la température T

$$\frac{dN}{Ndt} = -\frac{\ln(10)}{D(T)} \quad (3.1)$$

Forme analytique

Soient N_0 et $N(t)$ les concentrations microbiennes initiale et à l'instant t

et $D(T)$ le temps de réduction décimale à la température T

$$\log_{10}N(t) = \log_{10}N_0 - \frac{t}{D(T)} \quad (3.2)$$

Modèle secondaire : Modèle de Bigelow

Soient D_{ref} et $D(T)$ les temps de réduction décimale aux températures T_{ref} et T et z la constante de thermorésistance, définie comme l'augmentation de température nécessaire pour diviser D par 10

$$\log_{10}D(T) = \log_{10}D_{ref} - \frac{T - T_{ref}}{z} \quad (3.3)$$

3.1.2 Estimation des paramètres des modèles de destruction thermique des cellules végétatives de *Clostridium perfringens* : travaux publiés

De nombreuses études ont été publiées sur la destruction thermique des cellules végétatives de *Clostridium perfringens* dans différents milieux et matrices alimentaires et dans des conditions isothermes (Foegeding and Busta, 1980 ; Roy *et al.*, 1981 ; Smith *et al.*, 1981 ; Heredia *et al.*, 1997 ; Juneja and Marmer, 1998 ; Sarker *et al.*, 2000 ; Juneja *et al.*, 2001 ; Novak *et al.*, 2001 ; Novak and Yuan, 2003 ; Byrne *et al.*, 2006 ; Wijnands *et al.*, 2009). Dans ces travaux, les auteurs ont utilisé leurs propres données brutes, sous forme de dénombrements à intervalles de temps réguliers, pour estimer les paramètres d'un modèle de destruction thermique. Quand ces données brutes n'ont été obtenues qu'à une température de destruction, ils ont utilisé le modèle primaire classique (Eq. 3.2) pour estimer un temps de réduction décimale, D , défini comme le temps nécessaire pour diviser la population microbienne par 10. Quand les données brutes ont été obtenues à plusieurs températures de destruction, les auteurs ont estimé une valeur de D pour chaque température testée puis ils ont utilisé ces valeurs de D pour ajuster un modèle secondaire, classiquement le modèle de Bigelow (Eq. 3.3).

Dans ces travaux (Foegeding and Busta, 1980 ; Roy *et al.*, 1981 ; Smith *et al.*, 1981 ; Heredia *et al.*, 1997 ; Juneja and Marmer, 1998 ; Sarker *et al.*,

2000 ; Juneja *et al.*, 2001 ; Novak *et al.*, 2001 ; Novak and Yuan, 2003 ; Byrne *et al.*, 2006 ; Wijnands *et al.*, 2009), les auteurs ont étudié l'effet sur cette destruction thermique de certains facteurs, relatifs aux souches bactériennes, aux milieux de destruction, aux conditions de culture des cellules végétatives, issues de la germination de spores. Mais souvent ces études n'ont été menées qu'à une seule température de destruction, de telle sorte que seul le paramètre du modèle primaire, D , a pu être estimé dans ces études. Dans quelques études (Foegeding and Busta, 1980 ; Roy *et al.*, 1981 ; Smith *et al.*, 1981 ; Juneja and Marmer, 1998 ; Byrne *et al.*, 2006 ; Wijnands *et al.*, 2009), la destruction thermique des cellules végétatives de *Clostridium perfringens* a été suivie à plusieurs températures de destruction, rendant possible l'estimation des paramètres du modèle secondaire de destruction, D_{ref} et z .

En 2006, van Asselt and Zwietering ont utilisé des données publiées pour étudier l'effet de différents facteurs expérimentaux sur les paramètres du modèle de destruction thermique des cellules végétatives de *Clostridium perfringens* parmi de nombreuses espèces étudiées. Parmi les facteurs expérimentaux étudiés, on trouve, par exemple, le milieu de destruction ou de la matrice alimentaire, leur pH, leur aw, la souche microbienne. Les auteurs ont collecté des valeurs de D obtenues dans des conditions expérimentales variées. Ils ont ensuite essayé d'expliquer la dispersion observée parmi ces données collectées en définissant des effets déterministes, ponctuels, pour chaque facteur expérimental étudié dans des modèles à effets fixes. Leur analyse ne leur a pas permis d'identifier d'effet significatif des facteurs testés pour *Clostridium perfringens*.

Dans un tel processus de méta analyse, une partie de la dispersion observée parmi les données collectées est due à la variabilité non contrôlée d'une étude à l'autre, c'est-à-dire la variabilité inter études qui n'apparaît pas au travers de l'analyse du protocole expérimental. Cette variabilité, qui existe bien, doit être prise en compte (Nauta, 2002) même si elle ne peut pas être expliquée dans des modèles déterministes. Pour la modéliser, il peut être intéressant d'utiliser des modèles à effets mixtes. Dans ces modèles, certains facteurs expérimentaux sont supposés avoir des effets fixes sur la

réponse microbienne modélisée (ici la destruction thermique) à l'intérieur d'une étude comme d'une étude à l'autre mais une fois ces effets fixes estimés, la réponse modélisée peut encore différer d'une étude à une autre (Stram, 1996 ; Raudenbush and Bryk, 2002). Dans cette approche, les études utilisées sont considérées comme un échantillon aléatoire de toutes les études publiées. Cette approche permet de généraliser à la population des études non utilisées les résultats de l'analyse réalisée sur cet échantillon et de tirer des conclusions générales sur l'effet de certains facteurs expérimentaux sur la réponse microbienne (Kalaian, 2003 ; Gonzales-Barron and Butler, 2011).

Comme précédemment pour le modèle de germination croissance, nous avons construit le modèle de destruction des cellules végétatives en utilisant des données publiées obtenues en conditions isothermes de manière à explorer différentes sources de variabilité. Pour estimer les paramètres du modèle à partir de ces données issues de méta analyse, nous avons utilisé des modèles à effets mixtes. Parmi les modèles testés, nous avons choisi le modèle présentant le meilleur compromis entre l'ajustement des données et la faible complexité du modèle, avant de le valider en utilisant des données publiées obtenues dans des conditions thermiques dynamiques.

3.2 Recueil des données publiées sur *Clostridium perfringens*

L'objectif de ce travail est de paramétrer un modèle qui prédit la destruction des cellules végétatives de *Clostridium perfringens* dans des conditions proches des conditions finales de la remise en température des deux plats en sauce. Lors de la sélection des données publiées, nous avons donc écarté :

- les données obtenues en milieu modifié. Ici, contrairement au taux optimum de croissance du modèle de germination croissance, D , le temps de réduction décimale, ne dépend pas des caractéristiques intrinsèques du milieu. Pour autant, dans certaines études (Juneja and Marmer, 1998), les auteurs ont rajouté une substance chimique destinée à augmenter l'efficacité de la destruction thermique, ce que nous appelons ici milieu

modifié. Pour ces publications, seules les cinétiques correspondant au milieu non modifié ont été sélectionnées.

- les données obtenues à partir de protocoles expérimentaux ‘non réalistes’, dans la mesure où ils ne correspondent pas au process étudié. Ainsi, dans un article de 2001, Novak *et al.* récoltent des cellules végétatives cultivées à différentes températures. Ensuite ils divisent leur stock de cellules végétatives en 2 : une partie de ces cellules, sur lesquelles ils mènent leurs expériences de destruction immédiatement après leur récolte des cellules et l’autre partie sur laquelle ils mènent leurs expériences de destruction après une phase de stockage de 24 heures à 4°C. Dans ce cas, seules les données obtenues sur les cellules détruites immédiatement après leur récolte ont été retenues.
- les données résumées. En 2006, Byrne *et al.* suivent la destruction de *Clostridium perfringens* à différentes températures avec des réplicats pour chaque expérience. Mais dans leur article, on ne trouve qu’une valeur de D pour chaque température testée, estimée à partir des valeurs de D de chaque réplicat. Nous n’avons pas utilisé ces données.

Comme pour le modèle de germination croissance, nous avons cherché des données obtenues dans des conditions isothermes et proches des caractéristiques du procédé modélisé. Ainsi, les données qui ont pu être collectées correspondent à des données observées :

- sur deux milieux différents non modifiés : un bouillon de culture et de la viande de boeuf. Ici, contrairement aux critères de collecte de données pour le modèle de germination croissance, la teneur en sel importe peu. Nous avons surtout écarté les données obtenues dans des milieux enrichis en substance destinée à favoriser la destruction, comme le pyrophosphate de Sodium (Juneja and Marmer, 1998).
- pour la plupart sur des souches isolées et pour quelques unes sur cocktails de souches. Plus d’une vingtaine de souches et un cocktail de souches ont été testés. Toutes ces données ont été conservées pour estimer les paramètres du modèle.
- dans des conditions isothermes. Toutes les cinétiques obtenues corres-

- pondent à des températures de destruction comprises entre 55 et 65.6°C, certaines températures étant nettement plus représentées que d'autres.
- sur des cellules végétatives qui ont subi, ou non, un choc chaud préalable à la destruction. Ce choc chaud consiste à une élévation de la température à 50°C pendant 30 minutes généralement. Il est supposé déclencher la synthèse de protéines de stress permettant par la suite aux cellules végétatives de mieux résister à la destruction thermique.
 - sur des cellules végétatives qui, hormis ce choc chaud, sont issues de conditions de culture différentes : par exemple, certaines ont été cultivées dans des conditions isothermes (avec des températures de culture différentes), d'autres dans des conditions thermiques dynamiques. Ces différences se rencontrent d'une publication à une autre mais aussi au sein d'une même publication.

Les données collectées, présentées dans le tableau C.1, proviennent de COM'BASE et d'articles. Elles sont de deux types :

- généralement des estimations de D , le temps de réduction décimale (en heures) à une certaine température.
- parfois des données brutes, présentées sous la forme de dénombrements (en $\log_{10} ufc.g^{-1}$ ou $\log_{10} ufc.ml^{-1}$) à intervalles réguliers (en minutes). Toutes les valeurs de D publiées collectées par nos soins avaient été estimées par les auteurs en utilisant le modèle log-linéaire de destruction (Eq. 3.2). Aussi avons-nous estimé, en ajustant ce même modèle sur ces données de dénombrement, des valeurs de D pour chaque cinétique de façon à n'obtenir qu'un jeu de données, composé uniquement de valeurs de D à différentes températures.

L'ensemble des données utilisées sont représentées sur la figure 3.1b.

3.3 Construction du modèle

3.3.1 Choix des modèles de destruction

Pour estimer les paramètres du modèle de destruction thermique de *Clostridium perfringens*, nous avons utilisé le modèle classiquement utilisé pour

décrire la destruction thermique, à savoir :

- pour le modèle primaire, le modèle log-linéaire (Eq. 3.2),
- pour le modèle secondaire, le modèle de Bigelow (Eq. 3.3).

Notre objectif était de décrire dans un modèle général l'ensemble des données collectées en décrivant autant que possible la dispersion de ces données. Afin de déterminer si cette dispersion s'expliquait par la variabilité de D_{ref} et/ou de z , nous avons utilisé un sous-jeu de données pour lesquelles plusieurs valeurs de D à différentes températures étaient disponibles pour les mêmes conditions de culture des cellules végétatives et nous avons ajusté sur ces données des modèles de destruction individuels afin d'étudier la variation de D_{ref} et z . Nous avons fixé T_{ref} à 60°C car la variabilité de l'ensemble des valeurs de D collectées est importante à cette température, comme le montre la figure 3.1b.

3.3.2 Estimation de paramètres individuels du modèle secondaire

Dans certaines études (Foegeding and Busta, 1980 ; Roy *et al.*, 1981 ; Smith *et al.*, 1981 ; Juneja and Marmer, 1998), plusieurs valeurs de D à différentes températures étaient disponibles pour les mêmes conditions de culture des cellules végétatives, ce qui nous a permis d'ajuster, en utilisant la méthode des moindres carrés, des modèles secondaires individuels sur les valeurs $\log_{10}D$ en fonction de T (Eq. 3.3). Ces modèles nous ont permis d'étudier la variation de D_{ref} et z en fonction des conditions de culture des cellules végétatives.

L'ensemble des données utilisées, ainsi que les modèles individuels sont représentés dans la figure 3.1a. Les paramètres des modèles individuels, ainsi que l'estimation du coefficient de variation de $\log_{10}D_{ref}$ et z (défini comme le rapport entre l'écart-type et la moyenne), sont aussi présentés dans le tableau 3.1.

Comme le montre la figure 3.1a, la variabilité sur $\log_{10}D_{ref}$ paraît plus importante que la variabilité sur les pentes ($\frac{1}{z}$). Si les coefficients de variation estimés pour $\log_{10}D_{ref}$ et z , présentés dans le tableau 3.1, sont relativement

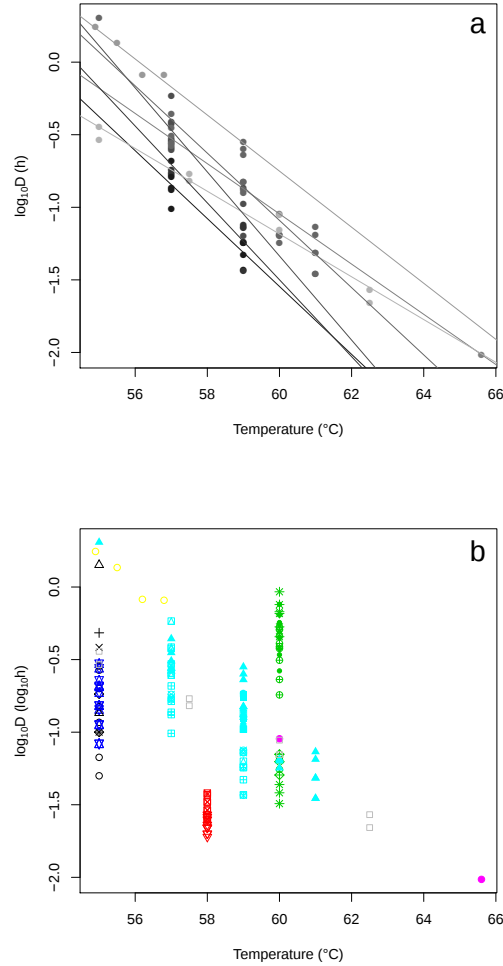


FIGURE 3.1 – Données collectées. a) Données pour lesquelles on disposait de valeurs de D à différentes températures pour les mêmes conditions de culture des cellules végétatives. Les lignes représentent les modèles individuels ajustés sur ces données D . Les niveaux de gris représentent les conditions de culture des cellules végétatives. b) Ensemble des valeurs de D collectées. Les conditions de culture des cellules végétatives sont représentées par les types de points tandis que leurs couleurs représentent les études (Foegeding and Busta, 1980; Roy et al., 1981; Smith et al., 1981; Heredia et al., 1997; Juneja and Marmer, 1998; Sarker et al., 2000; Juneja et al., 2001; Novak et al., 2001).

proches, les intervalles de confiance à 95% de $\log_{10}D_{ref}$ de chaque modèle individuel ne se chevauchent pas tous, contrairement aux intervalles de confiance

à 95% de z , comme le montre la figure 3.2.

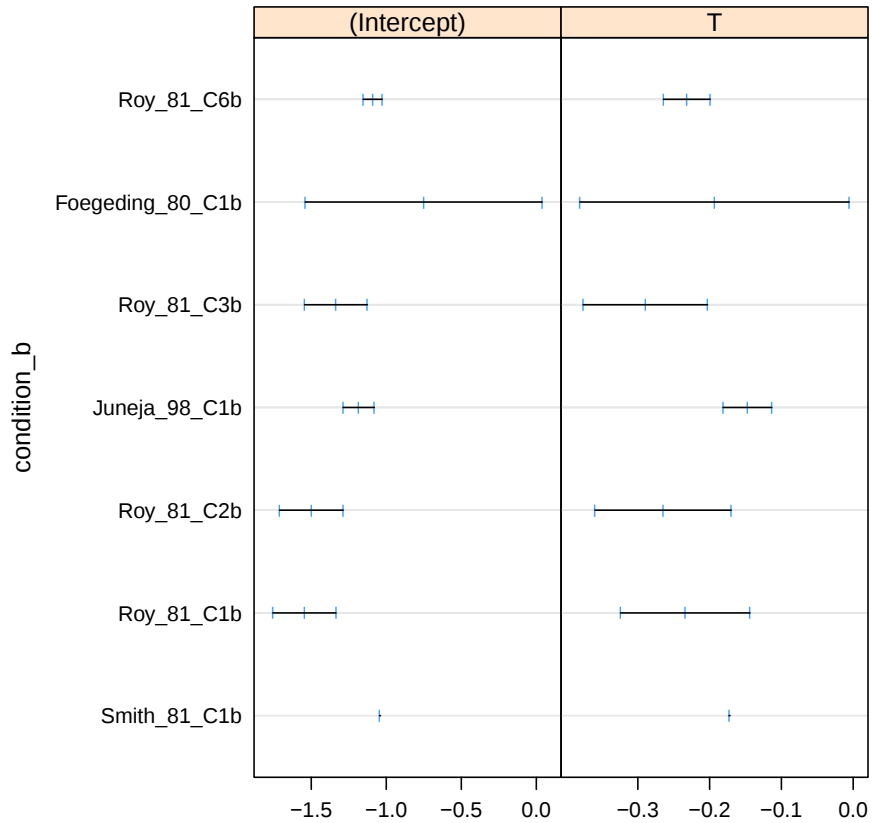


FIGURE 3.2 – Intervalles de confiance à 95% des paramètres individuels du modèle secondaire. Pour chaque paramètre estimé, le tiret vertical bleu du milieu représente la valeur estimée du paramètre, tandis que le segment représente son intervalle de confiance à 95%. *Intercept* renvoie à $\log_{10}D_{ref}$ et *T* renvoie à $\frac{1}{z}$. *condition.b* renvoie à la condition de culture des cellules végétatives.

De plus, sur l'ensemble du jeu de données, pour la plupart des conditions de culture des cellules végétatives, on ne disposait de valeurs de D qu'à une seule température, ne permettant pas d'estimer une valeur de z par condition de culture.

Pour ces raisons, dans notre modèle général décrivant l'ensemble des données, nous avons supposé que seul le $\log_{10}D_{ref}$ était variable. L'effet de

l'étude sur $\log_{10}D_{ref}$ apparaît clairement sur la figure 3.1b. Dans une même étude, l'effet de la condition de culture des cellules végétatives apparaît aussi sur cette même figure.

Etude	$\log_{10}D_{ref}(\log_{10}(h))$ ($T_{ref} = 60^{\circ}\text{C}$)	$z (^{\circ}\text{C})$
Smith <i>et al.</i> , 1981	-1.05	5.78
Roy <i>et al.</i> , 1981	-1.54 [-1.76,-1.33]	4.28 [3.09,6.95]
Roy <i>et al.</i> , 1981	-1.50 [-1.71,-1.29]	3.78 [2.78,5.89]
Roy <i>et al.</i> , 1981	-1.34 [-1.54,-1.13]	3.45 [2.66,4.93]
Roy <i>et al.</i> , 1981	-1.09 [-1.15,-1.03]	4.32 [3.78,5.02]
Juneja and Marmer, 1998	-1.18 [-1.29,-1.08]	4.79 [5.52,8.82]
Foegeding and Busta, 1980	-0.75 [-1.54,0.04]	5.18 [2.63,179.25]
Coefficient de variation	0.23	0.18

TABLE 3.1 – Paramètres des modèles individuels. Les valeurs entre crochets représentent les bornes de l'intervalle de confiance à 95%.

3.3.3 Choix du modèle pour décrire l'ensemble des données

D'après les résultats des modèles individuels, nous n'avons donc modélisé que la variabilité de D_{ref} , en supposant une valeur commune de z . Dans un premier modèle, le modèle 0, nous n'avons décrit aucune variabilité de D_{ref} en utilisant le modèle de Bigelow (Eq. 3.3) et en ajoutant un terme d'erreur gaussien.

Ensuite, nous avons modélisé la variabilité de D_{ref} en ajoutant à ce modèle deux types d'effets : les effets aléatoires et les effets fixes.

Les effets aléatoires permettent de décrire les effets des facteurs dont seul un échantillon aléatoire des modalités est testé. Dans cette étude, les facteurs aléatoires identifiés étaient :

- l'étude, c'est-à-dire la publication.
- la condition de culture des cellules végétatives. Les différences de conditions de culture des cellules végétatives nous ont conduit à définir un facteur appelé 'culture des cellules' pour différencier ces conditions de culture. Ce facteur est imbriqué dans le facteur 'étude'.
- la souche.

Les effets aléatoires de ces facteurs ont été décrits par des termes supposés additifs suivant des lois normales centrées sur 0 et d'écarts types respectifs $\sigma_{étude}$, $\sigma_{culture}$ et σ_{souche} .

Les effets fixes permettent de décrire les effets des facteurs dont toutes les modalités d'intérêt sont testées. Ici, nous nous sommes particulièrement intéressés à deux facteurs :

- le milieu de destruction, viande ou bouillon de culture. Ce facteur est qualitatif, avec deux modalités, 'boeuf' et 'FTG' (le bouillon de culture).
- la présence/absence de choc chaud sur les cellules végétatives avant leur destruction, facteur qualitatif codifié en O/N.

Les effets fixes de ces facteurs ont été décrits par des termes supposés additifs, d'une part, par un β_{mil} par milieu, et, d'autre part, un β_{HS} selon la présence ou l'absence de choc chaud, avec les contraintes suivantes :

$$\sum_{mil} \beta_{mil} = 0 \quad \text{et} \quad \sum_{HS} \beta_{HS} = 0 \quad (3.4)$$

Nous avons choisi de modéliser les effets aléatoires en premier et à partir de nos premières observations, nous avons ajouté ces effets un à un en commençant par celui qui apparaît le plus clairement sur la figure 3.1b, l'effet 'étude'. Puis dans un troisième modèle, nous avons ajouté l'effet 'culture des cellules' et dans un quatrième modèle, l'effet 'souche'. Dans un cinquième modèle, nous avons ajouté l'effet fixe 'milieu' et dans un sixième l'effet 'choc

chaud'. Le modèle d'ensemble est décrit dans le DAG, présenté sur la figure 3.3 et les liens entre noeuds sont décrits dans le tableau 3.2.

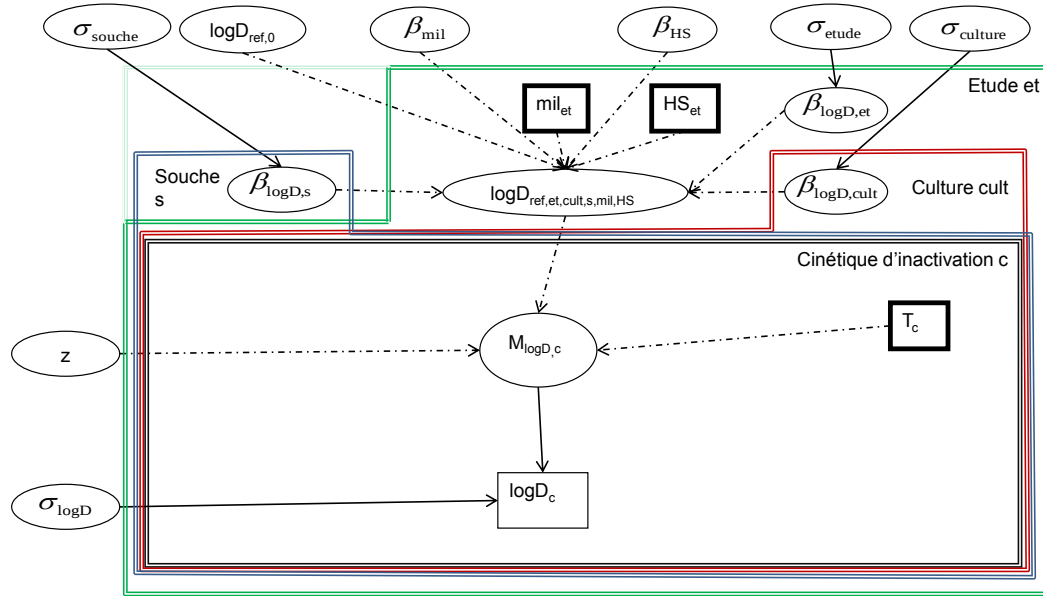


FIGURE 3.3 – Graphe acyclique dirigé du modèle de destruction des cellules végétatives. Les liens logiques entre chaque noeud sont représentés par des flèches en pointillé, les liens stochastiques par des flèches pleines. Les liens entre noeuds sont décrits dans le tableau 3.2.

Les index 'et', 'cult', 's' et 'c' représentent les différents niveaux hiérarchiques du modèle : l'étude, la condition de culture, la souche et la cinétique de destruction individuelle. $M_{\log D, c}$ est le logarithme du temps de réduction décimale théorique pour la cinétique 'c' et $\log D_c$ est la valeur observée correspondante. $\log D_{ref, et, cult, s, mil, HS}$ est le logarithme de D_{ref} théorique pour la souche 's', avec la condition de culture 'cult' de l'étude 'et', dans le milieu 'mil', après un choc chaud ou non ('HS'). Il résulte de l'addition des différents effets à $\log D_{ref, 0}$.

Pour estimer les paramètres des différents modèles ainsi que la qualité de leur ajustement, nous avons utilisé deux types d'inférence :

- l'inférence fréquentiste. Nous avons utilisé le package *lme4* (Bates, 2010) car le package *nlme* ne permettait pas de gérer ce modèle, et en particulier l'emboîtement partiel des facteurs. Pour comparer les modèles, nous avons utilisé le BIC et l'AIC.
- l'inférence bayésienne. Nous avons utilisé JAGS et comparé les modèles grâce au DIC.

Pour l'inférence bayésienne, des priors relativement informatifs ont été définis pour $\log_{10}D_{ref,0}$ et z à partir de données non utilisées pour l'inférence et/ou d'informations quand celles-ci étaient disponibles. Des distributions *a priori* des écarts types, $\sigma_{étude}$, $\sigma_{culture}$, σ_{souche} et $\sigma_{\log D}$ non informatives (Gelman, 2006) ont été choisies, de même que celles des effets fixes, β_{mil} et β_{HS} . Ils sont présentés dans le tableau 3.3.

Noeud	Lien	Définition
$\beta_{\log D, et}$	Stochastique	$\beta_{\log D, et} \sim N(0, \sigma_{etude})$
$\beta_{\log D, cult}$	Stochastique	$\beta_{\log D, cult} \sim N(0, \sigma_{culture})$
$\beta_{\log D, s}$	Stochastique	$\beta_{\log D, s} \sim N(0, \sigma_{\beta_{souche}})$
$\log D_{ref, et, cult, s, mil, HS}$	Logique	$\log D_{ref, et, cult, s, mil, HS} = \log D_{ref, 0} + \beta_{\log D, et} + \beta_{\log D, cult} + \beta_{\log D, s} + \beta_{mil} + \beta_{HS}$
$M_{\log D, c}$	Logique	$M_{\log D, c} = \log D_{ref, et, cult, s, mil, HS} - \frac{T_c - T_{ref}}{z}$
$\log D_c$	Stochastique	$\log D_c \sim N(M_{\log D, c}, \sigma_{\log D})$

TABLE 3.2 – Définition des liens entre les noeuds du modèle complet de destruction de cellules végétatives.

Paramètre	Unité	Distribution	Source d'information
$\log D_{ref,0}$ avec $T_{ref} = 60^\circ\text{C}$	$\log_{10}(h)$	$N(0, 1)$	Novak <i>et al.</i> (2003), Byrne <i>et al.</i> (2006), Wijnands <i>et al.</i> (2009)
σ_{etude}	$\log_{10}(h)$	$Unif(0, 20)$	Non informatif
$\sigma_{culture}$	$\log_{10}(h)$	$Unif(0, 20)$	Non informatif
σ_{souche}	$\log_{10}(h)$	$Unif(0, 20)$	Non informatif
β_{mil}	$\log_{10}(h)$	$N(0, 5)$	Non informatif
β_{HS}	$\log_{10}(h)$	$N(0, 5)$	Non informatif
$\sigma_{\log D}$	$\log_{10}(h)$	$Unif(0, 20)$	Non informatif
z	$^\circ\text{C}$	$N(10, 3)$	Byrne <i>et al.</i> (2006), van Asselt and Zwietering (2006), Wijnands <i>et al.</i> (2009)

TABLE 3.3 – Définition des distributions *a priori* des paramètres du modèle complet de destruction des cellules végétatives. Les paramètres des loi normales sont la moyenne et l'écart type.

Le recours à ces deux types d'inférence nous a permis de comparer les estimations des paramètres et des qualités d'ajustement de chaque modèle obtenues avec chaque type d'inférence et de bénéficier des atouts de chaque approche :

- la relative facilité de mise en oeuvre de l'inférence fréquentiste, grâce au package *lme4*. La mise en oeuvre de l'inférence bayésienne est plus complexe.
- la prise en compte de l'incertitude grâce à l'inférence bayésienne, ce qui n'est pas encore possible en inférence fréquentiste avec le package *lme4*.
- la possibilité d'intégrer des informations initiales sous forme de distributions *a priori* dans l'approche bayésienne. Cet apport d'informations permet parfois de pallier à un petit effectif de l'échantillon, ce qui n'est pas forcément le cas ici.
- la comparaison des modèles en utilisant le DIC de chaque modèle, estimé par inférence bayésienne. L'AIC et le BIC utilisent le maximum de vraisemblance mais en pénalisant les modèles comportant trop de

paramètres. Ainsi, pour un modèle comportant k paramètres estimés à partir de n observations, on estime l'AIC et le BIC en ajoutant à la déviance de ce modèle un terme, $2k$ pour l'AIC (Sakamoto *et al.*, 1986) ou $n \ln(k)$ pour le BIC (Schwarz, 1978). Dans l'estimation de ces deux statistiques, chaque paramètre compte pour un degré de liberté, qu'il décrive un effet fixe ou un effet aléatoire. De ce fait, si l'AIC et le BIC sont appropriés pour comparer des modèles à effets fixes, ils le sont moins pour les modèles comportant des effets aléatoires.

Le DIC utilise lui aussi la déviance pénalisée (Spiegelhalter *et al.*, 2002), dont on obtient une distribution du DIC liée à la distribution des paramètres du modèle, qu'on peut intégrer en calculant sa moyenne (Hobbs and Hilborn, 2006) ou résumer par d'autres statistiques comme, par exemple, le mode ou la médiane (Celeux *et al.*, 2006). Comme pour l'AIC ou le BIC, le terme pénalisant la déviance traduit la complexité du modèle mais en inférence bayésienne, ce terme n'est pas uniquement lié au nombre de paramètres, il est aussi lié à la nature des effets décrits. Le DIC est donc approprié pour comparer des modèles comportant des effets aléatoires.

Dès lors, les critères d'ajustement basés sur le maximum de vraisemblance, comme l'AIC et le BIC, sont moins adaptés pour comparer des modèles à effets mixtes, que le DIC (Ward, 2008). L'utilisation, dans le cadre de cette étude, des deux types d'inférence nous a permis de vérifier si les deux types de critères permettaient de sélectionner le même modèle et, surtout, de sélectionner un modèle selon un critère adapté aux modèles mixtes, le DIC.

Comme pour les précédents modèles, l'inférence a été réalisée en utilisant le logiciel JAGS (Plummer, 2009) et le package *rjags* du logiciel R (R Development Core Team, 2010). Après une première phase d'adaptation de 5.10^3 itérations, la phase d'inférence proprement dite a été conduite sur 3 chaînes MCMC indépendantes avec 5.10^5 itérations pour chaque chaîne. Nous n'avons retenu qu'une valeur sur 100, de sorte que, pour chaque chaîne MCMC, 5.10^3 valeurs de chaque paramètre ont été gardées. Le diagnostic de convergence a été réalisé en examinant visuellement les traces des chaînes

MCMC et en étudiant les statistiques de convergence, définies par Brooks and Gelman (1997).

Le tableau 3.4 présente les différents modèles testés, les valeurs de D_{ref} et de z estimées par inférence fréquentiste, ainsi que les AIC, les BIC et les DIC.

Modèle	Facteurs aléatoires			Facteurs fixes		$\log_{10}D_{ref,0}$	z	BIC	AIC	DIC
	Etude	Culture des cellules	Souche	Milieu	Choc chaud					
Modèle 0						-0.99	16.9	219.4	210.1	208.6
Modèle 1	X					-1.24	5.84	93.7	81.3	53.1
Modèle 2	X	X				-1.28	5.24	75.7	60.2	10.8
Modèle 3	X	X	X			-1.3	5.21	67.2	48.6	-15.4
Modèle 4	X	X	X	X		-1.31	5.2	72.2	50.5	-11.5
Modèle 5	X	X	X		X	-1.27	5.21	72.1	50.4	-15.5

TABLE 3.4 – Différents modèles à effets mixtes testés. X signifie que l'effet est décrit dans le modèle. Les valeurs de $\log_{10}D_{ref,0}$ et de z reportées sont les valeurs estimées par inférence fréquentiste.

Les différentes statistiques présentées dans le tableau 3.4, AIC, BIC et DIC, sont cohérentes. D'après le DIC, le modèle qui décrit les effets aléatoires liés à l'étude, la condition de culture des cellules végétatives et la souche (modèle 3) est celui qui présente le meilleur compromis entre ajustement et parcimonie. Les paramètres de ce modèle figurent dans le tableau 3.5.

Les estimations des paramètres avec les deux types d'inférence sont cohérentes. L'estimation de $\log_{10}D_{ref,0}$ est cohérente avec les valeurs estimées des modèles individuels, présentées dans le tableau 3.1. Même si l'estimation de z est supérieure à toutes les valeurs estimées, elle reste cohérente avec celles-ci. La valeur de $\log_{10}D_{ref,0}$ estimée par ce modèle est aussi proche de -1.23, la valeur estimée par van Asselt and Zwietering (2006) tandis que l'estimation de z par ces auteurs est pratiquement double de notre valeur (5.21 ou 5.39 [4.60,6.55]). De plus, les estimations de ces 2 paramètres par les modèles 0

Paramètres	Unité	Inférence	
		Fréquentiste Valeur	Bayésienne Médiane [IC95]
$\log_{10}D_{ref,0}$ ($T_{ref}=60^{\circ}\text{C}$)	$\log_{10}(h)$	-1.30 (SE=0.17) ($D_{ref}=3$ mn)	-1.25 [-1.65,-0.80] ($D_{ref}=3.4$ [1.3,9.5] mn)
z	$^{\circ}\text{C}$	5.21 (SE=0.47)	5.39 [4.60,6.55]
σ_{etude}	$\log_{10}(h)$	0.42	0.52 [0.28,1.09]
$\sigma_{culture}$	$\log_{10}(h)$	0.18	0.19 [0.11,0.33]
σ_{souche}	$\log_{10}(h)$	0.16	0.17 [0.08,0.29]
σ	$\log_{10}(h)$	0.22	0.22 [0.20,0.25]

TABLE 3.5 – Paramètres du modèle 3 estimés par les deux approches. Les valeurs entre crochets représentent les bornes de l’intervalle de crédibilité à 95% autour de la valeur médiane.

et 3 diffèrent beaucoup comme le montre le tableau 3.4. Il semble donc que le fait de ne pas décrire de variabilité sur ce jeu de données amène à une surestimation excessive de z .

Les paramètres σ_{etude} , $\sigma_{culture}$ et σ_{souche} décrivent la variabilité de $\log_{10}D_{ref}$.

Pour l’instant, le package *lme4* ne permet d’estimer qu’une valeur ponctuelle des paramètres, accompagnée de son erreur standard uniquement pour les effets fixes, et non un intervalle d’incertitude. Aussi le modèle 3, estimé par inférence fréquentiste ne permet-il de décrire en simulation que la variabilité de $\log_{10}D_{ref}$ sans prise en compte de l’incertitude. L’inférence bayésienne sur les mêmes données avec le même modèle permet de décrire l’incertitude. Comme on peut le voir dans le tableau 3.5, cette incertitude peut être importante notamment sur $\log_{10}D_{ref,0}$ et sur z . D’après le tableau 3.5, la variabilité inter étude, décrite par le paramètre σ_{etude} , paraît la plus importante, loin devant la variabilité résiduelle (σ) elle-même supérieure aux variabilités inter culture et souche (décrites respectivement par $\sigma_{culture}$ et σ_{souche}). Il semble donc qu’une grande partie de la variabilité soit expliquée par des facteurs expérimentaux non contrôlés.

Pour vérifier l'aptitude du modèle 3 à décrire les données observées, nous avons procédé de deux manières différentes.

Nous avons d'abord représenté les données, le modèle ajusté et ses intervalles de variabilité et de crédibilité à 95%. On s'attend à ce que ces intervalles contiennent à peu près 95% des valeurs observées.

En utilisant les paramètres estimés par inférence fréquentiste, nous avons estimé un écart-type global en sommant les variances des effets aléatoires (soit $1.76.10^{-1}$, $3.24.10^{-2}$ et $2.56.10^{-2}$ pour σ_{etude}^2 , $\sigma_{\text{culture}}^2$ et σ_{souche}^2) et la variance résiduelle du modèle 3 ($4.84.10^{-2}$), comme suit :

$$\sigma_{\log D}^2 = \sigma_{\text{etude}}^2 + \sigma_{\text{culture}}^2 + \sigma_{\text{souche}}^2 + \sigma^2 \quad (3.5)$$

Grâce à cet écart-type $\sigma_{\log D}$, nous avons estimé un intervalle de variabilité autour du modèle ajusté.

En utilisant les paramètres estimés par inférence bayésienne, nous avons estimé deux intervalles :

- un intervalle de variabilité en estimant une valeur de $\sigma_{\log D}$ autour de la valeur médiane de $\log_{10} D_{\text{ref}}$ à partir des valeurs médianes des chaînes MCMC de σ_{etude} , σ_{culture} , σ_{souche} et σ . Nous avons aussi utilisé la valeur médiane de z .
- un intervalle de crédibilité en faisant des simulations de Monte Carlo à une dimension à partir des distributions *a posteriori* conjointes de $\log_{10} D_{\text{ref}}$, σ_{etude} , σ_{culture} , σ_{souche} , σ et z . Dans ces simulations, pour un jeu de valeurs de ces paramètres, nous n'avons tiré qu'une valeur de $\log_{10} D_{\text{ref}}$, de z , des effets de chaque facteur et de l'erreur, de sorte que nous n'avons estimé qu'une valeur de $\log_{10} D$ par température. Répétée N_v fois, cette démarche nous a permis d'obtenir N_v valeurs de $\log_{10} D$ par température, dont nous avons estimé la valeur médiane et l'intervalle de crédibilité à 95%.

Le modèle ainsi que les données récoltées sont reportées dans la figure 3.4. D'après cette figure, le modèle 3, qui modélise les effets aléatoires de l'étude, la condition de culture et la souche, décrit bien la dispersion observée dans les données de méta analyse.

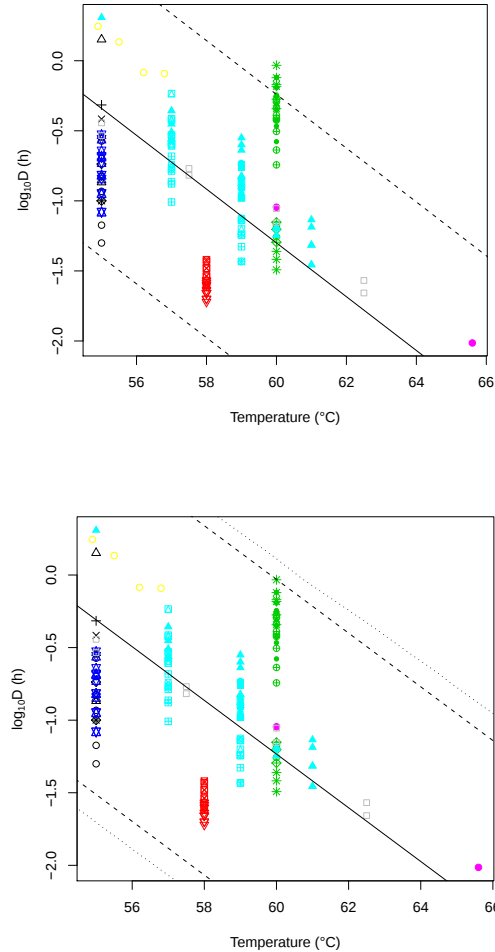


FIGURE 3.4 – Données collectées et modèle 3 ajusté par inférence fréquentiste (figure du haut) ou bayésienne (figure du bas). Les points représentent les données collectées par étude (Foegeding and Busta, 1980; Roy *et al.*, 1981; Smith *et al.*, 1981; Heredia *et al.*, 1997; Juneja and Marmer, 1998; Sarker *et al.*, 2000; Juneja *et al.*, 2001; Novak *et al.*, 2001) et condition de culture des cellules végétatives (type de points). Sur la figure du haut, la droite noire en trait plein représente le modèle ajusté et les droites en tiret les bornes de son intervalle de variabilité à 95%. Sur la figure du bas, la droite noire en trait plein représente le modèle ajusté, les droites en tiret les bornes de son intervalle de variabilité à 95% et les droites pointillées les bornes de son intervalle de crédibilité à 95%.

Pour vérifier la capacité du modèle à prédire les valeurs observées, nous avons comparé les valeurs prédites par le modèle et les valeurs observées.

Pour estimer les valeurs prédites avec les paramètres estimés par inférence fréquentiste, nous avons extrait les valeurs de chaque modalité de chaque effet aléatoire estimées grâce au package *lme4* et les écarts types résiduels estimés pour chaque observation. Pour chaque observation collectée, correspondant à la température T_c , nous avons estimé la prédiction correspondante en ajoutant à la prédiction médiane par le modèle ($\log_{10} D_{ref,0} - \frac{T_c - T_{ref}}{z}$) les valeurs de chaque modalité de chaque effet aléatoire. Puis, pour estimer l'intervalle de variabilité à 95% autour de cette prédiction, nous avons utilisé l'écart type résiduel.

Pour estimer l'intervalle de crédibilité à 95% de chaque prédiction réalisée avec les paramètres du modèle estimés par inférence bayésienne, nous avons utilisé les valeurs de $M_{\log D, c}$ générées dans les chaînes de Markov du modèle. Nous avons calculé, pour chaque valeur $\log D_c$ du jeu de données, l'intervalle de crédibilité à 95% des valeurs $M_{\log D, c}$ générées par le modèle et l'avons comparé graphiquement aux cinétiques observées.

On s'attend à ce que les valeurs médianes prédites, représentées par des points sur la figure 3.5, soient proches de la bissectrice, ou au moins à ce que les intervalles de variabilité et de crédibilité à 95% coupent cette bissectrice.

Comme le montre la figure 3.5, le modèle 3 semble décrire correctement la majorité des données. Cependant, certains intervalles de crédibilité ne contiennent pas la valeur observée, surtout les valeurs observées par Novak *et al.* (2001). Il serait intéressant de chercher l'origine de cet écart.

Quel que soit le mode d'inférence utilisé, le modèle 3 semble donc bien décrire les données observées, avec cependant un écart observé dans les deux cas entre les valeurs prédites par le modèle et les données issues de l'étude de Novak *et al.* (2001), qu'il serait intéressant d'étudier.

3.4 Validation du modèle

Cette validation a été réalisée à partir de données acquises en conditions thermiques dynamiques, collectées dans 3 études (Tuomi *et al.*, 1974 ;

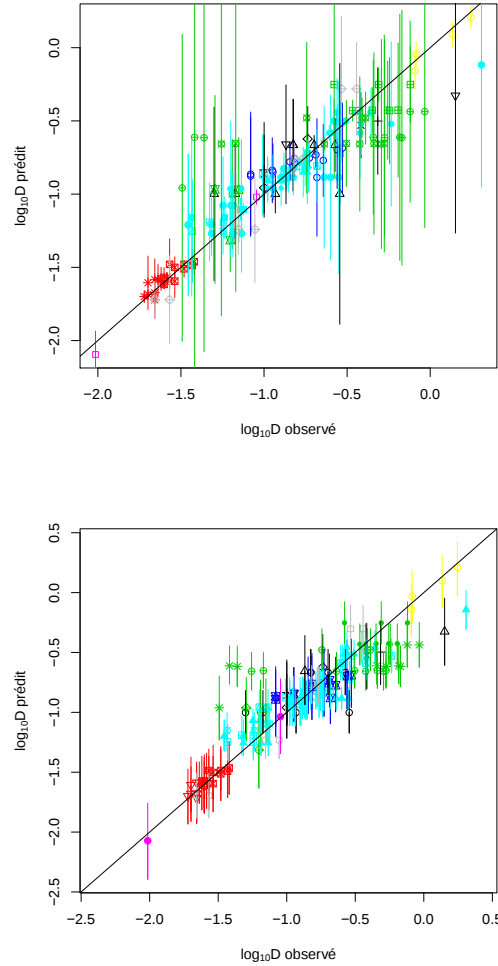


FIGURE 3.5 – Comparaison des valeurs observées et prédites par le modèle 3, dont les paramètres ont été estimés par inférence fréquentiste (figure du haut) ou bayésienne (figure du bas). En abscisse sont reportées les valeurs observées dans la littérature et en ordonnée les intervalles de variabilité (figure du haut) ou de crédibilité (figure du bas) à 95% des valeurs prédites par le modèle. Les points représentent les valeurs médianes prédites et les segments représentent les intervalles de variabilité ou de crédibilité à 95%. Les couleurs des points et des segments représentent les études (Foegeding and Busta, 1980; Roy *et al.*, 1981; Smith *et al.*, 1981; Heredia *et al.*, 1997; Juneja and Marmer, 1998; Sarker *et al.*, 2000; Juneja *et al.*, 2001; Novak *et al.*, 2001).

Willardsen *et al.*, 1978; Foegeding and Busta, 1980) présentées dans le tableau D.1 en annexes. Dans ces expériences, les auteurs se sont intéressés surtout à la germination puis à la croissance de *Clostridium perfringens* dans la viande de boeuf le long de profils thermiques dynamiques linéaires correspondant à un réchauffement. Cependant ils ont suivi l'évolution de *Clostridium perfringens* jusqu'à plus de 60°C. Seules les données acquises au-dessus de 53°C (température maximum de croissance de *Clostridium perfringens*, estimée par inférence bayésienne (Jaloustre *et al.*, 2010)) ont été collectées de manière à exclure toute croissance résiduelle. Ces données ne décrivent donc que la destruction de *Clostridium perfringens*.

Elles se présentent sous la forme de dénombrements à intervalles réguliers. Pour chaque profil, nous avons défini :

- la concentration initiale à partir de la première concentration mesurée au-dessus de 53°C,
- la concentration finale à partir de la dernière concentration mesurée.

A partir de cette concentration initiale et du profil thermique décrit par les auteurs, nous avons cherché à prédire la concentration finale avec le modèle sélectionné (modèle 3) et le modèle sans variabilité (modèle 0). Dans ces simulations, nous avons supposé que le seuil de détection était égal à 1 *ufc.g*⁻¹, de sorte que la concentration finale prédite ne pouvait pas être inférieure à 0 *log₁₀ufc.g*⁻¹. Nous avons aussi comparé les prédictions par nos deux modèles aux valeurs prédites par le modèle publié par van Asselt and Zwietering (2006).

Pour chaque donnée publiée, une seule valeur est prédite par le modèle 0, qui ne décrit aucune variabilité. De la même façon, dans nos simulations, une seule valeur est prédite par le modèle de van Asselt and Zwietering (2006), dans la mesure où l'écart type estimé par les auteurs ne correspond qu'à l'erreur du modèle (comme dans le cas de notre modèle 0).

Avec les paramètres du modèle 3 estimés par inférence fréquentiste, pour chaque concentration initiale et chaque profil thermique décrit par les auteurs, nous avons tiré au sort N_v valeurs de $\log_{10}D_{ref}$ dans la distribution normale $N(\log_{10}D_{ref,0}, \sigma_{\log D})$ et prédit N_v concentrations finales. Les prédictions

et les données observées sont présentées dans la figure 3.6.

Avec les paramètres du modèle 3 estimés par inférence bayésienne, nous avons estimé, pour chaque donnée collectée, deux intervalles de crédibilité à 95% :

- un intervalle de crédibilité décrivant à la fois la variabilité de D_{ref} et l'incertitude sur les paramètres en tirant au sort N_v jeux de valeurs des paramètres incertains et, pour chaque jeu de valeurs, une valeur de $\log_{10} D_{ref}$.
- un intervalle de crédibilité ne décrivant que la variabilité de D_{ref} en tirant au sort N_v valeurs de $\log_{10} D_{ref}$ et en utilisant la valeur médiane des paramètres incertains.

Les intervalles de crédibilité à 95% des concentrations finales prédites sont reportées dans la figure 3.6. Pour chaque donnée, les deux intervalles des crédibilités sont pratiquement confondus, montrant que l'incertitude sur la destruction prédite est assez faible, voire négligeable par rapport à la variabilité de D_{ref} .

Comme le montre la figure 3.6, pour chaque profil, la concentration médiane prédite par le modèle 3 est souvent plus faible que la concentration finale observée. Cette surestimation de la destruction pourrait être due à une éventuelle adaptation des cellules végétatives en conditions thermiques dynamiques. Mais si on prend en compte la variabilité, décrite par l'intervalle de variabilité sur la prédiction, le modèle 3 prédit correctement la concentration finale observée, celle-ci approchant souvent la borne supérieure de cet intervalle de variabilité en restant inférieure à cette borne. Il apparaît donc que les prédictions déterministes, comme la prédiction par le modèle 0 et le modèle de Van Asselt and Zwietering (2006) ou la prédiction médiane par le modèle 3, sont souvent trop optimistes pour être utilisées dans une démarche d'AQR.

Si on compare, pour chaque donnée de validation, l'intervalle de variabilité prédit par le modèle 3 construit en inférence fréquentiste (symbolisé par les segments gris sur la figure 3.6) et l'intervalle de variabilité prédit par le modèle 3 construit en inférence bayésienne (représentés par les segments pointillés noirs sur la figure 3.6), il apparaît que ces intervalles se superposent

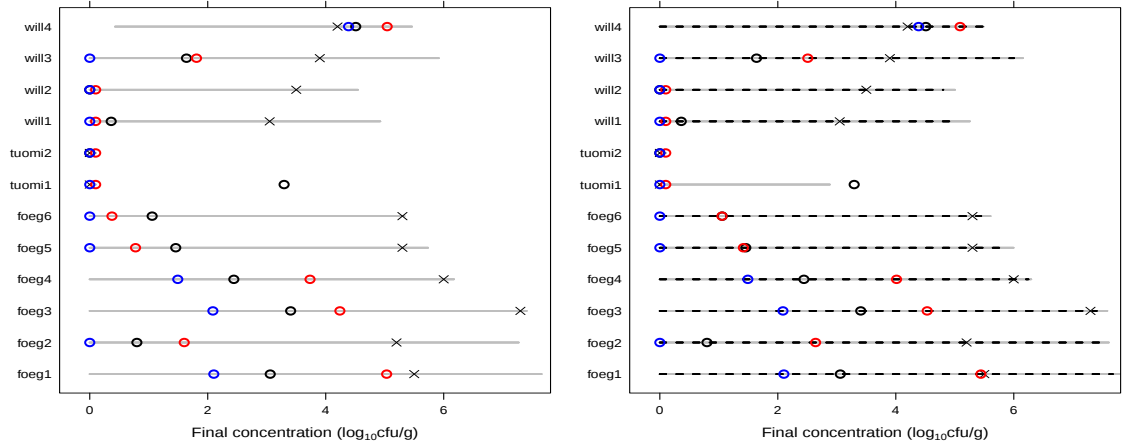


FIGURE 3.6 – Données obtenues en conditions thermiques dynamiques et prédictions par les différents modèles : modèles 0 et 3 et modèle de van Asselt and Zwietering (2006). Les croix représentent les données publiées. Les cercles noirs représentent les prédictions par le modèle 0, sans variabilité. Les cercles bleus représentent les concentrations finales prédites par le modèle de van Asselt and Zwietering (2006). Les cercles rouges représentent les valeurs médianes prédites par le modèle 3 (paramètres estimés par inférence fréquentiste sur la figure de gauche, par inférence bayésienne sur la figure de droite). A gauche, les segments horizontaux gris représentent les bornes des intervalles de variabilité à 95% des concentrations finales prédites par ce même modèle. A droite, les segments horizontaux gris représentent les bornes des intervalles de crédibilité à 95% des concentrations finales prédites en prenant en compte la variabilité et l'incertitude. Les segments noirs pointillés horizontaux représentent les bornes des intervalles de crédibilité à 95% des concentrations finales prédites en ne prenant en compte que la variabilité.

bien. En revanche, les prédictions médianes par le modèle 3 construit en inférence fréquentiste sont souvent inférieures aux mêmes prédictions par le modèle 3 construit en inférence bayésienne. Mais dans la mesure où il est important de prendre en compte la variabilité, donc de raisonner en intervalles de prédiction, cette différence entre les prédictions médianes n'est pas importante. Si on cherche à prédire uniquement la variabilité d'une destruction en conditions thermiques dynamiques, on peut donc utiliser indifféremment le modèle construit par inférence fréquentiste ou par inférence bayésienne.

3.5 Discussion

Nous avons estimé les paramètres d'un modèle de destruction en utilisant des données de méta analyse sélectionnées à partir de protocoles expérimentaux proches du process étudié. Malgré cette sélection, les données collectées montre une grande dispersion, que nous avons décrite en modélisant la variabilité de D_{ref} incluant un effet de l'étude, de la condition de culture des cellules végétatives et de la souche. La variabilité inter étude correspond *a priori* à des facteurs expérimentaux non contrôlés. De plus, la variabilité résiduelle est plus importante que la variabilité relative aux effets de la culture et de la souche. Une grosse part de variabilité est donc due à des facteurs non contrôlés ou inexpliquée. Mais cette variabilité est réellement observée dans les données collectées en conditions isothermes ou non. Il est donc important de la prendre en compte et de la modéliser comme une distribution.

Comme le montre la figure 3.6, l'utilisation de modèles déterministes (modèle publié par Van Asselt and Zwietering (2006) ou seule prédiction médiane du modèle 3) conduit à surestimer la destruction des cellules végétatives. De la même façon, la majeure partie des intervalles de variabilité et de crédibilité à 95% prédits par le modèle sélectionné sont inférieures aux données observées et surestiment aussi la destruction. Il paraît important de comprendre l'origine de cette surestimation de la destruction des cellules végétatives de manière à la prendre en compte dans les modèles. Une éventuelle adaptation des cellules en conditions thermiques dynamiques pourrait être une piste. Cette adaptation a été observée par van Derlinden *et al.* (2009). Sur différentes souches d'*Escherichia coli*, ils ont en effet noté qu'une partie des cellules, soumises à une augmentation lente de la température jusqu'à une température finale supérieure à leur température maximum de croissance, devenaient thermorésistantes. Cette acquisition de cette thermorésistance a été observée sur différentes souches. Il apparaît que la thermorésistance acquise augmente quand la vitesse de réchauffement diminue (Hassani *et al.*, 2005, 2006). Ce phénomène, qui n'a jamais été étudié sur *Clostridium perfringens*, pourrait affecter cette bactérie. La modélisation de ce phénomène permettrait d'améliorer la qualité des prédictions par les modèles d'exposition.

Seule la variabilité sur D_{ref} a été modélisée. Il serait intéressant d'explorer la variabilité de z mais la structure des données collectées ne nous l'a pas permis puisque souvent pour une combinaison de facteurs (étude+culture+souche) les valeurs de D disponibles ne l'étaient qu'à une seule température, ne permettant pas d'estimer une valeur de z .

Dans notre approche de modélisation, étant donné que van Asselt and Zwietering (2006) n'avaient identifié aucun effet fixe significatif sur la destruction de *Clostridium perfringens*, nous avons choisi d'introduire en premier dans nos modèles les effets aléatoires puis les effets fixes. Mais en marge du travail présenté dans cette partie (et dans l'article soumis), nous avons aussi testé toutes les combinaisons possibles de 1 à 5 facteurs, soit 31 modèles. Les AIC et les BIC de chaque combinaison de facteurs testée sont reportés dans le tableau E.1. D'après les valeurs d'AIC et de BIC, utilisées ici car le package *lme4* permet d'automatiser ces estimations alors que l'estimation du DIC sur 31 modèles demande d'écrire chaque modèle sans automatisation possible, le modèle choisi semble le meilleur compromis entre ajustement des données et parcimonie.

Dans cette étude, nous avons utilisé deux approches pour estimer les paramètres du modèle sélectionné. Etant donné la taille assez importante de notre jeu de données, les deux inférences, fréquentiste et bayésienne, nous ont menés à des résultats équivalents à savoir :

- des estimations des paramètres cohérentes d'une approche à l'autre, avec l'avantage en inférence bayésienne d'avoir, en plus d'une estimation ponctuelle de ces paramètres, leur distribution d'incertitude.
- le même modèle sélectionné. L'AIC et le BIC, dans le cadre fréquentiste, et le DIC, dans le cadre bayésien, ont permis de sélectionner le même modèle. Cette cohérence est intéressante même si *a priori* seul le DIC apparaît comme un critère de sélection adapté pour ce type de modèle.
- des intervalles de variabilité de prédiction semblables quelle que soit l'approche utilisée pour estimer les paramètres du modèle. Mais là encore, l'inférence bayésienne offre l'avantage d'estimer l'incertitude associée à cette variabilité.

Il apparaît aussi que l'incertitude sur le modèle choisi est très faible comparée à la variabilité modélisée sur D_{ref} . C'est pourquoi, dans l'article que nous avons soumis à *International Journal of Food Microbiology*, nous avons décidé de ne présenter que l'approche fréquentiste. En effet, il nous semblait utile de proposer une méthodologie d'estimation des paramètres d'un modèle de destruction que des microbiologistes n'utilisant que R pourraient mettre en oeuvre facilement. Dans ce contexte, le package *lme4* est un outil très intéressant même s'il ne permet pas encore de décrire l'incertitude.

Nous avons utilisé des données issues de méta analyse pour estimer les paramètres de nos modèles. De par sa constitution, le jeu de données collectées est déséquilibré : toutes les études, toutes les conditions et toutes les souches ne sont pas également représentées dans le jeu de données.

La répartition des données en 'paquets', qui correspondent souvent aux études, pose le problème du poids de ces données sur l'estimation des paramètres. Un point particulier a retenu notre attention : la seule valeur de D collectée au dessus de 65°C , très éloignée des autres points, semble 'tirer' le modèle et a peut-être beaucoup de poids sur l'estimation des paramètres. C'est ce que nous avons vérifié en retirant cette observation de notre jeu de données et en estimant les paramètres du modèle 3. Sans cette observation, les paramètres estimés restent équivalents (-1.32 pour $\log_{10}D_{ref,0}$, 5.13 pour z , 0.42 pour σ_{etude} , 0.18 pour $\sigma_{culture}$, 0.16 pour σ_{souche} et 0.22 pour σ), ce qui montre que cette observation, malgré les apparences, n'influe pas de manière importante sur l'estimation des paramètres du modèle.

Chapitre 4

Modèle Dose Réponse

4.1 Introduction

L'objectif était de paramétrer un modèle dose réponse liant la probabilité d'un effet néfaste à la dose de *Clostridium perfringens* ingérée, c'est-à-dire le nombre de cellules végétatives ingérées, en prenant en compte les sources de variabilité dans la réponse.

4.1.1 Les hypothèses biologiques à la base des modèles dose réponse

La plupart des modèles dose réponse publiés sont mécanistes et reposent sur deux hypothèses biologiques (Haas *et al.*, 1999a) :

- l'absence d'un seuil, c'est-à-dire d'un nombre minimum de cellules (de l'agent pathogène) nécessaires au déclenchement d'un effet néfaste. Ce seuil est aussi appelé 'dose minimum infectieuse'. Deux raisons ont conduit à préférer les modèles sans seuil, appelés aussi 'single hit' : la difficulté à déterminer cette dose minimum infectieuse et la thèse, soutenue par des biologistes, selon laquelle, grâce à ses capacités de multiplication dans l'hôte, une seule cellule peut suffire à infecter celui-ci. Les modèles '*single hit*' reposent sur l'hypothèse qu'un seul succès, c'est-à-dire une seule rencontre avec la cellule, peut suffire à déclencher l'infection. Une cellule a alors une probabilité faible mais non nulle de

survivre aux barrières de l'hôte, de se multiplier et d'atteindre les sites d'infection et déclencher l'effet néfaste (Haas *et al.*, 1999a ; FAO, 2003). La probabilité qu'au moins une cellule de la dose ingérée déclenche l'infection est d'autant plus élevée que la dose est importante.

- l'absence d'interaction. Quand l'hôte est envahi par plusieurs cellules, dans l'hypothèse d'une action indépendante, la probabilité moyenne pour une cellule de déclencher l'infection ne dépend pas du nombre de cellules ingérées et reste constante. Au contraire, si les cellules travaillent en synergie, la probabilité moyenne pour une cellule de déclencher l'infection augmente avec le nombre de cellules. Cette augmentation de virulence traduit alors la synergie entre celles-ci. Dans la littérature, l'hypothèse de l'action indépendante est privilégiée (FAO, 2003).

Ces deux hypothèses conditionnent les modèles dose réponse. Les modèles les plus couramment utilisés sont des modèles '*single hit*' sans interaction.

4.1.2 Description de la variabilité dans les différents modèles dose réponse

Dans l'hypothèse de l'absence de seuil et de l'absence d'interaction, la probabilité d'apparition de l'effet néfaste chez un individu dépend de deux facteurs : le nombre de cellules ingérées, appelé la dose individuelle d , et la probabilité que chacune de ces cellules ingérées déclenche l'effet néfaste. Le modèle '*single hit*' sur dose individuelle (Eq. 4.1) décrit cette relation.

Définition 4.1.1 (Modèle '*single hit*' sur dose individuelle)

Si on considère r la probabilité d'un succès, c'est-à-dire la probabilité pour une cellule de survivre aux barrières physiologiques, d'atteindre les sites de l'infection et de déclencher l'effet néfaste, pour un individu la probabilité d'apparition de l'effet néfaste après l'absorption de d cellules est décrite par :

$$P_{maladie}(d) = 1 - (1 - r)^d \quad (4.1)$$

Quand on cherche à décrire dans un modèle dose réponse la probabilité d'apparition de l'effet néfaste dans une population, il faut tenir compte de la variabilité de la dose ingérée d et de la probabilité de succès r .

Variabilité de la dose ingérée

La variabilité de la dose peut être plus ou moins importante selon la source des données utilisées pour estimer les paramètres du modèle. La variabilité de la dose individuelle est parfois modélisée en tant que telle quand les doses individuelles sont connues ou qu'elles peuvent être estimées grâce à des simulations. Dans ce cas, les auteurs utilisent des modèles développés sur dose individuelle d . Ainsi, en 2008, Delignette-Muller *et al.* ont estimé la dose d'*Escherichia coli* 0157 :H7 ingérée par chaque consommateur d'un lot de steaks hachés surgelés incriminés dans une TIAC. Pour ce faire, ils ont utilisé les données de dénombrement disponibles sur le lot incriminé et recouru à des scénarios de destruction thermique pendant la cuisson et à des données de consommation pour simuler, pour chaque consommation de steak provenant du lot incriminé, la dose ingérée par chaque individu exposé. Enfin, ils ont estimé les paramètres du modèle dose réponse sur dose individuelle.

Mais le plus souvent, les auteurs utilisent des modèles dose réponse sur dose moyenne, dans lesquels la variation de la dose individuelle est décrite par une loi de distribution prise en compte dans le modèle : loi de Poisson si on suppose une répartition homogène des cellules dans la matrice alimentaire et la même quantité de produit consommé par tous les consommateurs, loi binomiale négative dans le cas contraire (ILSI, 2010). En 2008, Teunis *et al.* ont modélisé la probabilité de maladie liée à l'exposition à *Escherichia coli* 0157 :H7 et ont estimé les paramètres de leur modèle dose réponse en utilisant des données de TIAC. Ne disposant que d'informations sur la dose moyenne ingérée par les personnes exposées, ils ont défini un coefficient de dispersion par TIAC, γ , pour décrire, à partir de la dose moyenne, à la fois la variabilité de la quantité de produit ingérée par ces personnes et la dispersion de la contamination dans le produit. Toutefois ces coefficients de dispersion ont été fixés de manière arbitraire.

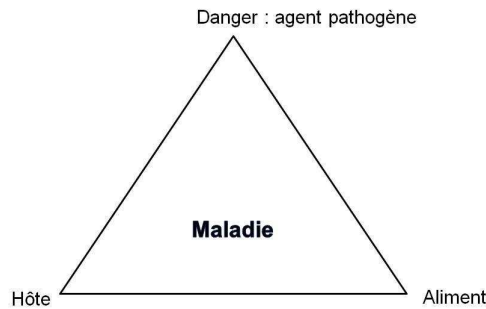


FIGURE 4.1 – Triangle de l'épidémiologie.

Variabilité de la probabilité de succès

La probabilité qu'une cellule déclenche l'effet néfaste, appelée aussi probabilité d'un succès, peut varier en fonction de trois composantes (Fig. 4.1) :

- l'agent pathogène. D'une souche à une autre, il peut y avoir une variabilité de la pathogénicité, de la spécificité envers l'hôte et de la résistance aux antimicrobiens.
- l'hôte. D'une personne à une autre, certains facteurs peuvent expliquer une plus grande sensibilité à un même agent pathogène comme l'âge, le sexe, le statut immunitaire, l'état général, les prédispositions génétiques, la médication, l'historique... C'est pourquoi on trouve dans les recommandations de la FAO (FAO, 2004) une classification des individus en 5 catégories :

Healthy (H) personne de 20 à 50 ans en bonne santé

Young (Y) jeune ou enfant

Old (O) personne âgée

Pregnant (P) femme enceinte

Immunodepressed (I) personne immunodéprimée

- l'aliment. L'aliment peut fournir une protection contre la barrière gastrique (protection physique et/ou pouvoir tampon), des conditions de culture du danger. De plus, la nature de l'aliment a une influence sur la rapidité du transit intestinal.

Il est donc important d'intégrer dans le modèle dose réponse toutes ces sources de variabilité. Dans les modèles réponse publiés, la probabilité de succès, n'est pas toujours décrite comme une distribution de valeurs. Le choix d'attribuer à la probabilité d'un succès une valeur fixe ou de la décrire par une loi de distribution de variabilité conditionne le modèle.

Les modèles dans lesquels les auteurs ont attribué une valeur fixe à r décrivent généralement la probabilité de succès pour une partie restreinte de la population, caractérisée par une sensibilité homogène à l'agent pathogène, comme par exemple la sensibilité particulière des populations dites à risque à *Listeria monocytogenes* (Haas *et al.*, 1999b ; Lindqvist and Westöo, 2000 ; FAO, 2004), ou des jeunes enfants à *Escherichia coli* O157 :H7 (Teunis *et al.*, 2004 ; Delignette-Muller *et al.*, 2008). En déterminant différentes valeurs de r pour des populations de sensibilités diverses, il est possible de calculer des risques relatifs pour les personnes plus sensibles (Teunis *et al.*, 2004 ; FAO, 2004).

Quand elle est modélisée, la variabilité de r , entre 0 et 1 comme toute probabilité, a souvent été décrite par une loi Bêta pour décrire, par exemple, la distribution de la sensibilité de toute la population ou d'une partie à *Escherichia coli* O157 :H7 (Cassin *et al.*, 1998 ; Marks *et al.*, 1998 ; Powell *et al.*, 2000 ; Haas *et al.*, 2000 ; Teunis *et al.*, 2008), *Salmonella sp.* (Latimer *et al.*, 2001 ; Bemrah *et al.*, 2003 ; Teunis *et al.*, 2010). La loi Bêta convient bien pour décrire la variabilité de r pour des valeurs de r relativement fortes, c'est-à-dire entre 10^{-7} et 10^{-2} , estimées pour *Escherichia coli* O157 :H7 et *Salmonella sp.* mais aussi pour *Campylobacter* (Medema *et al.*, 1996 ; Teunis *et al.*, 1999 ; Teunis and Havelaar, 2000).

Pour décrire des valeurs très faibles de r , la loi Bêta n'est pas toujours appropriée (Latimer *et al.*, 2001) car elle ne permet pas de décrire des distributions unimodales et relativement larges pour des valeurs faibles de r . Dans leur étude sur *Clostridium perfringens*, Golden *et al.* (2009) ont utilisé une distribution lognormale pour décrire la variabilité de r entre 10^{-8} et 10^{-12} .

La description de la variabilité de la dose ingérée et de la probabilité de succès conditionne le modèle. Le nom des modèles utilisés par les auteurs résulte de ces deux descriptions : par exemple, en utilisant le modèle 'Bêta

Poisson', les auteurs (Medema *et al.*, 1996 ; Cassin *et al.*, 1998 ; Marks *et al.*, 1998 ; Teunis *et al.*, 1999 ; Teunis and Havelaar, 2000 ; Powell *et al.*, 2000 ; Haas *et al.*, 2000 ; Bemrah *et al.*, 2003 ; Teunis *et al.*, 2008, 2010) ont décrit la variabilité de la dose individuelle par une loi de Poisson et la variabilité de la probabilité de succès par une loi Bêta.

4.1.3 Estimation des paramètres des modèles à partir de données

Pour estimer les paramètres d'un modèle dose réponse, plusieurs sources de données sont parfois disponibles dont les expériences menées sur des volontaires sains et des données issues d'épidémies.

Dans les expériences menées sur des volontaires sains, un certain nombre d'humains volontaires ont reçu une dose connue de l'agent pathogène et ont été suivis pour noter l'apparition et l'évolution des effets néfastes potentiels. Ces données ont des avantages :

- c'est le moyen le plus direct de récolter de l'information sur les divers effets néfastes d'un agent pathogène.
- la dose est connue assez précisément.
- pour chaque dose le nombre de personnes exposées et infectées est connu.
- il est possible de tester différentes souches et différents aliments.

Mais elles présentent aussi des inconvénients :

- ces expériences ne sont conduites que sur des volontaires sains, de la catégorie *Healthy*. Dans certaines études, les humains ont subi d'abord un examen médical poussé auprès d'un gastro-entérologue afin de s'assurer de l'absence de lésions digestives. Ces données ne sont donc pas représentatives de la variabilité liée à l'hôte.
- pour être sûrs d'observer des effets, les auteurs utilisent des doses assez fortes (de l'ordre de 10^8 ufc), qui ne sont pas forcément représentatives des doses rencontrées dans les épisodes d'intoxications alimentaires.
- dans les faits, les auteurs utilisent souvent des produits laitiers ou des bouillons de culture. De ce fait, l'exploration de la variabilité liée à

l'aliment est très limitée.

- pour des raisons éthiques, ces expériences sont limitées tant en nombre d'expériences qu'en effectif d'humains exposés. De ce fait, quand, dans une publication, les auteurs testent plusieurs souches et aliments à différentes doses, les effectifs correspondant à chaque combinaison des facteurs testés sont très faibles (de 2 à 6 personnes en général), ce qui génère une incertitude importante sur ces données.

Pour ces différentes raisons, utiliser uniquement des données issues d'expériences sur humains volontaires ne permet pas de modéliser toute la variabilité liée à l'agent pathogène, l'hôte et l'aliment. De ce fait, nous avons décidé d'élargir notre base de données en ajoutant à ces données d'expériences sur humains volontaires des données issues de Toxi Infections Alimentaires Collectives, définies comme des cas d'intoxications touchant au moins 2 personnes et pouvant être reliés à la même source alimentaire. Elles aussi présentent des avantages :

- les symptômes décrits informent sur la diversité des réponses possibles.
- ces données donnent des informations sur la diversité des facteurs liés à l'hôte.
- ces données donnent des informations sur la source de contamination et sur le couple danger/aliment.
- ces données donnent des informations sur le niveau de contamination des produits si ceux-ci sont bien conservés.
- les souches impliquées dans ces TIAC sont des souches dites 'sauvages', certainement différentes des souches employées dans le cadre des expériences sur volontaires sains et plus virulentes (Teunis *et al.*, 2010).

Mais elles aussi des inconvénients :

- il est souvent difficile de détecter la source de contamination.
- l'investigation des TIAC est souvent parcellaire. Si souvent on dispose de beaucoup d'informations sur les personnes infectées, on en a peu sur les personnes exposées mais non infectées.
- il est souvent obligatoire de recourir à des scénarios pour estimer les doses ingérées par les personnes exposées, d'autant plus que les résultats des investigations par les autorités compétentes manquent souvent de

précision.

Utiliser différentes sources de données pour estimer les paramètres d'un modèle permet d'explorer certaines sources de variabilité et selon les sources de données, l'ampleur de la variabilité et de l'incertitude peut varier.

4.1.4 Prise en compte de la variabilité et de l'incertitude

Dans le cadre d'une expérience sur volontaires sains, la matrice, l'agent pathogène et le statut de l'hôte sont des composantes fixes. Le seul facteur variable est la dose ingérée, dont la variation est relativement maîtrisée. En utilisant des données provenant de plusieurs expériences, il devient possible d'explorer la variabilité de la virulence de l'agent pathogène et de l'aliment, alors qu'on peut considérer que la variabilité du statut de l'hôte est négligeable.

L'incertitude sur ces données d'expériences est liée, d'une part, aux faibles effectifs des volontaires exposés dans chaque expérience, qui engendrent une incertitude d'échantillonnage, et, d'autre part, aux fortes doses administrées à ces volontaires. Ces fortes doses posent en effet le problème de la nécessaire extrapolation des résultats observés aux faibles doses. Cette extrapolation engendre une incertitude sur les prédictions à faible dose, cette incertitude étant liée au modèle (Medema *et al.*, 1996 ; Holcomb *et al.*, 1999).

Lors d'une TIAC, deux facteurs restent fixes : la matrice alimentaire et l'agent pathogène. En revanche, il faut prendre en compte la variabilité du statut de l'hôte et de la dose ingérée, dont la variation résulte de la concentration de cellules dans le produit, de la quantité de produit consommée par individu exposé, des conditions de stockage et de préparation du produit (FAO, 2003). L'ampleur de cette variabilité dépend du contexte de la TIAC, en particulier de son cadre :

- en cadre restreint, comme dans le cas de restaurations collectives (Teunis *et al.*, 2004), certains facteurs deviennent fixes ou moins variables, comme les conditions de stockage et de préparation de l'aliment par

exemple. Dans certains cas très particuliers, comme les cas de cantines scolaires ou de maisons de retraite, la variabilité du statut de l'hôte peut elle aussi diminuer.

- dans un cadre plus diffus de TIAC liée à un produit commercialisé et consommé dans le cadre privé, la variabilité de chaque facteur peut être importante.

De la même façon, l'incertitude sur les facteurs dépend du cadre de la TIAC :

- en cadre restreint, certains facteurs comme les paramètres du stockage avant cuisson et de la cuisson du produit, les statuts des hôtes deviennent connus et l'incertitude sur ces facteurs est faible. Surtout, une TIAC centralisée est plus facilement détectée, les individus exposés sont alors suivis et le dénombrement des cas est facilité et plus fiable, comme le montre l'exemple de la TIAC dans une cantine scolaire au Japon relatée par Teunis *et al.* (2004).
- dans le cas d'une TIAC diffuse, il est parfois nécessaire de recourir à des enquêtes de consommation pour modéliser la variabilité sur les paramètres d'intérêt et l'incertitude sur les distributions obtenues peut être grande (Audits international, 2000). L'incertitude sur le nombre de cas recensés dans le cas d'une épidémie est liée à la définition de l'effet adverse, le plus souvent la maladie, que l'on recherche : si les symptômes participant à la définition de la maladie sont peu caractéristiques et s'il existe des formes bénignes, des cas peuvent ne pas être détectés et l'incertitude sur le nombre de cas est alors importante.

La prise en compte des données relatives à différentes épidémies induit la prise en compte de la variabilité sur la virulence de l'agent pathogène et sur l'effet de la matrice, en supplément des autres facteurs. Si la variabilité de la virulence de l'agent pathogène est souvent prise en compte dans la littérature (Strachan *et al.*, 2005 ; Teunis *et al.*, 2008), celle de l'effet de la matrice est moins traitée par manque de données et de méthode.

L'incertitude sur les données se trouve augmentée à cause de la multiplicité des sources. En particulier, la définition des cas, en terme d'infection ou de maladie, peut différer significativement d'une étude à une autre.

Variabilité et incertitude sont deux composantes importantes d'un modèle dose-réponse. Les auteurs (Havelaar *et al.*, 2004, Marks *et al.*, 1998 ; FAO, 2003) préconisent de traiter séparément ces deux concepts en modélisant d'abord la variabilité puis l'incertitude. Leur prise en compte dans les études publiées est hétérogène et les confusions entre les deux notions sont courantes. Ainsi, en 2008, Teunis *et al.* ont utilisé des données de différentes TIAC pour estimer les paramètres d'un modèle hiérarchique par inférence bayésienne, en ne disposant que de la dose moyenne comme information sur la dose. Dans cette étude, ils ont défini un coefficient de dispersion, dont les valeurs ont été fixées de manière arbitraire, pour tenir compte à la fois de la variation des portions d'aliments ingérées, ce qui est bien une source de variabilité, mais aussi de la variation de la concentration en *Escherichia Coli* O157 :H7, ce qui pourrait apparaître plutôt comme de l'incertitude.

4.1.5 Modèle publié sur *Clostridium perfringens*

Un seul modèle dose réponse à *Clostridium perfringens* a été décrit pour l'instant. Dans leur article de 2009, Golden *et al.* ont estimé les paramètres d'un modèle dose réponse en utilisant des données publiées provenant uniquement d'expériences menées sur humains volontaires. Pour chaque expérience, les auteurs ont collecté des informations sur le nombre de personnes exposées et malades, en définissant dans ce cas la maladie comme l'apparition d'une diarrhée dans les 6 à 24 heures suivant l'exposition à *Clostridium perfringens*, et des informations sur la dose ingérée par les personnes exposées.

Dans les articles utilisés par les auteurs, l'information concernant cette dose est une dose unique, même si tous les volontaires n'ont pas ingéré exactement la même dose. Aussi Golden *et al.* (2009) ont ajusté sur ces données un modèle dit exponentiel (Medema *et al.*, 1996 ; Latimer *et al.*, 2001) ou simple exponentiel (Holcomb *et al.*, 1999). Ce modèle (Eq. 4.2) repose sur deux hypothèses (Haas *et al.*, 1999) :

- la probabilité de succès r est constante dans la population considérée,
- la répartition des cellules dans la matrice alimentaire est supposée homogène, de sorte que la distribution des doses individuelles est décrite

par une loi de Poisson de paramètre la dose indiquée pour chaque expérience.

Définition 4.1.2 (Modèle dose réponse (simple) exponentiel)

Soient r la probabilité de succès, ou probabilité pour une cellule de survivre aux barrières physiologiques, d'atteindre les sites de l'infection et de déclencher la maladie, et D_{moy} la dose moyenne, ou nombre moyen de cellules ingérées par les personnes exposées

$$P_{maladie}(r, D_{moy}) = 1 - \exp(-r \times D_{moy}) \quad (4.2)$$

A partir des données qu'ils ont collectées, estimant que la variabilité de l'aliment était négligeable, Golden *et al.* (2009) ont exploré la variabilité de la souche en estimant une valeur r par souche par la méthode du maximum de vraisemblance. Ils ont ensuite estimé les paramètres de la distribution lognormale caractérisant cette variabilité inter souches. En revanche, ils n'ont pas pris en compte l'incertitude d'échantillonnage importante sur leurs données.

Dans notre démarche de modélisation de la dose réponse, nous avons pris en compte à la fois la variabilité des données et leur incertitude dans un modèle hiérarchique, dont les paramètres ont été estimés par inférence bayésienne. Nous avons modélisé l'incertitude sur la dose individuelle résultant de la variabilité inter individus de la taille de portion, en simulant chaque exposition à partir de données de consommation et de données publiées, et de l'incertitude sur le dénombrement réalisé sur le plat incriminé. Nous avons aussi tenu compte de l'incertitude d'échantillonnage sur la proportion de malades observée à chaque exposition.

4.2 Recueil des données publiées sur la dose réponse

Aux données publiées issues d'expériences sur humains volontaires, nous avons donc ajouté des données issues de TIAC. Nous avons donc collecté des données issues de TIAC publiées et de TIAC investiguées par les inspecteurs

des services vétérinaires de la région parisienne. Nous avons au préalable effectué un tri parmi toutes les données disponibles pour ne retenir que les TIAC qui nous fournissaient de manière sûre le nombre de personnes exposées et infectées et la dose ingérée par ces personnes.

4.2.1 Sélection des données

En ce qui concerne les données provenant d'expériences sur humains volontaires, nous avons choisi d'utiliser toutes les études publiées, même celles dans lesquelles aucun hôte infecté n'avait été détecté (Dack *et al.*, 1954). Nous n'avons retiré du jeu de données que les données acquises sur des souches non porteuses du gène de l'entérotoxine, responsable des symptômes (Strong *et al.*, 1971). Ces études sont relativement anciennes. Au final, nous avons collecté des données provenant de 4 études (Dack *et al.*, 1954 ; Dische and Elek, 1957 ; Hauschild and Thatcher, 1967 ; Strong *et al.*, 1971) et correspondant à 25 expériences menées :

- sur des souches seules. Au total, 14 souches ont été testées.
- dans des matrices différentes telles que du bouillon de culture, du poulet, du boeuf et des produits laitiers.
- sur des effectifs variables et assez faibles. A part une expérience menée sur 24 personnes (Dische and Elek, 1957), les autres expériences ont été menées sur moins de 10 personnes.

Les TIAC publiées sont relativement anciennes et proviennent le plus souvent de revues médicales. Les articles ont souvent pour objectif de présenter une démarche d'identification de l'agent pathogène responsable de la TIAC. De ce fait, dans beaucoup d'articles, l'information concernant les nombres de personnes exposées et infectées ou la dose est manquante. Nous avons donc dû écarter de notre jeu de données toutes les TIAC insuffisamment documentées. De la même façon, dans certains articles, les auteurs mentionnent des résultats d'analyses sous forme d'une concentration en *Clostridium perfringens* sans préciser s'il s'agit de l'analyse de l'aliment ou des fèces. Ces données ont elles aussi été écartées de notre jeu de données. Au final, nous avons donc utilisé les données de 4 cas de TIAC publiées par Hobbs *et al.*

(1953) et de 2 cas publiées par Sutton *et al.* (1968). Pour chaque TIAC, publiée ou investiguée, nous disposons d'informations sur le nombre de personnes exposées et infectées, sur la concentration en *Clostridium perfringens* dans l'aliment, et parfois sur la catégorie de personnes exposées.

Les TIAC investiguées par les services vétérinaires nous ont été signalées par le Laboratoire Central des Services Vétérinaires (LCSV). Nous n'avons pas eu à notre disposition les rapports d'inspection des services vétérinaires mais, outre les informations sur le nombre de personnes exposées et infectées et la concentration en *Clostridium perfringens* de l'aliment, nous disposons d'un descriptif du cadre de la TIAC (restaurant, traiteur...). En tout, 9 cas de TIAC à *Clostridium perfringens* ont été rapportés au LCSV mais sur ces 9 cas, nous n'en avons finalement retenu que 4 après avoir écarté :

- 4 TIAC, dans lesquelles le nombre d'exposés était trop faible compte tenu du cadre de la TIAC. Par exemple, une de ces 4 TIAC avait eu lieu dans un restaurant et sur 2 personnes exposées, les 2 avaient été malades. Nous avons considéré qu'il était probable que plus de 2 personnes aient été exposées et compte tenu de cette incertitude, nous n'avons pas utilisé les données relatives à cette TIAC.
- Une TIAC, dans une maison de retraite. Le nombre de personnes exposées et infectées était connue de manière certaine de même que la concentration en *Clostridium perfringens* de l'aliment. Malheureusement, un deuxième agent pathogène avait été isolé dans l'aliment, ce qui empêchait de relier les cas directement à *Clostridium perfringens*.

Dans l'ensemble des publications sélectionnées, les auteurs décrivent différents effets néfastes (douleurs abdominales, maux de tête, ballonnements, diarrhées, vomissements, fièvres) dans des délais différents. Dans un souci de cohérence, nous avons considéré comme effet néfaste uniquement l'apparition de diarrhées dans les 6 à 24 heures suivant l'ingestion. C'est la probabilité de cet effet que nous cherchons à modéliser.

Nous avons aussi chercher à estimer, pour chaque TIAC ou expérience, la dose ingérée par les personnes exposées ainsi que sa variabilité.

4.2.2 Estimation de la dose individuelle et de son incertitude

Que ce soit à l'occasion de TIAC ou lors d'expériences, la dose ingérée par les personnes exposées ne peut pas être décrite par une seule valeur, du fait de la variabilité des quantités d'aliments ingérées par les personnes exposées dans le cas des TIAC et/ou de la dispersion des doses distribuées aux volontaires lors des expériences. Suivant la source des données (TIAC ou expérience), les doses étaient directement disponibles ou non.

Estimation de la dose dans les expériences

Dans certaines publications (Dische and Elek, 1957; Hauschild *et al.*, 1967), la dose est exprimée en dose moyenne assortie d'un intervalle borné par les doses minimale et maximale. Cette variabilité est expliquée pour partie par une variabilité des volumes distribués aux volontaires et pour une autre partie à l'hétérogénéité de la répartition de *Clostridium perfringens* dans l'aliment distribué.

Dans d'autres publications (Dack *et al.*, 1954; Strong *et al.*, 1971), les auteurs ne citent qu'une dose moyenne. Pour leurs expériences, ils utilisent des aliments liquides et solides. Ils synthétisent une grande quantité de bouillon de culture de *Clostridium perfringens*, qu'ils répartissent ensuite dans l'aliment immédiatement avant leur ingestion par les volontaires ou quelques heures avant (Strong *et al.*, 1971). Il semble logique de penser que la dose ingérée est très variable, pour plusieurs raisons :

- l'hétérogénéité de la répartition de *Clostridium perfringens* dans le bouillon ajouté à l'aliment. Cette hétérogénéité a été décrite dans les autres publications (Dische and Elek, 1957; Hauschild *et al.*, 1967). On peut imaginer qu'elle existe aussi dans ces études d'autant plus qu'étant donné la date de ces publications, les techniques d'homogénéisation de la concentration microbienne en milieu liquide étaient alors rudimentaires.
- la variabilité de la quantité d'aliment ingéré. Dans certaines expériences (Dack *et al.*, 1954; Strong *et al.*, 1971), les auteurs utilisent de la viande

de boeuf. Même si l'aliment est distribué en portions, il se peut que certains volontaires n'ingèrent pas toute la viande, donc pas toute la dose.

- dans le cas où plusieurs heures séparent la contamination de l'aliment et son ingestion (Strong *et al.*, 1971), on peut imaginer une étape de croissance dans l'aliment avec la variabilité correspondante. Mais ce cas de figure est assez rare.

Considérant que la dose est le produit de la concentration de l'aliment en *Clostridium perfringens* par la quantité d'aliment ingérée, nous nous sommes focalisés sur la variabilité de cette concentration et sur la variabilité de la quantité d'aliment ingérée. Dans les publications, cette quantité était contrôlée et variait peu. C'est pourquoi nous nous sommes concentrés sur la variabilité de la concentration en *Clostridium perfringens*.

Dans certaines publications (Dische and Elek, 1957; Hauschild *et al.*, 1967), les auteurs avaient reporté, pour une même expérience, plusieurs valeurs de doses assorties des volumes correspondants, ce qui nous a permis d'estimer plusieurs concentrations. A partir de ces concentrations à l'échelle $\log_{10}$, nous avons estimé un coefficient de variation de cette concentration à l'échelle $\log_{10}$ en divisant l'écart type estimé sur ces données par la concentration moyenne estimée à l'échelle $\log_{10}$. Quand il a pu être estimé, ce coefficient figure dans le tableau F.2 en annexes. Nous avons ensuite estimé un coefficient de variation moyen de $4.5 \cdot 10^{-2}$ de la concentration à l'échelle $\log_{10}$ et, pour les expériences où n'étaient reportés qu'une dose d (en cfu) et un volume v (en ml) ou une masse m (en g) de matrice, nous avons estimé la concentration correspondante $conc$ puis les concentrations minimum et maximum manquantes, $conc_{mini}$ et $conc_{maxi}$, en utilisant ce coefficient de variation CV comme suit :

$$\begin{aligned} conc &= \frac{d}{v} \quad \text{ou} \quad conc = \frac{d}{m} \\ \log_{10} conc_{mini} &= \log_{10} conc (1 - 3CV) \\ \log_{10} conc_{maxi} &= \log_{10} conc (1 + 3CV) \end{aligned} \tag{4.3}$$

En utilisant $3 CV$ pour décrire la variabilité de la dose pour chaque expérience,

nous avons estimé l'intervalle à 99% de cette dose et nous avons utilisé les bornes de cet intervalle pour définir les doses minimum et maximum pour chaque expérience.

Estimation de la dose dans les TIAC

Dans le cas des TIAC, publiées ou investiguées, les informations disponibles sont les concentrations en *Clostridium perfringens* de l'aliment. La dispersion de la dose ingérée par les personnes exposées résulte essentiellement de deux facteurs :

- la dispersion de la contamination dans l'aliment. Hormis pour les aliments liquides et hachés finement, la concentration microbienne dans un aliment ne peut pas être supposée constante, certaines parties de l'aliment étant plus contaminées que d'autres.
- la variabilité de la quantité d'aliment ingérée par les personnes exposées, que nous appellerons taille des portions. Cette quantité n'est pas contrôlée expérimentalement et varie d'un individu à l'autre et d'un produit à l'autre.

En l'absence de données sur la dispersion de la contamination dans les aliments incriminés dans les TIAC étudiées, nous avons utilisé le coefficient de variation CV estimé sur les données issues d'expériences. Ainsi, à partir de la concentration estimée pour chaque TIAC, nous avons estimé les concentrations minimum et maximum comme nous l'avons fait pour les expériences (Eq. 4.3), de manière à décrire l'intervalle à 99% de cette concentration.

Pour décrire la variabilité de la taille des portions, nous avons utilisé les résultats d'INCA2, l'étude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires, menée de 2006 à 2007 en France par l'AFSSA (Dubuisson *et al.*, 2010; Lioret *et al.*, 2010). Ces données peuvent *a priori* être utilisées pour modéliser la consommation d'aliments dans d'autres pays européens et à des dates bien antérieures à 2006 puisqu'il semble que les modifications dans les habitudes alimentaires d'un pays à l'autre et/ou dans les décennies précédentes n'aient pas ou peu affecté la taille des portions (van der Wilk and Jansenb, 2005).

A la suite d'un échantillonnage stratifié, la consommation de 2624 adultes et 1455 enfants a été suivie. Chaque personne suivie (une personne par foyer) recevait deux visites d'un enquêteur et devait renseigner un carnet de consommation pendant 7 jours en notant tout aliment, liquide ou solide, ingéré et en estimant la quantité ingérée. Les visites permettaient aux enquêteurs d'identifier les 'sous-déclarants', c'est-à-dire les personnes qui oublièrent de noter certaines consommations dans leur carnet (cette sous-déclaration porte sur les aliments ingérés, pas sur la taille des portions). Les suivis étaient échelonnés dans l'année afin d'éviter tout effet saison. En revanche, l'échantillon n'était pas représentatif de la population française. On note en effet :

- une sur-représentation des femmes,
- une sur-représentation des 35-49 ans et 50-64 ans.

Dans le fichier, deux tailles de portions, appelées quantités dans le fichier, étaient estimées :

- la quantité brute. C'est la quantité déclarée par les membres du panel.
- la quantité nette. C'est la quantité estimée par les enquêteurs après application de coefficients correcteurs pour tenir compte de la portion d'os, coquilles... dans la quantité brute.

Nous avons utilisé les quantités nettes pour décrire les tailles de portions. Dans un premier temps, nous avons comparé les distributions empiriques des tailles de portions pour chaque sexe et chaque classe d'âge. Ainsi nous avons pu vérifier que le déséquilibre de l'échantillon INCA2 n'affectait pas la distribution des tailles individuelles de portions des aliments incriminés dans les TIAC. Ensuite, nous avons modélisé la taille individuelle des portions de ces aliments

- en utilisant le coefficient d'aplatissement et l'asymétrie des distributions empiriques pour choisir la distribution paramétrique appropriée (Cullen and Frey, 1999),
- en ajustant des lois paramétriques sur les données INCA2 par la méthode du maximum de vraisemblance.

Les distributions ajustées sont lognormales. L'ajustement des données par les distributions est présenté dans la figure F.1 en annexes et leurs paramètres figurent dans le tableau F.3 en annexes.

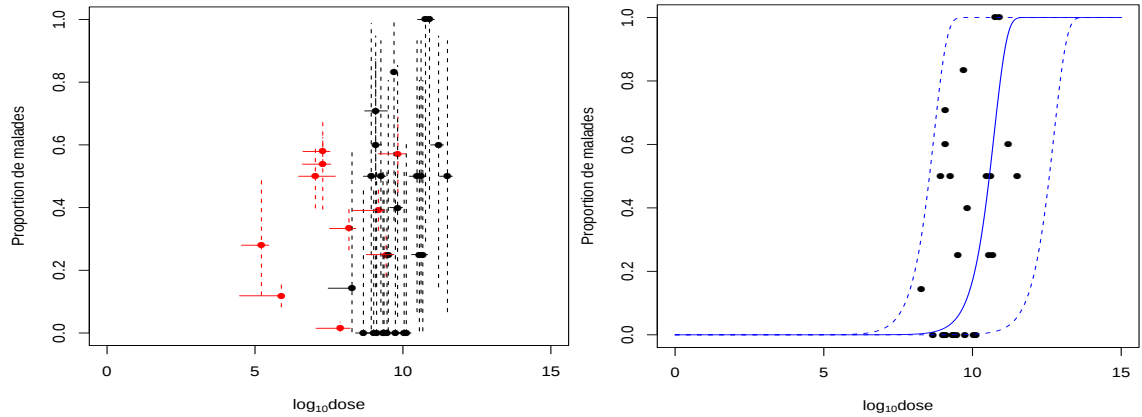


FIGURE 4.2 – Données collectées par étude et par source (figure de gauche) et modèle dose réponse publié par Golden *et al.* (2009) (figure de droite). Sur la figure de gauche, la couleur des points et des segments représente la source des données : **TIAC publiées et investiguées**, expériences sur humains volontaires. Les segments horizontaux représentent la dispersion de la dose, estimée par nos soins ou fournie par les auteurs, les segments verticaux pointillés représentent l'incertitude sur la probabilité de maladie estimée à partir de la proportion de malades observés sur chaque TIAC ou expérience. Sur la figure de droite, la courbe en trait plein représente le modèle dose réponse publié par Golden *et al.* (2009) et sa bande de confiance à 95%, estimé à partir de la distribution lognormale du paramètre r décrite par les auteurs, est représenté par les courbes noires pointillées. Les données issues d'expériences qu'ils ont utilisées pour estimer les paramètres de leur modèle sont représentées par les points noirs.

Les données sélectionnées issues d'expériences et de TIAC sont présentées dans les tableaux F.1 et F.2 en annexes. Elles sont aussi représentées dans la figure 4.2. Pour chaque exposition collectée, nous avons représenté :

- l'intervalle de variabilité à 95% de la dose. Pour les données issues d'expériences, cet intervalle était soit reporté par les auteurs, soit estimé par nos soins en utilisant le coefficient de variation CV . Pour les données issues de TIAC, la variabilité de la dose résulte de la variabilité de la concentration de l'aliment en *Clostridium perfringens*, décrite par le coefficient de variation CV , et de la variabilité de la taille des

portions. Pour estimer l'intervalle de variabilité, nous avons tiré au sort N_v concentrations et N_v tailles de portions dans leurs distributions respectives. En les multipliant, nous avons obtenu N_v doses, résumées par leur intervalle de variabilité à 95%.

- l'intervalle d'incertitude sur la réponse, c'est-à-dire l'intervalle à 95% de la probabilité de maladie estimée à partir de la proportion de malades observés sur chaque TIAC ou expérience. Cet intervalle a été estimé pour chaque exposition en calculant les bornes de l'intervalle de confiance à 95% d'une loi binomiale de paramètres le nombre de personnes exposées et la proportion de malades observée.

Enfin, nous avons représenté le modèle dose réponse publié par Golden *et al.* (2009). Dans leur article de 2009, Golden *et al.* décrivent le paramètre r du modèle dose réponse par une loi log normale de moyenne -24.7 et d'écart type 2.32. Nous avons utilisé ces paramètres pour estimer l'intervalle de confiance à 95% de ce modèle. Comme le montre cette figure, la variabilité de la dose est relativement faible mais l'incertitude sur les données d'expériences est très importante et liée au faible effectif pour chaque expérience. Elle est plus faible sur les données issues de TIAC du fait d'effectifs plus importants de personnes exposées lors de ces épisodes. L'intervalle de confiance à 95% du modèle publié par Golden *et al.* (2009) contient la plupart des données recueillies d'expériences sur humains volontaires mais contient peu de données issues de TIAC. Ce modèle ne décrit donc pas correctement les cas de TIAC.

Les données représentées dans la figure 4.2 montrent une variabilité de la réponse. Cette variabilité peut être due :

- au type de personnes exposées (H,Y,O,P,I) mais à cause du manque d'informations sur certaines TIAC, il n'a pas été possible d'explorer un éventuel impact du type de personnes exposées.
- à la souche mais cette information est manquante pour toutes les données de TIAC. Aussi nous n'avons pas pu explorer une éventuelle variabilité inter-souche.
- à l'aliment impliqué mais comme les informations sur l'aliment sont parfois vagues et ne permettent pas de caractériser le pouvoir "protecteur" de chaque aliment, il n'a pas été possible d'explorer un éventuel

impact de l'aliment.

Dès lors, la variabilité observée entre chaque exposition, que ce soit à l'occasion d'une TIAC ou lors d'une expérience, ne peut pas être décomposée en variabilité inter-souche, inter-aliment ou inter-hôte. Nous avons donc modélisé une variabilité inter-exposition, résultant de ces 3 variabilités.

Sur la figure 4.2, les zones correspondant aux données de TIAC et d'expériences apparaissent relativement distinctes, ce qui nous conforte dans l'idée d'un effet de la source des données. Dans la mesure où les expériences sont menées sur des individus en pleine santé, avec des souches de laboratoire et des aliments assez standardisés (produits laitiers), on peut se demander si les données d'expériences permettent vraiment de décrire correctement les TIAC (Teunis *et al.*, 2010). Pour répondre à cette question et identifier un éventuel effet relatif à la source des données, nous avons construit deux modèles :

- un modèle décrivant les données issues d'expériences,
- un modèle décrivant les données issues de TIAC.

Puis nous avons comparé ces deux modèles.

4.3 Construction des modèles

4.3.1 Choix du modèle dose réponse

Pour prendre en compte la variabilité inter individuelle de la sensibilité à *Clostridium perfringens*, il était nécessaire de décrire, pour chaque exposition, la dose ingérée par chaque personne exposée, grâce aux données fournies par les auteurs et à l'enquête de consommation. De ce fait, nous avons décrit un modèle '*single hit*' sur **dose individuelle** (Eq. 4.1).

4.3.2 Estimation des paramètres par inférence bayésienne

Le modèle '*single hit*' sur **dose individuelle** vise à décrire la probabilité d'apparition d'une maladie en fonction de la dose de cellules de *Clostridium perfringens*. Pour modéliser la variabilité inter-TIAC et inter-expérience de

r , nous avons utilisé le $\text{logit}(r)$, défini comme $\text{logit}(r) = \ln(\frac{r}{1-r})$, pour plusieurs raisons :

- le logit convient parfaitement pour décrire la distribution d’une probabilité, qui ne peut varier qu’entre 0 et 1.
- cette transformation nous permet de décrire la variabilité de r en modélisant la variabilité du $\text{logit}(r)$ par une loi normale car quand r varie de 0 à 1, le $\text{logit}(r)$ varie de $-\infty$ à $+\infty$.
- dans la mesure où, pour *Clostridium perfringens*, Golden *et al.* (2009) ont décrit une variation de r entre 10^{-8} et 10^{-12} , la transformation à l’échelle logarithmique permet de bien décrire cette variation et pour des valeurs très faibles de r , comme celles estimées par Golden *et al.* (2009), $\text{logit}(r) \simeq \ln(r)$. Ceci nous a permis d’utiliser la distribution ajustée par les auteurs comme information *a priori* de nos modèles.

Nous avons défini 2 modèles :

- le modèle ‘TIAC’, dans lequel nous considérons r comme variable d’une TIAC à une autre. Dans ce modèle, r est décrit par deux paramètres, $\mu_{\text{logitr-TIAC}}$ et $\sigma_{\text{logitr-TIAC}}$.
- le modèle ‘expérience’, dans lequel nous considérons r comme variable d’une expérience à une autre. Dans ce modèle, r est décrit par deux paramètres, $\mu_{\text{logitr-exp}}$ et $\sigma_{\text{logitr-exp}}$.

Les graphes acycliques de ces modèles sont présentés dans les figures 4.3 et 4.4) et les liens entre les noeuds sont définis dans le tableau 4.1.

Pour le modèle ‘TIAC’, les index ‘t’ et ‘i’ représentent les deux niveaux hiérarchiques du modèle : la TIAC et l’individu. $P_{\text{mal},i}$ est la probabilité de maladie théorique pour l’individu ‘i’ lors de la TIAC ‘t’ après l’ingestion de la dose théorique dose_i , qui est une covariable incertaine dépendant de la concentration de l’aliment impliqué et de la taille de la portion. r_t est la probabilité de succès des cellules de *Clostridium perfringens* impliquées dans la TIAC ‘t’.

Pour le modèle ‘expérience’, les index ‘e’ et ‘i’ représentent les deux niveaux hiérarchiques du modèle : l’expérience et l’individu. $P_{\text{mal},i}$ est la probabilité de maladie théorique pour l’individu ‘i’ exposé lors de l’expérience

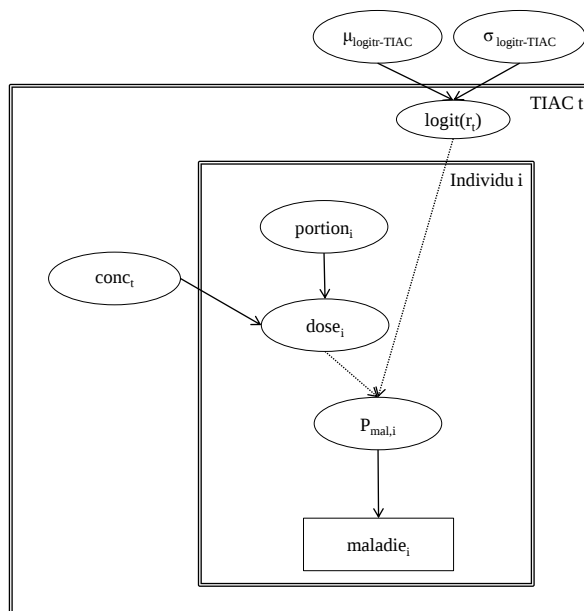


FIGURE 4.3 – Graphe acyclique dirigé du modèle ‘TIAC’. Les liens logiques entre chaque noeud sont représentés par des flèches en pointillé, les liens stochastiques par des flèches pleines. Les liens entre noeuds sont décrits dans le tableau 4.1.

‘e’ à la dose théorique $dose_i$, là encore une covariable incertaine. r_e est la probabilité de succès des cellules de *Clostridium perfringens* impliquées dans l’expérience ‘e’.

Les distributions *a priori* des paramètres $\mu_{logitr-TIAC}$ et $\mu_{logitr-exp}$, présentées dans le tableau 4.2, ont été définies à partir de la distribution de $\ln(r)$, publiée par Golden *et al.*(2009) en doublant l’écart type estimé par les auteurs.

Dans chaque modèle, la dose $dose_i$ est une covariable incertaine. Dans le modèle ‘TIAC’, $dose_i$ dépend de $conc_t$, la concentration de l’aliment impliqué dans la TIAC ‘t’ en *Clostridium perfringens*, et de $portion_i$, la taille de la portion ingérée par l’individu ‘i’. Dans le modèle ‘expérience’, $dose_i$ dépend de $dose_{min}$ et $dose_{max}$, les doses minimum et maximum reportées par les auteurs et présentées dans le tableau F.2, ou estimées par nos soins en appliquant le

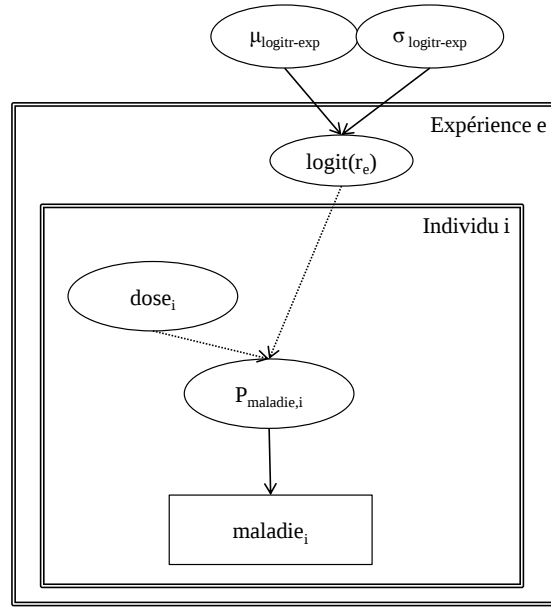


FIGURE 4.4 – Graphe acyclique dirigé du modèle ‘expérience’. Les liens logiques entre chaque noeud sont représentés par des flèches en pointillé, les liens stochastiques par des flèches pleines. Les liens entre noeuds sont décrits dans le tableau 4.1.

Noeud	Lien	Définition
Modèle ‘TIAC’		
$logit(r_t)$	Stochastique	$logit(r_t) \sim N(\mu_{logitr-TIAC}, \sigma_{logitr-TIAC})$
$dose_i$	Stochastique	$dose_i \sim Poisson(conc_t \times portion_i)$
$P_{mal,i}$	Logique	$P_{mal,i} = 1 - (1 - r_t)^{dose_i}$
$maladie_i$	Stochastique	$maladie_i \sim Bern(P_{mal,i})$
Modèle ‘expérience’		
$logit(r_e)$	Stochastique	$logit(r_e) \sim N(\mu_{logitr-exp}, \sigma_{logitr-exp})$
$P_{mal,i}$	Logique	$risque_i = 1 - (1 - r_e)^{dose_i}$
$maladie_i$	Stochastique	$maladie_i \sim Bern(P_{mal,i})$

TABLE 4.1 – Définition des liens entre les noeuds des modèles ‘TIAC’ et ‘expérience’.

coefficient de variation CV (Eq. 4.3) à la dose unique reportée par les auteurs et présentée dans le tableau F.2.

Enfin, les distributions *a priori* des paramètres $\sigma_{logitr-TIAC}$ et $\sigma_{logitr-exp}$ ont été choisies non informatives (Gelman, 2006).

Là encore, l'inférence a été réalisée en utilisant le logiciel JAGS (Plummer, 2009) et le package *rjags* du logiciel R (R Development Core Team, 2010). Après une première phase d'adaptation de 5.10^3 itérations, la phase d'inférence proprement dite a été conduite sur 3 chaînes MCMC indépendantes avec 5.10^5 itérations pour chaque chaîne. Nous n'avons retenu qu'une valeur sur 100, de sorte que, pour chaque chaîne MCMC, 5.10^3 valeurs de chaque paramètre ont été gardées. Le diagnostic de convergence a été réalisé en examinant visuellement les traces des chaînes MCMC et en étudiant les statistiques de convergence, définies par Brooks and Gelman (1997).

Paramètre	Distribution	Source d'information	Construction des modèles
Modèle 'TIAC'			
$\mu_{logitr-TIAC}$	$N(-25, 5)$	Golden <i>et al.</i> (2009)	
$\sigma_{logitr-TIAC}$	$Unif(0, 10)$	pas d'information	
$portion_i$	$ln(portion_i) \sim N(\mu_{qte_alim}, \sigma_{qte_alim})T(0, ln(500))$	données d'INCA2, présentées dans le tableau F.3	
$conc_t$	$ln(conc_t) \sim Unif(ln(concent) \times (1 - 3CV), ln(concent) \times (1 + 3CV))$	<i>concent</i> : concentrations reportées dans les cas de TIAC, présentées dans le tableau F.1 <i>CV</i> : coefficient de variation de la concentration, estimé à partir des données d'expériences dans le tableau F.2	
Modèle 'expérience'			
$\mu_{logitr-exp}$	$N(-25, 5)$	Golden <i>et al.</i> (2009)	
$\sigma_{logitr-exp}$	$Unif(0, 10)$	pas d'information	
$dose_i$	$Unif(dose_{min}, dose_{max})$	<i>dose_{min}</i> et <i>dose_{max}</i> : doses minimum et maximum reportées par les auteurs ou estimées en appliquant <i>CV</i> (Eq. 4.3) à la dose unique. Doses présentées dans le tableau F.2	

TABLE 4.2 – Définition des distributions *a priori* des paramètres des modèles 'TIAC' et 'expérience'.

Les statistiques des distributions *a priori* et des chaînes MCMC des deux modèles sont présentées dans le tableau 4.3.

Paramètre	Distribution <i>a priori</i>	Statistiques des chaînes MCMC	
		Modèle ‘TIAC’	Modèle ‘expérience’
$\mu_{logitr-TIAC}$	-25 [-34.8,-15.2]	-18.9 [-21.7,-16.4]	-24.4 [-25.8,-23.3]
$\mu_{logitr-exp}$			
$\sigma_{logitr-TIAC}$	4.85 [0.39,9.81]	3.93 [2.52,6.96]	2.32 [1.53,3.78]
$\sigma_{logitr-exp}$			

TABLE 4.3 – Statistiques des paramètres d’intérêt des modèles ‘TIAC’ et ‘expérience’.

Comme le montrent le tableau 4.3 et la figure 4.5, les distributions des chaînes MCMC des paramètres des 2 modèles sont très nettement resserrées par rapport aux distributions *a priori*. Les estimations de $\mu_{logitr-exp}$ et $\sigma_{logitr-exp}$ sont cohérentes avec les estimations de μ_{lnr} et σ_{lnr} à -24.7 et 2.32 par Golden *et al.* (2009) à partir de données issues d’expériences.

Les intervalles de crédibilité à 95% $\mu_{logitr-TIAC}$ et $\mu_{logitr-exp}$ sont nettement séparés, ce qui montre l’effet de la source de données sur la variabilité de la réponse. L’intervalle de crédibilité à 95% $\sigma_{logitr-TIAC}$ est plus grand $\mu_{logitr-exp}$, ce qui pourrait s’expliquer par la relative ‘homogénéité’ du statut des hôtes et des aliments impliqués dans les expériences.

Pour vérifier l’aptitude des 2 modèles à décrire les données observées, nous avons comparé les intervalles de crédibilité à 95% des valeurs de P_{mal} prédites par chaque modèle aux valeurs observées dans la figure 4.6. D’après cette figure, les données de TIAC sont bien décrites par le modèle ‘TIAC’, les données d’expériences sont elles aussi correctement décrites par le modèle ‘expérience’.

La figure 4.7 représente l’ajustement des données collectées par les 2 modèles. Comme le montre cette figure, les modèles et leurs bandes de crédibilité à 95% décrivent bien les données observées. D’après cette figure,

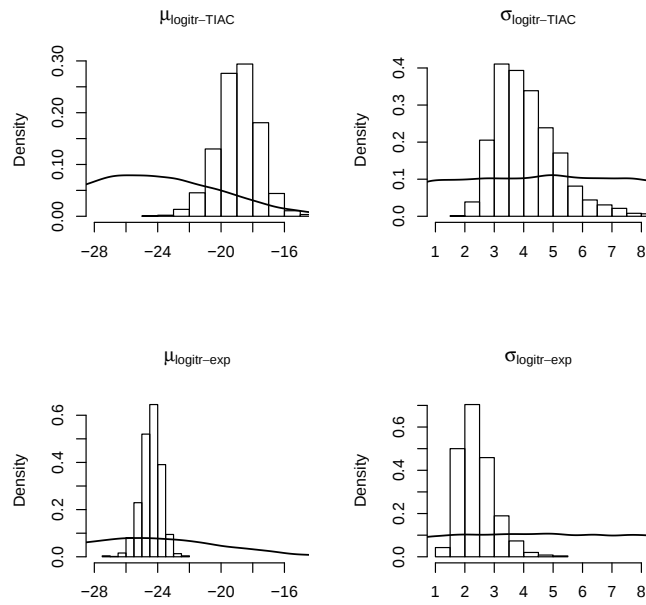


FIGURE 4.5 – Distributions *a priori* et *a posteriori* des paramètres $\mu_{logitr-TIAC}$ et $\sigma_{logitr-TIAC}$ du modèle ‘TIAC’ et $\mu_{logitr-exp}$ et $\sigma_{logitr-exp}$ du modèle ‘expérience’. Les distributions *a priori* sont représentées par les courbes, les distributions des chaînes MCMC par les histogrammes

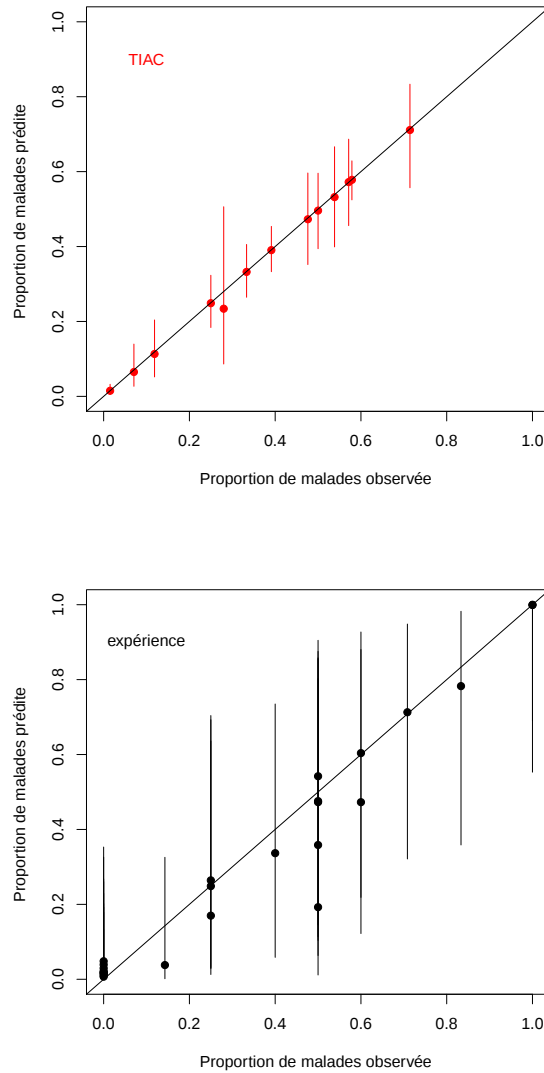


FIGURE 4.6 – Comparaison des valeurs observées et prédites par les modèles ‘TIAC’ et ‘expérience’. En abscisse sont reportées les valeurs observées. En ordonnée sont reportés les valeurs médianes de P_{mal} (points) prédites par chaque modèle ainsi que les intervalles de crédibilité à 95% (segments). La couleur des points et des segments représente la source des données : rouge pour les TIAC, noir pour les expériences.

la dose médiane infectieuse, définie comme la dose provoquant l'apparition des symptômes chez 50% des personnes exposées, est estimée à 8.0 [4.5,11.4] $\log_{10}cfu$, avec une incertitude très importante.

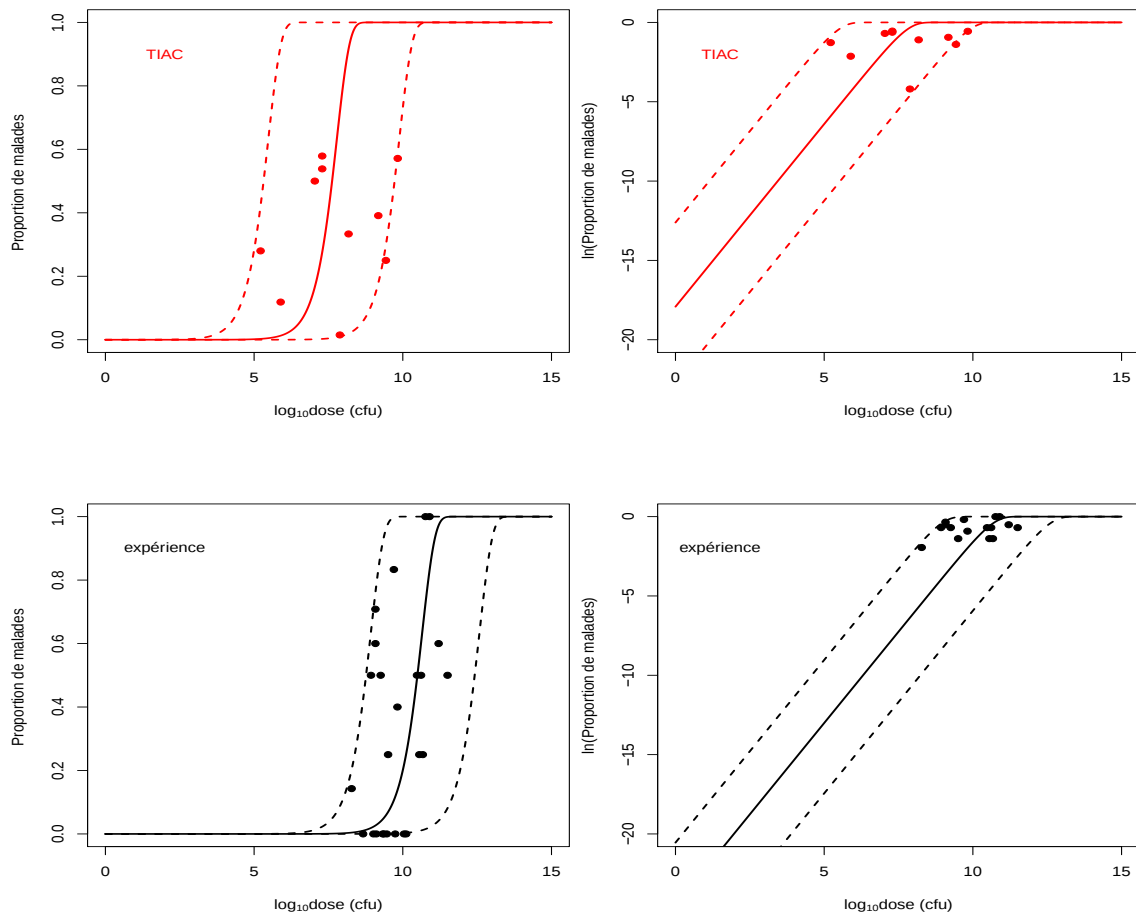


FIGURE 4.7 – Données collectées et modèles ajustés (le risque est représenté tel quel sur les figures de gauche, à l'échelle logarithmique sur les figures de droite). La couleur des points et des segments représente la source des données : rouge pour les TIAC, noir pour les expériences. Pour chaque modèle, la courbe en trait plein noir représente la prédiction médiane par le modèle dose réponse. Les courbes en pointillés représentent l'intervalle de crédibilité à 95%.

L'objectif du modèle dose réponse étant de prédire le risque de TIAC, nous avons ensuite cherché à comparer les capacités prédictives du modèle

publié par Golden *et al.* (2009) et de nos 2 modèles.

4.3.3 Comparaison des prédictions avec chaque modèle

Pour comparer les 3 modèles, nous avons prédit avec chacun le risque de diarrhée résultant de l'ingestion d'une certaine dose d de *Clostridium perfringens* en prenant en compte la variabilité de r , décrite dans les 3 modèles, et l'incertitude sur les paramètres, décrite dans les modèles 'TIAC' et 'expérience'. Pour estimer un risque moyen assorti de son incertitude quand c'était possible, nous avons réalisé des simulations de Monte Carlo à deux dimensions :

- en tirant au sort un jeu de valeurs des paramètres incertains, soit $\mu_{logitr-TIAC}$ et $\sigma_{logitr-TIAC}$ pour le modèle 'TIAC' et $\mu_{logitr-exp}$ et $\sigma_{logitr-exp}$ pour le modèle 'expérience'. Cette étape n'a pas pu être réalisée avec le modèle publié par Golden *et al.* (2009) car dans leur publication, les auteurs n'avaient modélisé aucune incertitude.
- en tirant au sort N_v valeurs de r dans la distribution lognormale décrite par Golden *et al.* (2009), et N_v valeurs de r pour chaque jeu de valeurs des paramètres incertains pour les 2 autres modèles.
- en simulant N_v P_{mal} avec les N_v valeurs de r tirées au sort dans chaque modèle.
- en estimant la valeur moyenne des N_v P_{mal} simulées avec chaque modèle.
- en répétant N_u fois cette démarche pour les modèles 'TIAC' et 'expérience', de manière à estimer l'incertitude sur cette valeur médiane.

Nous avons mené ces simulations pour différentes doses de *Clostridium perfringens*. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.4. Les prédictions par le modèle 'expérience' et les prédictions déterministes par le modèle de Golden *et al.* (2009) sont cohérentes mais elles sont très inférieures aux prédictions par le modèle 'TIAC'. Entre les prédictions par le modèle 'expérience' et celles par le modèle 'TIAC', le risque est pratiquement multiplié par 100, ce qui n'est pas négligeable. Ceci montre bien qu'utiliser des données issues d'expériences menées sur des volontaires sains pour prédire le risque de TIAC peut conduire à sous-estimer ce risque. Nous avons donc

choisi d'utiliser par la suite le modèle 'TIAC', caractérisé par une valeur médiane du paramètre r de $1.65 \cdot 10^{-8}$ avec un intervalle de crédibilité à 95% de $[1.31 \cdot 10^{-10}, 3.32 \cdot 10^{-6}]$

Dose ($\log_{10} ufc$)	Modèle		
	'TIAC'	'expérience'	Golden <i>et al.</i> (2009)
5	$5.2 \cdot 10^{-2}$ [$7.8 \cdot 10^{-3}, 1.9 \cdot 10^{-1}$]	$3.7 \cdot 10^{-5}$ [$6.8 \cdot 10^{-6}, 1.5 \cdot 10^{-3}$]	$2.0 \cdot 10^{-5}$
7	$2.9 \cdot 10^{-1}$ [$1.5 \cdot 10^{-1}, 5.1 \cdot 10^{-1}$]	$3.3 \cdot 10^{-3}$ [$6.8 \cdot 10^{-4}, 2.8 \cdot 10^{-2}$]	$2.4 \cdot 10^{-3}$
9	$7.3 \cdot 10^{-1}$ [$4.8 \cdot 10^{-1}, 8.8 \cdot 10^{-1}$]	$1.2 \cdot 10^{-1}$ [$5.2 \cdot 10^{-2}, 2.5 \cdot 10^{-1}$]	$9.6 \cdot 10^{-2}$

TABLE 4.4 – Risques moyens de maladie prédits par le modèle publié par Golden *et al.* (2009) et les modèles 'TIAC' et 'expérience'. La première valeur représente la valeur médiane du risque moyen. Les valeurs entre crochets représentent les bornes des intervalles de crédibilité à 95% du risque moyen.

4.4 Discussion

Les 2 modèles proposées fournissent deux estimations très différentes de $\mu_{logitr-TIAC}$ et $\mu_{logitr-exp}$, montrant ainsi que la source de données a un impact sur l'estimation de r . L'estimation de $\mu_{logitr-exp}$ est cohérente avec la valeur estimée par Golden *et al.* (2009) à partir de données d'expériences. Les intervalles de crédibilité de $\sigma_{logitr-TIAC}$ et $\sigma_{logitr-exp}$ se chevauchent sans effet clairement apparent de la source. Toutefois, on peut noter que l'intervalle de crédibilité de $\sigma_{logitr-TIAC}$ est plus important que celui de $\sigma_{logitr-exp}$, traduisant peut-être la relative hétérogénéité des aliments et statuts des hôtes impliqués dans les TIAC par opposition à la relative standardisation des aliments et des statuts des hôtes exposés dans le cadre d'expériences.

Dans cette étude, nous avons estimé les paramètres d'un modèle '*single hit*' sur dose individuelle, en décrivant l'incertitude sur cette dose individuelle résultant de la variabilité de la taille des portions et de la dispersion de la

contamination. Nous avons décrit séparément ces deux sources d'incertitude en utilisant des données publiées : la variabilité de la taille des portions à partir des observations relevées à l'occasion de l'enquête de consommation INCA2 et la dispersion de la contamination en utilisant le coefficient *C.V.*, estimé à partir de données collectées à partir d'expériences sur volontaires sains. Cela nous a permis de décrire l'incertitude sur la dose individuelle sans fixer arbitrairement la valeurs de certains paramètres.

Nous avons utilisé les données issues de l'enquête de consommation INCA2 telles quelles pour modéliser la consommation d'aliments impliqués dans des TIAC survenues dans d'autres pays et à d'autres époques. Dans la mesure où les données utilisées dans cette étude proviennent de TIAC survenues dans des pays développés et, pour majorité, européens, la récente standardisation des comportements alimentaires dans les pays européens (van der Wilk and Jansenb, 2005) conforte notre hypothèse selon laquelle la taille des portions ne diffère pas d'un pays européen à un autre. L'utilisation de ces données repose aussi sur l'hypothèse que les tailles des portions ingérées n'a pas évolué de manière significative entre les années 1960 et 2005. Des études (Dubuisson *et al.*, 2010 ; Lioret *et al.*, 2010) ont montré que l'évolution des comportements alimentaires ces dernières années se traduisaient en termes de fréquence de consommation de produits mais que la taille des portions n'évoluait pas ou peu, ce qui nous permet d'utiliser les données d'INCA2 sans mésestimer la taille des portions.

Nous n'avons pas modélisé l'incertitude sur le dénombrement de cellules de *Clostridium perfringens* réalisé par les auteurs dans les expériences ou les laboratoires sanitaires dans les cas de TIAC. Or toute méthode de dénombrement génère une incertitude plus ou moins importante sur le résultat, en termes de nombre de cellules dénombrées et de concentration estimée. Il est souvent impossible de trouver dans les publications les méthodes de dénombrement mises en oeuvre donc d'estimer cette incertitude. Il serait intéressant de l'estimer en utilisant des dires d'experts par exemple.

Pour toutes les expériences et toutes les TIAC, nous avons utilisé le coefficient de variation *C.V.*, estimé à partir de certaines données d'expériences,

pour décrire la dispersion de la contamination de l'aliment. Cette dispersion était le plus souvent liée à l'hétérogénéité de la répartition des cellules de *Clostridium perfringens* dans le produit mais elle pouvait aussi être liée à l'évolution de la contamination dans le temps. A titre d'exemple, une des TIAC collectées auprès du LCSV se déroulait dans le cadre d'un restaurant d'entreprise où sur 332 personnes seulement 5 ont été malades après avoir consommé du poulet. On peut imaginer qu'étant donné le temps nécessaire pour servir 332 personnes, les cellules de *Clostridium perfringens* aient eu le temps de se multiplier et compte tenu du temps de doublement (7 minutes dans les conditions optimales), la croissance de *Clostridium perfringens* dans le poulet a pu être importante et avoir un impact important sur la contamination du produit juste avant sa consommation. Dans ces conditions, on peut imaginer que les premières personnes servies ont ingéré du poulet faiblement contaminé alors que le poulet ingéré par les dernières personnes servies était beaucoup plus fortement contaminé. Pour ce cas, le coefficient de variation $C.V.$ ne suffit certainement pas à décrire la dispersion de la contamination mais en l'absence d'informations pour mieux décrire cette dispersion, nous avons utilisé le coefficient $C.V.$.

Dans les cas de TIAC, nous avons supposé que le nombre de personnes exposées et malades était connu de manière certaine. Or on sait que pour n'importe quelle TIAC il est difficile de connaître précisément le nombre de personnes exposées et que dans les TIAC à *Clostridium perfringens*, les symptômes sont tellement "bénins" qu'un certain nombre de cas peuvent ne pas être signalés. Pour autant, en l'absence d'informations, nous n'avons pas modélisé l'incertitude sur le nombre de personnes exposées et malades.

L'effet de la source de données sur r apparaît bien dans cette étude. Utilisé pour prédire un risque de TIAC, le modèle construit à partir de données d'expériences conduit à une sous-estimation importante de ce risque. Dès lors, on peut se poser des questions sur l'utilité de données d'expériences pour estimer les paramètres d'un modèle dose réponse destiné à prédire le risque de TIAC. Dans cette étude, nous avons disposé d'un nombre assez important de données de TIAC, ce qui nous a permis d'estimer les paramètres

d'un modèle uniquement à partir de ces données. Pourtant, parmi toutes les TIAC publiées ou collectées au LCSV, seule une petite partie a pu être utilisée, souvent à cause d'une documentation insuffisante des cas reportés. En améliorant l'investigation de ces TIAC et la mise à disposition des informations relatives à chaque cas, il deviendrait possible d'augmenter la taille de notre base de données, améliorant ainsi notre connaissance des TIAC à *Clostridium perfringens* et la modélisation du risque de TIAC et des incertitudes associées.

Chapitre 5

Efficacité des mesures de maîtrise sanitaire

Pour établir un lien entre la contamination initiale d'un produit, l'évolution de cette contamination au cours d'un procédé de fabrication et la contamination finale du produit, certains auteurs (Membré *et al.*, 2007, 2009 ; Zwietering *et al.*, 2011 ; Soza Meija *et al.*, 2011) ont utilisé la formule de l'ICMSF (ICMSF, 2002)

Définition 5.0.1 (Formule de l'ICMSF (ICMSF, 2002))

Soient H_0 le niveau de contamination des matières premières ou d'un produit au début de sa fabrication, ΣR la somme des réductions pendant le procédé, ΣI la somme des recontaminations et croissances pendant le procédé et FSO l'objectif de sécurité alimentaire

$$H_0 - \Sigma R + \Sigma I \leq FSO \quad (5.1)$$

Si les variabilités de H_0 , ΣR et ΣI sont décrites par des lois normales, il est facile d'obtenir la variabilité du FSO (Zwietering *et al.*, 2010) et de la décrire par une loi normale dont la moyenne s'obtient en sommant les moyennes de H_0 et ΣI et en retranchant la moyenne de ΣR et dont l'écart type s'obtient en prenant la racine carrée de la somme des variances de H_0 , ΣR et ΣI .

Cette formule, simple, présente cet atout mais elle présente aussi certaines limites, qui ne nous ont pas permis de l'utiliser :

- si, comme dans notre cas, les variabilités de H_0 , ΣR et ΣI ne peuvent pas être décrites par des lois normales ou si une variable du modèle s’obtient par le produit de deux autres variables, la formule de l’ICSMF ne permet pas d’estimer la variabilité du FSO (Havelaar *et al.*, 2004).
- si, comme nous l’avons fait, on décrit l’incertitude par une distribution des paramètres caractérisant la distribution de variabilité dans des modèles hiérarchiques, il devient difficile d’estimer la variabilité et l’incertitude du FSO.
- cette formule permet d’estimer une somme de critères de performance tout au long du procédé. En utilisant cette formule, il devient impossible d’établir un lien entre les paramètres des mesures de maîtrise sanitaire et le risque, ce qui constituait un objectif majeur de ce travail.
- en utilisant cette formule, il n’est plus possible de prévoir une analyse de sensibilité à la variabilité comme à l’incertitude pour identifier les sources de variabilité et d’incertitude ayant l’impact le plus important sur le risque estimé (Pouillot *et al.*, 2009; Ellouze *et al.*, 2010).

Pour ces différentes raisons, nous n’avons pas utilisé la formule de l’ICSMF.

Dans un premier temps, nous avons cherché à estimer le risque ‘actuel’ à partir des profils thermiques enregistrés *in situ*. Nous avons défini plusieurs métriques de ce risque, que nous avons estimées en intégrant la variabilité et en accompagnant ces estimations de leur incertitude. Pour cela, nous avons réalisé des simulations de Monte Carlo à deux dimensions (Cullen and Frey, 1999; Pouillot *et al.*, 2007, 2009) en utilisant les distributions *a posteriori* conjointes des paramètres des modèles de germination croissance et de destruction des cellules végétatives et du modèle dose réponse. Dans la mesure où, sur certaines parties du modèle, comme la description de taille des portions par exemple, seule la dimension de variabilité était décrite, ces simulations de Monte Carlo à deux dimensions peuvent être considérées comme partielles. Néanmoins, elle nous ont permis d’identifier les étapes clés, définies comme les étapes essentielles pour la maîtrise du risque, avant de proposer des mesures de maîtrise sanitaire correspondant à ces étapes.

5.1 Détermination des étapes clés

Pour déterminer les étapes clés, nous avons appliqué les modèles microbiens sur les profils enregistrés pour estimer, à partir d'une contamination initiale, la concentration finale du produit en cellules végétatives de *Clostridium perfringens* puis le risque de diarrhée lié à la consommation du produit.

5.1.1 Modélisation de la contamination initiale

Pour modéliser la contamination initiale dans le produit au début de sa fabrication, nous avons utilisé

- les résultats des analyses effectuées sur les matières premières prélevées *in situ*,
- les informations collectées sur les quantités de chaque ingrédient dans le produit au début de sa fabrication.

Nous avons collecté les données de détection et de dénombrement dans les matières premières en nous focalisant sur les spores de *Clostridium perfringens*. La méthode d'analyse utilisée a conduit à un seuil de détection de 5 ou 2 $u.f.c.g^{-1}$. Compte tenu du grand nombre d'épices entrant dans la composition des deux plats, il n'a pas été possible de réaliser un grand nombre d'analyses par épice. Pour certaines épices, on ne dispose que de deux résultats d'analyses, généralement sous forme d'absence de spores.

Au terme des analyses menées, des spores de *Clostridium perfringens* n'ont été trouvées que dans trois ingrédients : le poivre, l'ail en semoule et le thym. Dans les autres épices (persil, paprika, laurier et cumin), aucune spore n'a été détectée au cours des analyses, ce qui ne signifie pas forcément que ces ingrédients en sont exempts. Dans la mesure où on trouve des publications dans lesquelles des spores ont été détectées dans le persil (Pafumi, 1986), le paprika (Smith, 1963 ; Masson, 1978 ; Pafumi, 1986 ; Eisgruber and Reuter, 1987 ; Candlish *et al.*, 2001), le laurier (Powers *et al.*, 1975 ; Candlish *et al.*, 2001) et le cumin (Rodriguez-Romo *et al.*, 1998), nous avons supposé que ces épices pouvaient elles aussi être contaminées.

Pour estimer cette contamination, nous avons utilisé, pour chaque épice, des données personnelles et des données publiées et nous avons ajusté des

distributions lognormales aux données censurées correspondant à ces trois ingrédients en utilisant l'algorithme de Nelder-Mead (Nelder and Mead, 1965 ; Busschaert *et al.*, 2010), qui utilise le maximum de vraisemblance, disponible dans le package *fitdistrplus* (Pouillot and Delignette-Muller, 2010). Pour chaque épice, nous avons constitué Nu échantillons bootstrap des analyses collectées, de manière à obtenir un échantillon bootstrap caractérisant l'incertitude sur les paramètres des distributions ajustées. Les données utilisées, ainsi que les paramètres des distributions ajustées, sont présentés dans le tableau G.1 et les ajustements, réalisés en utilisant la valeur médiane des paramètres incertains, sont dans la figure G.1. Comme le montre le tableau, pour le persil nous ne disposons que de 6 résultats d'analyses, donnant tous une estimation de la concentration inférieure à $100\text{ }ufc.g^{-1}$. Ces données, trop imprécises, ne nous ont pas permis de modéliser la concentration du persil en spores de *Clostridium perfringens*. Aussi avons-nous utilisé, pour décrire cette concentration, la distribution Gamma (shape = 0.0562, scale = 2641) ajustée par Crouch and Golden (2005) sur les données de dénombrement collectées sur des épices peu analysées mais cette distribution ne caractérise que la variabilité de la concentration, sans description de l'incertitude.

Les quantités d'épices utilisées ont été récoltées à partir d'observations ou des fiches-recettes mises à la disposition des cuisiniers. Mais disposant au final de peu d'informations sur ces quantités, nous avons modélisé la variabilité de chaque quantité d'épice utilisée par des lois uniformes dont les bornes ont été définies à partir des observations réalisées sur place. Les quantités minimales et maximales, définissant les paramètres des distributions uniformes, sont présentées dans le tableau G.2 en annexes. Par manque d'informations, nous n'avons pas pu décrire l'incertitude sur les quantités d'épices utilisées.

Pour estimer la masse correspondant à la totalité du produit (viande et sauce) dans la sauteuse, nous avons utilisé :

- le nombre de portions préparées dans une sauteuse. D'après nos observations, ce nombre varie entre 450 et 600. Nous avons donc défini, pour décrire le nombre de portions, la distribution uniforme $Unif(450, 600)$ en ne retenant que les valeurs entières.

- la taille des portions. Là encore d’après nos observations sur place, la taille des portions peut être décrite par une loi uniforme de paramètres 150 et 200, les tailles minimales et maximales observées (en grammes) de portions de viande et de sauce.

Là encore, par manque d’informations, nous n’avons pu décrire que la dimension de variabilité sur ces données.

Pour séparer variabilité et incertitude dans les simulations de la concentration initiale en spores de la préparation dans la sauteuse, nous avons tiré au sort, comme décrit dans la figure 5.1 Nu jeux de paramètres incertains décrivant la variabilité de la concentration de chaque épice (présentés dans le tableau G.1 et pour chaque jeu de paramètres incertains, nous avons tiré au sort :

- Nv concentrations initiales en spores de chaque épice dans la distribution de paramètres le jeu de paramètres incertains,
- Nv quantités d’épices dans les distributions uniformes dont les paramètres figurent dans le tableau G.2,
- Nv nombres et tailles de portions.

Reproduite Nu fois, cette démarche permet d’obtenir une distribution de variabilité de cette concentration initiale du produit dans la sauteuse, accompagnée de son incertitude.

5.1.2 Estimation du niveau de sécurité sanitaire

Le but était de relier les paramètres opérationnels des professionnels à la croissance/décroissance de *Clostridium perfringens* et à l’atteinte de critères de sécurité. Plusieurs types de critères ont été proposés.

Nous avons d’abord proposé des objectifs de performance, définis sur une partie du procédé. Ainsi, nous avons cherché à estimer

- la concentration en cellules végétatives de *Clostridium perfringens* après croissance pendant la phase de refroidissement en cellule de refroidissement rapide puis dans la chambre froide,
- la concentration en cellules végétatives de *Clostridium perfringens* après croissance pendant le début de la remise en température.

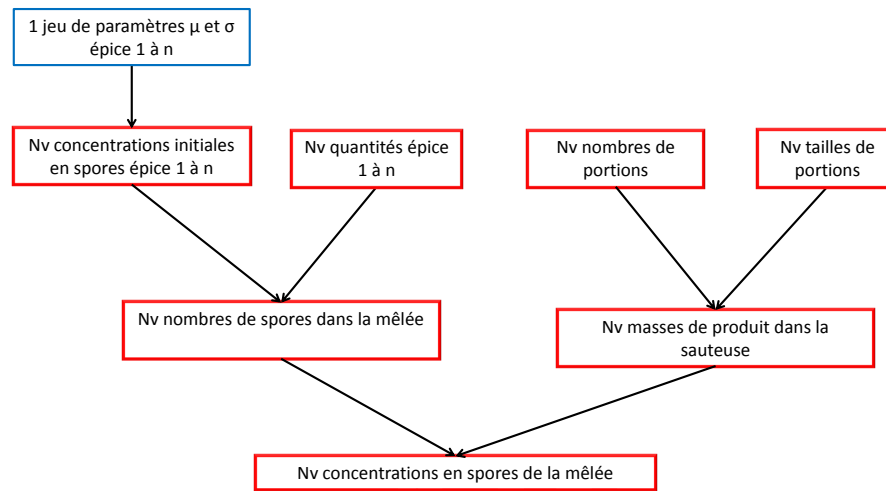


FIGURE 5.1 – Démarche de simulation entreprise pour simuler la contamination initiale du produit dans la sauteuse. Les rectangles bleus représentent les jeux de paramètres incertains et les rectangles épais rouges représentent la dimension de variabilité. Avec un jeu de paramètres incertains, on obtient Nv concentrations initiales décrivant sa variabilité. Menée avec Nu jeux de paramètres incertains, cette démarche de Monte Carlo à 2 dimensions permet aussi d’estimer l’incertitude sur la concentration prédite.

Puis nous avons cherché à estimer l’objectif de sécurité alimentaire (OSA ou FSO) défini comme la concentration en cellules végétatives de *Clostridium perfringens* après inactivation à la fin de la remise en température. Enfin, nous nous sommes intéressés au degré approprié de protection de la santé (DPA ou ALOP) défini comme le risque de diarrhée liée à la consommation des deux plats en sauce.

Etant donné que nous n’avons pas modélisé la destruction des spores au cours de la cuisson, nous nous sommes appuyés ici sur l’hypothèse sécuritaire selon laquelle toutes les spores contenues dans les matières premières survivaient à cette étape de cuisson. Ainsi, la concentration en spores à la fin de la cuisson a été supposée égale à la concentration en spores avant la cuisson. C’est à partir de cette contamination initiale que nous avons estimé ensuite les différents critères de sécurité sanitaire.

Pour séparer variabilité et incertitude dans les simulations de critères de sécurité, nous avons adopté une démarche de Monte Carlo à deux dimensions, décrite dans la figure 5.3. Nous avons tiré au sort N jeux de valeurs des paramètres incertains, c'est-à-dire :

- les paramètres μ et σ décrivant la variabilité de la concentration de chaque épice (présentés dans le tableau G.1,
- les paramètres T_{min} , T_{opt} , T_{max} , $\mu_{opt_{beef}}$, m_{lnh0} et s_{lnh0c} tirés au sort dans la distribution *a posteriori* jointe des paramètres du modèle de germination croissance B3, présentée dans le tableau 2.6,
- les paramètres z , $\sigma_{\beta_{logD,etude}}$, $\sigma_{\beta_{logD,culture}}$ et $\sigma_{\beta_{logD,souche}}$ tirés au sort dans la distribution *a posteriori* jointe des paramètres du modèle de destruction thermique, présentée dans le tableau 3.5,
- les paramètres $\mu_{logitr-TIAC}$, $\sigma_{logitr-TIAC}$ tirés au sort dans la distribution *a posteriori* jointe des paramètres du modèle dose réponse, présentée dans le tableau 4.3.

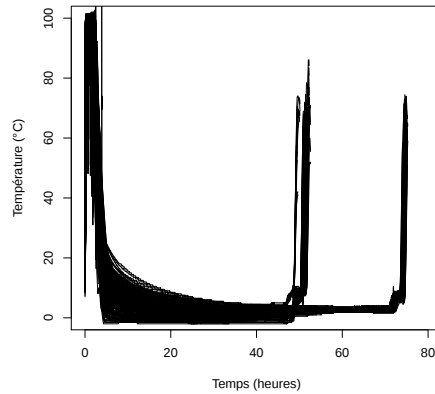


FIGURE 5.2 – Profils enregistrés à l'hôpital. Chaque courbe noire représente l'un des 217 profils enregistrés.

En utilisant chaque jeu de paramètres incertains, nous avons tiré au sort dans la dimension de variabilité :

- N concentrations initiales en spores de la mêlée,
- N profils thermiques tirés au sort avec remise parmi les 217 enregistrés, présentés sur la figure 5.2,

- Nv valeurs de h_0 , pour le modèle de germination croissance, de manière à simuler les Nv croissances et à calculer les Nv concentrations en cellules végétatives de *Clostridium perfringens* à la fin du refroidissement (A) et pendant la remise en température (B) (Eq. 2.2 et 2.3),
- Nv valeurs de D_{ref} , pour le modèle de destruction thermique, de manière à simuler les Nv destructions et à calculer les Nv concentrations en cellules végétatives de *Clostridium perfringens* à la fin de la remise en température (C) (Eq. 3.2 et 3.3),
- Nv portions dans la distribution ajustée sur les données de consommation provenant d'INCA2, présentées dans le tableau F.3, pour calculer les Nv doses ingérées de *Clostridium perfringens* (D),
- Nv valeurs de r , pour le modèle dose réponse, de manière à calculer les Nv probabilités de maladie (E) (Eq. 4.1).

Cette technique nous a permis de modéliser l'incertitude sur le risque moyen.

Dans une première approche, nous avons utilisé les profils enregistrés tels quels. Puis nous avons considéré que les étapes de refroidissement et de remise en température ne sont pas forcément liées dans la mesure où elles se déroulent dans deux lieux différents (cuisine pour la première, services pour la deuxième) sans communication entre les opérateurs responsables de ces deux étapes. Il est donc possible d'augmenter artificiellement le nombre de profils enregistrés en créant de nouvelles combinaisons de profils de refroidissement et de remise en température. C'est ce que nous avons fait avant d'estimer à nouveau les critères de sécurité correspondant au procédé. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 5.1.

D'après le tableau 5.1, il apparaît que la croissance prédite est faible et qu'elle intervient en partie pendant le refroidissement et pendant la remise en température. Si la croissance pendant la remise en température ne peut guère être évitée ou freinée car les plats doivent impérativement être réchauffés, on peut imaginer agir pendant la phase de refroidissement pour maintenir ou réduire encore cette croissance. Dans la mesure où, pendant cette étape, la maîtrise thermique du procédé passe par un échantillonnage de la température au coeur du produit à la fin de la phase de refroidisse-

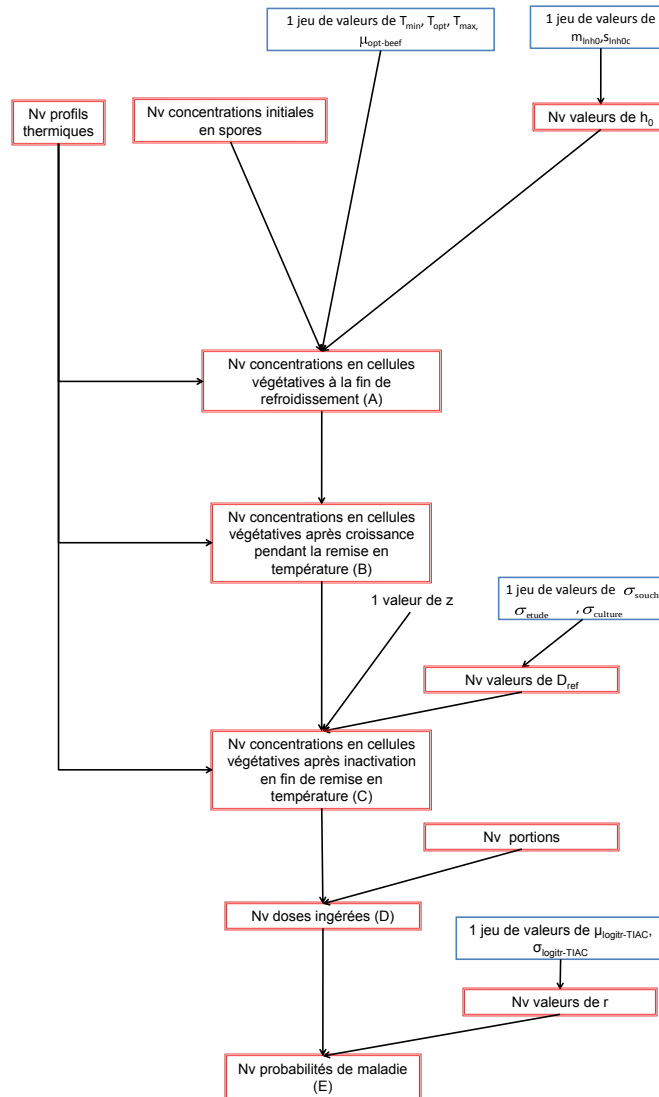


FIGURE 5.3 – Démarche de simulation entreprise pour estimer les critères de sécurité définis pour le procédé étudié. Les rectangles bleus représentent les jeux de paramètres incertains et les rectangles épais rouges représentent la dimension de variabilité. Avec un jeu de paramètres incertains, on obtient N_v valeurs de ces critères décrivant la variabilité inhérente au procédé étudié. Menée avec N_u jeux de paramètres incertains, cette démarche de Monte Carlo à 2 dimensions permet aussi d'estimer l'incertitude sur les critères prédits.

ment rapide, on peut imaginer qu'une mesure de maîtrise repose sur cet échantillonnage.

Critère de sécurité	Statistique	Profils réels	Profils recombinés
Concentration dans le produit avant cuisson $\log_{10}cfu.g^{-1}$	Médiane 2.5 ^{ème} perc. 97.5 ^{ème} perc.	0.38 [-0.44,1.59] 0.19 [-0.69,1.28] 0.55 [-0.23,1.90]	0.38 [-0.44,1.59] 0.19 [-0.69,1.28] 0.55 [-0.23,1.90]
Concentration après la phase de croissance pendant le refroidissement (A) $\log_{10}cfu.g^{-1}$	Médiane 2.5 ^{ème} perc. 97.5 ^{ème} perc.	$4.7.10^{-1}$ [-4.1.10 ⁻¹ ,1.7] $4.2.10^{-1}$ [-4.4.10 ⁻¹ ,1.6] $5.5.10^{-1}$ [-3.6.10 ⁻¹ ,1.9]	$4.7.10^{-1}$ [-4.1.10 ⁻¹ ,1.7] $4.2.10^{-1}$ [-4.4.10 ⁻¹ ,1.6] $5.5.10^{-1}$ [-3.6.10 ⁻¹ ,1.9]
Concentration après la phase de croissance pendant la remise en température (B) $\log_{10}cfu.g^{-1}$	Médiane 2.5 ^{ème} perc. 97.5 ^{ème} perc.	$5.6.10^{-1}$ [-3.7.10 ⁻¹ ,1.9] $4.7.10^{-1}$ [-4.2.10 ⁻¹ ,1.7] $6.7.10^{-1}$ [-2.7.10 ⁻¹ ,2.1]	$5.8.10^{-1}$ [-3.6.10 ⁻¹ ,1.9] $4.8.10^{-1}$ [-4.1.10 ⁻¹ ,1.6] $6.7.10^{-1}$ [-2.8.10 ⁻¹ ,2.0]
Concentration après la phase de destruction en fin de remise en température (C) $\log_{10}cfu.g^{-1}$	Médiane 2.5 ^{ème} perc. 97.5 ^{ème} perc.	0 [0,1.5] 0 [0,1.4] 0 [0,1.7]	0 [0,1.4] 0 [0,1.3] 0 [0,1.7]
Dose ingérée (D) $\log_{10}cfu$	Médiane 2.5 ^{ème} perc. 97.5 ^{ème} perc.	2.4 [1.2,3.9] 2.3 [1.1,3.8] 2.4 [1.2,4.2]	2.5 [1.2,3.9] 2.2 [1.1,3.7] 2.5 [1.3,4.2]
Probabilité de maladie (E)	Moyenne	$1.4.10^{-6}$ [3.3.10 ⁻⁹ ,4.8.10 ⁻³]	$1.5.10^{-6}$ [3.2.10 ⁻⁹ ,4.9.10 ⁻³]

TABLE 5.1 – Critères de sécurité simulés à partir des profils thermiques enregistrés. Les profils réels sont les profils réellement enregistrés *in situ*. Les profils recombinaés sont les profils artificiellement obtenus en créant de nouvelles combinaisons de profils de refroidissement et de remise en température. Chaque statistique présentée caractérise la distribution de variabilité du critère de sécurité, la première valeur représentant la valeur médiane de cette statistique et les valeurs entre crochets les bornes de l'intervalle de crédibilité à 95% de cette statistique caractérisant l'incertitude.

Il apparaît aussi que la destruction thermique des cellules végétatives peut être particulièrement efficace en fin de remise en température mais que dans certains cas, elle peut être limitée si on se réfère aux bornes supérieures des intervalles de crédibilité à 95% de la concentration en cellules végétatives

après la phase de destruction thermique. L'étape de remise en température apparaît donc essentielle pour la maîtrise du danger *Clostridium perfringens* et il serait intéressant de définir pour cette étape une mesure de maîtrise sanitaire.

Malgré toutes les sources d'incertitude identifiées dans le modèle et malgré l'importance de cette incertitude, notamment l'incertitude sur les paramètres décrivant la variabilité des concentrations de chaque épice ou la variabilité de D_{ref} , l'incertitude sur la dose ingérée (D) est relativement faible, de l'ordre d' $1 \log_{10} cfu$ alors qu'on pouvait s'attendre à plus. En revanche, l'incertitude sur le risque de maladie (E) est assez importante puisqu'entre les bornes de l'intervalle de crédibilité à 95% sur le risque moyen il y a un facteur de l'ordre de 10^6 . Ceci montre l'impact de l'incertitude sur les paramètres du modèle dose réponse sur le risque prédit. Il semble donc important d'améliorer la modélisation dose réponse pour diminuer cette incertitude, en améliorant la collecte des données issues de TIAC.

Le risque moyen prédit est faible. Ceci peut être dû à un biais expérimental dans la collecte des données, et en particulier dans la collecte des profils thermiques. Durant les jours de production que nous avons suivis, notre présence dans la cuisine de l'hôpital a eu un impact sur le comportement des opérateurs, qui ont prêté plus d'attention à la préparation des plats de boeuf en sauce qu'à celle des autres plats. Ainsi, nous n'avons enregistré, sur les plats de boeuf en sauce, aucun des temps d'attente prolongés que nous avons pu observer pour les autres plats.

5.2 Echantillonnage de la température en sortie de cellule de refroidissement rapide

Après sa cuisson, le produit est réparti dans des bacs multi portions en plastique jetable. Ces bacs sont ensuite operculés avant d'être portés sur un chariot, qui entre ensuite dans des cellules de refroidissement rapide. Le pilotage de ces cellules de refroidissement rapide est assuré grâce à une sonde thermique plantée dans un des bacs. Dès que cette sonde indique une

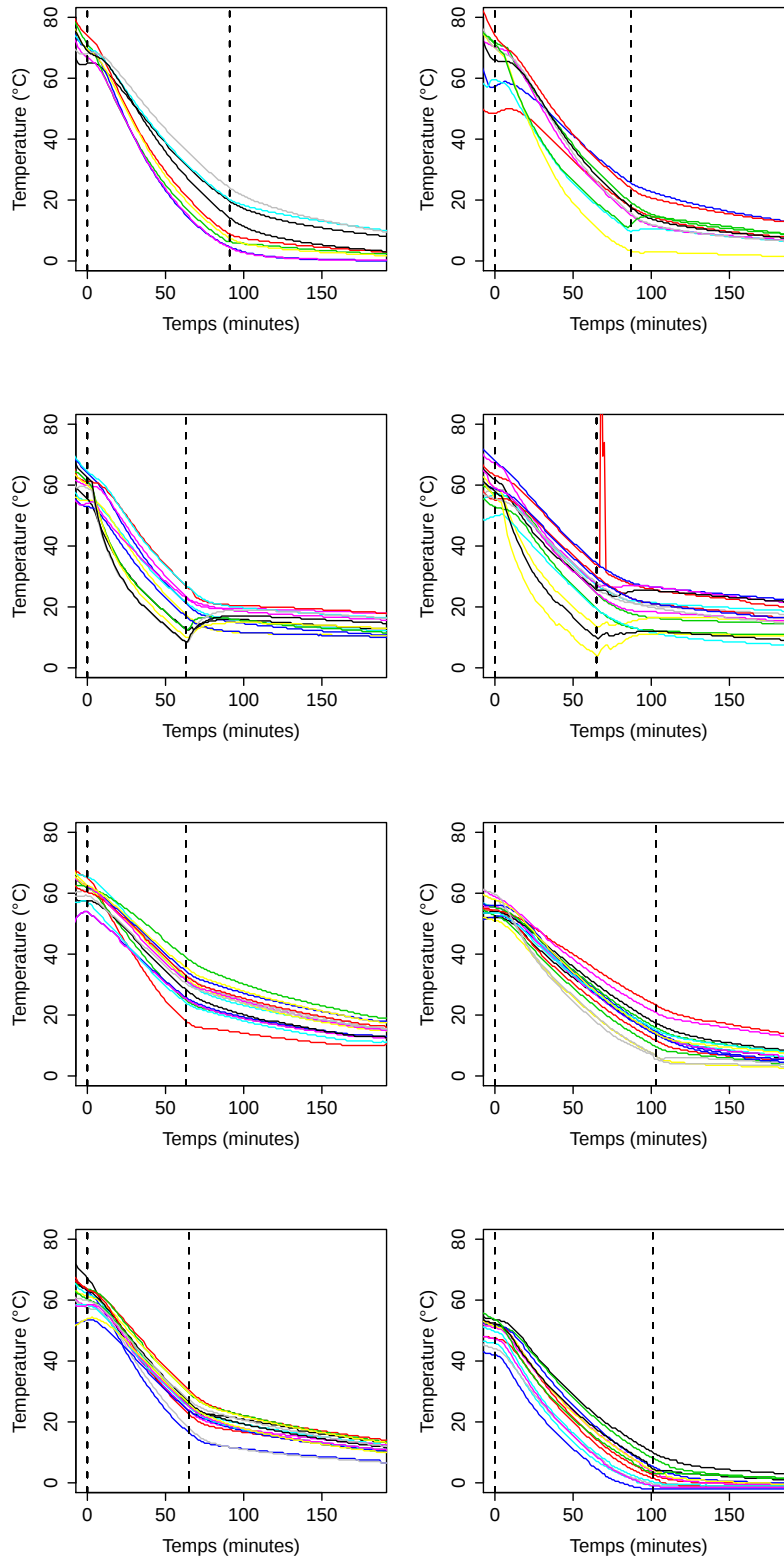
température de 10°C, un signal sonore prévient l'opérateur, qui vérifie l'atteinte de cette température de 10°C en réalisant une mesure de température avec un thermomètre. Si ce thermomètre indique une température égale ou inférieure à 10°C, le chariot est sorti de la cellule de refroidissement rapide pour entrer en chambre froide. Dans le cas contraire, le refroidissement rapide continue, jusqu'à ce qu'une deuxième mesure, réalisée par l'opérateur, n'indique une température égale ou inférieure à 10°C.

Pour suivre l'évolution thermique du produit pendant cette étape, des capteurs thermiques, chargés d'enregistrer la température à intervalles réguliers tout au long du procédé, ont été placés à coeur de morceaux de viande et dans la sauce. Au total, 217 mesures ont été réalisées au cours des 15 jours de production, avec une moyenne d'environ 15 mesures par jour de suivi. Ces mesures nous ont permis de constater la grande variabilité des profils thermiques collectés, que ce soit au niveau :

- de la température d'entrée en cellule de refroidissement. Cette température est très variable d'un jour à l'autre, à cause des temps d'attente et de manipulation séparant la fin de cuisson de l'entrée dans la cellule de refroidissement, mais aussi entre bacs d'une même journée de production, comme le montre la figure 5.4.
- de la vitesse de refroidissement du produit. Là encore, sur la figure 5.4, la variabilité apparaît importante d'un jour à l'autre mais aussi entre profils relevés un même jour de production.

Etant donné l'importance de la variabilité des profils thermiques entre jours de production mais aussi pour un même jour de production, la stratégie actuelle d'échantillonnage mise en place dans la cuisine de l'hôpital repose sur une prise de température unique à n'importe quel point du bac avec, comme règle de décision, la sortie du chariot de la cellule si la température relevée est inférieure ou égale à 10°C. S'appuyer sur une seule température pour décider de la sortie de plusieurs centaines de portions peut paraître risqué, surtout dans la première heure du refroidissement rapide, durant laquelle la variabilité des températures au coeur du produit est assez importante.

Aussi avons-nous, après avoir observé les pratiques des opérateurs en cui-



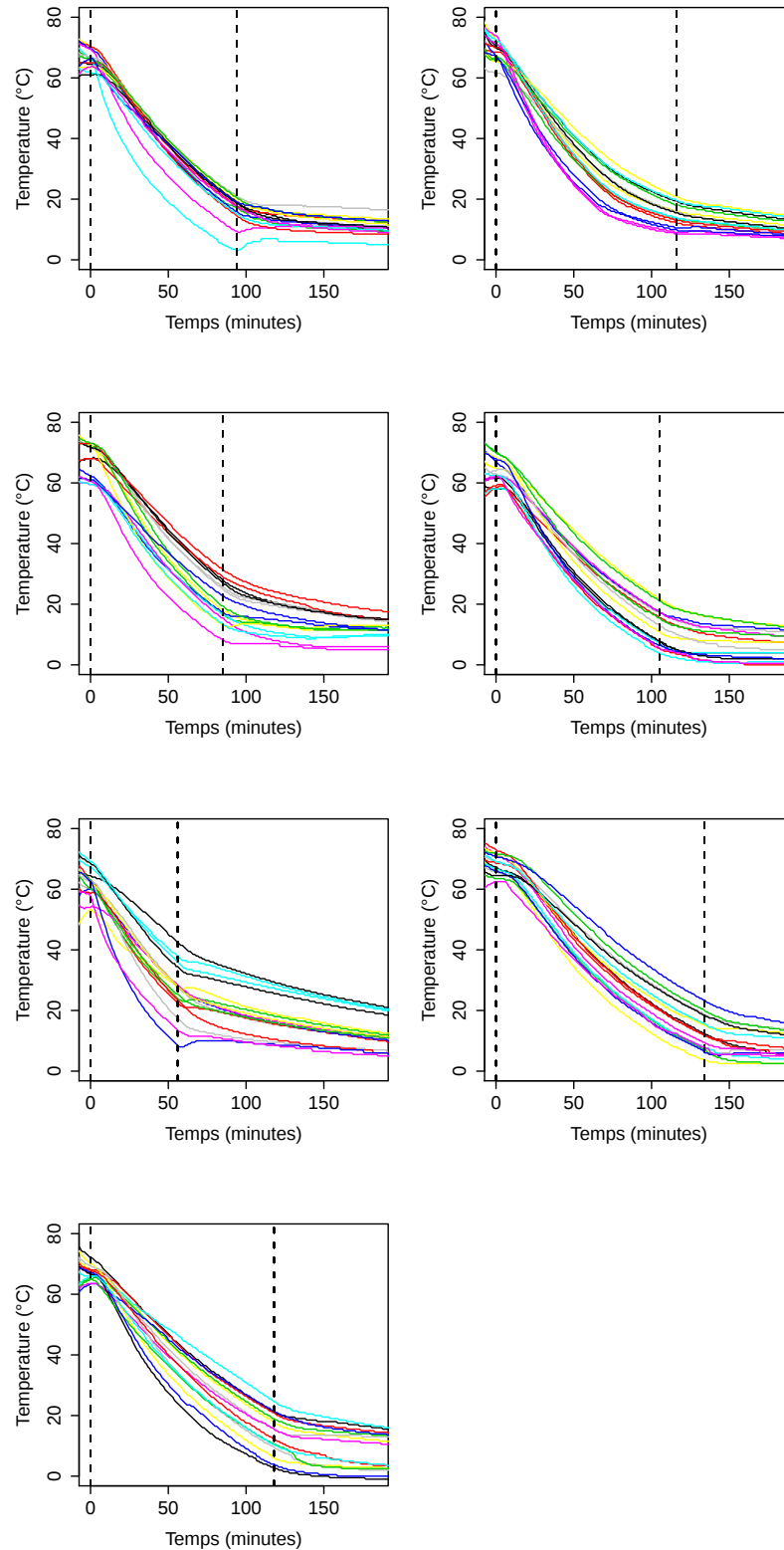


FIGURE 5.4 – Profils thermiques enregistrés à l'hôpital correspondant au refroidissement pendant chaque jour de suivi (un graphe par jour). Les courbes de couleur représentent les profils enregistrés lors d'une journée de production. La première verticale en pointillés représente l'entrée en cellule de refroidissement et la deuxième la sortie de cellule de refroidissement.

sine, proposé différentes stratégies d'échantillonnage assez simples à mettre en application :

- la prise d'une température au centre géométrique d'un bac (qui fait partie des points les plus chauds),
- la prise de deux températures n'importe où dans 2 bacs différents,
- la prise de deux températures à 2 centres géométriques de 2 bacs différents.

Pour chaque stratégie, la règle de décision est la même : le chariot ne sort de la cellule de refroidissement rapide que si la (ou les) température(s) relevée(s) est (sont) inférieure(s) ou égale(s) à 10°C.

Mais les 217 profils thermiques enregistrés ne nous ont pas permis de tester ces stratégies. Nous avons donc cherché à simuler des profils thermiques similaires aux profils enregistrés et décrivant la même variabilité observée. En l'absence d'un modèle thermique validé par les thermiciens, nous avons cherché à décrire cette variabilité dans un modèle thermique plus simple, comme le montre la figure 5.5.

Comme le montre la figure 5.5, pour estimer une probabilité de sortie par stratégie d'échantillonnage, nous avons besoin de pouvoir décrire :

- les températures des centres géométriques des bacs. Pour cela, nous avons construit un premier modèle.
- les températures à n'importe quel point de n'importe quel bac. Dans la mesure où la température n'importe où dans un bac semble liée à la température de son centre géométrique, nous avons décrit la différence entre ces deux températures dans un deuxième modèle. Couplé au premier modèle thermique, ce modèle nous a permis de décrire les températures à n'importe quel point de n'importe quel bac.

Ces deux modèles couplés nous ont permis d'estimer la probabilité de sortie pour chaque stratégie d'échantillonnage. Pour lier cette probabilité de sortie au risque et quantifier l'impact de ces stratégies d'échantillonnage sur le risque, nous avons considéré deux métriques du risque :

- un critère de performance, défini à partir d'exigences américaines, c'est-à-dire que la croissance durant le refroidissement complet ne dépasse pas le seuil de 1 $\log_{10}cfu.g^{-1}$. Dans nos simulations, nous avons donc

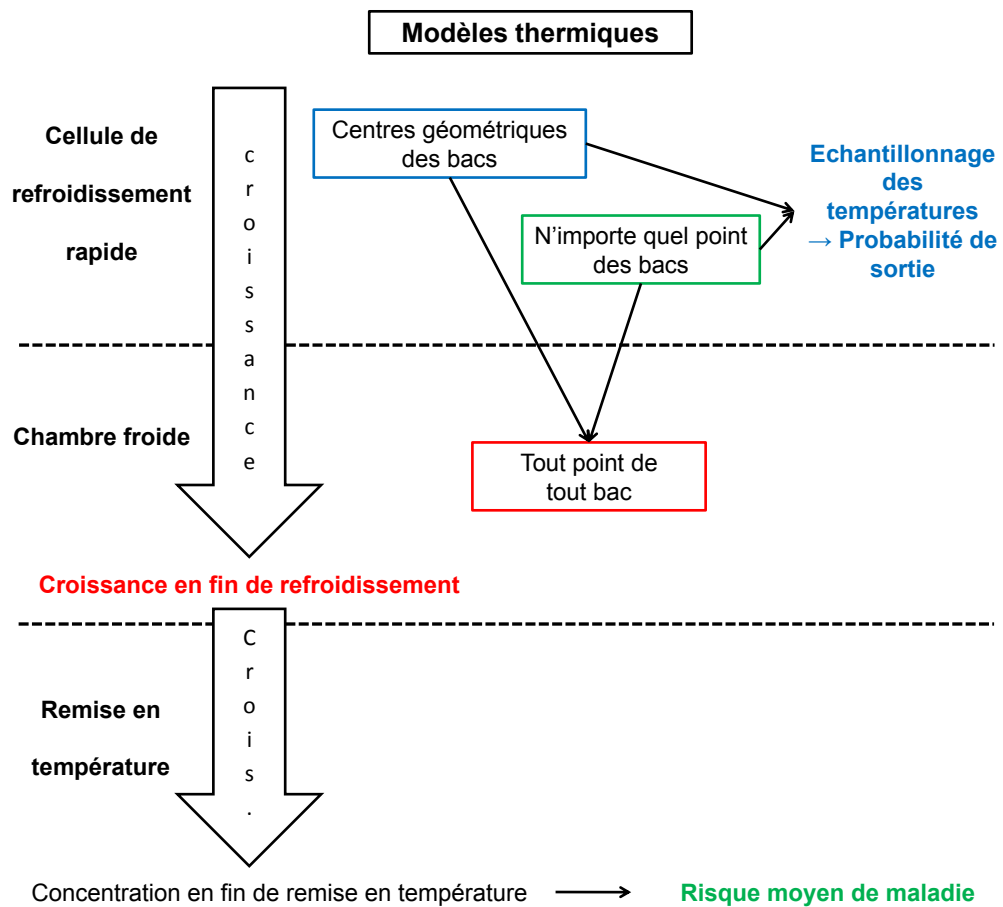


FIGURE 5.5 – Modèles thermiques nécessaires au test des stratégies d'échantillonnage. Pour le refroidissement rapide, deux modèles thermiques couplés permettent de décrire la température des centres géométriques des bacs et la température à n'importe quel point de n'importe quel bac, pour estimer la probabilité de sortir le chariot de la cellule selon la stratégie d'échantillonnage de la température. A sa suite, le modèle thermique correspondant au passage dans la chambre froide permet de décrire la température n'importe où dans le produit pour estimer la croissance de *Clostridium perfringens* durant le refroidissement complet. Enfin, la croissance de *Clostridium perfringens* durant la remise en température a été estimée en utilisant les profils enregistrés jusqu'à 53°C pour estimer une concentration finale dans le produit et le risque de maladie lié à l'ingestion de ce produit.

cherché à estimer la probabilité que la croissance de *Clostridium per-*

fringens dans le produit dépasse ce seuil selon les différentes stratégies d'échantillonnage.

- le risque de maladie consécutive à la consommation du produit. Dans nos simulations, nous avons cherché à estimer cette probabilité de maladie selon les différentes stratégies d'échantillonnage.

Pour estimer la croissance de *Clostridium perfringens* durant le refroidissement complet et le risque de maladie, nous avons décrit deux autres étapes :

- le refroidissement en chambre froide. Au moment où le produit sort de la cellule, toutes les températures enregistrées n'ont pas atteint la température de stockage au froid, comme le montre la figure 5.4. De ce fait, le refroidissement du plat continue en chambre froide, laissant aux cellules végétatives de *Clostridium perfringens* du temps pour se multiplier. C'est pourquoi nous avons décrit la température du produit dans la chambre froide dans un troisième modèle thermique, comme le montre la figure 5.5.
- la remise en température, durant laquelle les cellules de *Clostridium perfringens* peuvent encore se multiplier. Pour cela, nous avons imaginé le pire scénario, c'est-à-dire le cas de figure dans lequel, la température finale au coeur du produit dépassant la température maximale de croissance de *Clostridium perfringens* sans dépasser 53°C, la remise en température permet la croissance des cellules végétatives sans phase ultérieure de destruction. Dans la mesure où, au terme de la remise en température, certains profils thermiques enregistrés n'ont pas atteint une température suffisante pour permettre cette destruction, ce scénario est plausible. Pour cette étape, nous avons utilisé les profils enregistrés *in situ*, que nous avons arrêtés à 53°C.

5.2.1 Probabilité de sortie selon les stratégies

Modèle thermique de la cellule de refroidissement

L'objectif était de simuler les profils thermiques enregistrés pendant la phase de refroidissement rapide. Le modèle thermique devait en particulier

reproduire la dispersion observée dans les profils enregistrés tant au niveau des températures d'entrée en cellule qu'au niveau des pentes de refroidissement. Cette dispersion a été observée tant entre profils enregistrés sur une même journée de production, comme le montre la figure 5.4, qu'entre profils enregistrés à des jours différents. Pour ce faire, nous avons, dans un premier temps, modélisé l'évolution de la température des centres géométriques des bacs puis, dans un deuxième temps, modélisé la différence de température entre n'importe quel point du bac et son centre géométrique. Dans notre démarche de modélisation, nous avons cherché à décrire trois niveaux de variabilité :

- la variabilité inter jour,
- la variabilité inter bac, c'est-à-dire la variabilité des températures de centres géométriques de bacs pour un même jour de production,
- la variabilité intra bac, c'est-à-dire la variabilité des températures à l'intérieur d'un bac.

Modélisation de la température des centres géométriques des bacs

Comme on peut le voir sur la figure 5.4, le refroidissement dans les cellules de l'hôpital correspond à un modèle thermique exponentiel.

Définition 5.2.1 (Modèle thermique exponentiel)

Si on considère $T_{cg,0}$ et $T_{cg,a}$ les températures initiale et asymptotique des centres géométriques (en °C), t le temps (en min) et k le taux de refroidissement/réchauffement exponentiel (en min^{-1}), l'évolution de la température T_{cg} au coeur du produit est décrite par :

$$T_{cg} = T_{cg,a} + (T_{cg,0} - T_{cg,a})\exp(-kt) \quad (5.2)$$

Pour simplifier l'équation 5.2, nous avons fixé $T_{cg,a}$ à 0 °C (ce que nous avons d'ailleurs observé dans les profils enregistrés), ce qui nous a permis de transformer l'équation 5.2 comme suit :

$$\ln T_{cg} = \ln T_{cg,0} - kt \quad (5.3)$$

avec $\ln T_{cg}$ et $\ln T_{cg,0}$ les logarithmes népériens des températures des centres géométriques.

Nous avons cherché à modéliser $\ln T_{cg}$ en fonction du temps en décrivant aussi bien la variabilité observée sur les températures d'entrée en cellule, soit $\ln T_{cg,0}$, que la variabilité observée sur les pentes des profils enregistrés, soit k .

Notre objectif était de créer des profils permettant de décrire la variabilité inter et intra jour. Cette variabilité apparaît bien sur la figure 5.4. Sur cette figure où chaque graphe correspond aux profils enregistrés pendant un jour de production, les températures au moment de l'entrée en cellule de refroidissement varient de 80 à 40°C. Cette variation est expliquée par des variations entre jours de production mais aussi par des variations inter bac. De la même façon, la variabilité inter jour et inter bac de la vitesse de refroidissement apparaît bien sur la figure. D'un jour de production à l'autre, nous avons observé des variations dans le procédé de fabrication qui peuvent avoir une influence sur l'étape de refroidissement rapide tels que :

- les temps d'attente et de manipulations (mise en bacs, operculage des bacs) entre la fin de la cuisson et l'entrée en cellule, qui peuvent avoir un impact sur la température d'entrée en cellule,
- la part de sauce et de viande dans le produit ainsi que leur répartition dans les différents bacs, qui peuvent influencer la vitesse de refroidissement du produit.
- le taux de remplissage de la cellule. Défini comme le rapport entre le nombre de places occupées par des bacs et le nombre total des places disponibles sur un chariot, le taux de remplissage varie entre 0.2 et 0.4, et peut avoir un impact sur la vitesse de refroidissement.
- la cellule de refroidissement. De la même façon d'un jour à l'autre, le chariot ne passe pas dans la même cellule de refroidissement. Trois cellules de refroidissement sont en fonctionnement dans la cuisine. Elles sont reliées à un même moteur. Parfois, les trois fonctionnent simultanément mais parfois seules deux cellules voire une seule cellule fonctionnent en même temps.
- le niveau du bac sur le chariot. Sur un chariot, vingt niveaux sont

disponibles et sur chaque niveau, les bacs peuvent être placés à deux places différentes. D'un jour à l'autre, les opérateurs placent les bacs multi portions différemment sur le chariot, ce qui peut avoir un impact sur la vitesse de refroidissement dans le produit, comme peut-être sur la température à l'entrée dans la cellule.

Tous ces facteurs peuvent avoir un impact sur la température du produit à l'entrée en cellule et sur la vitesse de refroidissement. Nous avons donc décrit dans le modèle MTRR (Eq. 5.4) cette variabilité inter jour par des effets aléatoires sur la température d'entrée en cellule et sur la vitesse de refroidissement, de même que la variabilité intra jour (variabilité résiduelle du modèle).

Définition 5.2.2 (Modèle MTRR)

$$\begin{cases} \ln T_{cg,ij} = \ln T_{cg,0j} + \beta_{1j} \times t + \varepsilon_{ij} \\ \ln T_{cg,0j} = \ln T_{cg,0} + \gamma_{0j} & \gamma_{0j} \sim N(0, \sigma_{inter0}) \\ \beta_{1j} = \beta_1 + \gamma_{1j} & \gamma_{1j} \sim N(0, \sigma_{inter1}) \\ \varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma_{interbac}) \end{cases} \quad (5.4)$$

Dans ce modèle, l'effet du facteur 'jour' sur la température d'entrée est décrit par la quantité γ_{0j} , avec σ_{inter0} la variabilité inter jour de la température d'entrée, et son effet sur la pente du refroidissement est décrit par la quantité γ_{1j} , avec σ_{inter1} la variabilité inter jour de cette pente.

Les paramètres du modèle MTRR ont été estimés par inférence fréquentiste en utilisant le package *lme4*. Ils sont présentés dans le tableau 5.2. Comme le montre ce tableau, la variabilité inter bac, décrite par $\sigma_{interbac}$, reste très importante en dépit des effets décrits. La variabilité inter jour (σ_{inter0}) et inter bac ($\sigma_{interbac}$) de la température d'entrée est très importante et si on simule Nv valeurs de γ_{0j} et de ε_{ij} qu'on ajoute à $\ln T_{cg,0}$, on obtient un intervalle de variabilité à 95% de la température d'entrée de [41.7,138.9]. Cet intervalle de variabilité est énorme et irréaliste dans la mesure où la température d'entre en cellule ne peut excéder 100°C, la température d'ébullition, voire 80 à 90°C, étant donné les manipulations nécessaires entre la fin de la cuisson et l'entrée dans la cellule. Aussi avons-nous décidé de tronquer la température initiale

simulée à 85°C, de manière à simuler des températures plus réalistes.

Paramètre	Valeur
$\ln T_{cg,0}$	4.30 (SE=2.6.10 ⁻²)
σ_{inter0}	0.10
β_1	-1.69.10 ⁻² (SE=1.3.10 ⁻³)
σ_{inter1}	4.86.10 ⁻³
$\sigma_{interbac}$	0.30

TABLE 5.2 – Paramètres du modèle MTRR.

Afin de vérifier l'aptitude du modèle MTRR à prédire les profils enregistrés, nous avons simulé un grand nombre de profils thermiques en tirant à chaque fois un jeu de paramètres et en tronquant la température d'entrée à 85°C. Nous avons estimé la bande de variabilité à 95% de ces profils simulés en estimant, pour chaque pas de temps d'une minute, l'intervalle de variabilité à 95% des températures simulées. Cette bande de variabilité a ensuite été comparée aux profils enregistrés. Comme le montre la figure 5.6, les profils enregistrés semblent dans l'ensemble correctement prédits par le modèle MTRR. Il apparaît toutefois une légère surestimation de la température prédite par le modèle par rapport aux températures observées. Mais, en surestimant la température, le modèle décrit des conditions plus propices à la croissance de *Clostridium perfringens* qu'observées sur site, ce qui rend ce modèle sécuritaire.

C'est pourquoi ce modèle a été choisi pour prédire la température des centres géométriques des bacs au cours du refroidissement rapide.

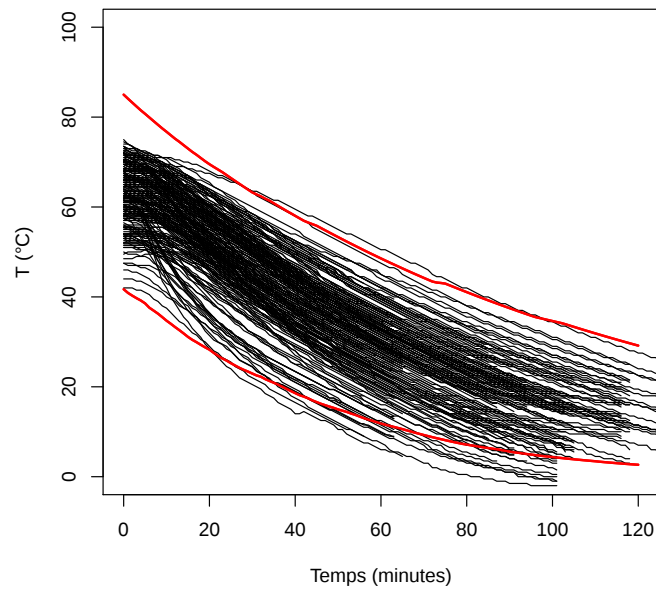


FIGURE 5.6 – Profils thermiques enregistrés et bande de variabilité à 95% des profils simulés. Les courbes noires représentent les profils enregistrés, les courbes rouges les bornes de la bande de variabilité à 95% des profils simulés.

Modélisation de la température en n'importe quel point des bacs

Pour décrire la température en n'importe quel point du bac, nous nous sommes intéressés à la différence de températures entre le centre géométrique du bac et ce point. Pour acquérir des données sur cette différence, nous avons équipé certains bacs de plusieurs capteurs, dont un placé au centre géométrique de ces bacs. La figure 5.7 montre l'évolution de la différence de températures entre son centre géométrique et plusieurs points d'un bac pour un jour de production. Comme le montre cette figure, le centre géométrique est parmi les points les plus chauds du bac et la différence entre la température du centre et celle d'un point du bac peut être très importante (jusqu'à 20°C comme le montre la figure). La différence entre la température du centre et celle d'un point du bac au moment de l'entrée dans la cellule est assez variable d'un point à un autre, de même que son évolution dans le temps.

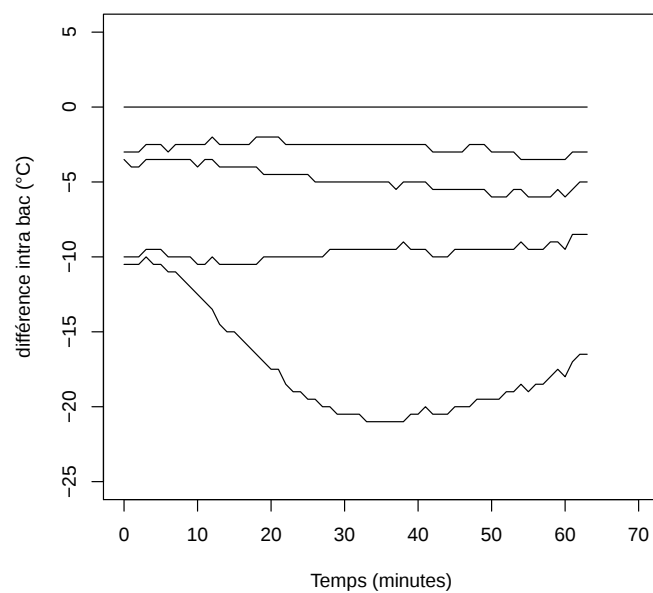


FIGURE 5.7 – Différences mesurées entre la température du centre géométrique d'un bac et la température relevée en d'autres points de ce bac dans la cellule de refroidissement pour un jour de production. Les courbes noires représentent les différences mesurées. Le temps 0 correspond à l'entrée dans la cellule de refroidissement.

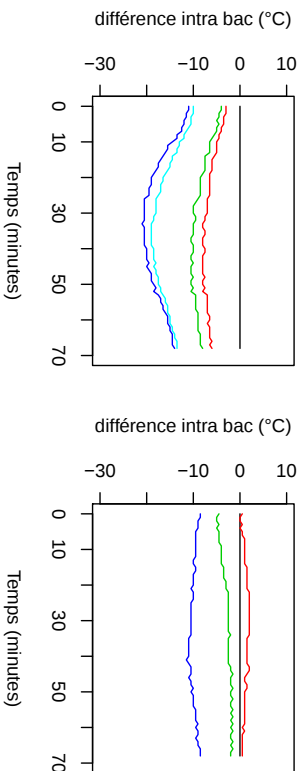
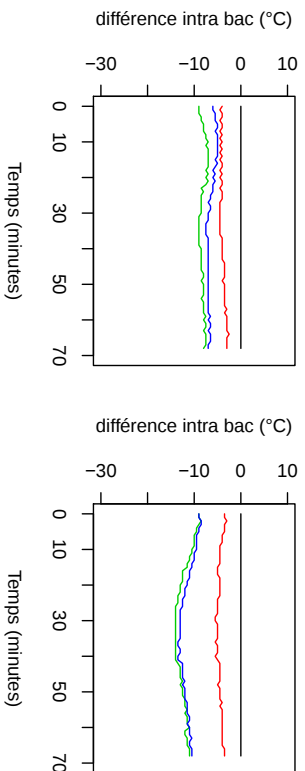
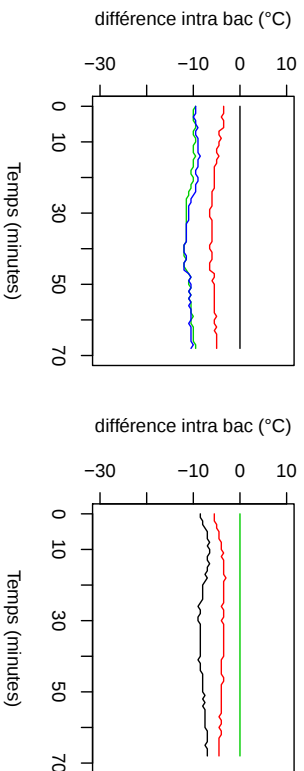
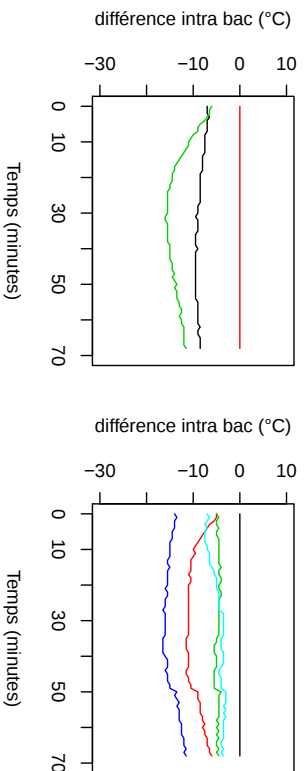
Au terme de notre campagne de collecte de profils, nous avons obtenu 78 profils thermiques, collectés pendant 9 jours de production. Pour chaque jour de production, souvent nous avons équipé deux bacs, placés à deux niveaux différents de la cellule de refroidissement. Dans chaque bac équipé, hormis le capteur placé au centre géométrique, les autres capteurs étaient placés dans des zones différentes d'un capteur à l'autre, c'est-à-dire selon notre classification, placés ou non entre le centre géométrique et la ventilation de la cellule, sur une diagonale du bac ou non..., et à des distances variables par rapport au centre géométrique. Il aurait été intéressant de définir comme facteur quantitatif la distance du capteur par rapport au centre géométrique du bac mais la qualité des informations collectées ne nous a pas permis de le faire et la forme rectangulaire des bacs rendait difficile la description de l'effet quantitatif de cette distance sur la différence de températures. Nous n'avons donc défini qu'un facteur aléatoire, l'emplacement du capteur, en dehors du centre géométrique du bac.

Au total, notre base de données se composait de 78 profils thermiques, collectés pendant 9 jours de production, correspondant à 16 bacs et 16 niveaux sur le chariot, avec des emplacements différents des bacs. Les différences de températures observées dans chaque bac sont représentées dans la figure 5.8.

Etant donné le nombre de facteurs aléatoires (jour, niveau du bac dans la cellule, emplacement du capteur dans le bac) et le nombre de profils collectés, il nous est apparu difficile d'explorer une potentielle variabilité liée à chacun de ces facteurs. Aussi avons nous décidé de décrire dans notre modèle

- un effet du temps sur la différence de températures car il décrivait un phénomène physique attendu (on s'attend à ce que la différence de températures diminue avec le temps, tous les points du bac tendant vers la même température asymptotique).
- une variabilité intra bac.

Dans ce modèle, appelé modèle MDiffT, l'effet du temps sur la différence de températures est décrit par la quantité δ_1 et l'effet des facteurs aléatoires est décrit par la quantité ν_{0k} , avec σ_{intra} la variabilité 'intra bac' et $\sigma_{res-diff}$ la variabilité résiduelle.



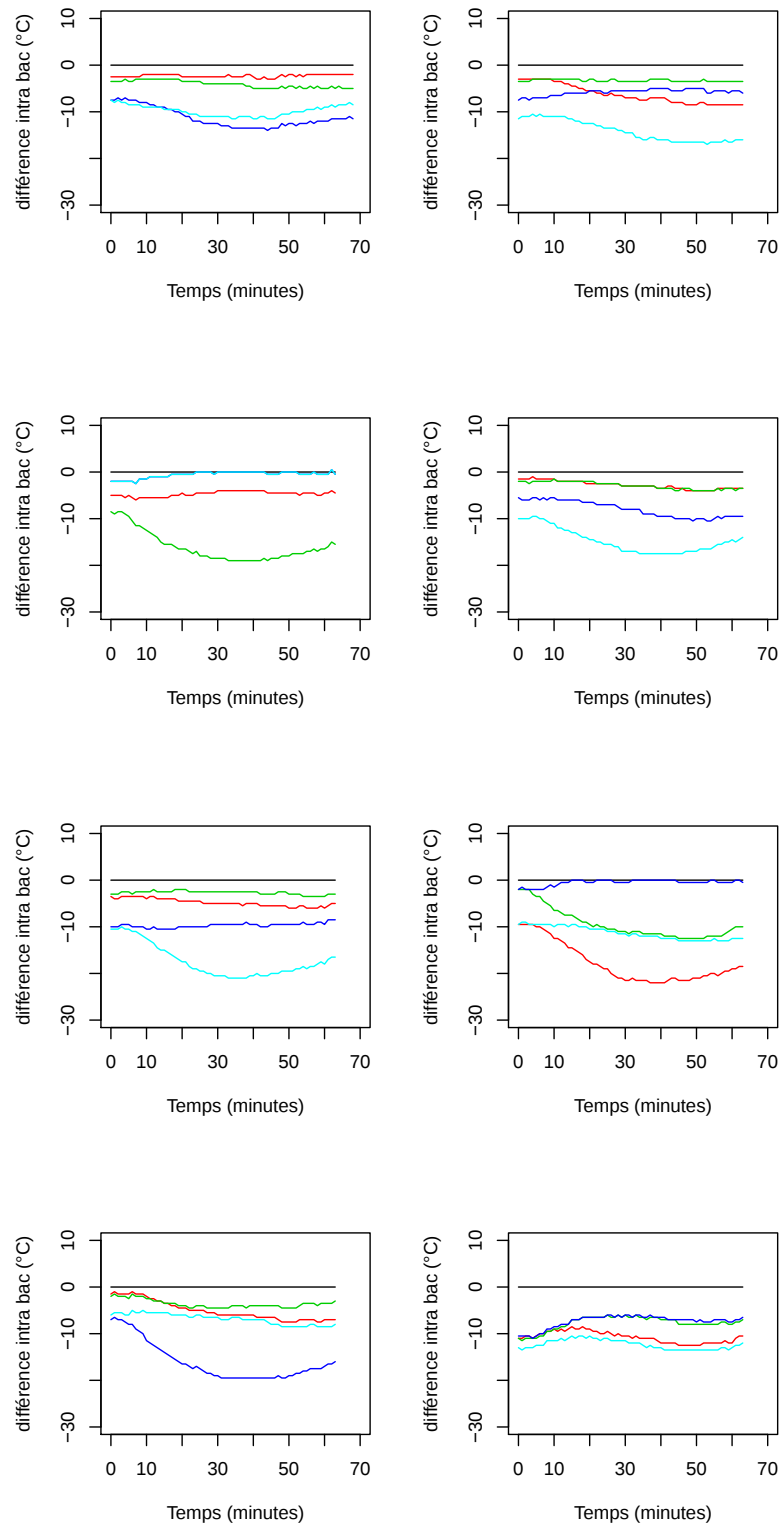


FIGURE 5.8 – Différences de températures observées dans les bacs (un graphe par bac). Les courbes de couleur représentent les profils enregistrés dans un bac.

Définition 5.2.3 (Modèle MDiffT)

$$\begin{cases} T_{bac,ik} - T_{cg,i} = \varphi_0 + v_{0k} + \delta_1 \times t + \varepsilon_{ik} \\ v_{0k} \sim N(0, \sigma_{intra}) \\ \varepsilon_{ik} \sim N(0, \sigma_{res-diff}) \end{cases} \quad (5.5)$$

Les paramètres du modèle MDiffT ont été estimés avec le package *lme4*. Ils sont présentés dans le tableau 5.3. Comme le montre ce tableau, l'effet du temps sur la différence est relativement faible, puisque la différence de températures ne diminue que de $2.5 \cdot 10^{-2}$ °C par minute. Pour autant, nous avons conservé cet effet dans le modèle car il décrit un phénomène physique attendu. La variabilité intra bac, liée au jour de production, au niveau du bac dans la cellule et à l'emplacement du capteur dans le bac, est 3 à 4 fois moins importante que la variabilité résiduelle, décrite par $\sigma_{res-diff}$.

Paramètre	Valeur
φ_0	-5.67 (SE = 0.56)
δ_1	$-2.48 \cdot 10^{-2}$ (SE = $4.1 \cdot 10^{-3}$)
σ_{intra}	1.60
$\sigma_{res-diff}$	5.61

TABLE 5.3 – Paramètres du modèle MDiffT.

Comme pour le modèle précédent, afin de vérifier l'aptitude du modèle MDiffT à prédire les différences de températures observées, nous avons simulé un grand nombre de différences en tirant à chaque fois un jeu de paramètres. Nous avons ensuite estimé la bande de variabilité à 95% des différences de températures simulées en estimant, pour chaque pas de temps d'une minute, l'intervalle de variabilité à 95% des différences simulées. Cette bande de variabilité a ensuite été comparée aux différences observées sur les profils enregistrés. Comme le montre la figure 5.9, les différences observées sont bien prédites par le modèle MDiffT. On peut noter qu'un certain nombre de simulations mènent à des différences positives, prédisant une température plus

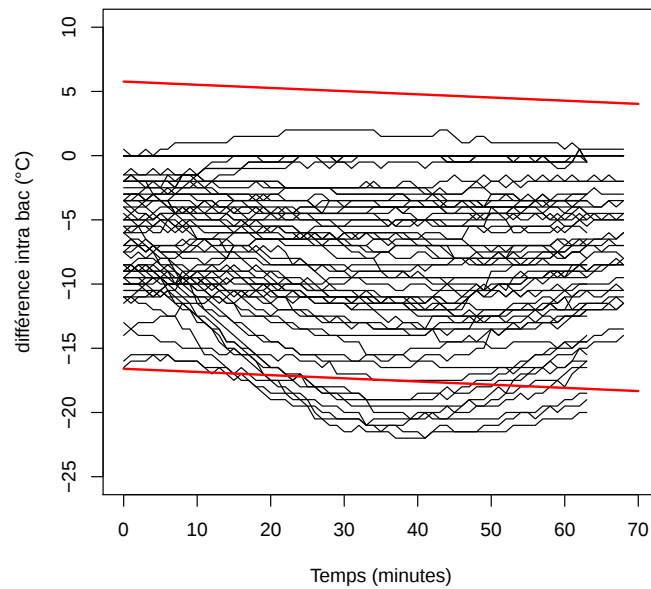


FIGURE 5.9 – Différences de températures observées et bande de variabilité à 95% différences de températures simulées. Les courbes noires représentent les différences observées, les courbes rouges les bornes de la bande de variabilité à 95% des différences simulées.

chaude au point k qu'au centre géométrique du bac, ce qui peut sembler-t-il arriver car le centre géométrique n'est pas forcément le point le plus chaud. Quoi qu'il en soit, en surestimant potentiellement la température à certains points du bac, le modèle décrit là encore des conditions propices à la croissance de *Clostridium perfringens*, ce qui rend ce modèle sécuritaire.

C'est pourquoi ce modèle a été choisi pour prédire la différence de températures entre les centres géométriques et les autres points des bacs.

Probabilité de sortie

Pour estimer les différentes probabilités de sortie du chariot selon les stratégies d'échantillonnage, nous avons réalisé des simulations de Monte Carlo en distinguant trois niveaux de variabilité, comme le montre la figure 5.10 :

- le jour de production j , dont l'effet porte sur la température d'entrée d'un centre géométrique et sur la vitesse de refroidissement.
- le bac i . En tirant Nv_1 valeurs de $\epsilon_{i,j}$ nous avons simulé Nv_1 profils thermiques de Nv_1 centres géométriques pour chaque jour j .
- les points k d'un même bac i . En tirant Nv_2 valeurs de $\epsilon_{i,k}$ nous avons simulé Nv_2 profils thermiques de Nv_2 points k d'un même bac i (pour chaque jour j).

Ainsi, pour chaque jour de production j , il a été possible d'obtenir, pour différents temps, les distributions empiriques des Nv_1 températures de centres géométriques et des $Nv_1 \times Nv_2$ températures de n'importe quels points dans la cellule, tous bacs confondus. Dès lors, il a été possible d'estimer la probabilité de sortie du chariot, égale à la probabilité qu'une ou deux températures de centre géométrique T_{cg} ou de points k n'importe où dans le produit soient inférieures ou égales à 10°C selon la stratégie d'échantillonnage.

Ces simulations ont été menées pour Nv jours de production, de façon à obtenir Nv valeurs de la probabilité de sortie pour chaque stratégie d'échantillonnage. Nous avons reporté dans la figure 5.11 les valeurs médianes de ces probabilités de sortie en fonction de la proportion de points dont la température est inférieure ou égale à 10°C pour différentes durées de refroidissement rapide.

Comme le montre cette figure, pour des proportions de points dont la température est inférieure ou égale à 10°C , $P(T_{bac} \leq 10^\circ\text{C})$, très faibles (à 50 minutes par exemple) ou, au contraire, très fortes (à 150 minutes par exemple), les différentes stratégies se valent et aboutissent à des probabilités de sortie relativement équivalentes. Par contre, en dehors de ces $P(T_{bac} \leq 10^\circ\text{C})$ extrêmes, les stratégies ne sont plus équivalentes : par rapport à la stratégie actuelle, mesurer une température de centre géométrique abaisse fortement la probabilité de sortie pour une même $P(T_{bac} \leq 10^\circ\text{C})$, de même que le fait de mesurer deux températures, que ce soient des températures de centres géométriques ou non.

Pour mesurer l'impact de ces probabilités de sortie différentes d'une stratégie d'échantillonnage à une autre, nous avons estimé les métriques du risque, c'est-à-dire le critère de performance et le risque de maladie, pour

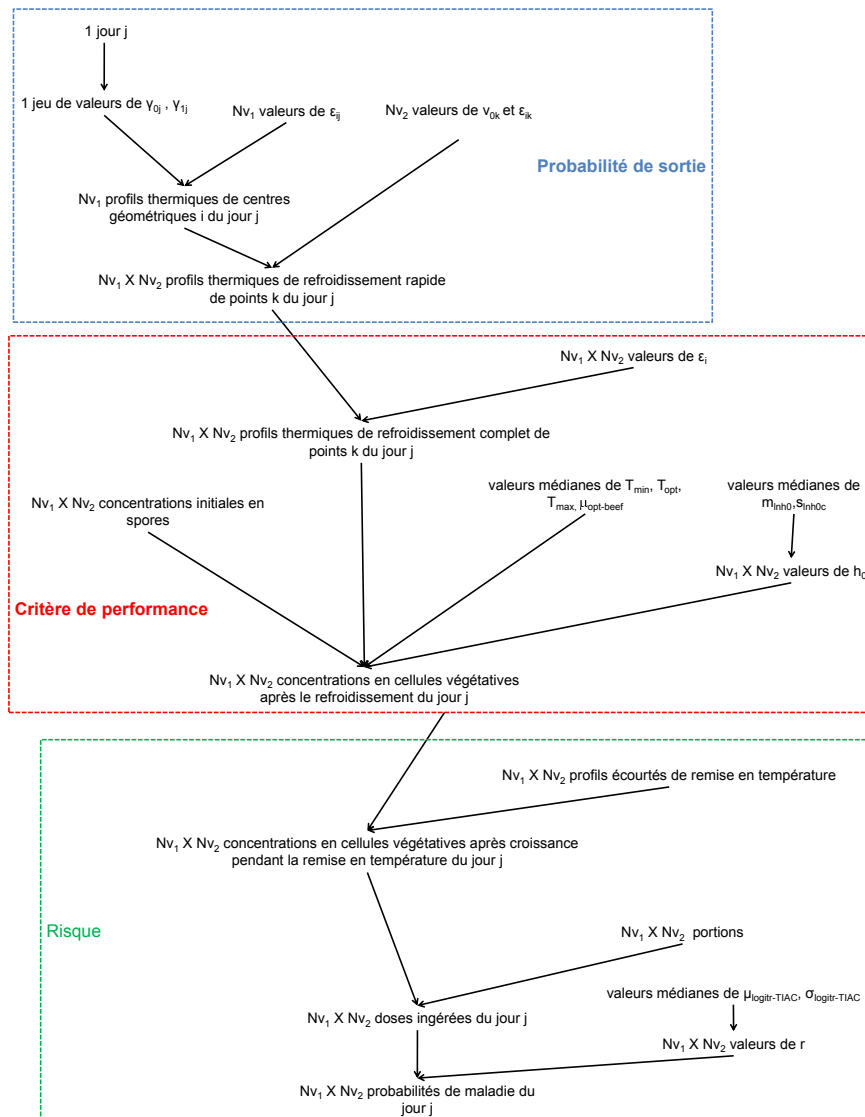


FIGURE 5.10 – Démarche de simulation entreprise pour estimer la probabilité de sortie et les métriques du risque suivant les stratégies d'échantillonnage. Trois étapes se distinguent : la simulation de la probabilité de sortie (partie bleue), à partir des simulations de températures de centres géométriques et de n'importe quels points de n'importe quel bac, puis la simulation de la concentration en cellules végétatives après la phase de croissance pendant le refroidissement complet (en cellule puis en chambre froide) (partie rouge) et enfin la simulation du risque de maladie lié à la consommation du plat après la phase de croissance pendant la remise en température (partie verte).

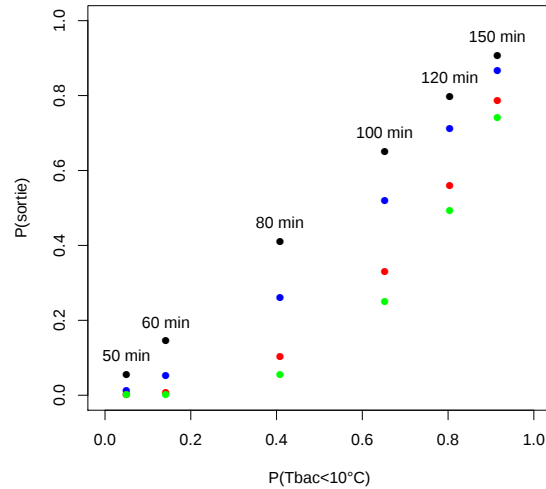


FIGURE 5.11 – Probabilité de sortir le chariot de la cellule de refroidissement rapide suivant la stratégie d'échantillonnage : prise d'une température n'importe où dans un bac (stratégie actuelle) ou au centre géométrique d'un bac, prise de deux températures n'importe où dans 2 bacs différents ou prise de deux températures à 2 centres géométriques de 2 bacs différents. $P(T_{bac} \leq 10^\circ C)$ est la proportion simulée de points situés à n'importe quels endroits de n'importe quels bacs et dont la température est égale ou inférieure à $10^\circ C$.

différents scénarios correspondant à des durées de refroidissement rapide de 50, 60, 80, 100, 120 et 150 minutes.

5.2.2 Risque selon les stratégies

Pour estimer le critère de performance et le risque de maladie associés à chaque stratégie et à chaque durée de refroidissement rapide, nous avons

- utilisé les $Nv_1 \times Nv_2$ profils thermiques simulés précédemment, que nous avons prolongés pour simuler le refroidissement en chambre froide, afin de simuler la croissance de *Clostridium perfringens* et d'estimer le critère de performance,
- puis simulé les étapes ultérieures afin d'estimer le risque. Nous nous sommes placés dans le cas de figure le pire en arrêtant les profils ther-

miques de remise en température avant que celle-ci ne permette la destruction des cellules végétatives, c'est-à-dire avant 53°C. Dans ce cas de figure, l'étape de remise en température ne peut que provoquer la croissance de *Clostridium perfringens*.

La première étape consistait à décrire la température n'importe où dans le produit pendant la phase en chambre froide.

Modèle thermique de la chambre froide

Une fois les produits sortis de la cellule de refroidissement, ceux-ci passaient directement en chambre froide, où ils terminaient leur refroidissement qui correspond, là encore, à un modèle thermique exponentiel.

Dans ce modèle, nous avons cherché à modéliser l'évolution des températures de tous les points des bacs, sans distinguer le centre géométrique des autres points. Cette fois-ci encore, nous avons simplifié l'équation du modèle thermique exponentiel en fixant T_a à 0 °C, ce qui nous a permis de transformer l'équation 5.2 comme suit :

$$\ln T = \ln T_0 - k't \quad (5.6)$$

avec $\ln T$ et $\ln T_0$ les logarithmes népériens des températures de n'importe quel point des bacs et k' le taux de refroidissement exponentiel dans la chambre froide.

Dans ce modèle, la température initiale T_0 d'un point d'un bac correspond à la température de ce point à la sortie de la cellule de refroidissement et nous est donnée par la combinaison des 2 modèles précédents (modèle des températures des centres géométriques et modèle de la différence de températures). Dans la chambre froide, la température de l'air était relativement constante. De plus, avant d'être placés en chambre froide, les chariots étaient entièrement entourés de cellophane, ce qui limitait la variabilité de la vitesse du courant d'air au contact des bacs. Dans ces conditions de stabilité de la vitesse du courant d'air et de la température de l'air au contact des bacs, la variabilité de la vitesse de refroidissement, donc de k' , peut être

considérée comme faible (Rabi *et al.*, 2010). Aussi nous n'avons pas décrit de variabilité de cette vitesse de refroidissement dans notre modèle MCF (Eq. 5.7).

Définition 5.2.4 (Modèle MCF)

$$\ln T_i = \ln T_0 - k't + \varepsilon_i \quad \varepsilon_i \sim N(0, \sigma) \quad (5.7)$$

La température initiale T_0 étant fournie par les modèles thermiques précédents, les paramètres de ce modèle ont été estimés en utilisant la méthode des moindres carrés :

$$k' = 5.42.10^{-3}$$

$$\sigma = 1.26$$

Estimation du risque selon les stratégies

Etant donné que dans la simulation des profils thermiques nous n'avons modélisé que la variabilité, nous avons modélisé uniquement la variabilité quand nous avons utilisé le modèle de germination croissance et le modèle dose-réponse, en utilisant la valeur médiane des paramètres incertains, comme présenté dans la figure 5.10. Ainsi, pour chaque jour de production j , à partir des $Nv_1 \times Nv_2$ concentrations initiales en spores et des $Nv_1 \times Nv_2$ valeurs de h_0 tirées au sort, nous avons simulé $Nv_1 \times Nv_2$ croissances, afin d'estimer le critère de performance, et $Nv_1 \times Nv_2$ concentrations microbiennes à la fin du refroidissement complet.

A partir de ces $Nv_1 \times Nv_2$ concentrations microbiennes à la fin du refroidissement complet, nous avons estimé les $Nv_1 \times Nv_2$ concentrations microbiennes à la fin de la remise en température en tirant au sort avec remise $Nv_1 \times Nv_2$ profils parmi les profils enregistrés mais en n'utilisant que la partie du profil au-dessous de 53°C . Ces $Nv_1 \times Nv_2$ concentrations microbiennes à la fin de la remise en température nous ont ensuite permis de simuler $Nv_1 \times Nv_2$ doses ingérées et $Nv_1 \times Nv_2$ probabilités de maladie.

Le critère de performance défini pour cette étape est d'obtenir une croissance inférieure à $1 \log_{10} cfu.g^{-1}$. Dans la figure 5.12, la probabilité de ne pas respecter ce critère et d'obtenir une croissance supérieure ou égale à 1

$\log_{10}cfu.g^{-1}$ est reportée en fonction de la $P(T_{bac} \leq 10^{\circ}C)$ pour différentes durées de refroidissement rapide. La variabilité de la probabilité d'obtenir une croissance supérieure ou égale à $1 \log_{10}cfu.g^{-1}$ résulte de la variabilité décrite dans le modèle de germination croissance mais aussi de la variabilité des profils thermiques. Malgré ces deux sources importantes de variabilité, la variabilité de la probabilité d'obtenir une croissance supérieure ou égale à $1 \log_{10}cfu.g^{-1}$ est relativement faible. Assez logiquement, plus la probabilité qu'une température prise n'importe dans un bac soit inférieure ou égale à $10^{\circ}C$ est faible, plus la probabilité d'obtenir une croissance supérieure ou égale à $1 \log_{10}cfu.g^{-1}$ est forte mais cette dernière reste tout de même relativement minime (de l'ordre de 0.12 pour une durée de refroidissement rapide de 50 minutes).

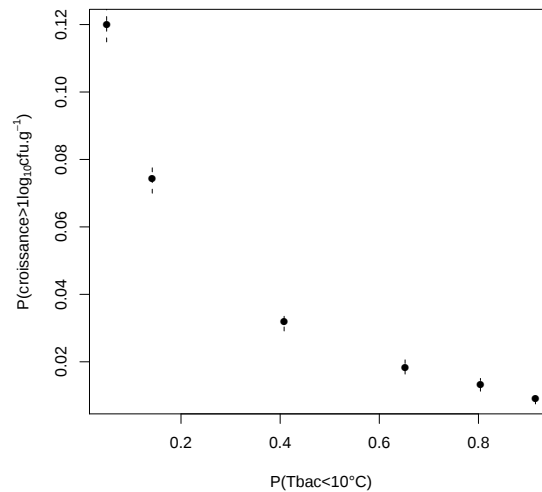


FIGURE 5.12 – Probabilité d'obtenir une croissance supérieure ou égale à $1 \log_{10}cfu.g^{-1}$ au terme du refroidissement complet. Les points représentent les prédictions médianes, les segments pointillés les intervalles de variabilité à 95%.

Pour estimer l'efficacité de chaque stratégie d'échantillonnage au regard du critère de performance, nous avons reporté la probabilité de sortir un chariot de la cellule de refroidissement en fonction de la probabilité d'obtenir une croissance supérieure ou égale à $1 \log_{10}cfu.g^{-1}$ dans la figure 5.13.

On s'attend à ce que la probabilité de sortie soit faible quand la probabilité d'obtenir une croissance supérieure ou égale à $1 \log_{10}cfu.g^{-1}$ est importante. A cet égard, pour des durées de refroidissement extrêmes (50 ou 150 minutes), les 4 stratégies sont pratiquement équivalentes. Mais pour des durées intermédiaires, pour une même probabilité d'obtenir une croissance supérieure ou égale à $1 \log_{10}cfu.g^{-1}$, la probabilité de sortie peut varier du simple au quadruple. Si les opérateurs ne prennent qu'une température, le fait de prendre une température de centre géométrique permet d'abaisser la probabilité de sortie. Mais les deux stratégies les plus efficaces sont celles dans lesquelles deux températures sont mesurées au terme du refroidissement rapide et le fait de prendre des températures de centres géométriques permet encore d'abaisser la probabilité de sortie.

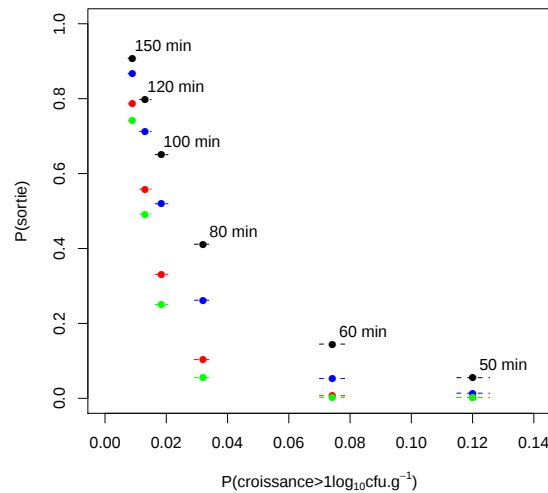


FIGURE 5.13 – Probabilités de sortir un chariot de la cellule de refroidissement rapide et d'obtenir une croissance supérieure ou égale à $1 \log_{10}cfu.g^{-1}$ au terme du refroidissement complet suivant la stratégie d'échantillonnage : prise d'une température n'importe où dans un bac (stratégie actuelle) ou **au centre géométrique d'un bac**, prise de deux températures **n'importe où dans 2 bacs différents** ou prise de deux températures **à 2 centres géométriques de 2 bacs différents**. Les points représentent les prédictions médianes, les segments pointillés les intervalles de variabilité à 95%.

Le risque de maladie moyen estimé pour chaque durée de refroidissement rapide est reporté dans le tableau 5.4. Le risque moyen prédit varie de manière importante en fonction de la durée du refroidissement rapide, puisqu'en 50 et 150 minutes de refroidissement rapide, il est divisé par 23.

Durée de refroidissement rapide (min)	Risque moyen de maladie
50	$2.3.10^{-2}$
60	$1.5.10^{-2}$
80	$3.8.10^{-3}$
100	$2.1.10^{-3}$
120	$1.1.10^{-3}$
150	$1.0.10^{-3}$

TABLE 5.4 – Probabilité moyenne de maladie en fonction de la durée du refroidissement rapide.

Dans la figure 5.14, nous avons reporté les probabilités de sortie en fonction du risque moyen pour les différentes stratégies d'échantillonnage. On s'attend à ce que la probabilité de sortie soit faible pour des risques moyens relativement élevés. Là encore, pour des valeurs intermédiaires de durée de refroidissement, pour un même risque moyen les stratégies donnent des probabilités de sortie assez différentes, les stratégies les plus efficaces étant encore celles qui prévoient deux prises de température.

5.3 Pilotage de la remise en température

L'étape de remise en température, si elle conduit à une température finale à coeur du produit supérieure à 53°C, peut entraîner la destruction des cellules végétatives de *Clostridium perfringens*. Pour proposer des mesures de maîtrise sanitaire à cette étape, nous avons décidé de ne modéliser que la variabilité sans prendre en compte l'incertitude, assez faible en comparaison

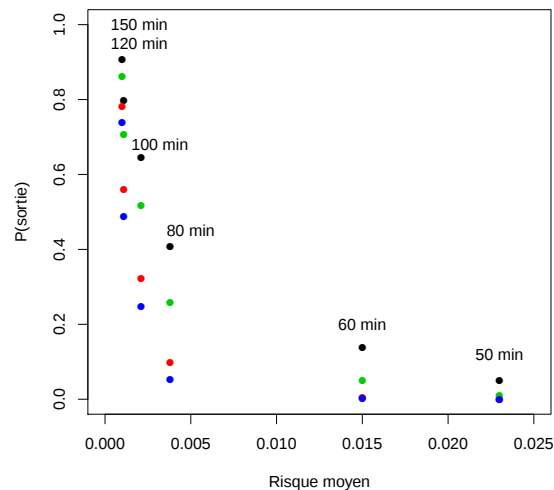


FIGURE 5.14 – Probabilités de sortir un chariot de la cellule de refroidissement rapide et risque moyen de maladie suivant la stratégie d’échantillonnage : prise d’une température n’importe où dans un bac (stratégie actuelle) ou au centre géométrique d’un bac, prise de deux températures n’importe où dans 2 bacs différents ou prise de deux températures à 2 centres géométriques de 2 bacs différents.

de la variabilité, comme le montre la figure 3.6. Nous avons donc utilisé le modèle ajusté avec le package *lme4*.

La figure 5.15 montre un exemple de simulation sur un profil, en ciblant une destruction de $3 \log_{10} ufc.g^{-1}$ de *Clostridium perfringens*. Pour ce profil, nous avons estimé la destruction ainsi que sa bande de variabilité décrivant la variabilité de D_{ref} . Comme le montre cette figure, la destruction de *Clostridium perfringens* peut être très rapide. La cible de $3 \log_{10} ufc.g^{-1}$ de destruction a été fixée à partir des simulations réalisées en utilisant les profils enregistrés. En effet, la dose maximale estimée à partir de ces simulations a été estimée à $7.7 \log_{10} ufc$, ce qui correspond à un risque de maladie moyen de 0.42 [0.24,0.65]. Nos prédictions de risque moyen avec le modèle ‘TIAC’, présentées dans le tableau 4.4, montrent qu’un risque moyen prédit proche de 0.05 correspond à une dose de $5 \log_{10} ufc$, soit pratiquement $3 \log_{10} ufc$ de moins que la dose maximale prédite. Sachant que la taille de portion va-

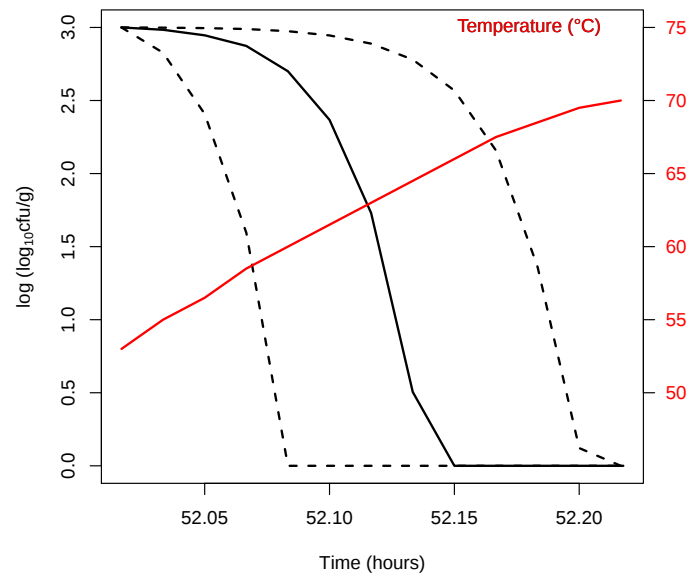


FIGURE 5.15 – Destruction thermique des cellules de *Clostridium perfringens* prédite par le modèle 3 et sa bande de variabilité. La concentration prédite est représentée par la courbe noire en trait plein et sa bande de variabilité par les courbes noires en pointillés. La courbe rouge représente la courbe de température.

rie entre 150 et 200 grammes, nous avons fixé une destruction cible de $3 \log_{10} ufc.g^{-1}$.

Dès lors, cette étape apparaît comme une étape ‘assainissante’, dont la maîtrise peut avoir un impact important sur la salubrité du produit. L’annexe IV de l’arrêté du 21 décembre 2009 (relatif aux règles sanitaires applicables aux activités de commerce de détail, d’entreposage et de transport de produits d’origine animale et denrées alimentaires en contenant) traite des dispositions particulières aux établissements de restauration collective. Cette annexe comporte des préconisations en matière de remise en température : ‘La remise en température des préparations culinaires à servir chaudes est opérée de telle manière que leur température ne demeure pas pendant plus d’une heure à des valeurs comprises entre + 10 °C et la température de remise au consommateur. En tout état de cause, cette température ne peut être

inférieure à $+ 63^{\circ}\text{C}$, sauf si une analyse des dangers validée a montré qu'une température inférieure n'entraîne pas de risque pour la santé du consommateur.'

En l'absence d'analyse des dangers validée, ces exigences réglementaires portent donc sur deux paramètres :

- la température finale à coeur du produit, dont le minimum est fixé à 63°C .
- la vitesse de réchauffement, qui doit être supérieure ou égale à $53^{\circ}\text{C.h}^{-1}$.

D'après nos observations à l'hôpital, sur 203 profils pendant 14 jours, présentés dans la figure 5.16, ces exigences ne sont pas toujours respectées. En particulier, la maîtrise de la vitesse de réchauffement semble difficile, puisque dans 15% des cas, les taux de réchauffement linéaires estimés à partir des profils enregistrés sont inférieurs à $53^{\circ}\text{C.h}^{-1}$. Dès lors, nous avons proposé, pour cette étape, trois mesures de maîtrise ne comportant aucune obligation de maîtriser la pente du réchauffement.

Pour proposer ces mesures de maîtrise, nous nous sommes renseignés sur les évolutions du matériel de remise en température. Parmi ces évolutions notamment, les cellules de remise en température récentes sont équipées de capteurs permettant de mesurer en temps réel la température au coeur du produit. Les cellules de remise en température ne sont pas équipées de ce système mais on peut imaginer d'utiliser des sondes thermiques semblables à celles qui équipent les cellules de refroidissement rapide et de les relier à un dispositif externe de contrôle. Dans ces conditions, il est possible de définir 3 mesures de maîtrise sanitaire basées sur :

- la durée au dessus de 53°C (DA53),
- la température finale à coeur du produit (FTF),
- la somme des températures au-dessus de 53°C (ST53), définie comme la somme des températures atteintes à chaque minute au-dessus de 53°C .

Dans un premier temps, nous avons proposé un modèle pour décrire la variabilité des profils thermiques observés puis nous avons cherché à estimer les valeurs seuils de chaque mesure de maîtrise sanitaire avant de comparer leur efficacité et leur coût.

5.3.1 Modèle thermique

La remise en température se fait dans les services dans des chariots conçus à cet effet et reliés à des bornes permettant le stockage à froid de la partie froide de chaque plateau et la remise en température de la partie du plateau qui contient le plat principal.

D'après ce que nous avons observé sur les profils enregistrés, présentés dans la figure 5.16, la remise en température est linéaire, ce qui nous a conduit à décrire cette phase par un modèle thermique linéaire.

Définition 5.3.1 (Modèle thermique linéaire)

Si on considère T_0 la température initiale du produit dans une assiette (en °C), t le temps (en h) et k le taux de réchauffement linéaire (en h^{-1}), l'évolution de la température T au coeur du produit est décrite par :

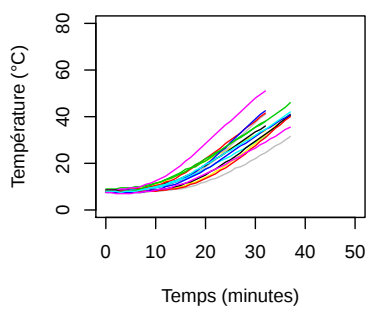
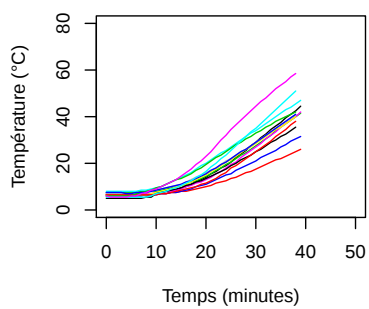
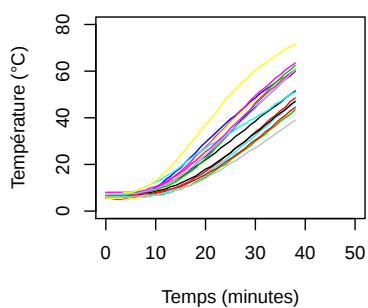
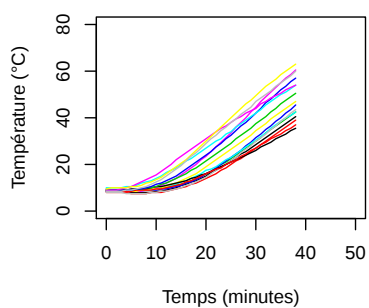
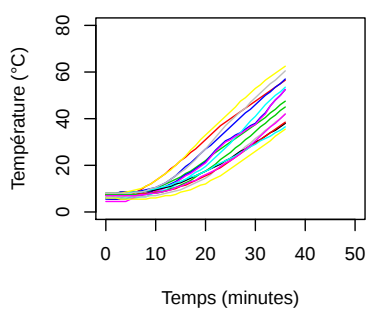
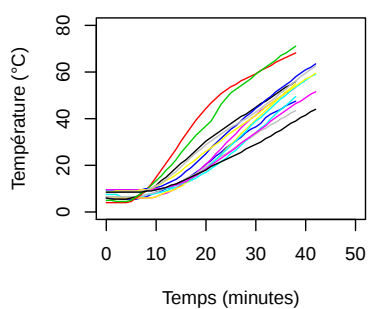
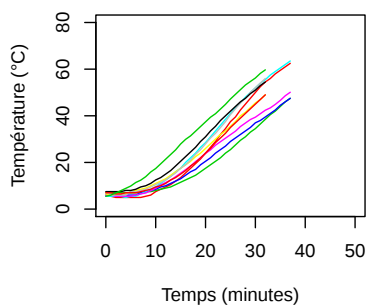
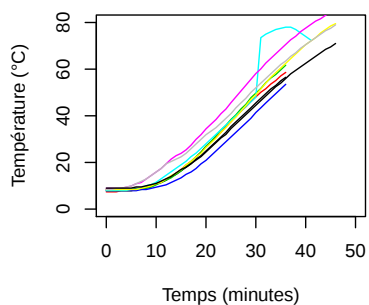
$$T = T_0 + kt \quad (5.8)$$

Dans ce modèle, seule la variabilité du paramètre k nous intéresse. De la même manière que pour le refroidissement rapide, nous avons cherché à modéliser la variabilité de ce paramètre k en identifiant comme source de variabilité potentielle le jour de distribution *jour* car d'un jour à un autre, le plat est remis en température dans des services et des bornes différentes et la mise en place des plateaux dans chaque borne peut varier. Nous avons donc défini un modèle à effets mixtes (Eq. 5.9), avec un effet aléatoire du facteur *jour* uniquement sur la vitesse de la remise en température, soit k la pente du modèle thermique linéaire.

Définition 5.3.2 (Modèle de remise en température)

$$\begin{cases} T_i = T_{0i} + k_i \times t + \varepsilon_i \\ k_i = k + \beta_{jr-i} \\ \beta_{jr-i} \sim N(0, \sigma_{jour-RT}) \\ \varepsilon_i \sim N(0, \sigma_{RT}) \end{cases} \quad (5.9)$$

Etant donné que la destruction thermique des cellules végétatives débute



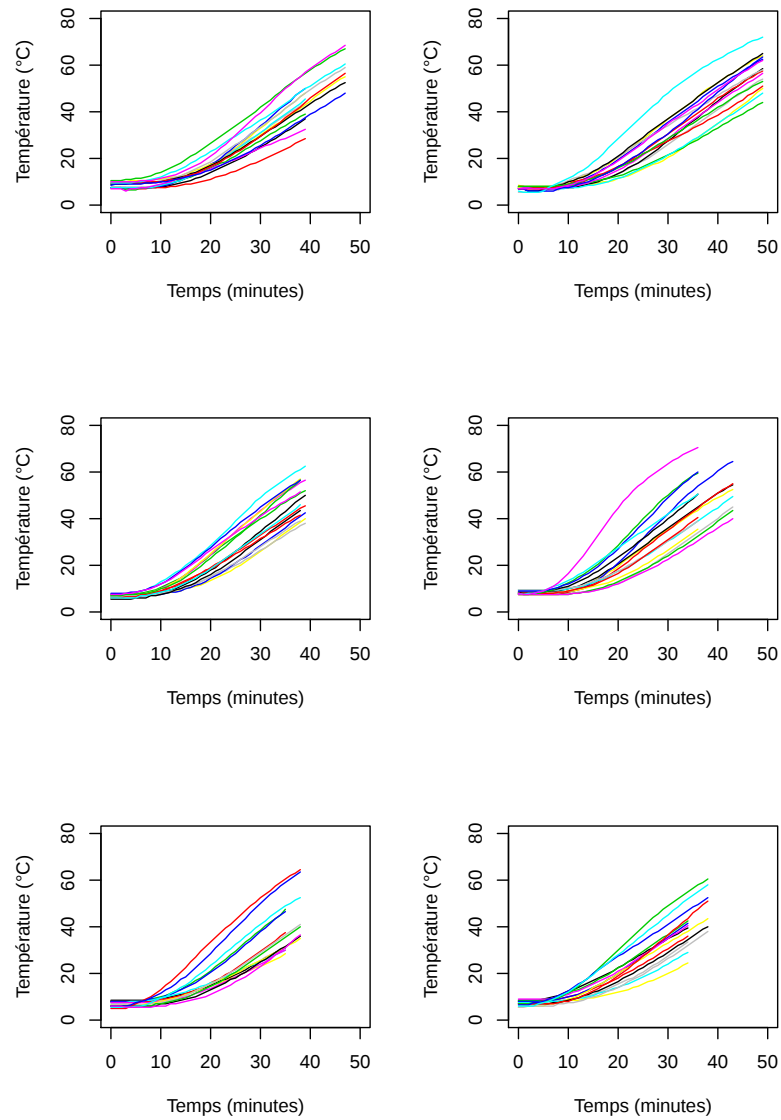


FIGURE 5.16 – Profils thermiques de remise en température enregistrés à l'hôpital pendant 14 jours de production (un graphe par jour). Les courbes de couleur représentent les profils enregistrés pour un jour de production.

à 53°C, nous avons fixé pour nos simulations ultérieures la température initiale T_0 à 53°C. Les paramètres de ce modèle sont :

$$k = 104.1$$

$$\sigma_{\text{jour-RT}} = 10.1$$

$$\sigma_{RT} = 3.15$$

La variabilité inter jour, $\sigma_{\text{jour-RT}}$, apparaît ici importante, plus importante que la variabilité résiduelle, σ_{RT} .

Nous avons utilisé ce modèle pour simuler la partie finale des profils de remise en température et estimer les valeurs seuils de chaque mesure de maîtrise sanitaire.

5.3.2 Estimation des valeurs seuils de chaque mesure de maîtrise sanitaire

Ces valeurs seuils doivent être uniques pour chaque mesure. Pour autant, elles doivent être estimées en tenant compte des sources de variabilité :

- la variabilité biologique de D_{ref} décrite dans le modèle de destruction thermique,
- la variabilité observée de la vitesse de réchauffement, décrite par le modèle de remise en température (Eq. 5.9).

Pour estimer les valeurs seuils des 3 mesures, nous avons ciblé une destruction de 3 $\log_{10}cfu$ et réalisé des simulations de Monte Carlo à une dimension pour estimer les valeurs des 3 mesures de maîtrise sanitaire permettant d'atteindre cette cible :

- en tirant au sort une valeur de $\log_{10}D_{ref}$ dans la distribution normale $N(\log_{10}D_{ref,0}, \sigma_{\log D})$
- en tirant au sort une valeur de k et en simulant le profil thermique correspondant à partir d'une température initiale fixée à 53°C,
- en simulant la destruction de *Clostridium perfringens* le long de ce profil thermique
- en arrêtant la simulation dès que la destruction ciblée avait été atteinte
- en estimant les valeurs de DA53, FTF et ST53 correspondantes

- en réitérant cette simulation N_v fois pour obtenir des distributions empiriques des 3 mesures de maîtrise.

La valeur seuil de chaque mesure de maîtrise a ensuite été définie à partir du 97.5^{ème} percentile de sa distribution empirique, comme le montre le tableau 5.5. Malgré une variabilité importante de D_{ref} et de la vitesse de réchauffement, décrite par le paramètre k , la variabilité des valeurs de mesures de maîtrise reste raisonnable. La valeur seuil de FTF est bien supérieure aux 63°C préconisés par la réglementation. De même, si on traduit l'exigence réglementaire de passage de 10 à 63 °C en valeur de DA53, on obtient une DA53 de 11.3 minutes, ce qui est bien inférieur à la valeur seuil estimée pour cette mesure.

Mesure de maîtrise	Unité	Intervalle de variabilité à 95%	Valeur seuil
DA53	min	[4,18]	18
FTF	°C	[58.3,68.7]	68.7
ST53	°C.min	[226,1082]	1082

TABLE 5.5 – Valeurs seuils estimées pour chaque mesure de maîtrise.

Ces 3 mesures de maîtrise sanitaire peuvent être mises en place par les professionnels. Dans un deuxième temps, nous avons voulu vérifier leur efficacité et comparer leur coût.

5.3.3 Comparaison des mesures de maîtrise

Pour les professionnels, la mesure de maîtrise 'idéale' est efficace sans être trop coûteuse. Pour mesurer ces deux aspects et comparer les 3 mesures de maîtrise, nous avons tout d'abord défini deux critères de comparaison :

- la proportion d'échecs de chaque mesure par rapport à une cible de 3 $\log_{10} ufc.g^{-1}$ de destruction. D'après la définition des valeurs seuils, on s'attend à ce que cette proportion soit de l'ordre de 2.5% pour chaque mesure.

- le temps nécessaire pour atteindre la valeur seuil de chaque mesure. Plus ce temps est court, moins la mesure est coûteuse.

Nous avons donc cherché à identifier, parmi les 3 mesures de maîtrise proposées, celle qui, pour une proportion d'échec assez basse, requiert le temps le plus court. Pour ce faire, comme précédemment, nous avons réalisé des simulations de Monte Carlo à une dimension mais cette fois-ci, nous avons arrêté chaque simulation à l'atteinte des valeurs seuils de chaque mesure de maîtrise de manière à pouvoir estimer, pour chaque simulation, d'une part, la destruction prédite et, d'autre part, les temps correspondant à l'atteinte des 3 valeurs seuils. En réitérant cette simulation N_v fois, nous avons pu estimer la proportion d'échecs de chaque mesure et obtenir des distributions empiriques des temps nécessaires pour atteindre les valeurs seuils des 3 mesures de maîtrise.

Nous avons aussi estimé la proportion d'échecs et le temps nécessaire pour atteindre la valeur réglementaire. Pour cela, nous avons, là aussi, réalisé des simulations de Monte Carlo à une dimension en arrêtant la simulation dès que la température à coeur du produit atteignait 63°C avec des valeurs de k simulées à partir du modèle 5.9 mais tronquées à gauche à 53°C.h^{-1} , valeur minimum réglementaire.

Les résultats de ces comparaisons sont présentés dans le tableau 5.6. Si le temps nécessaire pour atteindre les 63°C réglementaires est le plus faible de tous les temps estimés dans ce tableau, l'efficacité de cette mesure est aussi la plus faible, avec seulement 39.11% des destructions simulées qui atteignent la cible. A l'opposé, les proportions d'échec des 3 mesures de maîtrise proposées sont faibles et concordent avec la façon dont chaque valeur seuil a été estimée. Mais les temps nécessaires pour atteindre chaque valeur seuil diffère beaucoup d'une mesure à l'autre, comme le montre la figure 5.17.

La variabilité du temps nécessaire pour atteindre la valeur seuil de ST53 est faible puisque toutes les valeurs estimées sont comprises entre 16 et 20 minutes. Au contraire, la variabilité du temps nécessaire pour atteindre la valeur seuil de FTF apparaît nettement plus importante. Si la valeur seuil

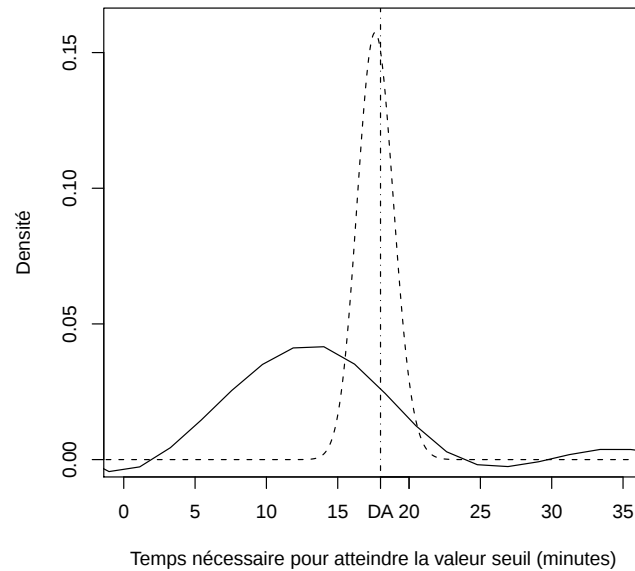


FIGURE 5.17 – Distributions des temps nécessaires pour atteindre la valeur seuil de DA53 (ligne pointillée verticale), FTF (ligne en trait plein) et ST53 (courbe pointillée).

de FTF est atteinte avant celle de ST53 dans 77% des cas et avant celle de DA53 dans 85% des cas, pour certains profils thermiques correspondant à des réchauffements particulièrement lents la valeur seuil de FTF n'est atteinte qu'après un long moment, plus de 25 minutes dans 4.5% des cas.

C'est pourquoi nous avons aussi proposé de combiner deux mesures de maîtrise et testé toutes les combinaisons possibles. Comme le montre le tableau 5.6, ces combinaisons, en gardant les mêmes valeurs seuils pour chaque mesure, ne semblent pas pénaliser excessivement l'efficacité puisque les proportions d'échecs estimées avec chaque combinaison restent en dessous de 5%. La combinaison entre DA53 et ST53, dans laquelle les simulations sont arrêtées dès que la somme des températures atteint 1082°C avant 18 minutes, ou après 18 minutes au-dessus de 53°C , ne réduit pas énormément ni le temps médian nécessaire, ni son intervalle de variabilité. Ce sont les combinaisons avec FTF qui sont les moins consommatrices de temps tout en restant rela-

tivement efficaces.

Mesure de maîtrise	Valeur seuil	Proportion d'échecs	Temps nécessaire pour atteindre la valeur seuil (min)
Réglementation	63°C et $k > 53^\circ\text{C.h}^{-1}$	60.89%	7.6 [5,11]
DA53	18 min	2.37%	18
FTF	68.7 °C	2.35%	12.5 [7.9,28.8]
ST53	1082 °C.min	2.39%	18 [16,19]
DA53 et FTF	18 min ou 68.7 °C	4.76%	12.5 [7.9,18]
DA53 et ST53	18 min ou 1082 °C.min	2.80%	18 [16,18]
FTF et ST53	68.7 °C ou 1082 °C.min	4.48%	12.5 [7.9,19]

TABLE 5.6 – Comparaison des mesures de maîtrise sanitaire. La proportion d'échecs est la proportion de simulations pour lesquelles la destruction cible de $3 \log_{10} ufc.g^{-1}$ n'a pas été atteinte. La première valeur du temps est le temps médian nécessaire pour atteindre le seuil de chaque mesure de maîtrise. Les valeurs entre crochets représentent les bornes de l'intervalle de variabilité à 95%.

La combinaison entre FTF et DA53 paraît particulièrement intéressante pour deux raisons :

- pour des cellules de remise en température qui ne seraient pas encore équipées des sondes nécessaires à la mise en place de ces mesures de maîtrise, il suffirait d'acheter des sondes, de les planter au coeur du produit pour suivre en temps réel la température (FTF) et mesurer le temps écoulé depuis 53°C (DA53). Un professionnel qui souhaiterait se baser sur la somme des températures ST53 devrait, en plus de cet équipement, se procurer le logiciel permettant de calculer cette somme en temps réel, ce qui serait plus coûteux.
- cette combinaison apparaît légèrement moins coûteuse en temps que les autres combinaisons proposées.

Mais on peut encore augmenter l'efficacité de cette combinaison en définissant d'autres valeurs de seuils. Nous avons testé l'efficacité de cette combinaison avec différentes valeurs de seuils pour FTF et DA53 en estimant, pour cha-

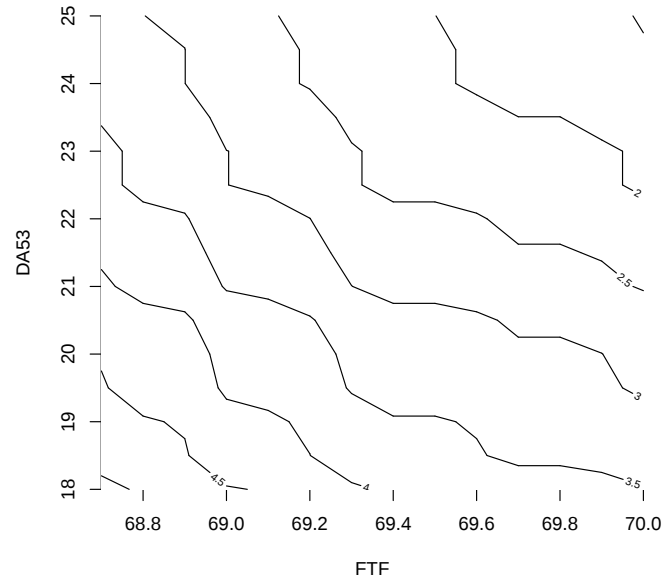


FIGURE 5.18 – Proportion d’échecs de la combinaison entre FTF et DA53 en fonction de la valeur seuil de chaque mesure de maîtrise.

cune de ces valeurs, la proportion d’échecs. Les estimations sont présentées dans la figure 5.18. Pour augmenter l’efficacité et réduire la proportion d’échec, les professionnels peuvent augmenter la valeur seuil de l’une ou l’autre des mesures de maîtrise, voire les deux. Par exemple, en fixant les valeurs seuils de FTF et DA53 à 70°C et 20 minutes, ils obtiendraient une combinaison aussi efficace que chaque mesure de maîtrise prise séparément pour un temps de 14.1 [8.5,20] minutes.

5.4 Discussion

En appliquant les modèles microbiens sur les profils enregistrés pour prédire la concentration finale en cellules végétatives de *Clostridium perfringens* dans le plat au moment de sa consommation, les simulations nous ont permis de prédire une faible dose ingérée de *Clostridium perfringens* par les patients, ce qui se traduit, après application du modèle dose réponse, par un risque très

faible de maladie, lié

- à une faible contamination initiale du produit. Seules les épices ont été identifiées comme "porteuses" de spores de *Clostridium perfringens* mais leur dilution dans la préparation limite la contamination initiale du produit.
- à une bonne conduite du refroidissement rapide, permettant de limiter la croissance de *Clostridium perfringens*.
- à l'étape de remise en température, qui permet de détruire rapidement les cellules végétatives de *Clostridium perfringens*.

Pour autant, nous avons tout de même identifié les étapes clés de ce procédé et proposé des mesures de maîtrise sanitaire pour chacune. Si l'échantillonnage des températures en fin de refroidissement rapide permet seulement de limiter la croissance de *Clostridium perfringens*, le pilotage de la remise en température permet de détruire les cellules végétatives. On pourrait être tenté de ne s'appuyer que sur la remise en température, qui, en tant qu'étape à la fois assainissante et finale, apparaît comme l'étape-clé avec comme mesure de maîtrise le suivi de la température finale dans le produit jusqu'à une certaine durée au-dessus de 53°C. Pourtant il semble important de conserver ces deux mesures de maîtrise sanitaire, pour plusieurs raisons :

- en ne s'appuyant que sur la remise en température sans chercher à maîtriser le refroidissement, on court le risque, en cas de panne ou d'autre perturbation de la remise en température, de proposer à la consommation des produits plus fortement contaminés que ceux qui sont produits actuellement et pour lesquels la remise en température a été inefficace.
- dans le cas de restaurations collectives où les plats sont préparés dans un atelier et remis en température dans un autre, le fait de s'appuyer sur l'étape finale, à la charge exclusive du deuxième atelier, peut poser des problèmes de responsabilité en termes de sécurité sanitaire.
- les barèmes des mesures de maîtrise durant la remise en température (DA53, FTF et ST53) ont été établis pour une destruction cible de $3 \log_{10} u.f.c.g^{-1}$, compte tenu de la faible contamination du plat après la phase de croissance et de la faible probabilité d'ingérer une dose rela-

tivement forte (de l'ordre de $7 - 8 \log_{10} ufc$) de cellules végétatives de *Clostridium perfringens*. Si on ne cherche pas à maîtriser le refroidissement rapide, la contamination du plat avant la phase de destruction risque d'être plus élevée, entraînant une augmentation des valeurs seuils des trois mesures de maîtrise donc une potentielle altération des qualités nutritionnelles du produit (perte de vitamines par exemple).

En ce qui concerne plus particulièrement le refroidissement rapide, le risque moyen de maladie évolue de manière importante en fonction de la durée du refroidissement. Il est important que les plats restent au moins 100 minutes dans la cellule de refroidissement et l'échantillonnage de la température à la sortie de cette cellule devrait permettre de réduire la probabilité de sortir le chariot avant ces 100 minutes.

Il serait intéressant d'estimer l'impact d'un temps d'attente prolongé avant l'entrée en cellule : dans ce cas, la multiplication des cellules commence avant l'entrée en cellule et le refroidissement est relativement rapide, menant peut-être à une concentration en cellules végétatives assez hétérogène et peut-être élevée. Mais pour cela, il faudrait pouvoir modéliser l'évolution thermique du produit pendant les phases d'attente avant l'entrée en cellule, ce que nous ne pouvons pas faire pour l'instant car, d'une part, notre présence dans la cuisine a introduit un biais expérimental ne nous permettant d'observer ces longs temps d'attente sur nos plats de boeuf, et, d'autre part, les temps d'attente observés sur nos profils enregistrés étaient trop courts pour permettre d'ajuster un modèle thermique, même sommaire.

En ce qui concerne plus particulièrement la remise en température, la destruction cible de $3 \log_{10} ufc.g^{-1}$ a été fixée à partir de la dose maximale prédite lors de nos simulations pour identifier les étapes clés du procédé de fabrication et de prédictions du risque moyen par le modèle dose réponse 'TIAC'. La démarche présentée ici pour fixer cette cible est relativement simple. On pourrait envisager une démarche plus élaborée en utilisant davantage le modèle dose réponse. A titre d'exemple, dans cette étude, nous avons arbitrairement fixé 0.05 comme limite supérieure du risque moyen mais nous aurions pu fixer une autre valeur de risque, voire travailler avec une valeur

d'ALOP, fixée par le gestionnaire du risque. Il serait intéressant de mesurer l'impact de cette valeur de risque sur la destruction cible et sur les valeurs seuils de chaque mesure de maîtrise.

Enfin, la mesure de maîtrise ST53 permet de comparer des profils thermiques de pente et de durée différentes en estimant pour chacun une sorte de quantité d'énergie nécessaire pour atteindre une destruction cible de $3 \log_{10} ufc.g^{-1}$. Avec cette mesure, deux profils, correspondant pour l'un à une remise en température très rapide (pente importante) mais courte (durée faible) et pour l'autre à une remise en température très lente (pente faible) mais longue (durée importante), sont jugés pareillement efficaces s'ils permettent d'atteindre la même valeur de ST53. Mais pour d'autres raisons, comme la volonté de préserver une certaine qualité nutritionnelle de l'aliment, un professionnel préférera peut-être un profil à l'autre. Il serait donc intéressant de coupler le modèle de destruction thermique à un modèle permettant de prédire l'évolution de la qualité nutritionnelle de l'aliment pour allier l'aspect sanitaire du produit et sa qualité nutritionnelle.

Chapitre 6

Conclusion - Discussion

6.1 Réalisation des objectifs

L'objectif de cette étude était de relier les paramètres de pilotage d'un procédé de fabrication et de consommation d'un plat à un risque pour le consommateur en prenant en compte variabilité et incertitude pour identifier des étapes clés du procédé de fabrication et de la distribution, proposer des mesures de maîtrise et mesurer leur efficacité quant à l'atteinte de niveaux acceptables définis. Cet objectif a nécessité de :

- construire des modèles de croissance, de destruction, de consommation pour établir un modèle d'exposition,*
- construire un modèle dose réponse,*
- modéliser quelques étapes du procédé de fabrication et leur impact sur l'évolution thermique du produit,*
- estimer le risque 'actuel' et identifier les étapes clés.*

6.1.1 Modèles microbiens et modèle dose réponse

La démarche de modélisation a été la même pour les trois modèles développés dans le cadre de cette étude. Pour chaque modèle, nous avons utilisé des données publiées de manière à identifier d'éventuelles sources de variabilité, auxquelles nous avons ajouté des données personnelles pour le modèle dose réponse uniquement. Ces données collectées, obtenues dans des condi-

tions variables, et incertaines, ont permis d'estimer les paramètres de chaque modèle par inférence bayésienne, avec pour résultat de séparer les dimensions de variabilité et d'incertitude. Pour ce faire, les données collectées ont été décrites dans des modèles qui reposent sur des hypothèses biologiques et dont les paramètres ont un sens biologique. Cette signification biologique des paramètres nous a permis de définir, pour chacun, des distributions *a priori* à partir d'informations collectées dans la littérature quand nous avons utilisé l'inférence bayésienne.

Pour estimer les paramètres de chaque modèle, nous avons utilisé deux approches d'inférence, l'inférence fréquentiste et l'inférence bayésienne, quand nous l'avons pu. L'inférence fréquentiste est plus facile à utiliser et plus 'automatisable' que l'inférence bayésienne. Ainsi l'estimation des AIC et BIC des 31 modèles de destruction des cellules végétatives a nécessité beaucoup moins de temps qu'il n'en aurait fallu pour estimer les 31 DIC correspondants. En revanche, l'inférence bayésienne permet de décrire des structures hiérarchiques quelconques et des modèles non linéaires. Elle permet aussi d'estimer directement l'incertitude sur les paramètres. Mais sa mise en oeuvre est relativement plus difficile.

Une fois construits, les modèles de croissance et de destruction ont été validés avant leur application au procédé de fabrication. Pendant cette phase de validation, nous avons vérifié l'aptitude de chaque modèle à prédire de nouvelles données, provenant de publications, obtenues en conditions thermiques dynamiques, correspondant à une phase de refroidissement pour le modèle de germination croissance, à une remontée en température pour le modèle de destruction, comme dans le procédé de fabrication modélisé. Chaque modèle microbien est donc capable de prédire l'évolution de la concentration microbienne pendant les différentes étapes du procédé modélisé.

En revanche, il n'a pas été possible de valider le modèle dose réponse par manque de données, comme souvent pour les modèles publiés. En améliorant l'investigation des TIAC à *Clostridium perfringens*, il serait possible de collecter un plus grand nombre de données et d'envisager la mise en place d'une validation croisée. En l'absence de ces données, nous avons seulement pu

vérifier l'aptitude du modèle à décrire les données collectées mais étant donné la bonne description de ces données par le modèle, nous avons pu utiliser ce modèle pour prédire le risque de maladie.

6.1.2 Modélisation du procédé

Compte tenu de l'utilisation de vaisselle jetable et d'ustensiles et de matériel facilement nettoyables, ainsi que des pratiques des opérateurs, nous avons exclu la possibilité d'une contamination environnementale du plat. Dès lors, la contamination initiale du produit ne peut provenir que des matières premières et l'évolution de cette contamination au cours du temps ne dépend que de l'évolution de la température sur cette période. La modélisation du procédé consiste donc, pour partie, à traduire les pratiques des opérateurs en profils thermiques à coeur du produit. Une modélisation complète comprendrait, en plus des étapes déjà modélisées de refroidissement rapide, de refroidissement en chambre froide et de remise en température, les temps d'attente entre ces étapes, parmi lesquels notamment les temps d'attente avant l'entrée en cellule (avec les bacs operculés ou non), après la remise en température, les temps de distribution.

Ces temps entre chaque étape peuvent être longs et avoir un impact sur la qualité sanitaire du produit, par exemple, si le temps d'attente avant l'entrée en cellule de refroidissement est assez long pour que la température du produit descende en-dessous de la température maximum de croissance de *Clostridium perfringens*. Nous avons d'ailleurs pu observer de tels temps d'attente sur certains produits, autres que ceux dont nous suivions la fabrication. Peut-être à cause de notre présence dans les locaux, nous n'avons pas pu mesurer de tels temps d'attente sur les produits suivis dans le cadre de notre étude. De la même façon, durant les jours de suivi, aucun incident ou panne n'est venu perturber le fonctionnement de la cuisine. Pour ces raisons, nous n'avons pas pu enregistrer de profil thermique correspondant à ces temps d'attente importants ou à un fonctionnement perturbé de la cuisine.

Pour pallier ce manque, nous avons collecté de nouveaux profils thermiques au coeur du produit, correspondant à ces situations "extrêmes" rai-

sonnablement envisageables avant l'entrée en cellule de refroidissement. Ces situations ont été définies à partir d'observations de l'équipe HPR à l'hôpital sur d'autres plats ou dans d'autres cuisines et appliquées sur des produits qui ont ensuite été détruits. A partir des profils d'origine et de ces nouveaux profils, nous avons ensuite essayé de modéliser l'évolution de la température pendant ces temps d'attente mais le faible nombre de nouveaux profils collectés, présentés dans le tableau H.1 et dans la figure H.1, ne nous a pas permis d'estimer correctement les paramètres de ces modèles. Le modèle présenté dans cette étude ne décrit donc aucune phase d'attente entre la fin de la cuisson et la consommation par le patient.

Dans les deux plats de boeuf en sauce, on peut distinguer deux composantes : la viande et la sauce. Il aurait été intéressant de prédire l'évolution microbienne dans l'une et l'autre composante séparément. Dans notre étude, nous n'avons pas pu réaliser cette distinction à cause d'un manque d'informations. Par exemple, pour prévoir l'évolution de *Clostridium perfringens* dans la viande, nous avons besoin de données sur la contamination initiale de la viande en spores de *Clostridium perfringens* et sur la localisation de ces spores de *Clostridium perfringens* dans les morceaux de viande (en surface ou en profondeur) pour modéliser d'éventuels échanges de spores de la viande vers la sauce. Des analyses menées sur la viande ne nous ont pas permis d'estimer sa contamination en spores et faute d'informations récentes publiées, nous n'avons pas pu modéliser cette contamination initiale. De ce fait, nous avons considéré une contamination de l'ensemble du produit sans distinction viande/sauce. Le biais induit par cette simplification ne devrait pas être important car :

- la contamination de la viande, supposée nulle dans notre étude, semble généralement très faible, de sorte qu'aucune donnée récente de dénombrement de spores dans la viande ne soit disponible (Crouch and Golden, 2005). Il semblerait qu'une forte contamination de la viande en spores de *Clostridium perfringens* soit très exceptionnelle et liée à des accidents survenus aux animaux.
- les valeurs de μ_{max} reportées par Blankenship et al. (1988) dans le

chili, plat de boeuf en sauce, sont de l'ordre de $2.5 - 3.5 \text{ h}^{-1}$ pour des températures de croissance allant de 35 à 49°C . Elles sont donc du même ordre de grandeur que les μ_{max} prédits par notre modèle de germination croissance dans le boeuf. On peut donc imaginer que les μ_{max} des deux sauces (bourguignon et goulash) soient elles aussi du même ordre de grandeur que les μ_{max} prédits par notre modèle.

Enfin, nous avons raisonné sur l'ensemble du procédé modélisé en concentration de cellules végétatives de *Clostridium perfringens* sans tenir compte de l'évolution de la contamination après des étapes de portionnement :

- au moment de la répartition du produit cuit dans la sauteuse dans les bacs multi portions. D'un bac à un autre, la contamination peut alors varier.
- à la préparation des assiettes. Là encore la contamination peut être très variable d'une assiette à l'autre.

Pour modéliser ces variations, il aurait fallu des informations sur le poids des morceaux de viande et leur répartition tout au long du procédé, le volume de sauce total et sa répartition dans les bacs multi portions puis dans les assiettes. En l'absence de ces informations, nous n'avons pas pu modéliser ces variations. En décrivant dans notre modèle les étapes de portionnement, nous aurions certainement augmenté la variabilité de la concentration en *Clostridium perfringens* dans le produit au moment de sa consommation et de la dose ingérée mais, étant donné qu'au moment de sa consommation, la concentration en *Clostridium perfringens* (C dans le tableau 5.1) est relativement faible, on peut imaginer que la variabilité de la concentration finale et de la dose liée aux étapes de portionnement soit, elle aussi, faible.

Pour décrire certaines étapes du procédé, nous avons créé des modèles thermiques. Dans ces modèles, nous n'avons cherché qu'à décrire la dispersion observée parmi les profils enregistrés *in situ* sans décrire les phénomènes impliqués dans cette dispersion. Pour ce faire, nous avons utilisé le package *lme4* pour construire des modèles à effets mixtes les plus simples possibles, et ce pour plusieurs raisons :

- *sans connaissances sur les phénomènes physiques impliqués dans l'évolution thermique du produit, il nous était impossible de construire un modèle un tant soit peu mécaniste.*
- *notre unique objectif était de pouvoir simuler les profils enregistrés. Les effets aléatoires décrits dans les différents modèles nous ont permis de d'atteindre cet objectif.*
- *ces modèles thermiques devaient ensuite être intégrés dans le modèle d'appréciation quantitative des risques pour permettre de mesurer l'efficacité de mesures de maîtrise sanitaire. Il était donc important que les simulations nécessaires ne soient pas trop coûteuses en temps de calcul. Pour cette raison, les modèles thermiques devaient être les plus simples possibles.*
- *enfin il aurait été possible d'explorer plus finement la variabilité observée en définissant différents facteurs, aléatoires ou fixes, comme le niveau du bac, la cellule de refroidissement, le service de remise en température par exemple, en les ajoutant un à un dans différents modèles puis en comparant ces modèles, comme nous l'avons fait pour le modèle de destruction des cellules végétatives. Mais étant donné que le package *lme4* ne permet pas encore de comparer les modèles de manière appropriée, il aurait fallu utiliser une approche bayésienne, plus difficile à mettre en oeuvre et plus chronophage.*

Pour ces raisons, nous n'avons proposé qu'un modèle par phénomène thermique décrit à partir d'hypothèses assez simples et certainement réductrices. Il sera possible par la suite, pour améliorer ce modèle d'AQR, de remplacer ces modèles par des modèles thermiques validés par des thermiciens.

6.1.3 Estimation du risque 'actuel' et identification des étapes clés

Compte tenu de la faible contamination des matières, de l'organisation du travail dans la cuisine étudiée, le risque prédit est faible.

Concernant le refroidissement, même en se plaçant dans le cas le moins favorable, où la destruction thermique finale n'est pas possible, tant la proba-

bilité médiane de dépasser un certain seuil de croissance que le risque moyen de maladie sont faibles. Pour autant, il faut être attentif aux intervalles de crédibilité autour de ces métriques. Plus la durée de refroidissement rapide est forte, plus cet intervalle est faible, montrant une certaine homogénéité du risque prédit. Au contraire, quand l'étape de refroidissement rapide est courte, même si le risque moyen reste faible, dans certains cas extrêmes le risque prédit devient nettement plus important.

Pour l'étape de la remise en température, nous avons proposé des mesures de maîtrise nécessitant un équipement dont l'hôpital suivi ne dispose pas pour l'instant. En attendant la mise en place de nouvelles cellules de remise en températures dûment équipées, il est possible pour cet hôpital d'utiliser des équipements légers reliés à une sonde thermique placée au coeur du produit dans une assiette pour piloter la remise en température et pour définir les réglages de la cellule qui lui permettent d'atteindre la valeur seuil de la mesure de maîtrise sélectionnée.

Au terme de cette étude, le modèle développé permet donc d'estimer un risque de maladie relatif à un procédé de fabrication certes simplifié dans la démarche de modélisation, mais dont les étapes clés ont été correctement décrites. Ce risque intègre de nombreuses sources de variabilité, tant biologiques que liés au procédé de fabrication. Il est assorti de son incertitude, résultant de l'incertitude sur les paramètres du modèle. La modélisation du procédé nous a permis d'identifier des mesures de maîtrise sanitaire et d'en mesurer l'efficacité en utilisant différentes métriques du risque.

Parmi les outils développés dans le cadre de la construction de ce modèle, la méta analyse nous a permis d'explorer la variabilité biologique inhérente aux modèles de croissance et de destruction et au modèle dose réponse.

6.2 La méta analyse

La méta analyse est l'analyse statistique d'un grand nombre de données collectées dans des publications. Dans chaque étude, les auteurs étudient l'impact d'un ou plusieurs facteurs sur un phénomène, biologique en l'occu-

rence, et essaient d'estimer l'effet de ces facteurs sur le phénomène. Souvent d'une étude à une autre, le protocole expérimental, les souches, les niveaux des facteurs étudiés diffèrent. Il a été suggéré que l'effet d'un facteur estimé à partir de la combinaison des résultats de différentes études est plus facilement généralisable que l'effet du même facteur estimé à partir des résultats d'une seule étude (Sutton *et al.*, 2001). Avec la mise en place de bases de données (COMBASE par exemple) et la disponibilité des articles, la méta analyse devient un outil puissant, non seulement pour estimer les effets de différents facteurs mais aussi pour explorer l'hétérogénéité des résultats d'une étude à une autre mais aussi dans une même étude, à condition toutefois d'en respecter la méthodologie.

Dans la mesure où on combine les résultats de différentes études pour en faire une analyse statistique, il faut bien respecter certaines étapes (Gonzales-Barron and Butler, 2011) :

- définir des critères d'inclusion/exclusion objectifs avant la lecture des données et définir une qualité minimum d'étude.
- enregistrer et coder le protocole pour chaque donnée expérimentale, y compris les données de contrôle, en faisant bien attention que la combinaison de facteurs expérimentaux définissant les conditions de contrôle n'est souvent pas la même d'une étude à une autre. Cette étape est très importante car elle permet par la suite d'identifier les différences entre études lorsqu'on investigate l'hétérogénéité des résultats entre études.
- adopter une définition commune du phénomène à modéliser.

Au terme de ces étapes, on obtient une base de données permettant de réaliser une analyse statistique correcte et d'estimer les paramètres du modèle. Les modèles à effets mixtes sont alors particulièrement indiqués (Stram, 1996 ; Sutton *et al.*, 2001 ; Raudenbush and Bryk, 2002) et permettent de distinguer :

- les effets fixes, souvent pour des facteurs, dont l'effet est supposé constant d'une étude à une autre (Gonzales-Barron and Butler, 2011).
- les effets aléatoires, souvent pour estimer l'hétérogénéité des résultats entre études liée à des facteurs dont seul un échantillon supposé aléatoire

des modalités possibles a été testé.

Le recours à la méta analyse présente certains atouts :

- *grâce à la disponibilité des articles et au développement de bases de données internationales, il est possible d’acquérir rapidement et à moindre coût des données obtenues dans des conditions expérimentales plus ou moins variées.*
- *les résultats issus d’une méta analyse sont plus facilement généralisables que les résultats issus d’une seule étude, en permettant d’identifier des effets communs à toutes les études.*
- *après l’identification des effets fixes, communs à chaque étude, la méta analyse permet d’explorer les différences entre études, souvent imputables à des facteurs biologiques ou à des variations dans les protocoles expérimentaux.*

Mais la méta analyse présente aussi certaines limites :

- *dans un domaine donné, toutes les données expérimentales ne sont pas forcément disponibles, certaines sont aussi plus facilement disponibles que d’autres, ce qui crée un premier biais.*
- *la définition de critères d’inclusion/exclusion objectifs des études n’est pas toujours facile (Noble, 2006).*
- *les données publiées sont souvent celles qui montrent un effet significatif d’un ou plusieurs facteurs, les études dans lesquelles aucun effet significatif n’a été identifié étant peu publiées. Ce biais de publication (Sutton et al., 2001) peut provoquer une surestimation de l’effet. Il existe différentes méthodes pour détecter la présence d’un tel biais, parmi lesquelles le “funnel plot” (Light and Pillemar, 1984), graphe dans lequel on reporte pour chaque étude l’estimation de l’effet en fonction de l’inverse de son erreur standard. Si le graphe obtenu est symétrique et ressemble à une cheminée, aucun biais de publication ne semble mis en évidence.*
- *la qualité des études publiées est souvent hétérogène, certaines exposant très clairement les protocoles expérimentaux et les résultats obtenus, d’autres étant plus difficiles à comprendre. Souvent cela conduit à juger*

la publication au lieu de l'expérience et peut parfois amener à exclure les données d'articles de moindre qualité rédactionnelle, créant ainsi un biais potentiel.

- l'enregistrement et le codage des protocoles expérimentaux est souvent difficile et peut être source d'erreur si on ne donne pas des définitions précises à chaque variable décrivant le protocole.
- au terme de la collecte des données publiées on obtient très souvent une base de données déséquilibrée avec des modalités sous-représentées et d'autres sur-représentées. Ce déséquilibre est important à prendre en compte lors de la phase d'analyse statistique des données collectées.

En suivant attentivement les étapes de collecte des données, de recherche des articles correspondants, puis de collecte des données, nous avons acquis, pour chaque modèle, grâce à la méta analyse, un grand nombre de données, acquises dans des conditions expérimentales très variées. Il était ensuite important de prendre en compte cette variabilité dans les modèles construits.

6.3 Prise en compte de la variabilité

La variabilité, définie comme l'hétérogénéité naturelle des composantes d'un système à modéliser, est inhérente au système.

Dans un modèle déterministe, comme, par exemple, les modèles de destruction des cellules végétatives ne décrivant que l'effet fixe du milieu de destruction et/ou du choc chaud préalable (tableau E.1), aucun facteur aléatoire n'intervient dans la définition du système à modéliser, de sorte que ce type de modèle ne repose que sur des relations fonctionnelles.

Ainsi par exemple, le modèle n'incluant que les effets 'Milieu' et 'Choc chaud' permet de prédire une valeur de D , le temps de réduction décimale, pour chaque température et pour un milieu et un choc chaud préalable donnés. Dans la mesure où les données utilisées pour estimer les paramètres du modèle correspondent à deux milieux de destruction, un tel modèle ne permet de prédire que quatre valeurs de D par température de destruction. Un tel modèle ne permet donc pas de décrire la variabilité observée dans les

données collectées et liée à des facteurs aléatoires. Dans ces conditions, les modèles stochastiques semblent plus appropriés.

Un modèle stochastique fait intervenir, dans sa définition, des facteurs aléatoires, caractérisées par des distributions de valeurs. Dès lors, la sortie d'un modèle stochastique est, elle aussi, une distribution de valeurs, souvent résumée par ses percentiles. Dans la mesure où notre objectif était de décrire dans notre modèle la gamme des possibles, nous avons décrit, pour décrire chaque phénomène biologique et l'ensemble du procédé, des modèles stochastiques, dans lesquels un certain nombre de facteurs aléatoires ont été définies.

Un modèle peut être construit dans différents buts (Zwietering and den Besten, 2011) parmi lesquels :

- décrire un phénomène bien spécifique. Dans ce cas, le modèle contient des variables bien spécifiques d'un processus et doit être utilisé dans un contexte similaire au contexte d'acquisition des données ayant permis d'estimer les paramètres du modèles. Ainsi, par exemple, notre modèle de germination croissance est un modèle mécaniste, décrivant les phases de latence puis de croissance de *Clostridium perfringens* dans le boeuf non modifié après un choc chaud. Ce modèle peut être utilisé pour prédire cette même croissance dans des conditions similaires. Pour l'utiliser dans d'autres conditions (autres matrices ou boeuf modifié, profils thermiques différents), il faudrait au moins vérifier sa capacité à prédire la croissance dans ces nouvelles conditions, et certainement en estimer à nouveau les paramètres.
- ajuster des données et identifier des effets significatifs. Pour les modèles de germination croissance et de destruction thermique des cellules végétatives, nous avons proposé plusieurs modèles et les avons comparé en utilisant des statistiques de qualité d'ajustement tout en privilégiant une faible complexité du modèle.
- prédire le comportement d'un agent pathogène dans une filière alimentaire, comme dans le cadre de cette étude. En combinant les deux modèles microbiens et les modèles décrivant l'évolution de la tempé-

rature pendant les étapes de production et de distribution, nous avons prédit le devenir de *Clostridium perfringens* dans deux produits de boeuf en sauce de manière à identifier les étapes clés du procédé et proposer des mesures de maîtrise sanitaire.

L'objectif de cette étude étant de proposer des mesures de maîtrise sanitaire et de mesurer leur efficacité quant au risque pour le consommateur, nous avons donc proposé un modèle général

- qui permette de prédire la gamme des possibles. Ce modèle général stochastique permet de prédire la variabilité du risque en prenant en compte toutes les sources de variabilité identifiées dans chaque modèle.
- qui permette d'estimer l'incertitude sur le risque résultant de l'incertitude des données utilisées pour estimer les paramètres de chaque modèle.
- qui reste relativement simple. Pour chaque phénomène décrit, nous avons choisi le modèle qui propose un bon ajustement des données tout en restant simple et quand nous l'avons pu, nous avons encore simplifié le modèle. Ainsi, le modèle de destruction des cellules végétatives, qui comptait au départ six paramètres ($\log_{10}D_{ref,0}$, z , σ_{etude} , $\sigma_{culture}$, σ_{souche} et σ) a encore été simplifié dans un modèle à trois paramètres ($\log_{10}D_{ref,0}$, z et $\sigma_{\log D}$). L'étape de validation de ce modèle simplifié a permis de vérifier sa capacité à prédire la destruction observée dans des conditions thermiques dynamiques et de l'utiliser ensuite pour prédire le comportement de *Clostridium perfringens* durant le procédé de fabrication.

Le modèle général proposé permet donc bien décrire l'ensemble du procédé tout en restant simple, démontrant ainsi que pour atteindre notre objectif un modèle d'AQR simple convient (Zwietering, 2009). D'autres modèles plus simples existent comme les modèles construits à partir de la formule de l'ICMSF (ICMSF, 2002) mais cette formule ne nous permettait pas d'atteindre tous nos objectifs.

Pour pouvoir prendre en compte toutes les sources et tous les niveaux (inter et intra jour de production) de variabilité et obtenir une estimation du risque avec son incertitude, nous avons réalisé des simulations de Monte

Carlo à deux dimensions dans les distributions de paramètres obtenues par inférence bayésienne quand nous l'avons pu.

6.4 Inférence fréquentiste - Inférence bayésienne

Après la collecte des données, que ce soit des données personnelles concernant le procédé ou des données de la littérature pour les modèles microbiens et dose réponse, nous avons le plus souvent utilisé l'inférence bayésienne pour estimer les paramètres des modèles.

L'inférence consiste à induire les caractéristiques inconnues d'une population à partir d'un échantillon représentatif de cette population en estimant un paramètre. En inférence fréquentiste, on considère que ce paramètre est fixe mais inconnu, donc décrit par une valeur, souvent estimée à partir de l'échantillon en utilisant le maximum de vraisemblance.

*En inférence bayésienne, ce paramètre est une variable aléatoire. Il est donc décrit par une distribution de valeurs possibles, la distribution *a posteriori*, combinant l'information initiale et l'information apportée par les données. Cette distribution est souvent résumée par son intervalle de crédibilité à 95%. Ces distributions *a posteriori* ont été directement utilisées dans nos simulations comme distributions d'incertitude des paramètres de chaque modèle microbien et du modèle dose réponse, ce qui constituait un objectif fort de cette thèse.*

La description de l'incertitude est plus difficile quand on utilise l'inférence fréquentiste dans le cadre de la méta analyse. Ainsi, les paramètres du modèle de destruction des cellules végétatives ont été estimés à la fois par inférence bayésienne et par inférence fréquentiste. Dans le premier cas, nous avons directement obtenu les distributions d'incertitude des paramètres du modèle. Dans le second cas, nous n'avons obtenu qu'une valeur de chaque paramètre et nous avons tenté de décrire une distribution de chaque paramètre en créant un échantillon bootstrap de ces paramètres :

- en créant N_v échantillons bootstrap des données sous forme de valeurs de D .*

- en estimant N_v valeurs des paramètres à partir des N_v échantillons bootstrap des données.

Mais nous nous sommes heurtés à un problème de définition de l'échantillon bootstrap des données dans le cadre de la méta analyse : comment définir l'échantillon bootstrap ? en tirant au sort avec remise les points observés ? les études ? Le choix de la stratégie de bootstrap n'est pas toujours facile à justifier et il a un impact important sur la distribution de chaque paramètre. Dans ces conditions, nous n'avons pas pu décrire l'incertitude sur les paramètres en utilisant l'inférence fréquentiste.

L'inférence fréquentiste ne s'appuie que sur l'information apportée par l'échantillon, ce qui peut poser des problèmes si l'échantillon est biaisé ou faible voire inexistant (événement rare ou difficile à mesurer).

L'inférence bayésienne repose sur l'idée, assez naturelle d'ailleurs, que, même sans échantillon, on dispose d'informations permettant de proposer une estimation initiale, même assez vague, du paramètre décrivant la caractéristique inconnue de la population à partir de dires d'experts, d'informations collectées dans la littérature. Cette estimation initiale, appelée distribution *a priori*, est ensuite combinée à l'information apportée par l'échantillon pour obtenir la distribution *a posteriori*. On peut alors vérifier si l'information apportée par l'échantillon est cohérente avec l'information initiale en vérifiant la convergence du modèle et si elle contribue à améliorer notre connaissance de la caractéristique en comparant les distributions *a priori* et *a posteriori*. Si ce processus semble relativement naturel, il faut tout de même faire attention lorsqu'on décrit les distributions *a priori* car celles-ci ont un impact sur les distributions *a posteriori* (Parent and Bernier, 2007). On distingue deux types de distributions *a priori* :

- les distributions informatives, décrites en utilisant une information initiale qui ne provient pas de données utilisées ensuite pour l'inférence. La forme de ces distributions a un impact sur la forme des distributions *a posteriori*.
- les distributions non-informatives. Nous avons toujours utilisé ce type de distributions pour les paramètres de précision. Là encore, la forme

de la distribution définie peut avoir un impact sur la distribution *a posteriori*. A titre d'exemple, pour décrire l'écart type d'une loi normale, il est possible de définir comme distribution *a priori* une loi uniforme sur cet écart type ou une distribution Gamma 'plate' sur le paramètre de précision (τ , l'inverse de la variance). En 2006, Gelman a montré que le choix d'une distribution uniforme ou Gamma avait un impact sur la forme de la distribution *a posteriori* du paramètre et qu'il était préférable d'utiliser une loi uniforme.

Cet apport d'information initiale, sous la forme de distribution *a priori*, est particulièrement important quand on dispose d'un nombre faible de données sur une partie du modèle. Dans ce cas, l'apport d'information initiale est parfois nécessaire pour estimer les paramètres du modèle.

Quand on dispose de nombreuses données, les deux types d'inférence donnent des résultats cohérents, comme le montre l'exemple du modèle de destruction des cellules végétatives. Mais certaines raisons pratiques peuvent faire choisir un type d'inférence plutôt que l'autre :

- la facilité de mise en oeuvre. L'inférence fréquentiste est, pour des modèles simples, plus facile à mettre en oeuvre que l'inférence bayésienne.
- la rapidité de mise en oeuvre. Là encore, l'inférence fréquentiste est souvent plus rapide à mettre en oeuvre et requiert des temps de calculs souvent moins longs que l'inférence bayésienne.
- la possibilité de mise en oeuvre. Sur des modèles simples, l'inférence fréquentiste peut être mise en oeuvre, tout comme l'inférence bayésienne. Mais pour des modèles complexes, l'inférence fréquentiste est parfois difficile voire impossible à mettre en oeuvre. Ainsi, étant donné la complexité du modèle de germination-croissance, seule l'inférence bayésienne a permis de décrire simultanément les deux niveaux du modèle en couplant deux modèles non linéaires, les modèles primaire et secondaire, et en décrivant dans chacun des effets aléatoires. De plus, l'inférence bayésienne nous a permis de prendre en compte la qualité des données de dénombrement utilisées.

Pour ces différentes raisons, nous avons souvent utilisé l'inférence bayésienne pour estimer les paramètres de nos modèles.

6.5 Perspectives

Le modèle proposé dans cette étude permet d'énoncer des préconisations d'ordre sanitaire utilisables par les professionnels. Dans la mesure où un atelier de restauration collective travaillerait dans les mêmes conditions, il pourrait utiliser ce modèle pour estimer une concentration finale du produit en *Clostridium perfringens* et un risque de maladie associé à la consommation du plat. Mais ceci n'est possible qu'à condition de vérifier que le procédé de fabrication dans ce nouvel atelier correspond bien au procédé modélisé dans cette étude (même niveau de contamination des matières premières, recette équivalente, même procédé). De plus, ces estimations ne peuvent être considérées que comme des ordres de grandeur (Zwietering and den Besten, 2011) car le procédé étudié ne peut pas être reproduit à l'exacte identique. De manière plus générale, cette étude montre clairement que la maîtrise du danger *Clostridium perfringens* en restauration collective passe essentiellement par la maîtrise de deux étapes : le refroidissement rapide et la remise en température. Cette conclusion peut aider les professionnels dans la définition de priorités concernant la mise en place de mesures de maîtrise sanitaire.

A l'issue de cette étude sur *Clostridium perfringens* en restauration hospitalière, il serait aussi possible de réaliser une analyse de sensibilité (Sobol, 2001 ; Saltelli, 2002) pour estimer l'impact des entrées du modèle sur ses sorties. Ici, la sortie considérée pourrait être le risque de maladie mais aussi la concentration finale du produit en cellules végétatives de *Clostridium perfringens*. Suivant la sortie considérée, les conclusions de l'analyse de sensibilité peuvent être différentes (Ellouze et al., 2010).

Etant donné la structure en deux dimensions de notre modèle, décrivant séparément variabilité et incertitude, il est possible de réaliser une analyse de sensibilité à la variabilité et à l'incertitude (Busschaert et al., 2011).

L'analyse de variabilité a pour but de déterminer quelles sources de variabilité ont le plus d'impact sur la variabilité de la sortie du modèle. Cela permet d'identifier quelles sources de variabilité on peut réduire pour réduire la sortie et sa variabilité. Imaginons qu'une sortie d'un modèle, un risque de maladie par exemple, soit particulièrement sensible à la contamination initiale des matières premières. On pourrait dans ce cas définir des pistes d'amélioration, comme la sélection des fournisseurs ou un traitement assainissant des matières premières, pour réduire cette contamination initiale et le risque de maladie. Dans notre modèle, les sources de variabilité sont pour la plupart biologiques (temps de réduction décimale à la température de référence par exemple) et/ou inexpliquées ("*work to be done*" du modèle de germination croissance par exemple). On ne peut donc pas réduire ces variabilités. Les sources de variabilité liées au procédé sont peu nombreuses et souvent difficiles à maîtriser (vitesses de refroidissement et de réchauffement par exemple). Pratiquement la seule source de variabilité liée au procédé et qui puisse être maîtrisée par les opérateurs concerne la durée du réchauffement. Sa variabilité peut être réduite par la mise en place de la mesure de maîtrise proposée dans cette étude. Au final donc une analyse de sensibilité sur notre modèle n'apporterait pas beaucoup de solutions pratiques de maîtrise du danger.

L'analyse de sensibilité à l'incertitude permet d'identifier les sources d'incertitude qui ont le plus d'impact sur l'estimation de la sortie du modèle et de définir des pistes d'amélioration de la connaissance. Dans notre modèle, certaines sources d'incertitude peuvent paraître importantes (incertitude sur les températures cardinales du modèle de germination croissance ou sur le paramètre r du modèle dose réponse par exemple) et une analyse de sensibilité à l'incertitude nous permettrait de définir des priorités en matière d'acquisition de connaissances.

Enfin, le modèle proposé dans cette étude peut être utilisé pour de la réingénierie. Il serait possible, au terme d'une analyse de sensibilité, de définir les paramètres du procédé qui ont un impact sur le risque. Dans notre cas, le pilotage de la remise en température paraît d'un intérêt capital pour la

maîtrise du danger mais le refroidissement ne doit pas être négligé pour autant. Il est alors possible, pour chaque étape, d'imaginer des évolutions de la méthode ou du matériel capables d'atteindre le même niveau de sécurité sanitaire pour un moindre coût ou avec une meilleure fiabilité.

Ainsi, si on se focalise sur l'étape de remise en température, les conclusions de notre étude permettent d'imaginer d'appareiller, dans un premier temps, les cellules de remise en température de sondes capables d'enregistrer en temps réel l'évolution de la température au coeur du produit. Mais elles peuvent aussi servir aux fabricants de matériels de pistes d'amélioration des cellules de remise en température.

Bibliographie

- Afchain, A. L., Carlin, F., Nguyen-the, C., and Albert, I. (2008). Improving quantitative exposure assessment by considering genetic diversity of *B. cereus* in cooked, pasteurised and chilled foods. *International Journal of Food Microbiology*, 128 :165 – 173.
- Aguilera, M. O., Stagnitta, P. V., Micalizzi, B., and de Guzman, A. M. (2005). Prevalence and characterization of *Clostridium perfringens* from spices in argentina. *Anaerobe*, 11 :327–334.
- Alavi, S. H., Puri, V. M., Knabel, S. J., Mohtar, R. H., and Whiting, R. C. (1999). Development and validation of a dynamic growth model for *Listeria monocytogenes* in fluid whole milk. *Journal of Food Protection*, 62 :170 – 176.
- Albert, I. and Mafart, P. (2005). A modified weibull model for bacterial inactivation. *International Journal of Food Microbiology*, 100 :197 – 211.
- Amezquita, A., Weller, C. L., Wang, L., Thippareddi, H., and Burson, D. E. (2005). Development of an integrated model for heat transfer and dynamic growth of *Clostridium perfringens* during the cooling of cooked boneless ham. *International Journal of Food Microbiology*, 101 :123 – 144.
- Aran, N. (2001). The effect of calcium and sodium lactates on growth from spores of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* in a sous-vide beef goulash under temperature abuse. *International Journal of Food Microbiology*, 63 :117 – 123.
- Audits International (2000). 1999 u.s. food temperature evaluation. design

- and summary pages. Technical report, Audits International and U.S. Food and Drug Administration.
- Augustin, J. C., Bergis, H., Bourdin, G., Cornu, M., Couvert, O., Denis, C., Huchet, V., Lemonnier, S., Pinon, A., Vialette, M., Zuliani, V., and Stahl, V. (2009). Design of challenge testing experiments to assess the variability of microbial behaviors in foods. In 6th International Conference Predictive Modeling in Foods, September 8-12, 2009, Washington, USA.
- Augustin, J. C. and Carlier, V. (2000). Mathematical modeling of the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology, 56 :29 – 51.
- Baranyi, J. and Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. International Journal of Food Microbiology, 23 :277 – 294.
- Baranyi, J. and Roberts, T. A. (1995). Mathematics of predictive microbiology. International Journal of Food Microbiology, 26 :199 – 218.
- Baranyi, J., Robinson, T. P., Kaloti, A., and Mackey, B. M. (1995). Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. International Journal of Food Microbiology, 27 :61 – 67.
- Barker, G., Malakar, P., and Peck, M. (2005). Germination and growth from spores : variability and uncertainty in the assessment of food borne hazards. International Journal of Food Microbiology, 100 :67 – 76.
- Bates, D. (2010). lme4 : Mixed-effects modeling with r. available at <https://r-forge.r-project.org/projects/lme4/>.
- Baty, F. and Delignette-Muller, M. L. (2004). Estimating the bacterial lag time : which model, which precision ? International Journal of Food Microbiology, 91 :261 – 277.
- Bauer, F. T., Carpenter, J. A., and Reagan, J. O. (1981). Prevalence of *Clostridium perfringens* in pork during processing. Journal of Food Protection, 44 :279–283.
- Bemrah, N., Bergis, H., Colmin, C., Beaufort, A., Millemann, Y., Dufour, B., Benet, J. J., Cerf, O., and Sanaa, M. (2003). Quantitative risk

- assessment of human salmonellosis from the consumption of a turkey product in collective catering establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 80 :17–30.
- Bemrah, N., Sanaa, M., Cassin, M. H., Griffiths, M. W., and Cerf, . (1998). Quantitative risk assessment of human listeriosis from consumption of soft cheese made from raw milk. *Preventive Veterinary Medicine*, 37 :129 – 145.
- Bernaerts, K., Gysemans, K. P. M., Minh, T. N., and van Impe, J. F. (2005). Optimal experiment design for cardinal values estimation : guidelines for data collection. *International Journal of Food Microbiology*, 100 :153 – 165.
- Bigelow, W. (1921). The logarithmic nature of thermal death time curves. *Journal of Infectious Disease*, 29 :528 – 536.
- Blankenship, L. C., Craven, S. E., Leffler, R. G., and Cluster, C. (1988). Growth of *Clostridium perfringens* in cooked chili during cooling. *Applied and Environmental Microbiology*, 54 :1104 – 1108.
- Bovill, R., Bew, J., and Baranyi, J. (2001). Measurements and prediction of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* during fluctuating temperature. ii. rapidly changing temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 67 :131 – 137.
- Bovill, R., Bew, J., Cook, N., DAgostino, M., Wilkinson, N., and Baranyi, J. (2000). Predictions of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* during fluctuating temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 59 :157 – 165.
- Bréand, S., Fardel, G., Flandrois, J. P., Rosso, L., and Tomassone, R. (1998). Model of the influence of time and mild temperature on *listeria monocytogenes* nonlinear survival curves. *International Journal of Food Microbiology*, 40(3) :185 – 195.
- Bréand, S., Fardel, G., Flandrois, J. P., Rosso, L., and Tomassone, R. (1999). A model describing the relationship between regrowth lag time and mild temperature increase for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 46 :251 – 261.

- Brooks, S. P. and Gelman, A. (1997). General methods for monitoring convergence of iterative simulations. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 7 :434–455.
- Busschaert, P., Geeraerd, A. H., Uyttendaele, M., and Van Impe, J. F. (2011). Sensitivity analysis of a two-dimensional quantitative microbiological risk assessment : Keeping variability and uncertainty separated. *Risk Analysis*, pages no–no.
- Busschaert, P., Geereard, A. H., Uyttendaele, M., and Impe, J. F. V. (2010). Estimating distributions out of qualitative and (semi) quantitative microbiological contamination data for use in risk assessment. *International Journal of Food Microbiology*, 138 :260 – 269.
- Byrne, B., Dunne, G., and Bolton, D. J. (2003). Thermal inactivation of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores in pork luncheon roll. *Food Microbiology*, 23 :803 – 808.
- Candlish, A. A. G., Pearson, S. M., Aidoo, K. E., Smith, J. E., Kelly, B., and Irvine, H. (2001). A survey of ethnic foods for microbial quality and aflatoxin content. *Food Additives and Contaminants*, 18 :129 – 136.
- Cassin, M. H., Lammerding, A. M., Todd, E. C. D., Ross, W., and McColl, R. S. (1998). Quantitative risk assessment for *Escherichia coli* o157 :h7 in ground beef hamburgers. *International Journal of Food Microbiology*, 41 :21 – 44.
- Celeux, G., Forbes, F., Robert, C. P., and Titterington, D. M. (2006). Deviance information criteria for missing data models. *Bayesian Analysis*, 4 :651 – 674.
- Codex Alimentarius (1999). Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk assessment. Technical report, FAO edition, Rome.
- Codex Alimentarius (2003). Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk assesment. Technical report, Roma : FAO.
- Codex Alimentarius (2008). Directives relatives à la validation des mesures de maîtrise de la sécurité alimentaire.
- Collie, R. E. and McClane, B. A. (1998). Evidence that the enterotoxin gene can be episomal in *Clostridium perfringens* isolates associated with

- non-foodborne human gastrointestinal diseases*. Journal of Clinical Microbiology, 36 :30 – 36.
- Crouch, E. and Golden, N. (2005). *A risk assessment for Clostridium perfringens in ready-to-eat and partially cooked meat and poultry products*. Technical report, USDA, Food Safety Inspection Service.
- Crépet, A. (2007). *Statistique bayésienne et Monte-Carlo de second ordre pour l'évaluation des risques microbiologiques. Le cas de Listeria monocytogenes dans les produits de IVème gamme*. PhD thesis, Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement.
- Crépet, A., Stahl, V., and Carlin, F. (2009). *Development of a hierarchical bayesian model to estimate the growth parameters of Listeria monocytogenes in minimally processed fresh leafy salads*. International Journal of Food Microbiology, 131 :112 – 119.
- Cullen, A. C. and Frey, H. C. (1999). *Probabilistic techniques in exposure assessment : a handbook for dealing with variability and uncertainty in models and inputs*, pages 81–159. Plenum Press USA.
- Dack, G. M., Sugiyama, H., Owens, F. J., and Kirsner, J. B. (1954). *Failure to produce illness in human volunteers fed Bacillus cereus and Clostridium perfringens*. The Journal of Infectious Diseases, 94 :34–38.
- Dalgaard, P. (1995). *Modeling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish*. International Journal of Food Microbiology, 26 :305 – 317.
- Daube, G., Simon, P., Limbourg, B., Manteca, C., Mainil, J., and Kaeckenbeeck, A. (1996). *Hybridization of 2,659 Clostridium perfringens isolates with gene probes for seven toxins (α , β , ϵ , ι , ω , μ and enterotoxin) and for sialidase*. American Journal of Veterinary Research, 57 :496 – 501.
- de Jong, A. E. I., Beumer, R. R., and Zwietering, M. H. (2005). *Modeling growth of Clostridium perfringens in pea soup during cooling*. Risk Analysis, 25 :61 – 73.
- Delignette-Muller, M. L. (1998). *Relation between the generation and the lag time of bacterial growth kinetics*. International Journal of Food Microbiology, 43 :97 – 104.

- Delignette-Muller, M. L., Baty, F., Cornu, M., and Bergis, H. (2005). Modeling the effect of a temperature shift on the lag phase duration of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 100 :77 – 84.
- Delignette-Muller, M. L. and Cornu, M. (2008). Quantitative risk assessment for *Escherichia coli* o157 :h7 in frozen ground beef patties consumed by young children in french households. *International Journal of Food Microbiology*, 128(1) :158 – 164. 5th International Conference on Predictive Modelling in Foods.
- Delignette-Muller, M. L., Cornu, M., Pouillot, R., and Denis, J. B. (2006). Use of bayesian modeling in risk assessment : Application to growth of *Listeria monocytogenes* and food flora in cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 106 :195 – 208.
- Delignette-Muller, M. L., Cornu, M., and study group, A. S. (2008). Quantitative risk assessment for *Escherichia coli* o157 :h7 in frozen ground beef patties consumed by young children in french households. *International Journal of Food Microbiology*, 128 :158 – 164.
- Delignette-Muller, M. L., Pouillot, R., Denis, J. B., and Dutang, C. (2010). *fitdistrplus* : help to fit of a parametric distribution to non-censored or censored data. *R package version 0.1-3*.
- DevelopmentCoreTeam, R. *The r project for statistical computing*.
- Dische, F. E. and Elek, S. D. (1957). Experimental food poisoning by *Clostridium welchii*. *Lancet*, 273 :71–74.
- Doyle, M. P. (1989). Foodborne bacterial pathogens. *MP Doyle, M. Dekker, USA, New York*.
- Dubuisson, C., Lioret, S., Touvier, M., Dufour, A., Calamassi-Tran, G., Volatier, J. L., and Lafay, L. (2010). Trends in food and nutritional intakes of french adults from 1999 to 2007 : results from the inca surveys. *British Journal of Nutrition*, 103 :1035 – 1048.
- Efron, B. and Tibshirani, J. T. (1993). *An introduction to the bootstrap*.

- Eisgruber, H. and Reuter, G. (1987). Anaerobic spore formers in commercial spices and ingredients for infant food. *Z. Lebensm Unters Forsch*, 185 :281 – 287.
- Ellouze, M., Gauchi, J. P., and Augustin, J. C. (2010). Global sensitivity analysis applied to a contamination assessment model of *listeria monocytogenes* in cold smoked salmon at consumption. *Risk Analysis*, 30 :841–852.
- EPA (1997). Guiding principles for monte carlo analysis. Technical report, EPA.
- Evans, R. J., Russell, N. J., Gould, G. W., and McClure, P. J. (1997). The germinability of a psychrotolerant non-proteolytic strain of *Clostridium botulinum* is influenced by their formation and storage temperature. *Journal of Applied Microbiology*, 83 :273 – 280.
- FAO (2003). Hazard characterization for pathogens in food and water. Technical report, WHO/FAO, <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/pathogen/en/index.html>.
- FAO (2004). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Technical report, WHO/FAO, http://www.fao.org/ag/agn/agns/jemra_riskassessment_listeria_en.asp.
- FAO/WHO (2002). Risk assessment of *Campylobacter* spp. in broiler chickens and *Vibrio* spp. in seafood. Technical report, FAO/WHO.
- FAO/WHO (2006). The use of microbiological risk assessment outputs to develop practical risk management strategies : Metrics to improve food safety. Technical report, FAO/WHO.
- FAO/WHO (2008.). Exposure assessment of microbiological hazards in food : Guidelines. Technical report, FAO Food and Nutrition. FAO/WHO, Roma.
- Fapohunda, A. O., McMillin, K. W., Marshall, D. L., and Waites, W. M. (April 1994). Growth of selected cross-contaminating bacterial pathogens on beef and fish at 15 and 35c. *Journal of Food Protection*, 57 :337–340(4).

- Farber, J. M., Ross, W. H., and Harwig, J. (1996). Health risk assessment of *Listeria monocytogenes* in canada. International Journal of Food Microbiology, 30 :145–156.
- Foegeding, P. M. and Busta, F. F. (1980). *Clostridium perfringens* cells and phospholipase c activity at constant and linearly rising temperatures. Journal of Food Science, 45 :918 – 924.
- Fujisawa, T., Aikawa, K., T.Takahashi, Yamai, S., and Ueda, S. (2001). Occurrence of clostridia in commercially available curry roux. Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 42 :394–397.
- Geeraerd, A. H., Valdramidis, V. P., and Impe, J. F. V. (2005). GInaFit, a freeware tool to assess non-loglinear microbial survivor curves. International Journal of Food Microbiology, 102 :95 – 105.
- Gelman, A. (2006). Prior distributions for variance parameters in hierarchical models. Bayesian Analysis, 1 :515 – 533.
- Gelman, A., Carlin, J., Stern, H., and Rubin, D. (2004). Bayesian Data Analysis. Boca Raton.
- Gibson, A. M., Bratchell, N., and Roberts, T. A. (1988). Predicting microbial growth : growth responses of *salmonellae* in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. International Journal of Food Microbiology, 6 :155 – 178.
- Golden, N. J., Crouch, E. A., Latimer, H., Kadry, A. R., and Kause, J. (2009). Risk assessment for *Clostridium perfringens* in ready-to-eat and partially cooked meat and poultry products. Journal of Food Protection, 72 :1376–1384.
- Gonzales-Barron, U. and Butler, F. (2011). The use of meta-analytical tools in risk assessment for food safety. Food Microbiology, 28 :823 – 827.
- Haas, C. N., Rose, J. B., and Gerba, C. P. (1999a). Quantitative microbial risk assessment. John Wiley and sons USA New York. 449 pp.
- Haas, C. N., Thayyar-Madabusi, A., Rose, J. B., and Gerba, C. P. (1999b). Development of a dose response relationship for *Listeria monocytogenes*. Quantitative Microbiology, 1 :89 – 102.

- Haas, C. N., Thayyar-Madabusi, A., Rose, J. B., and Gerba, C. P. (2000). Development of a dose-response relationship for *Escherichia coli* o157 :h7. *International Journal of Food Microbiology*, 56 :153 – 159.
- Hall, H. E. and Angelotti, R. (1965). *Clostridium perfringens* in meat and meat products. *Applied Microbiology*, 13 :352 – 357.
- Hassani, M., Manas, P., Raso, J., Condon, S., and Pagan, R. (2005). Predicting heat inactivation of *Listeria monocytogenes* under nonisothermal treatments. *Journal of Food Protection*, 68 :736 – 743.
- Hassani, M., Manas, P., Raso, J., Condon, S., and Pagan, R. (2006). Induced thermotolerance under non isothermal treatments of a heat sensitive and a resistant strain of *Staphylococcus aureus* in media of different pH. *Letters in Applied Microbiology*, 43 :619 – 624.
- Hauschild, A. and Thatcher, F. (1967). Experimental food poisoning with heat-susceptible *Clostridium perfringens* type a. *Journal of Food Science*, 32 :467–471.
- Havelaar, A. H., Nauta, M. J., and Jansen, J. T. (2004). Fine-tuning food safety objectives and risk assessment. *International Journal of Food Microbiology*, 93 :11 – 29.
- Heredia, N. L., Garcia, A. G., Luevanos, R., Labbe, R. G., and Garcia-Alvarado, J. S. (1997). Elevation of the heat resistance of vegetative cells and spores of *Clostridium perfringens* type a by sublethal heat shock. *Journal of Food Protection*, 60 :998–1000.
- Hobbs, B. C., Smith, M. E., Oakley, C. L., Warrack, G. H., and Cruickshank, J. C. (1953). *Clostridium welchii* food poisoning. *Journal of Hygiene*, 51 :75–101.
- Hobbs, N. T. and Hilborn, R. (2006). Alternatives to statistical hypothesis testing in ecology : a guide to self teaching. *Ecological Applications*, 16 :5 – 19.
- Holcomb, D. L., Smith, M. A., Ware, G. O., Hung, Y. C., Brackett, R. E., and Doyle, M. P. (1999). Comparison of six dose-response models for use with food-borne pathogens. *Risk Analysis*, 19 :1091 – 1100.

- Huang, L. (2003). Growth kinetics of *Clostridium perfringens* in cooked beef. *Journal of Food Safety*, 23 :91 – 105.
- Huang, L. (2004). Numerical analysis of the growth of *Clostridium Perfringens* in cooked beef under isothermal and dynamic conditions. *Journal of Food Safety*, 24 :53 – 70.
- ICMSF (2002). (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) Microorganisms in foods 7 : Microbiological testing in food safety management. New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- ILSI (2010). *Impact of microbial distributions on food safety. Technical report, ILSI Europe.*
- INVS (2011). *Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives. données de la déclaration obligatoire, 2009.*
- Jaloustre, S., Cornu, M., Morelli, E., Noël, V., and Delignette-Muller, M. L. (2011). Bayesian modeling of *Clostridium perfringens* growth in beef-in-sauce products. *Food Microbiology*, 28 :311 – 320.
- Juneja, V. K., Bari, M. L., Inatsu, Y., Kawamoto, S., and Friedman, M. (2007). Control of *Clostridium perfringens* spores by green tea leaf extracts during cooling of cooked ground beef, chicken, and pork. *Journal of Food Protection*, 70 :1429 – 1433.
- Juneja, V. K., Call, J. E., Marmer, B. S., and Miller, A. J. (1994a). The effect of temperature abuse on *Clostridium perfringens* in cooked turkey stored under air and vacuum. *Food Microbiology*, 11 :187 – 193.
- Juneja, V. K., Marks, H., and Thippareddi, H. (2008). Predictive model for growth of *Clostridium perfringens* during cooling of cooked uncured beef. *Food Microbiology*, 25 :42– 55.
- Juneja, V. K. and Marks, H. M. (2002). Predictive model for growth of *Clostridium perfringens* during cooling of cooked cured chicken. *Food Microbiology*, 19 :313 – 327.
- Juneja, V. K. and Marmer, B. S. (1996). Growth of *Clostridium perfringens* from spore inocula in sous-vide turkey products. *International Journal of Food Microbiology*, 32 :115 – 123.

- Juneja, V. K. and Marmer, B. S. (1998). Thermal inactivation of *Clostridium perfringens* vegetative cells in ground beef and turkey as affected by sodium pyrophosphate. *Food Microbiology*, 15(3) :281 – 287.
- Juneja, V. K., Marmer, B. S., and Miller, A. J. (1994b). Growth and sporulation potential of *Clostridium perfringens* in aerobic and vacuum-packaged cooked beef. *Journal of Food Protection*, 57 :393 – 398.
- Juneja, V. K., Novak, J. S., Eblen, B. S., and McClane, B. A. (2001). Heat resistance of *Clostridium perfringens* vegetative cells in ground beef and turkey affected by prior heat shock. *Journal of Food Safety*, 21 :127–139.
- Juneja, V. K., Thippareddi, H., Bari, L., Inatsu, Y., Kawamoto, S., and Friedman, M. (2006a). Chitosan protects cooked ground beef and turkey against *Clostridium perfringens* spores during chilling. *Journal of Food Science*, 71 :236 – 240.
- Juneja, V. K., Thippareddi, H., and Friedman, M. (2006b). Control of *Clostridium perfringens* in cooked ground beef by carvacrol, cinnamaldehyde, thymol, or oregano oil during chilling. *Journal of food protection*, 69 :1546 – 1551.
- Juneja, V. K., Whiting, R. C., Marks, H. M., and Snyder, O. P. (1999). Predictive model for growth of *Clostridium perfringens* at temperatures applicable to cooling of cooked meats. *Food Microbiology*, 16 :335 – 349.
- Kalaian, S. A. (2003). Meta analysis methods for synthesizing treatments effects in multisite studies : hierarchical linear modeling (hlm) perspectives. *Practical Assessment, Research and Evaluation*, 8.
- Kalinowski, R. M., Tompkin, R. B., Bodnaruk, P. W., and Pruett, W. P. (2003). Impact of cooking, cooling, and subsequent refrigeration on the growth or survival of *Clostridium perfringens* in cooked meat and poultry products. *Journal of Food Protection*, 66 :1227–1232.
- Kimura, B., Kuroda, S., Murakami, M., and Fujii, T. (July 1996). Growth of *clostridium perfringens* in fish fillets packaged with a controlled carbon dioxide atmosphere at abuse temperatures. *Journal of Food Protection*, 59 :704–710(7).

- Kokai-Kun, J. F., Songer, J. G., Czeczulin, J. R., Chen, F., and McClane, B. A. (1994). Comparison of western immunoblots and gene detection assays for identification of potentially enterotoxigenic isolates of *Clostridium perfringens*. *Journal of Clinical Microbiology*, 32 :2533 – 2539.
- Labbé, R. G. and Chang, C. A. (1995). Recovery of heat-injured spores of *Clostridium perfringens* types b, c and d by lysozyme and an initiation protein. *Letters in Journal of Applied Microbiology*, 21 :302 – 306.
- Labbé, R. G. and Huang, T. H. (1995). Generation times and modeling of enterotoxin-positive and enterotoxin-negative strains of *Clostridium perfringens* in laboratory media and ground beef. *Journal of Food Protection*, 58 :1303 – 1306.
- Ladiges, W. C., Foster, J. F., and Ganz, W. M. (1974). Incidence and viability of *Clostridium perfringens* in ground beef. *Journal of Milk and Food Technology*, 37 :622–623.
- Lahti, P., Heikinheimo, A., Johansson, T., and Korkeala, H. (2007). *Clostridium perfringens* type a isolates carrying the plasmid-borne enterotoxin gene (genotypes is1151-cpe or is1470-like-cpe) are a common cause of food poisonings. *Journal of Clinical Microbiology*, 46 :371 – 373.
- Latimer, H. K., Jaykus, L. A., Morales, R. A., Cowen, P., and Crawford-Brown, D. (2001). A weighted composite dose-response model for human salmonellosis. *Risk Analysis*, 21 :295 – 305.
- le Marc, Y., Plowman, J., Aldus, C. F., Munoz-Cuevas, M., Baranyi, J., and Peck, M. W. (2008). Modelling the growth of *Clostridium perfringens* during the cooling of bulk meat. *International Journal of Food Microbiology*, 128 :41–50.
- Levinson, H. S. and Hyatt, M. T. (1964). Effect of sporulation medium on heat resistance, chemical composition and germination of *Bacillus megaterium* spores. *Journal of Bacteriology*, 87 :876 – 886.
- Light, R. J. and Pillemar, D. B. (1984). *Summing Up : the science of reviewing research*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Lindqvist, R., Sylvén, S., and Vagsholm, I. (2002). Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese

- made from raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 78 :155 – 170.
- Lindqvist, R. and Westöo, A. (2000). Quantitative risk assessment for *Listeria monocytogenes* in smoked or gravad salmon and rainbow trout in sweden. *International Journal of Food Microbiology*, 58 :181 – 196.
- Lioret, S., Dubuisson, C., Dufour, A., Touvier, M., Calamassi-Tran, G., Maire, B., Volatier, J. L., and Lafay, L. (2010). Trends in food intake in french children from 1999 to 2007 : results from the inca (étude individuelle nationale des consommations alimentaires) dietary surveys. *British Journal of Nutrition*, 103 :585 – 601.
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., and Leguerinel, I. (2002). On calculating sterility in thermal preservation methods : application of the weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology*, 72 :107 – 113.
- Marks, H. M., Coleman, M. E., Lin, C. T. J., and Roberts, T. (1998). Topics in microbial risk assessment : Dynamic flow tree process. *Risk Analysis*, 18 :309 – 328.
- Masson, A. (1978). La qualité hygiénique des épices. *Trav. chim. aliment. hyg.*, 69 :544 – 549.
- McClane, B. A. (2005). Handbook on Clostridia, chapter Clostridial enterotoxins, pages pp 385 – 406. Durre P.
- McKellar, R. C. (1997). A heterogeneous population model for the analysis of bacterial growth kinetics. *International Journal of Food Microbiology*, 36 :179 – 186.
- McKellar, R. C. and Knight, K. (2000). A combined discrete-continuous model describing the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 54 :171 – 180.
- McKellar, R. C. and Lu, X. (2004). Modelling microbial responses in food, chapter Primary models, pages 21 – 63. CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Mead, G. C. (1969). Growth and sporulation of *Clostridium welchii* in breast and leg muscle of poultry. *Journal of Applied Bacteriology*, 32 :82 – 95.

- Mead, P. S., Slutsker, L., and Dietz, V. (1999). Food-related illness and death in the united states. *Emerging Infection Diseases*, 5 :607–625.
- Medema, G. J., Teunis, P. F. M., Havelaar, A. H., and Haas, C. N. (1996). Assessment of the dose-response relationship of *Campylobacter jejuni*. *International Journal of Food Microbiology*, 30 :101 – 111.
- Mellefont, L. A., McMeekin, T. A., and Ross, T. (2005). Viable count estimates of lag time responses for *Salmonella typhimurium* m48 subjected to abrupt osmotic shifts. *International Journal of Food Microbiology*, 105 :399 – 410.
- Mellefont, L. A. and Ross, T. (2003). The effect of abrupt shifts in temperature on the lag phase duration of *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca*. *International Journal of Food Microbiology*, 83 :295 – 305.
- Membré, J. M., Bassett, J., and Gorris, L. G. M. (2007). Applying the food safety objective and related standards to thermal inactivation of *Salmonella* in poultry meat. *Journal of Food Protection*, 70 :2036 – 2044.
- Membré, J. M., Leporq, B., Vialette, M., Mettler, E., Perrier, L., Thuault, D., and Zwietering, M. H. (2005). Temperature effect on bacterial growth rate : quantitative microbiology approach including cardinal values and variability estimates to perform growth simulations on/in food. *International Journal of Food Microbiology*, 100 :179–186.
- Membré, J. M., Ross, T., and McMeekin, T. (1999). Behavior of *Listeria monocytogenes* under combined chilling processes. *Letters in Applied Microbiology*, 28 :216 – 220.
- Membré, J. M., Uyttendaele, M., Bourdichon, F., Geeraerd, A., and Zwietering, M. H. (2009). Application of qmra to go beyond safe harbors in thermal processes. part 2 : quantification and examples. In 6th International Conference Predictive Modeling in Foods Meeting Abstracts and Information Booklet, Washington DC, USA.
- Meyer, M. and Tholozan, J. L. (1999). A new growth and *in vitro* sporulation medium for *Clostridium perfringens*. *Letters in Applied Microbiology*, 28 :98 – 102.

- Moats, W. A., Dabbah, R., and Edwards, V. M. (1971). Interpretation of non-logarithmic survivor curves of heated bacteria. *Journal of Food Science*, 36 :523 – 526.
- Nauta, M. J. (2000). Separation of uncertainty and variability in quantitative microbial risk assessment models. *International Journal of Food Microbiology*, 57 :9 – 18.
- Nauta, M. J. (2002). Modeling bacterial growth in quantitative microbiological risk assessment : is it possible? *International Journal of Food Microbiology*, 73 :297 – 304.
- Nauta, M. J. and Havelaar, A. H. (2008). Risk-based standards for *Campylobacter* in the broiler meat chain. *Food Control*, 19 :372–381.
- Nelder, J. A. and Mead, R. (1965). A simplex algorithm for function minimization. *Computer Journal*, 7 :308 – 313.
- Noble, J. H. (2006). Meta-analysis : Methods, strengths, weaknesses, and political uses. *J Lab Clin Med*, 147 :7 – 20.
- Notermans, S., Dufrenne, J., Teunis, P., Beumer, R., te Giffel, M., and Weem, P. P. (1997). A risk assessment study of *Bacillus cereus* present in pasteurized milk. *Food Microbiology*, 14 :143 – 151.
- Notermans, S., Nauta, M. J., Jansen, J., Jouve, J. L., and Mead, G. C. (1998). A risk assessment approach to evaluating food safety based on product surveillance. *Food Control*, 4 :217–223.
- Novak, J. S., Tunick, M. H., and Juneja, V. K. (2001). Heat treatment adaptations in *Clostridium perfringens* vegetative cells. *Journal of Food Protection*, 64 :1527–1534.
- Novak, J. S. and Yuan, J. T. C. (2003). Viability of *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* surviving mild heat or aqueous ozone treatment on beef followed by heat, alkali or salt stress. *Journal of Food Protection*, 66 :382–389.
- Ozkaynak, H., Frey, H. C., Burke, J., and Pinder, R. W. (2009). Analysis of coupled model uncertainties in source-to-dose modeling of human exposures to ambient air pollution : A $pm_{2.5}$ case study. *Atmospheric Environment*, 43 :1641 – 1649.

- Pafumi, J. (1986). Assessment of microbiological quality of spices and herbs. *Journal of Food Protection*, 49 :958 – 963.
- Parent, E. and Bernier, J. (2007). Le raisonnement bayésien : modélisation et inférence. *Springer*.
- Peleg, M. and Cole, M. (1998). Reinterpretation of microbial survival curves. *Crit. Rev. Food Sci.*, 38 :353 – 380.
- Pin, C., de Fernando, G. D. G., Ordóñez, J. A., and Baranyi, J. (2002). Analysing the lag-growth rate relationship of *Yersinia enterocolitica*. *International Journal of Food Microbiology*, 73 :197 – 201.
- Pinon, A., Zwietering, M. H., Perrier, L., Membré, J. M., Leporq, B., Thuault, E., Coroller, D., Stahl, V., and Vialette, M. (2004). Development and validation of experimental protocols for use of cardinal models for prediction of microorganism growth in food products. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 :1081 – 1087.
- Plummer, M. *Jags version 1.0.9 manual*.
- Pouillot, R. (2006). Appréciation quantitative des risques en hygiène des aliments : développements et mise en oeuvre pour la prise en compte des recommandations internationales. *PhD thesis, Thèse de doctorat, Faculté de médecine Paris-Sud, ParisXI*.
- Pouillot, R., Albert, I., Cornu, M., and 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 :87 – 104.
- Pouillot, R. and Delignette-Muller, M. L. (2010). Evaluating variability and uncertainty separately in microbial quantitative risk assessment using two *r* packages. *International Journal of Food Microbiology*, 142(3) :330 – 340.
- Pouillot, R., Goulet, V., Delignette-Muller, M. L., Mahé, A., and Cornu, M. (2009). Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in french cold-smoked salmon : II. risk characterization. *Risk Analysis*, 29 :806 – 819.

- Pouillot, R., Miconnet, N., Afchain, A.-L., Delignette-Muller, M. L., Beaufort, A., Rosso, L., Denis, J.-B., and Cornu, M. (2007). Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in french cold-smoked salmon : I. quantitative exposure assessment. *Risk Analysis*, 27(3) :683–700.
- Powell, M., Ebel, E., Schlosser, W., Walderhaug, M., and Kause, J. (2000). Dose-response envelope for *Escherichia coli* o157 :h7. *Quantitative Microbiology*, 2 :141 – 163.
- Powers, E., Lawyer, R., and Masuoka, Y. (1975). Microbiology of processed spices. *Journal of Milk and Food Technology*, 39 :683 – 687.
- R Development Core Team (2010). R : A Language and Environment for Statistical Computing. *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.
- Rabi, J., Guilpart, J., Derens, E., and Duquesnoy, A. (2010). Thermal modeling of catering meals under blast-cooling. In 1st IIR Conference on Sustainability and the Cold Chain, Cambridge, UK, march 2010.
- Ranta, J., Tuominen, P., and Maijala, R. (2005). Estimation of true *Salmonella* prevalence jointly in cattle herd and animal populations using bayesian hierarchical modeling. *Risk Analysis*, 25 :23 – 37.
- Ratkowsky, D. A., Lowry, R. K., McMeekin, T. A., Stokes, A., and Chandler, R. E. (1983). Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *Journal of Bacteriology*, 154 :1222 – 1226.
- Ratkowsky, D. A., Olley, J. N., McMeekin, T. A., and Ball, A. (1982). Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *Journal of Bacteriology*, 149 :1 – 5.
- Raudenbush, S. W. and Bryk, A. S. (2002). Hierarchical Linear Models (Second Edition). *Sage Publications*.
- Robert, C. (2001). The Bayesian Choice. *New York*.
- Robinson, T. P., Ocio, M. J., Kaloti, A., and Mackey, B. M. (1998). The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 44 :83 – 92.

- Rodriguez-Romo, L. A., Heredia, N. L., Labbe, R. G., and Garcia-Alvarado, J. S. (1998). Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in spices used in Mexico by dot blotting using a DNA probe. *Journal of Food Protection*, 61 :201–204.
- Rosenquist, H., Nielsen, N. L., Sommer, H. M., Norrung, B., and Christensen, B. B. (2003). Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. *International Journal of Food Microbiology*, 83 :87 – 103.
- Rosso, L., Lobry, J. R., Bajard, S., and Flandrois, J. P. (1995). Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 :610 – 616.
- Roy, R. J., Busta, F. F., and Thompson, D. R. (1981). Thermal inactivation of *Clostridium perfringens* after growth at several constant and linearly rising temperatures. *Journal of Food Science*, 46 :1586–1591.
- Sagoo, S. K., Little, C. L., Greenwoodb, M., Mithania, V., Granta, K. A., McLauchlina, J., de Pinnaa, E., and Threlfall, E. J. (2009). Assessment of the microbiological safety of dried spices and herbs from production and retail premises in the United Kingdom. *Food Microbiology*, 26 :39–43.
- Sakamoto, Y., Ishiguro, M., and Kitagawa, G. (1986.). Akaike Information Criterion Statistics. D. Reidel Publishing Company.
- Saltelli, A. (2002). Making best use of model evaluations to compute sensitivity indices. *Computer Physics Communications*, 145 :280 – 297.
- Sanchez-Plata, M. X., Amezcuita, A., Blankenship, E., Burson, D. E., Juneja, V. K., and Thippareddi, H. (2005). Predictive model for *Clostridium perfringens* growth in roast beef during cooling and inhibition of spore germination and outgrowth by organic acid salts. *Journal of Food Protection*, 68 :2594 – 2605.
- Sarker, M. R., Shivers, R. P., Sparks, S. G., Juneja, V. K., and McClane, B. A. (2000). Comparative experiments to examine the effects of heating on vegetative cells and spores of *Clostridium perfringens* isolates carrying plasmid genes versus chromosomal enterotoxin genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 :3234–3240.

- Scannell, A. G. M., Ross, R. P., Hill, C., and Arendt, E. K. (March 2000). An effective lacticin biopreservative in fresh pork sausage. *Journal of Food Protection*, 63 :370–375(6).
- Schaffner, D. W. (1994). Application of a statistical bootstrapping technique to calculate growth rate variance for modeling psychrotrophic pathogen growth. *International Journal of Food Microbiology*, 24 :309–314.
- Schlundt, J. (2000). Comparison of microbiological risk assessment studies published. *International Journal of Food Microbiology*, 58 :197 – 202.
- Schroder, D. J. and Busta, F. F. (1971). Growth of *Clostridium perfringens* in meat loaf with and without added soybean protein. *Journal of Milk and Food Technology*, 34 :215 – 217.
- Schwarz, G. (1978). Estimating the dimension of a model. *Annals of Statistics*, 6 :461 – 464.
- Shoemaker, S. P. and Pierson, M. D. (1976). ‘phoenix phenomenon’ in the growth of *Clostridium perfringens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 32(6) :803–807.
- Smelt, J. P. P. M. and Brul, S. (2007). Modelling microorganisms in food, chapter Modelling lag-time in predictive microbiology with special reference to lag phase of bacterial spores, pages 67–81. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge and CRC Press LCC, Boca Raton.
- Smith, A. M., Evans, D. A., and Buck, E. M. (1981). Growth and survival of *Clostridium perfringens* in rare beef prepared in water bath. *Journal of Food Protection*, 44 :9–14.
- Smith, L. D. S. (1963). Microbiological Quality of Foods, chapter *Clostridium perfringens* food poisoning, pages 77 – 83. New York : Academic Press.
- Smith, S., Juneja, V. K., and Schaffner, D. W. (2004). Influence of several methodological factors on the growth of *Clostridium perfringens* in cooling rate challenge studies. *Journal of Food Protection*, 67 :1128 – 1132.
- Sobol, I. M. (2001). Global sensitivity indices for nonlinear mathematical models and their monte carlo estimates. *Mathematics and Computers in Simulation*, 55 :271 – 280.

- Sosa-Mejia, Z., Beumer, R. R., and Zwietering, M. H. (2011). Risk evaluation and management to reaching a suggested fso in a steam meal. *Food Microbiology*, 28 :631–638.
- Spiegelhalter, D., Best, N., Carlin, B., and van der Linde, A. (2002). Bayesian measures of model complexity and fit. *Journal of the Royal Statistical Society Series B*, 64 :583 – 639.
- Strachan, N. J., Doyle, M. P., Kasuga, F., Rotariu, O., and Ogden, I. D. (2005). Dose-response modelling of *Escherichia coli* o157 :h7 incorporating data from foodborne and environmental outbreaks. *International Journal of Food Microbiology*, 103 :35 – 47.
- Stram, D. O. (1996). Meta-analysis of published data using a linear mixed-effects model. *Biometrics*, 52 :536–544.
- Stringer, S. C., George, S. M., and Peck, M. W. (2000). Thermal inactivation of *Escherichia coli* o157 :h7. *Journal of Applied Microbiology*, 29 :79S – 89S.
- Stringer, S. C., Webb, M. D., George, S. M., Pin, C., and Peck, M. W. (2005). Heterogeneity of times required for germination and outgrowth from single spores of non proteolytic *Clostridium botulinum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 :4998 – 5003.
- Stringer, S. C., Webb, M. D., and Peck, M. W. (2009). Contrasting effects of heat treatment and incubation temperature on germination and outgrowth of individual spores of non proteolytic *Clostridium botulinum* bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 :2712 – 2719.
- Strong, D. H., Canada, J. C., and Griffiths, B. B. (1963). Incidence of *Clostridium perfringens* in american foods. *Applied Microbiology*, 11 :42–44.
- Strong, D. H., Duncan, C. L., and Perna, G. (1971). *Clostridium perfringens* type a food poisoning ii. response of the rabbit ileum as an indication of enteropathogenicity of strains of *Clostridium perfringens* in human beings. *Infection and Immunity*, 3 :171–178.
- Sutton, A. J., Abrams, K. R., and Jones, D. R. (2001). An illustrated guide to the methods of meta-analysis. *Journal of Evaluation in Clinical Practice*, 7 :135 – 148.

- Sutton, R. A. and Hobbs, B. C. (1968). Food poisoning caused by heat-sensitive *Clostridium welchii*. a report of five recent outbreaks. *Journal of Hygiene*, 66 :135–146.
- Swinnen, I. A., Bernaerts, K., Dens, E. J., Geeraerd, A. H., and Impe, J. F. V. (2004). Predictive modelling of the microbial lag phase : a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94 :137 – 159.
- Tanaka, D., Kimata, K., Shimizu, M., Isobe, J., Watahiki, M., Karasawa, T., Yamagishi, T., Kuramoto, S., Serikawa, T., Ishiguro, F., Yamada, M., Yamaoka, K., Tokoro, M., Fukao, T., Matsumoto, M., Hiramatsu, R., Monma, C., and Nagai, Y. (2007). Genotyping of *Clostridium perfringens* isolates collected from food poisoning outbreaks and healthy individuals in japan based on the *cpe* locus. *Japanese Journal of Infectious Disease*, 60 :68 – 69.
- Taormina, P. J., Bartholomew, G. W., and Dorsa, W. J. (2003). Incidence of *Clostridium perfringens* in commercially produced cured raw meat product mixtures and behavior in cooked products during chilling and refrigerated storage. *Journal of Food Protection*, 66 :72–81.
- Teunis, P. F. and Havelaar, A. H. (2000). The *bêta* poisson dose-response model is not a single hit model. *Risk Analysis*, 20 :513 – 520.
- Teunis, P. F., Nagelkerke, N. J., and Haas, C. N. (1999). Dose response models for infectious gastroenteritis. *Risk Analysis*, 19 :1251 – 1260.
- Teunis, P. F. M., Kasuga, F., Fazil, A., Ogden, I. D., Rotariu, O., and Strachan, N. J. C. (2010). Dose response modeling of *Salmonella* using outbreak data. *International Journal of Food Microbiology*, 144 :243 – 249.
- Teunis, P. F. M., Ogden, I. D., and Strachan, N. J. C. (2008). Hierarchical dose response of *E. coli* o157 :h7 from human outbreaks incorporating heterogeneity in exposure. *Epidemiology and Infectiology*, 136 :761 – 770.
- Teunis, P. F. M., Takumi, K., and Shinagawa, K. (2004). Dose response for infection by *Escherichia coli* o157 :h7 from outbreak data. *Risk Analysis*, 24 :401 – 407.

- Thippareddi, H., Juneja, V. K., Phebus, R. K., Marsden, J. L., and Kastner, C. L. (2003). Control of *Clostridium perfringens* germination and outgrowth by buffered sodium citrate during chilling of roast beef and injected pork. *Journal of Food Protection*, 66 :376 – 381.
- Tuomi, S., Matthews, M. E., and Marth, E. H. (1974). Behavior of *Clostridium perfringens* in precooked chilled ground beef gravy during cooling, holding, and reheating. *Journal of Milk and Food Technology*, 37 :494–498.
- van Asselt, E. D. and Zwietering, M. H. (2006). A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 107 :73–82.
- van der Wilk, E. A. and Jansen, J. (2005). Lifestyle-related risks : are trends in europe converging ? *Public Health*, 119(1) :55–66.
- van Derlinden, E., Lule, I., Bernaerts, K., and van Impe, J. F. (2009). Quantifying the heterogeneous heat response of *Escherichia coli* under dynamic temperatures. *Journal of Applied Microbiology*, 108 :1123 – 1135.
- van Gerwen, S. J. C. and Zwietering, M. H. (1998). Growth and inactivation models to be used in quantitative risk assessments. *Journal of Food Protection*, 61 :1541 – 1549.
- van Impe, J. F., Nicolai, B. M., Martens, T., Baerdemaeker, J. D., and Vandewalle, J. (1992). Dynamic mathematical model to predict microbial growth and inactivation during food processing. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 :2901 – 2909.
- Vaudagna, S. R., Sanchez, G., Neira, M. S., Insani, E. M., Picallo, A. B., Gallinger, M. M., and Lasta, J. A. (2002). Sous vide cooked beef muscles : effects of low temperature along time (ltât) treatments on their quality characteristics and storage stability. *International Journal of Food Science & Technology*, 37(4) :425–441.
- Vose, D. (2000). Risk analysis : a quantitative guide. *John Wiley and sons USA New York*. 418 pp.
- Ward, E. J. (2008). A review and comparison of four commonly used bayesian

- and maximum likelihood model selection tools. *Ecological Modelling*, 211 :1 – 10.
- Webb, M. D., Pin, C., Peck, M. W., and Stringer, S. C. (2007). Historical and contemporary nacl concentrations affect the duration and distribution of lag times from individual spores of non proteolytic *Clostridium botulinum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 :2118 – 2127.
- Whiting, R. C. (1993). Modeling bacterial survival in unfavorable environments. *Journal of Industrial Microbiology*, 12 :240 – 246.
- Whiting, R. C. and Bagi, L. K. (2002). Modelling the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 73 :291 – 295.
- Whiting, R. C. and Buchanan, R. L. (1997). Development of a quantitative risk assessment model for *Salmonella enteritidis* in pasteurized liquid eggs. *International Journal of Food Microbiology*, 36 :111– 125.
- Whiting, R. C. and Cygnarowicz-Provost, M. (1992). A quantitative model for bacterial growth and decline. *Food Microbiology*, 9 :269 – 277.
- Wijnands, L. M., van Asch, E. H. M. D., van der Meij-Florijn, A., and van Leusden, F. M. (2009). Food borne disease associated with *Clostridium perfringens* : investigations on exposure assessment. In *Spore Forming Bacteria in Foods*.
- Willardsen, R. R., Busta, F. F., and Allen, C. E. (1979). Growth of *Clostridium perfringens* in three different beef media and fluid thioglycollate medium at static and constantly rising temperatures. *Journal of Food Protection*, 42 :144 – 148.
- Willardsen, R. R., Busta, F. F., Allen, C. E., and Smith, L. B. (1978). Growth and survival of *Clostridium perfringens* during constantly rising temperatures. *Journal of Food Science*, 43 :470–475.
- Zwietering, M. H. (2009). Quantitative risk assessment : Is more complex always better ? simple is not stupid and complex is not always more correct. *International Journal of Food Microbiology*, 134 :57 – 62.
- Zwietering, M. H. and den Besten, H. M. W. (2011). Modelling : One word for many activities and uses. *Food Microbiology*, 28 :818 – 822.

Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M. ., and van't Riet, K. (1990). *Modeling of the bacterial growth curve*. Applied and Environmental Microbiology, 56 :1875 – 1881.

Zwietering, M. H., Stewart, C. M., Whiting, R. C., and International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) (2011). *Validation of control measures in a food chain using the fso concept*. Food Control, 21 :1716 – 1722.

Appendices

Annexe A

Données de croissance de *Clostridium perfringens* en conditions isothermes

Les données collectées sont de deux types : les données brutes, sous forme de dénombrements, et les estimations de paramètres des modèles primaires par les auteurs. Provenant de méta analyse, chaque type de cinétiques correspond à un plan d'échantillonnage déséquilibré, comme le montrent les tableaux de répartition des observations par souche et par milieu de croissance pour les données brutes (tableau A.1) et pour les données présentées sous forme de paramètres (tableau A.2).

Les données collectées ont présentées dans le tableau A.3 pour les données brutes et dans le tableau A.4 pour les données présentées sous forme de paramètres.

Souches	Milieu de croissance									Total
	CMM	FTG	Goulash	NSMGY	Poisson	RCM	TPGYDC	Boeuf	Volaille	
8797									17	17
8-6		1		1						2
ATCC 13124								5		5
ATCC 3624		2								2
CP23					7					7
DSM756						1				1
HT9	5									5
NA					2			2		4
NCTC 8238 NCTC 8239 ATCC 10288									8	8
NCTC 8238 NCTC 8239 ATCC 10388								9		9
NCTC 8238 NCTC 8239 ATCC 10240							65			65
NCTC 8239								8		8
NCTC 8798								1		1
R3		2		1						3
RSKK 480 RSKK 262 ATCC 13124			3							3
Total	5	5	3	2	9	1	65	25	25	140

TABLE A.1 – Répartition des cinétiques de croissance présentées en données de dénombrement selon les souches et les milieux de croissance.

Souches	Milieu de croissance					Total
	FTG	FTG + Boeuf	NSMGY	Boeuf	Volaille	
6_8			2			2
ATCC 3624	3	3		5		11
E1	2					2
E15	1					1
E2	1					1
FD1	6	4		4		14
FD1041	4	4		5		13
NCTC 8238	1			5		6
Cocktail 1 ^a	1			13		14
Cocktail 2 ^b				32		33
NCTC 8239					2	2
NCTC 8797	3					3
NCTC 8798	4	4	2	3		13
R3			4			4
S40				1		1
S45				1		1
Total	26	15	8	69	2	120

^a. NCTC 8238 NCTC 10240 ATCC 3624 NCTC 8797 NCTC 8798 NCTC 8239 S40 S45

^b. NCTC 8797 NCTC 8798 NCTC 10240

TABLE A.2 – Répartition des cinétiques de croissance présentées sous forme de paramètres selon les souches et les milieux de croissance.

Référence	Nombre de cinétiques	Souches	Type de choc chaud	Milieu de croissance	Température de croissance	Procédure de dénombrement
Mead, 1969	17	1 souche	80°C 10 mn dans bouillon CMM	Volaille	15°C : 2 CC 22°C : 2 CC 30°C : 2 CC 37°C : 6 CC 50°C : 5 CC 50°C : 1 CC 51°C : 1 CC	NA
Shoemaker and Pierson, 1976	5	1 souche	NA	CMM	51.5°C : 1 CC 51.7°C : 1 CC 51°C : 1 CC 37°C : 1 CC	NA
Foegeding and Busta, 1980	5	1 souche	NA	Boeuf	41°C : 1 CC 45°C : 2 CC 49°C : 1 CC	Sur boîte TSC après incubation 24 h à 37°C
Juneja <i>et al.</i> , 1994	8	1 souche	75°C 20 mn dans bouillon FTG	Boeuf	15°C : 2 CC 28°C : 2 CC 37°C : 2 CC 42°C : 2 CC	Sur boîte TSC après incubation 48 h à 37°C
Fapohunda <i>et al.</i> , 1994	2	NA	NA	Boeuf	15°C : 1 CC 35°C : 1 CC	Sur boîte TSC après incubation 24 h à 37°C
Labbé and Chang, 1995	1	1 souche	75°C 10 mn dans bouillon FTG	Boeuf	41°C : 1 CC	Sur boîte TyAG après incubation 24 h à 37°C
Juneja and Marmer, 1996	8	1 cocktail	75°C 20 mn dans solution stérile	Volaille	15°C : 3 CC 28°C : 4 CC	Sur boîte TSC après incubation 48 h à 37°C

Référence	Nombre de cinétiques	Souches	Type de choc chaud	Milieu de croissance	Température de croissance	Procédure de dénombrement
Kimura <i>et al.</i> , 1996	7	1 souche 1 cocktail	NA	Poisson	15°C : 4 CC 30°C : 4 CC 15°C : 3 CC 19°C : 7 CC 22°C : 6 CC 25°C : 6 CC 28°C : 5 CC 30°C : 6 CC 35°C : 3 CC 37°C : 5 CC 42°C : 6 CC 45°C : 6 CC 47°C : 6 CC 50°C : 6 CC	NA
Juneja <i>et al.</i> , 1999	65		75°C 20 mn dans solution stérile	Bouillon TPGYDC		Sur boîte SFP après incubation 48 h à 37°C
Meyer and Tholozan, 1999	5	2 souches	NA	NSMGY : 2 CC FTG : 3 CC	37°C : 5 CC	Densité optique Sur boîte TSC après incubation 48 h à 37°C
Scannell <i>et al.</i> , 2000	1	1 souche	NA	RCM	37°C : 1 CC	Sur boîte TSC après incubation 48 h à 37°C
Aran <i>et al.</i> , 2001	3	1 cocktail	80°C 10 mn dans boeuf	Goulash	15°C : 1 CC 20°C : 1 CC 25°C : 1 CC	Sur boîte TSC après incubation 48 h à 37°C

Référence	Nombre de cinétiques	Souches	Type de choc chaud	Milieu de croissance	Température de croissance	Procédure de dénombrement
Huang, 2003	6	1 cocktail	75°C 20 mn dans boeuf	Boeuf	25°C : 1 CC 30°C : 1 CC 36°C : 1 CC 45°C : 1 CC 47°C : 1 CC 50°C : 1 CC	Sur boîte TSC après incubation 48 h à 37°C
Huang, 2004	3	1 cocktail	75°C 20 mn dans boeuf	Boeuf	17°C : 1 CC 30°C : 1 CC 47°C : 1 CC	Sur boîte TSC après incubation 48 h à 37°C

TABLE A.3 – Références et caractéristiques des données de dénombrement collectées sur tous milieux et produits non modifiés. (NA pour les informations manquantes, CC pour courbe de croissance.)

Référence	Nombre de cinétiques	Souches	Type de choc chaud	Milieu de croissance ou produit	Température de croissance
Kang <i>et al.</i> , 1969	3	3 souches	80°C 15 mn dans bouillon FTG	FTG	37°C : 3 C
Schroder and Busta, 1971	2	2 souches	NA	Boeuf	45°C : 2 C
Rey <i>et al.</i> , 1975	7	5 souches	80°C 20 mn dans bouillon CMM	FTG	15°C : 4 C 22°C : 1 C 50°C : 1 C
Willardsen <i>et al.</i> , 1978	12	1 cocktail	NA	Boeuf	26°C : 1 C 33°C : 2 C 37°C : 2 C 41°C : 2 C 45°C : 2 C 49°C : 2 C 51°C : 1 C
Willardsen <i>et al.</i> , 1979	7	1 cocktail	NA	Boeuf	41°C : 3 C 45°C : 4 C
Craven <i>et al.</i> , 1981	2	1 souche	75°C 20 mn dans bouillon FTG	Volaille	37°C : 2 C
Labbé and Huang, 1995	47	5 souches	75°C 10 mn dans bouillon FTG	FTG FTG + Boeuf Boeuf	37°C : 12 C 41°C : 11 C 43°C : 10 C 46°C : 12 C 48°C : 2 C

**Données de croissance de *Clostridium perfringens* en conditions
238 isothermes**

Référence	Nombre de cinétiques	Souches	Type de choc chaud	Milieu de croissance ou produit	Température de croissance
Meyer and Tholozan, 1999	8	3 souches	NA	NSMGY	37°C : 8 C
					13°C : 2 C
					16°C : 2 C
					20°C : 2 C
					23°C : 2 C
					25°C : 2 C
					28°C : 2 C
					31°C : 2 C
Juneja <i>et al.</i> , 2008	32	1 cocktail	75°C 20 mn dans boeuf	Boeuf	33°C : 2 C
					35°C : 2 C
					37°C : 2 C
					40°C : 2 C
					43°C : 2 C
					46°C : 2 C
					48°C : 2 C
					50°C : 2 C
					51°C : 2 C

TABLE A.4 – Références et caractéristiques des données sous forme de paramètres collectées sur tous milieux et produits non modifiés. (NA pour les informations manquantes, C pour cinétique.)

Annexe B

Données de croissance de *Clostridium perfringens* en conditions thermiques dynamiques

**Données de croissance de *Clostridium perfringens* en conditions
thermiques dynamiques**

Référence	Milieu	Taux de refroidissement exponentiel k (h^{-1})	Croissance observée ($\log_{10}cfu.g^{-1}$)
Thippareddi <i>et al.</i> , 2003	Boeuf	0.095	5.27
Thippareddi <i>et al.</i> , 2003	Boeuf	0.146	1.51
Smith <i>et al.</i> , 2004	Boeuf	0.120	5.15,5.27,5.83
Smith <i>et al.</i> , 2004	Boeuf	0.140	3.19,3.99,5.22,5.29,5.01
Sanchez-Plata <i>et al.</i> , 2005	Boeuf	0.096	5.16,5.12,5.16
Sanchez-Plata <i>et al.</i> , 2005	Boeuf	0.112	3.81,4.83,5.15
Sanchez-Plata <i>et al.</i> , 2005	Boeuf	0.135	3.73,2.78,3.7
Sanchez-Plata <i>et al.</i> , 2005	Boeuf	0.169	2,3.39,4.88
Sanchez-Plata <i>et al.</i> , 2005	Boeuf	0.225	1.71,0.27,2.17
Juneja <i>et al.</i> , 2006a	Boeuf	0.112	4.6
Juneja <i>et al.</i> , 2006a	Boeuf	0.169	3.2
Juneja <i>et al.</i> , 2006b	Boeuf	0.096	4.7
Juneja <i>et al.</i> , 2006b	Boeuf	0.112	5
Juneja <i>et al.</i> , 2006b	Boeuf	0.135	4.5
Juneja <i>et al.</i> , 2006b	Boeuf	0.225	4.2
Juneja <i>et al.</i> , 2007	Boeuf	0.096	4.9,4.6
Juneja <i>et al.</i> , 2007	Boeuf	0.112	4.6,4.7
Juneja <i>et al.</i> , 2007	Boeuf	0.135	4.9,4.7,5.4,4.4,5.1,5
Juneja <i>et al.</i> , 2007	Boeuf	0.225	3.9,4,4.1,2.5
Le Marc <i>et al.</i> , 2008	Boeuf	0.114	5.05,4.88,4.43
Le Marc <i>et al.</i> , 2008	Boeuf	0.164	3.01,3.08,2.9
Le Marc <i>et al.</i> , 2008	Boeuf	0.187	2.13,1.91,1.62
Le Marc <i>et al.</i> , 2008	Boeuf	0.212	1.18,1.51,1.27
Le Marc <i>et al.</i> , 2008	Boeuf	0.222	1.14,1.22,0.52
Le Marc <i>et al.</i> , 2008	Boeuf	0.254	1.49,1.37,1.19
Le Marc <i>et al.</i> , 2008	Boeuf	0.339	0.26,0.29,0.28
Le Marc <i>et al.</i> , 2008	Boeuf	0.367	0,0.3,0

TABLE B.1 – Données de validation collectées, obtenues en conditions thermiques dynamiques. La croissance observée correspond à l'augmentation du nombre de cellules.

Annexe C

Données de destruction isotherme des cellules végétatives

Ce sont les données collectées dans la littérature, obtenues dans des conditions isothermes. Elles nous ont permis d'estimer les paramètres du modèle de destruction thermique des cellules végétatives.

Référence	Culture des cellules	Souches	Choc chaud	Milieu de destruction	Nombre de cinétiques
Heredia <i>et al.</i> (1997)	Cond1	FD1	N	FTG	55°C : 4 CD
Heredia <i>et al.</i> (1997)	Cond2	FD1	O	FTG	55°C : 1 CD
Heredia <i>et al.</i> (1997)	Cond3	FD1	O	FTG	55°C : 1 CD
Heredia <i>et al.</i> (1997)	Cond4	FD1	O	FTG	55°C : 1 CD
Heredia <i>et al.</i> (1997)	Cond5	FD1	O	FTG	55°C : 1 CD
Heredia <i>et al.</i> (1997)	Cond1	FD1041	N	FTG	55°C : 4 CD
Heredia <i>et al.</i> (1997)	Cond2	FD1041	O	FTG	55°C : 1 CD
Heredia <i>et al.</i> (1997)	Cond3	FD1041	O	FTG	55°C : 1 CD
Heredia <i>et al.</i> (1997)	Cond4	FD1041	O	FTG	55°C : 1 CD
Heredia <i>et al.</i> (1997)	Cond5	FD1041	O	FTG	55°C : 1 CD
Juneja <i>et al.</i> (2001)	Cond1	NCTC8238	N	boeuf	58°C : 2 CD
Juneja <i>et al.</i> (2001)	Cond2	NCTC8238	O	boeuf	58°C : 2 CD
Juneja <i>et al.</i> (2001)	Cond1	NCTC10239	N	boeuf	58°C : 1 CD
Juneja <i>et al.</i> (2001)	Cond2	NCTC10239	O	boeuf	58°C : 1 CD
Juneja <i>et al.</i> (2001)	Cond1	153	N	boeuf	58°C : 1 CD
Juneja <i>et al.</i> (2001)	Cond2	153	O	boeuf	58°C : 1 CD
Juneja <i>et al.</i> (2001)	Cond1	222	N	boeuf	58°C : 1 CD
Juneja <i>et al.</i> (2001)	Cond2	222	O	boeuf	58°C : 1 CD
Juneja <i>et al.</i> (2001)	Cond1	FD1041	N	boeuf	58°C : 1 CD
Juneja <i>et al.</i> (2001)	Cond2	FD1041	O	boeuf	58°C : 1 CD
Juneja <i>et al.</i> (2001)	Cond1	C1841	N	boeuf	58°C : 1 CD
Juneja <i>et al.</i> (2001)	Cond2	C1841	O	boeuf	58°C : 1 CD
Juneja <i>et al.</i> (2001)	Cond1	F4969	N	boeuf	58°C : 1 CD
Juneja <i>et al.</i> (2001)	Cond2	F4969	O	boeuf	58°C : 1 CD
Juneja <i>et al.</i> (2001)	Cond1	NB16	N	boeuf	58°C : 1 CD
Juneja <i>et al.</i> (2001)	Cond2	NB16	O	boeuf	58°C : 1 CD
Juneja <i>et al.</i> (2001)	Cond1	B40	N	boeuf	58°C : 1 CD
Juneja <i>et al.</i> (2001)	Cond2	B40	O	boeuf	58°C : 1 CD
Novak <i>et al.</i> (2001)	Cond1	NCTC8679	N	FTG	60°C : 1 CD
Novak <i>et al.</i> (2001)	Cond2	NCTC8679	N	FTG	60°C : 1 CD
Novak <i>et al.</i> (2001)	Cond3	NCTC8679	N	FTG	60°C : 3 CD
Novak <i>et al.</i> (2001)	Cond4	NCTC8679	N	FTG	60°C : 1 CD
Novak <i>et al.</i> (2001)	Cond1	NCTC8238	N	FTG	60°C : 3 CD
Novak <i>et al.</i> (2001)	Cond2	NCTC8238	N	FTG	60°C : 1 CD
Novak <i>et al.</i> (2001)	Cond3	NCTC8238	N	FTG	60°C : 3 CD
Novak <i>et al.</i> (2001)	Cond4	NCTC8238	N	FTG	60°C : 4 CD
Novak <i>et al.</i> (2001)	Cond1	H6	N	FTG	60°C : 3 CD
Novak <i>et al.</i> (2001)	Cond2	H6	N	FTG	60°C : 1 CD
Novak <i>et al.</i> (2001)	Cond3	H6	N	FTG	60°C : 3 CD
Novak <i>et al.</i> (2001)	Cond4	H6	N	FTG	60°C : 4 CD
Novak <i>et al.</i> (2001)	Cond1	NCTC8279	N	FTG	60°C : 2 CD
Novak <i>et al.</i> (2001)	Cond3	NCTC8279	N	FTG	60°C : 3 CD
Novak <i>et al.</i> (2001)	Cond4	NCTC8279	N	FTG	60°C : 3 CD

Référence	Culture des cellules	Souches	Choc chaud	Milieu de destruction	Nombre de cinétiques
Sarker <i>et al.</i> (2000)	Cond1	NCTC8239	N	FTG	55°C : 1 CD
Sarker <i>et al.</i> (2000)	Cond1	191-10	N	FTG	55°C : 1 CD
Sarker <i>et al.</i> (2000)	Cond1	C1841	N	FTG	55°C : 1 CD
Sarker <i>et al.</i> (2000)	Cond1	FD1041	N	FTG	55°C : 1 CD
Sarker <i>et al.</i> (2000)	Cond1	NCTC10239	N	FTG	55°C : 1 CD
Sarker <i>et al.</i> (2000)	Cond1	F4969	N	FTG	55°C : 1 CD
Sarker <i>et al.</i> (2000)	Cond1	NB16	N	FTG	55°C : 1 CD
Sarker <i>et al.</i> (2000)	Cond1	B40	N	FTG	55°C : 1 CD
Sarker <i>et al.</i> (2000)	Cond1	222	N	FTG	55°C : 1 CD
Sarker <i>et al.</i> (2000)	Cond1	153	N	FTG	55°C : 1 CD
Sarker <i>et al.</i> (2000)	Cond1	458	N	FTG	55°C : 1 CD
Sarker <i>et al.</i> (2000)	Cond1	E13	N	FTG	55°C : 1 CD
Sarker <i>et al.</i> (2000)	Cond1	F5603	N	FTG	55°C : 1 CD
Roy <i>et al.</i> (1981)	Cond1	NCTC8238	N	boeuf	57°C : 3 CD
Roy <i>et al.</i> (1981)	Cond2	NCTC8238	N	boeuf	57°C : 2 CD
Roy <i>et al.</i> (1981)	Cond3	NCTC8238	N	boeuf	57°C : 3 CD
Roy <i>et al.</i> (1981)	Cond1	NCTC8238	N	boeuf	59°C : 2 CD
Roy <i>et al.</i> (1981)	Cond2	NCTC8238	N	boeuf	59°C : 2 CD
Roy <i>et al.</i> (1981)	Cond3	NCTC8238	N	boeuf	59°C : 2 CD
Roy <i>et al.</i> (1981)	Cond4	NCTC8238	N	boeuf	59°C : 2 CD
Roy <i>et al.</i> (1981)	Cond1	NCTC8798	N	boeuf	57°C : 2 CD
Roy <i>et al.</i> (1981)	Cond2	NCTC8798	N	boeuf	57°C : 2 CD
Roy <i>et al.</i> (1981)	Cond3	NCTC8798	N	boeuf	57°C : 3 CD
Roy <i>et al.</i> (1981)	Cond1	NCTC8798	N	boeuf	59°C : 2 CD
Roy <i>et al.</i> (1981)	Cond2	NCTC8798	N	boeuf	59°C : 2 CD
Roy <i>et al.</i> (1981)	Cond3	NCTC8798	N	boeuf	59°C : 2 CD
Roy <i>et al.</i> (1981)	Cond4	NCTC8798	N	boeuf	59°C : 2 CD
Roy <i>et al.</i> (1981)	Cond5	NCTC8238	N	boeuf	59°C : 3 CD
Roy <i>et al.</i> (1981)	Cond6	NCTC8238	N	boeuf	55°C : 1 CD
Roy <i>et al.</i> (1981)	Cond6	NCTC8238	N	boeuf	57°C : 3 CD
Roy <i>et al.</i> (1981)	Cond6	NCTC8238	N	boeuf	59°C : 5 CD
Roy <i>et al.</i> (1981)	Cond6	NCTC8238	N	boeuf	60°C : 4 CD
Roy <i>et al.</i> (1981)	Cond6	NCTC8238	N	boeuf	61°C : 3 CD
Roy <i>et al.</i> (1981)	Cond7	NCTC8238	N	boeuf	59°C : 4 CD
Roy <i>et al.</i> (1981)	Cond5	NCTC8798	N	boeuf	59°C : 3CD
Roy <i>et al.</i> (1981)	Cond6	NCTC8798	N	boeuf	57°C : 3 CD
Roy <i>et al.</i> (1981)	Cond6	NCTC8798	N	boeuf	59°C : 2 CD
Roy <i>et al.</i> (1981)	Cond6	NCTC8798	N	boeuf	61°C : 3 CD
Roy <i>et al.</i> (1981)	Cond7	NCTC8798	N	boeuf	59°C : 3 CD

Référence	Culture des cellules	Souches	Choc chaud	Milieu de destruction	Nombre de cinétiques
Smith <i>et al.</i> (1981)	Cond1	S45	N	boeuf	60°C : 1 CD
Smith <i>et al.</i> (1981)	Cond1	S45	N	boeuf	65.6°C : 1 CD
Foegeding and Busta (1980)	Cond1	ATCC13124	N	boeuf	54.9 °C : 1 CD
Foegeding and Busta (1980)	Cond1	ATCC13124	N	boeuf	55.5°C : 1 CD
Foegeding and Busta (1980)	Cond1	ATCC13124	N	boeuf	56.2 °C : 1 CD
Foegeding and Busta (1980)	Cond1	ATCC13124	N	boeuf	56.8 °C : 1 CD
Juneja and Marmer (1998)	Cond1	8238-8239-10288	N	boeuf	55°C : 2 CD
Juneja and Marmer (1998)	Cond1	8238-8239-10288	N	boeuf	57.5°C : 2 CD
Juneja and Marmer (1998)	Cond1	8238-8239-10288	N	boeuf	60°C : 2 CD
Juneja and Marmer (1998)	Cond1	8238-8239-10288	N	boeuf	62.5°C : 2 CD

TABLE C.1 – Données obtenues en conditions isothermes et utilisées pour l'estimation des paramètres du modèle de destruction des cellules végétatives. Pour chaque étude, des conditions ont été définies à partir des conditions de culture des cellules végétatives. Pour chaque condition, chaque souche, le nombre de cinétiques de destruction (CD) est indiqué pour chaque température testée.

Annexe D

Données de destruction en conditions thermiques dynamiques

*Ces données proviennent d'études sur la croissance de *Clostridium perfringens* pendant une phase de réchauffement. Les conditions initiales sont définies à partir du premier dénombrement réalisé après 53°C et les conditions finales sont les conditions au moment du dernier dénombrement.*

Référence	Conditions initiales			Conditions finales		Analyse	
	Temps (h)	Température (°C)	Concent. $\log_{10}cfu.g^{-1}$	Temps (h)	Température (°C)	Temps (h)	Concent. $\log_{10}cfu.g^{-1}$
Tuomi <i>et al.</i> (1974)	22.53	65.50	5.87	22.6	74.00	22.60	0.00
Tuomi <i>et al.</i> (1974)	22.53	64.50	6.20	23.0	74.00	23.00	0.00
Willardsen <i>et al.</i> (1978)	3.50	54.75	5.50	4.5	63.25	4.20	3.05
Willardsen <i>et al.</i> (1978)	3.50	54.75	5.25	4.5	63.25	4.25	3.50
Willardsen <i>et al.</i> (1978)	5.00	55.00	6.30	6.0	61.00	5.70	3.90
Willardsen <i>et al.</i> (1978)	5.50	54.25	5.50	6.0	58.00	5.70	4.20
Foegeding and Busta (1980)	7.00	53.70	7.90	7.9	57.40	7.90	5.50
Foegeding and Busta (1980)	7.20	54.50	7.80	8.3	59.00	8.30	5.20
Foegeding and Busta (1980)	4.90	54.40	7.70	5.6	58.60	5.60	7.30
Foegeding and Busta (1980)	4.80	53.80	6.40	5.5	58.00	5.50	6.00
Foegeding and Busta (1980)	4.00	55.00	6.20	4.8	61.00	4.67	5.30
Foegeding and Busta (1980)	4.00	55.00	5.80	4.8	61.00	4.67	5.30

TABLE D.1 – Données de destruction thermique utilisées pour la validation du modèle. Les conditions initiales correspondent au moment où est réalisé le premier dénombrement après 53°C : le temps correspond à l'horaire de réalisation de ce dénombrement, la température à la température à coeur du boeuf au moment du dénombrement et concent. à la concentration de *Clostridium perfringens* dans le boeuf à ce même moment. Les conditions finales correspondent au terme du profil thermique : le temps correspond à l'horaire et la température à la température à coeur du boeuf à la fin du profil thermique. L'analyse correspond au moment où est réalisé le dernier dénombrement (qui n'est pas réalisé forcément au terme du profil thermique) : le temps correspond à l'horaire de ce dernier dénombrement et concent. à la dernière concentration dénombrée.

Annexe E

Comparaison de toutes les combinaisons possibles d'effets

Nous avons testé toutes les combinaisons possibles d'effets, fixes et aléatoires, du modèle de destruction thermique des cellules végétatives. Les AIC et les BIC de chaque modèle, estimés en utilisant le package `lme4`, sont reportés dans le tableau E.1.

Facteurs aléatoires			Facteurs fixes		BIC	AIC
Etude	Culture des cellules	Souche	Milieu	Choc chaud		
					219.4	210.1
			X		208.6	196.2
X			X		98.8	83.3
	X		X		88.6	73.1
		X	X		130.7	115.1
X	X		X		80.7	62.1
X		X	X		91.4	72.8
	X	X	X		81.9	63.3
				X	211.3	198.9
X				X	96.6	81.1
	X			X	83.4	67.9
		X		X	163.1	147.6
X	X			X	80.7	62.1
X		X		X	88.6	70.0
	X	X		X	76.9	58.3
			X	X	199.1	183.6
X			X	X	101.6	83.0
	X		X	X	87.6	69.0
		X	X	X	135.7	117.1
X	X		X	X	85.7	64.0
X		X	X	X	93.7	72.0
	X	X	X	X	81.0	59.3
X					93.7	81.3
	X				83.6	71.1
		X			160.3	147.9
X	X				75.7	60.2
X		X			86.4	70.9
	X	X			76.9	61.4
X	X	X			67.2	48.6
X	X	X	X		72.2	50.5
X	X	X		X	72.1	50.4
X	X	X	X	X	77.1	52.3

TABLE E.1 – Différentes combinaisons d'effets testées. X signifie que l'effet est décrit dans le modèle.

Annexe F

Données collectées pour le modèle dose réponse

Le tableau F.1 présente les observations issues de TIAC, que nous avons utilisées pour estimer les paramètres du modèle ‘TIAC’ et le tableau F.2 présente les données issues d’expériences.

Pour décrire la dose ingérée par chaque personne exposée lors des épisodes de TIAC, nous avons utilisé des données issues d’INCA2 pour décrire la variabilité des tailles de portions. La figure F.1 montre les données collectées à partir de l’enquête INCA2 et leurs ajustements par des distributions paramétriques, dont les paramètres figurent dans le tableau F.3.

Référence	Sour -ce	Nombre exposés	Type exposés	Nombre malades	Souche	Aliment	Concent. ($cfu.g^{-1}$)
hobbs1953	TP	475	Y	275	NA	boeuf	$1.3.10^5$
hobbs1953	TP	52	H	28	NA	boeuf	$1.3.10^5$
hobbs1953	TP	70	H	40	NA	boeuf	$4.5.10^7$
hobbs1953	TP	140	H	35	NA	boeuf	$1.8.10^7$
sutton1968	TP	225	NA	88	NA	langue	$1.0.10^7$
sutton1968	TP	180	O	60	NA	viande	$1.0.10^6$
carmes	TI	100	NA	50	NA	cassoulet	$5.5.10^4$
pot de terre	TI	25	NA	7	NA	porc	$1.1.10^3$
thales	TI	332	NA	5	NA	poulet	$5.1.10^5$
affiche	TI	278	NA	33	NA	pdt mer	$5.2.10^3$

TABLE F.1 – Données collectées issues de TIAC : 'TI' pour les TIAC investiguées et 'TP' pour les TIAC publiées. Les informations manquantes sont désignées par 'NA'.

Référence	Nombre exposés	Type exposés	Nombre malades	Souche	Aliment	Dose [min-max] $\log_{10}cfu$	Coef. de variation
dische1957	24	H	17	8797	bouillon	9.1 [7.9,10.2]	$4.2 \cdot 10^{-2}$
dische1957	5	H	3	8797	bouillon	9.1 [8.7,9.6]	$1.7 \cdot 10^{-2}$
dische1957	7	H	1	8797	bouillon	8.0 [6.6,9.4]	$5.8 \cdot 10^{-2}$
dische1957	6	H	0	8239	bouillon	9.3 [8.8,9.8]	$4.2 \cdot 10^{-2}$
dische1957	2	H	1	8238	bouillon	8.9	
dack1954	5	H	0	683	lait	9.5	
dack1954	5	H	0	689	lait	9.3	
dack1954	5	H	0	690	lait	9.1	
dack1954	5	H	0	692	lait	9.7	
dack1954	6	H	0	690	poulet	8.7	
dack1954	6	H	0	692	poulet	9.0	
strong1971	5	H	2	8239	lait choco	9.8	
strong1971	3	H	3	8239	boeuf	10.8	
strong1971	5	H	0	8798	lait choco	10.0	
strong1971	4	H	1	8798	boeuf	9.5	
strong1971	4	H	2	8798	boeuf	10.6	
strong1971	5	H	3	10239	lait choco	11.2	
strong1971	4	H	1	10239	boeuf	10.7	
strong1971	4	H	1	10239	boeuf	10.6	
strong1971	4	H	0	10240	lait choco	10.1	
strong1971	4	H	2	10240	boeuf	9.3	
strong1971	4	H	2	68900	boeuf	10.5	
strong1971	4	H	2	27	boeuf	11.5	
strong1971	4	H	4	79394	boeuf	10.9	
hauschild1967	6	H	5	S79	lait	9.7 [9.4,10.0]	$9.0 \cdot 10^{-3}$

TABLE F.2 – Données collectées issues d'expériences sur humains volontaires. Les informations manquantes sont désignées par 'NA'. Quand l'information sur l'intervalle de variabilité de la dose individuelle est disponible, celui-ci figure entre crochets. Les doses individuelles sont à l'échelle $\log_{10}$, de même que le coefficient de variation $C.V.$ reporté a été estimé à partir de ces log concentrations.

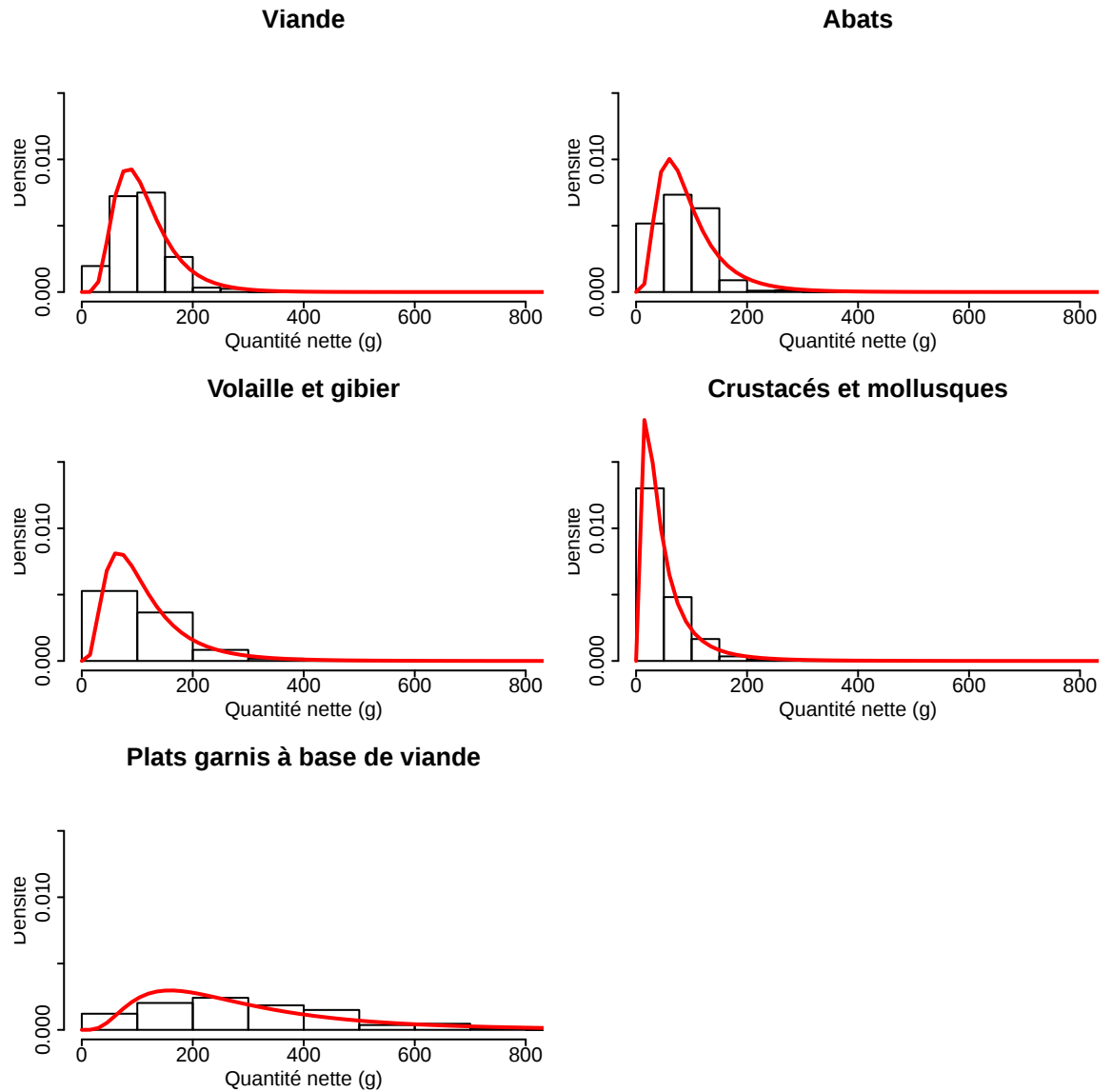


FIGURE F.1 – Ajustement de distributions paramétriques sur les tailles de portions recueillies lors de l'enquête INCA2. Les histogrammes représentent les distributions empiriques des données observées et les courbes rouges les distributions ajustées.

Aliment	μ_{qte_alim}	σ_{qte_alim}
boeuf	4.64	0.46
langue	4.4	0.58
viande	4.64	0.46
cassoulet	5.52	0.67
porc	4.64	0.46
poulet	4.56	0.62
produits de la mer	3.6	0.87

TABLE F.3 – Paramètres des distributions lognormales (moyenne μ et écart-type σ) décrivant les tailles de portions des aliments, ajustées sur les données de l'enquête de consommation INCA2.

Annexe G

Modélisation du procédé

Pour estimer le risque lié à la consommation des plats de boeuf en sauce, nous avons besoin d'informations sur la contamination des épices. Pour cela, nous avons utilisé des données de la littérature, présentées dans le tableau G.1. A partir de ces données, nous avons ajusté des distributions paramétriques, dont les paramètres sont présentés dans le tableau G.1. Les ajustements sont présentés dans la figure G.1.

*De plus, il nous fallait décrire les quantités d'épices utilisées. Nous avons estimé les paramètres des distributions de chaque quantité à partir d'observations *in situ*. Ceux-ci sont présentés dans le tableau G.2.*

Epice	Source des données	Nombre d'analyses	Concentration $ufc.g^{-1}$	Distributions ajustées
Poivre	Données personnelles	2	< 5	log normale $\mu = 2.68$ [1.87,3.27] $\sigma = 2.96$ [2.46,3.59]
		1	10	
		1	14	
		1	19	
	Pafumi, 1986	102	< 100	
		37	[100,999]	
		22	[1000,9999]	
		2	> 10000	
		74	< 100	
		2	[101,200]	
Thym	Rodriguez-Romo <i>et al.</i> , 1998	1	5	log normale $\mu = -1.87$ [-66.2,2.12] $\sigma = 3.75$ [1.96,7.96]
	Données personnelles	2	< 2	
		2	< 5	
		1	38	
		2	< 2	
		1	< 5	
Ail semoule	Données personnelles	1	5	log normale $\mu = 3.37$ [2.55,3.84] $\sigma = 1.21$ [0.82,1.69]
		16	< 100	
		12	< 100	
		1	[100,999]	
	Pafumi, 1986	61	< 100	
	Rodriguez-Romo <i>et al.</i> , 1998	9	[101,200]	
		2	[201,300]	
		1	[301,400]	
		3	[401,500]	
	Candlish <i>et al.</i> , 2001	1	20	
Cumin	Pafumi, 1986	11	< 100	log normale $\mu = 1.46$ [-2.84,3.83] $\sigma = 1.93$ [0.41,3.37]
		72	< 100	
	Rodriguez-Romo <i>et al.</i> , 1998	2	[101,200]	
		1	[301,400]	
		1	[401,500]	

Epice	Source des données	Nombre d'analyses	Concentration $ufc.g^{-1}$	Distributions ajustées
Laurier	Données personnelles	3	< 2	log normale $\mu = 0.14$ [-5.38,3.93] $\sigma = 2.42$ [$3.61 \cdot 10^{-2}$,4.32]
		1	< 5	
	Powers <i>et al.</i> , 1975	14	< 100	
		2	[100,500]	
	Rodriguez-Romo <i>et al.</i> , 1998	75	< 100	
		1	[401,500]	
Persil	Pafumi, 1986	6	< 100	Gamma shape = 0.0562 scale = 2641
	Données personnelles	3	< 2	log normale $\mu = 5.23$ [4.68,5.69] $\sigma = 1.18$ [0.59,1.64]
Paprika	Pafumi, 1986	2	< 5	
		91	< 100	
		20	[100,999]	
		3	[1000,9999]	
	Candlish <i>et al.</i> , 2001	1	60	

TABLE G.1 – Concentrations en *Clostridium perfringens* dans les épices reportées dans la littérature ou estimées dans les épices collectées à l'hôpital et distributions ajustées. Pour toutes les épices hormis le persil, l'intervalle d'incertitude à 95% des paramètres des distributions log normales ajustées, estimé en utilisant des techniques de bootstrap, est reporté dans les crochets suivant la valeur médiane du paramètre.

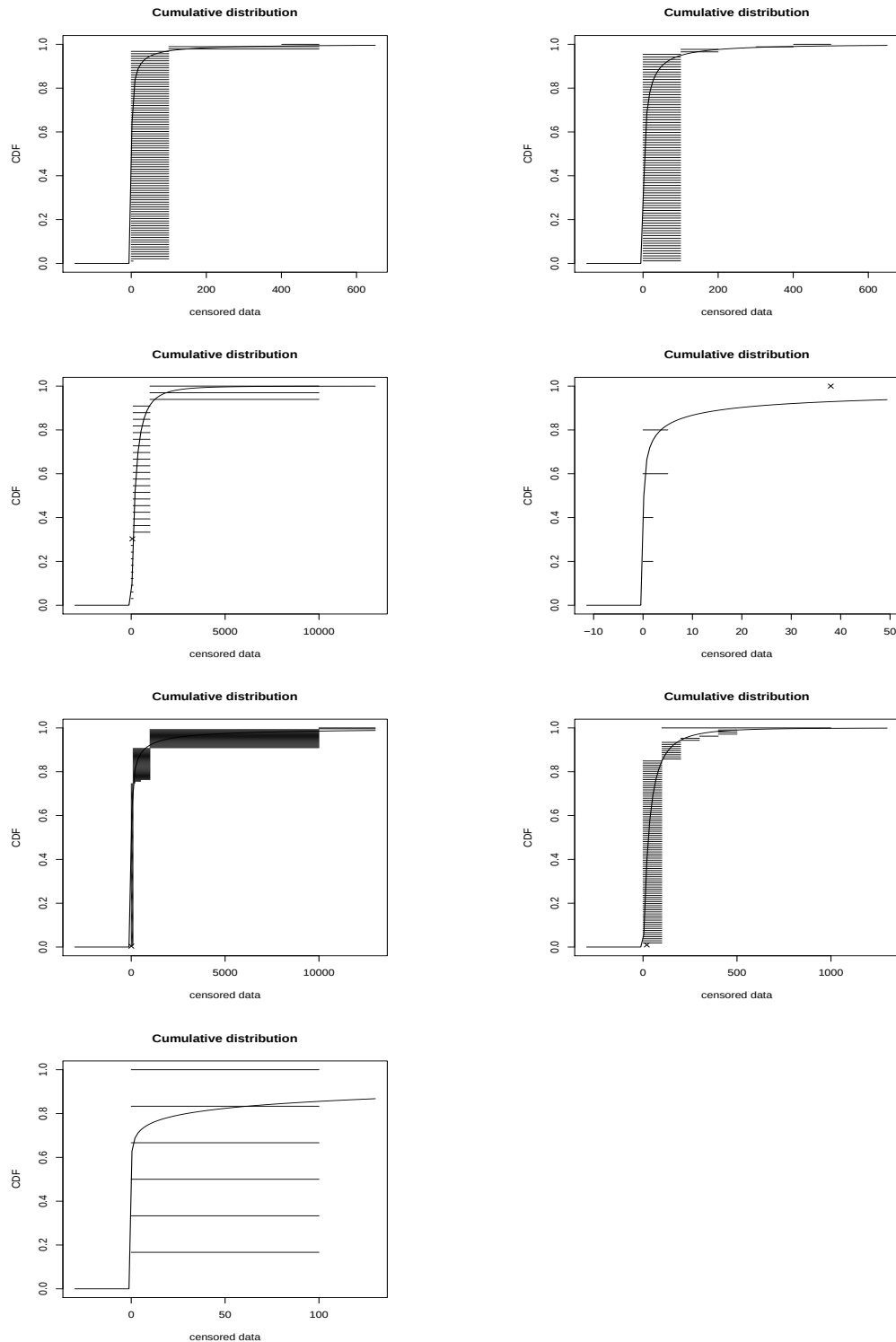


FIGURE G.1 – Ajustement des distributions aux données collectées pour le laurier (en haut à gauche), le cumin (en haut à droite), le paprika (2^{ème} ligne à gauche), le thym (2^{ème} ligne à droite), le poivre (3^{ème} ligne à gauche), l’ail semoule (3^{ème} ligne à droite) et le persil (en bas à gauche). Les traits horizontaux représentent les données censurées. La courbe représente la courbe de fréquence cumulée de la distribution ajustée.

Epice	Quantité minimale (g)	Quantité maximale (g)
Poivre	400	600
Thym	100	200
Ail semoule	300	600
Cumin	300	400
Laurier	20	50
Persil	200	300
Paprika	500	700

TABLE G.2 – Quantités minimales et maximales d'épices entrant dans la composition des plats de boeuf en sauce.

Annexe H

Acquisition de nouveaux profils

L'objectif de cette étude était de pouvoir utiliser, si ce n'est créer, des profils thermiques correspondant à des situations non observées à l'hôpital mais raisonnablement prévisibles (ou observées dans d'autres cuisines, visitées par l'équipe HPR). Nous avons donc collecté de nouveaux profils thermiques au coeur du produit, correspondant à des situations "extrêmes" raisonnablement envisageables avant l'entrée en cellule de refroidissement. Ces situations ont été définies à partir d'observations de l'équipe HPR à l'hôpital sur d'autres plats ou dans d'autres cuisines. Ces situations et le nombre de profils correspondants sont présentés dans le tableau H.1. Les profils sont représentés dans la figure H.1.

Etapas		Attente	avant	operculage
minutes		45	60	90
Attente	30	10	9	10
après	45	10	9	9
operculage	90	7	9	7

TABLE H.1 – Nombre de profils collectés dans des situations ‘extrêmes’ raisonnablement envisageables.

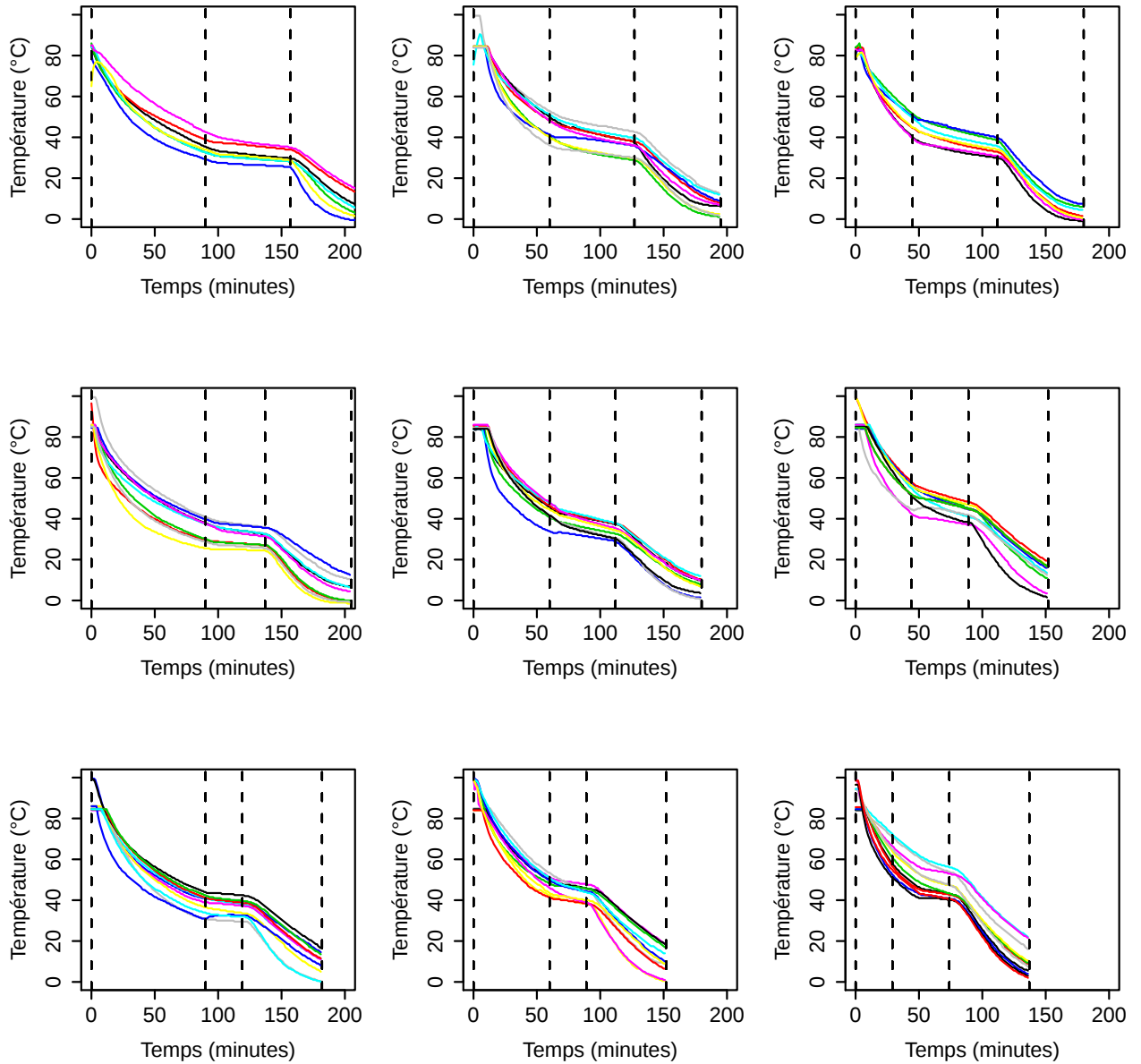


FIGURE H.1 – Profils collectés dans des situations ‘extrêmes’ raisonnablement envisageables.

Annexe I

Article sur la germination
croissance de *Clostridium*
perfringens



Contents lists available at ScienceDirect

Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fmBayesian modeling of *Clostridium perfringens* growth in beef-in-sauce productsS. Jaloustre^{a,b,c,*}, M. Cornu^a, E. Morelli^a, V. Noël^a, M.L. Delignette-Muller^{c,d}^a Agence française de sécurité des aliments (Afssa), LERQAP, 23 av. du Gal de Gaulle, F-94706, Maisons-Alfort Cedex, France^b AgroSup Dijon, F- 21079 Dijon, France^c Université de Lyon, F-69000, Lyon, Université Lyon 1, CNRS, UMR5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, F-69622, Villeurbanne, France^d Université de Lyon, F-69000, Lyon, VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon, F-69280 Marcy l'Etoile, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 December 2009

Received in revised form

29 March 2010

Accepted 1 April 2010

Available online xxx

Keywords:

Clostridium perfringens

Predictive model

Bayesian modeling

Variability

Uncertainty

ABSTRACT

Models on *Clostridium perfringens* growth which have been published to date have all been deterministic. A probabilistic model describing growth under non-isothermal conditions was thus proposed for predicting *C. perfringens* growth in beef-in-sauce products cooked and distributed in a French hospital. Model parameters were estimated from different types of data from various studies. A Bayesian approach was proposed to model the overall uncertainty regarding parameters and potential variability on the 'work to be done' (h_0) during the germination, outgrowth and lag phase. Three models which differed according to their description of this parameter h_0 were tested. The model with inter-curve variability on h_0 was found to be the best one, on the basis of goodness-of-fit assessment and validation with literature data on results obtained under non-isothermal conditions. This model was used in two-dimensional Monte Carlo simulations to predict *C. perfringens* growth throughout the preparation of beef-in-sauce products, using temperature profiles recorded in a hospital kitchen. The median predicted growth was $7.8.10^{-2} \log_{10} \text{cfu.g}^{-1}$ (95% credibility interval [2.4.10⁻², 0.8]) despite the fact that for more than 50% of the registered temperature profiles cooling steps were longer than those required by French regulations.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Clostridium perfringens is responsible for foodborne diseases in institutions and restaurants (Crouch and Golden, 2005). Vegetative cells provoke abdominal cramps and diarrhea from 7 to 30 h after ingestion of contaminated food. Symptoms are usually mild, lasting a day or less, but vulnerable people may die of the disease (Mead et al., 1999).

Outbreaks are often associated with processed meat (WHO, 2003) and non-compliance with prescribed temperatures, especially inappropriate cooling (de Jong et al., 2004). This study investigated the behavior of *C. perfringens* in beef-in-sauce products that were cooked and distributed in a French hospital. During the preparation process, beef and other ingredients first undergo 2 h of cooking followed by 1 h of boiling, and then 2–3 h of cooling. Products are then kept refrigerated at 4 °C for 2–3 days before being divided into portions which are reheated to about 60 °C and distributed to patients. For food operators it is difficult to control

cooling steps and it is often difficult to comply with French regulations (which prescribe cooling from 63 °C down to 10 °C within 2 h). It is important to measure the effect of this non-compliance with regulations on the behavior of *C. perfringens*.

Many studies have been published on the growth of *C. perfringens*, in different growth media and food products (e.g. Blankenship et al., 1988; Huang, 2003, 2004; Amezcua et al., 2005; Juneja et al., 2008; Le Marc et al., 2008). In some of these publications, authors proposed a secondary model describing the effect of temperature on the growth rate, using isothermal data, and validated it under changing thermal conditions. In their model Le Marc et al. (2008) described the effect of both temperature and physico-chemical properties on growth. In all these publications except that of Le Marc et al. (2008), authors only used their personal experimental data. In order to complete their personal dataset, Le Marc et al. (2008) performed a meta-analysis, collecting published results on growth kinetics obtained in meat or broth media to fit their model, and validated this model using personal non-isothermal data.

In all these studies, authors separately estimated the parameters of primary and secondary models by first fitting a primary model to the observed growth data and then fitting a secondary model to the estimated parameters of the primary model. This method disregards the precision of each growth parameter estimate due to both the number of observations and the quality of

* Corresponding author at: Agence française de sécurité des aliments (Afssa), LERQAP, 23 av. du Gal de Gaulle, F-94706, Maisons-Alfort Cedex, France. Tel.: +33 149772704.

E-mail address: s.sevrin@afssa.fr (S. Jaloustre).

data used for estimation. Consequently from a statistical point of view it seems preferable to simultaneously estimate the parameters of primary and secondary growth models by globally fitting the whole dataset as proposed by various authors (Bréand et al., 1999; Pouillot et al., 2003; Bernaerts et al., 2005; Delignette-Muller et al., 2006).

Moreover, published models (Blankenship et al., 1988; Huang, 2003, 2004; Amezquita et al., 2005; Juneja et al., 2008; Le Marc et al., 2008) have predicted deterministic growth without taking into account any potential source of variability or uncertainty which makes them difficult to use for risk assessment (Nauta, 2002). Variability refers to observed differences attributed to true heterogeneity or diversity in a population and usually cannot be reduced by further measurement or study (EPA, 1997). Uncertainty refers to the lack of knowledge about specific factors, parameters or models and can sometimes be reduced by collecting new information (Vose, 2000). International committees have stressed the need to describe variability and uncertainty in models, reminding researchers that risk assessment should take into account the 'actual situation' by reflecting as closely as possible the full range of

hours), $\mu_{\max}(t)$ the maximum specific growth rate [units: hours⁻¹] which may depend on time under non-isothermal conditions, $q(t)$ a dimensionless quantity related to the physiological state of the microbial population at the measurement time t and h_0 a dimensionless quantity defined as the 'work-to-be-done' (Baranyi and Roberts, 1995; Robinson et al., 1998) for cells to reach an exponential phase. More precisely, under constant conditions, h_0 is linked to λ by the relation $h_0 = \mu_{\max} \times \lambda$ where λ is the germination, outgrowth and lag (gol) time. In this article, for simplicity, the term lag will be used to refer to λ .

2.1.2. Secondary model

Considering that during the cooling and reheating steps for the beef-in-sauce products there was no variation of pH, aw or other physico-chemical properties of the products, only the effect of the temperature on the specific growth rate was explicitly modeled. The cardinal temperature model of Rosso et al. (1995) was chosen because of the biological significance of its parameters which makes it easier to define prior distributions. In this model, the maximum specific growth rate is defined by:

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

possible outcomes (Codex alimentarius, 1999; FAO/WHO, 2006, FAO/WHO, 2008). Bayesian methods have already been successfully used in predictive microbiology to model variability and uncertainty (Pouillot et al., 2003; Delignette-Muller et al., 2006; Crépet et al., 2009).

The aim of this study was to model the growth of *C. perfringens* in beef-in-sauce products under dynamic thermal conditions while taking into account potential sources of variability and uncertainty, according to FAO/WHO recommendations. To estimate microbial growth parameters, a meta-analysis was carried out on published growth data of different types obtained under various experimental conditions in order to model potential sources of variability. Parameters of primary and secondary models were simultaneously estimated using a Bayesian inference procedure.

2. Materials and methods

2.1. Growth model

2.1.1. Primary model

To describe the kinetics of *C. perfringens* growth, the primary model was adapted from the model published by Baranyi and Roberts (1994) and used by Le Marc et al. (2008). It was chosen because of its flexibility and especially its ability to describe the germination, outgrowth and lag phase under constant or changing conditions. In order to be able to model curves that would not attain the stationary phase, a deceleration function with no transition between exponential and stationary phases and with the maximum cell density defined from the final concentration observed in each curve, was used. It can be described as follows:

$$\begin{cases} \frac{dy}{dt} = \frac{\mu_{\max}(t)}{\ln(10)} \times \frac{q(t)}{1 + q(t)} \\ \frac{dq}{dt} = \mu_{\max}(t)q(t) \quad \text{with } q(t=0) = q_0 = \frac{1}{\exp(h_0) - 1} \end{cases} \quad (1)$$

with y the log to base 10 of the bacterial concentration [units: log₁₀ cfu.g⁻¹ or log₁₀ cfu.ml⁻¹] at the measurement time t [units:

with $\mu_{\max}$ the maximum specific growth rate [units: hours⁻¹] at temperature T [units: °C], $T_{\min}$, T_{opt} and $T_{\max}$ the cardinal temperatures [units: °C] and μ_{opt} the optimal growth rate in the medium [units: hours⁻¹] reached at T_{opt} . To model growth under non-isothermal conditions, this equation can be used with T described as a function of time throughout the process, writing $\mu_{\max}$ as a function of time in the differential equation of the Baranyi model (Eq. (1)).

2.2. Growth data

As only the effect of temperature on $\mu_{\max}$ was modeled, there was no need for data collected on media whose physico-chemical properties were modified, consequently only growth kinetics observed on unmodified media were collected. After personal measurements on the two beef-in-sauce products during 16 production days, NaCl concentration in beef-in-sauce products was found to be less than 1%, so growth data observed on cured media, as defined by Le Marc et al. (2008), were not collected. Attention was also paid to the aerobic status of each experiment, and, in order to predict optimal growth of *C. perfringens*, data obtained under aerobic conditions or using bags with high oxygen permeability (Juneja et al., 1994a) were not collected.

Two kinds of data were collected, first maximum specific growth rate values [units: hours⁻¹] (or doubling times [units: hours]) reported on various media. They were directly collected from one database, Combase (<http://www.combase.cc/>), and from published papers. Lag values were too sparse and sometimes aberrant in this dataset so it was decided to only consider maximum specific growth rate values. Secondly growth kinetics in raw data obtained in beef only, were collected. These data were reported as measurement times [units: hours] and corresponding log counts [units: log₁₀ cfu.g⁻¹]. Values were directly taken from Combase or published tables when available, otherwise graphs were scanned and points were digitized.

The whole dataset consists of 120 maximum specific growth rates (first dataset) and 17 growth kinetics (second dataset) of *C. perfringens* collected from 14 publications described in Table 1.

Table 1

Collected studies on isothermal *Clostridium perfringens* growth in food products and growth media. Growth kinetics (GK) and growth rates (GR) were respectively used with Models B and A.

References	Medium	Growth Kinetics (GK)/ Growth Rate (GR)	Number of growth kinetics/rates	Temperature (°C)	Heat shock (temperature (°C)/ time (min))
Foegeding and Busta, 1980	Beef	GK	5	37, 41, 45, 49	NA*
Fapohunda et al., 1994	Beef	GK	2	15, 35	NA*
Labbé and Chang, 1995	Beef	GK	1	41	75 °C for 10 min in FTG broth
Huang, 2003	Beef	GK	6	25, 30, 36, 45, 47, 50	75 °C for 20 min in beef
Huang, 2004	Beef	GK	3	17, 30, 47	75 °C for 20 min in beef
Kang et al., 1969	FTG broth	GR	3	37	80 °C for 15 min in FTG broth
Schroder and Busta, 1971	Beef	GR	2	45	NA*
Rey et al., 1975	FTG broth	GR	7	15, 22, 50	80 °C for 20 min in CMM broth
Willardsen et al., 1978	Beef	GR	12	26, 33, 37, 41, 45, 49, 51	NA*
Willardsen et al., 1979	Beef	GR	7	41, 45	NA*
Craven et al., 1981	Poultry	GR	2	37	75 °C for 20 min in FTG broth
Labbé and Huang, 1995	Beef, FTG broth	GR	47	37, 41, 43, 46, 48	75 °C for 10 min in FTG broth
Meyer and Tholoan, 1999	NMSGY broth	GR	8	37	NA*
Juneja et al., 2008	Beef	GR	32	13, 16, 20, 23, 25, 28, 31, 33, 35, 37, 40, 43, 46, 48, 50, 51	75 °C for 20 min in beef

*NA: not available.

In each study, growth was observed under constant thermal conditions (from 13 °C to 51 °C). Spores had always undergone a 'classical' heat shock (most often 75 °C for 20 min) to kill potential vegetative cells and activate spores. Inoculated strains or cocktails of strains differed from one study to another.

2.3. Bayesian modeling

2.3.1. Principles

A Bayesian approach was chosen for estimating the model parameters. As the cardinal temperatures ($T_{\min}$, T_{opt} , $T_{\max}$) are generally considered as only species or strain dependent (Pinon et al., 2004), it is possible to use data obtained on different media to estimate them. An inter-strain variability has been described by various authors (Membré et al., 2005; Delignette-Muller et al., 2006; Afchain et al., 2008; Le Marc et al., 2008; Crépet et al., 2009). But as a high proportion of collected growth rates (GR) and growth kinetics (GK) were obtained with spore cocktails, it was not possible to describe such a potential inter-strain variability at cardinal temperatures. From the collected data, it was not possible

to separate strain effects from medium effects on optimal growth rate, and one fixed optimal growth rate was thus defined for each product ($\mu_{\text{opt-prod}}$). To model both types of data (GR and GK) a two-step Bayesian approach was used. First, a Bayesian model based on Equation (2) was fitted to $\mu_{\max}$ values to estimate the cardinal temperatures, and optimal growth rates that were specific for each medium ($\mu_{\text{opt-prod}}$). Then a second Bayesian model based on Equations (1) and (2) was fitted to growth kinetics collected on beef to refine the estimation of the cardinal temperatures ($T_{\min}$, T_{opt} , $T_{\max}$) and the optimal growth rate in beef ($\mu_{\text{opt-beef}}$), and to estimate the distribution of the 'work to be done' (h_0) in beef after heat shock.

2.3.2. Bayesian models

2.3.2.1. Model A. Model A was built to describe $\mu_{\max}$ values obtained on various media. A directed acyclic graph of the model is shown in Fig. 1. $M_{\mu_{\max,c}}$ represents the theoretical maximum specific growth rate, described by Equation (2), for the curve c at temperature T_c and $\mu_{\max,c}$ the corresponding observed rate. The square root transformation of $M_{\mu_{\max,c}}$ and $\mu_{\max,c}$ was used to

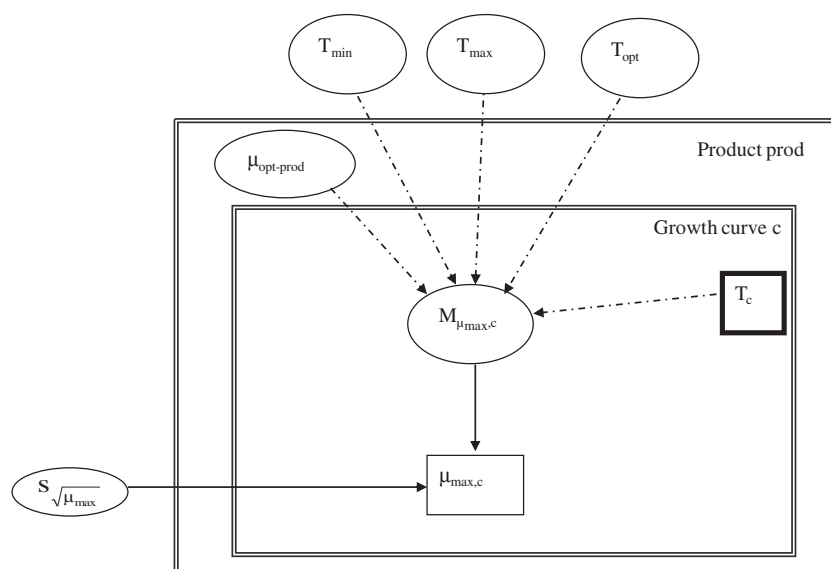


Fig. 1. Directed acyclic graph of Model A. This model is based on Equation (2). Rectangles indicate data, dark rectangles indicate covariates and ellipses indicate parameters or latent variables. Logical links between nodes are represented by dotted arrows whereas solid arrows indicate stochastic links.

normalize the errors (Zwietering et al., 1990; Schaffner, 1994) and $\sqrt{\mu_{\max,c}}$ is assumed to follow the normal distribution $N(\sqrt{M_{\mu_{\max,c}}}, s_{\sqrt{\mu_{\max,c}}})$ with $s_{\sqrt{\mu_{\max,c}}}$ the standard deviation.

2.3.2.2. Model B. Model B was built to describe the growth kinetics collected on beef in order to refine the estimations of $T_{\min}$, T_{opt} , $T_{\max}$, $\mu_{\text{opt-beef}}$, and to estimate the distribution of h_0 . Three models differing by their description of this last parameter h_0 were tested:

- Model with no variability on h_0 (Model B1),
- Model with inter-study variability on h_0 (Model B2): variability on h_0 was assumed to be mainly governed by experimental conditions that differ from one study to another,
- Model with inter-curve variability on h_0 (Model B3): variability on h_0 was assumed to be mainly governed by uncontrolled variations of experimental conditions or of microbial responses from one growth kinetics to another, whether they were obtained in the same study or not.

Due to the low number of growth kinetics, it was not possible to test the complete model while including all types of variability on h_0 .

The directed acyclic graph of the general model encompassing Models B1, B2 and B3 is shown in Fig. 2 and links are shown in Table 2. Indices s, c, m denote the three hierarchical levels of the model: respectively the study, the growth curve and the individual measurement. $M_{\mu_{\max,c}}$ is the theoretical maximum specific growth rate for the curve c at temperature T_c , $y_{0,c}$ and $y_{\max,c}$ derive from $Y_{0,c}$ and $Y_{\text{end},c}$ respectively the first and last points observed on the curve c . $M_{y,m}$ is the theoretical log count for the curve c at time t_m and Y_m is the corresponding observed one. The parameters $h_{0,s}$ and $h_{0,c}$ are assumed to follow log-normal distributions specified respectively by $m_{\ln h_0}$ and $\ln(h_{0,s})$ expected values and $s_{\ln h_{0,s}}$ and $s_{\ln h_{0,c}}$ standard deviations. s_y denotes the standard deviation of the error of the primary model.

2.3.3. Prior distributions

2.3.3.1. Model A. Prior distributions for Model A are shown in Table 3. Quite informative prior distributions were defined from information in articles which data had not been used in computations (Blankenship et al., 1988; Juneja et al., 1994b; Juneja and Marks, 2002; De Jong et al., 2005; Le Marc et al., 2008). For $\mu_{\text{opt-prod}}$ reported values of maximum specific growth rates estimated at temperatures around T_{opt} on different media were used and from these values the same broad prior distribution for each medium was defined. A non-informative prior distribution was defined for the standard deviation $s_{\sqrt{\mu_{\max}}}$.

2.3.3.2. Model B. Prior distributions for Model B are reported in Table 4. Marginal posterior distributions of $T_{\min}$, T_{opt} , $T_{\max}$ and $\mu_{\text{opt-beef}}$ obtained from inference with Model A were used as priors for Model B. For each parameter, parametric distributions were fitted to MCMC replicates, corresponding to samples from their joint posterior distribution, using R software (R Development Core Team, 2009) and the fitdistrplus package (Delignette-Muller et al., 2009). Prior distribution of $m_{\ln h_0}$ was defined from α_0 values reported by Le Marc et al. (2008) using the equation $\alpha_0 = \exp(-h_0)$. Non-informative prior distributions were defined for the three standard deviations s_y , $s_{\ln h_{0,s}}$ and $s_{\ln h_{0,c}}$.

2.3.4. Computations

Computations were performed using the JAGS software (Plummer, 2009) and the rjags package of R software (R Development Core Team, 2009). For each model, inferences were made on 5.10^5 iterations for each of 3 independent MCMC chains after an adaptation phase of 5.10^3 iterations. A thinning interval of 100 was used and 5000 values were thus kept for each chain. Convergence was checked by visually analyzing MCMC chain traces and examining Gelman and Rubin convergence statistics, as modified by Brooks and Gelman (1998).

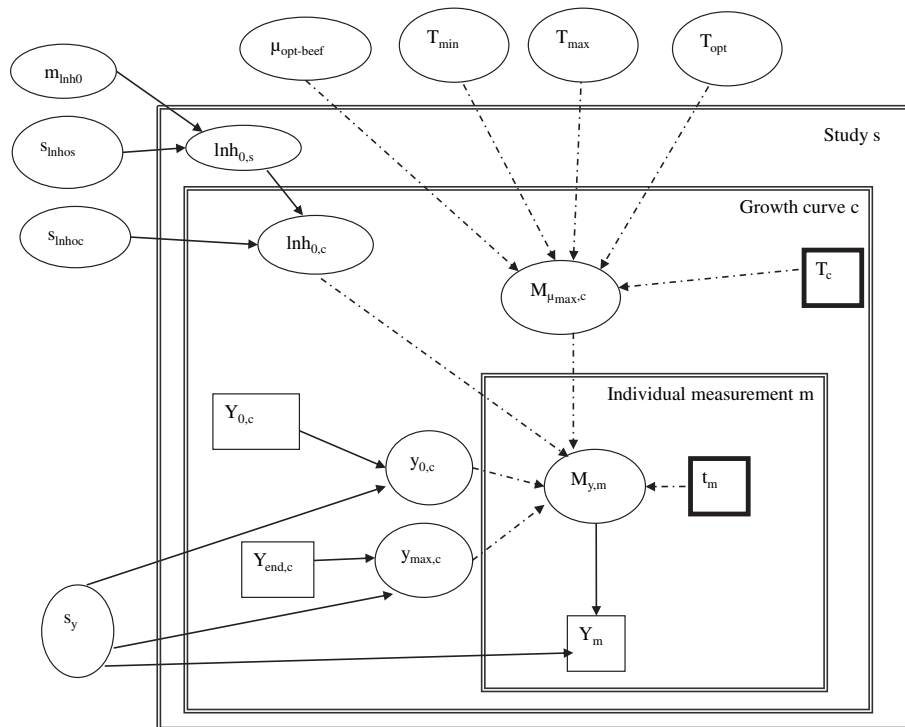


Fig. 2. General directed acyclic graph of general Model B. Rectangles indicate data, dark rectangles indicate covariates and ellipses indicate parameters or latent variables. Logical links between nodes are represented by dotted arrows whereas solid arrows indicate stochastic links. Links are reported in Table 2.

Table 2

Definition of the links between nodes in Models B1 (model with no variability on h_0), B2 (model with inter-study variability on h_0) and B3 (model with inter-curve variability on h_0).

Node	Type	Definition
Y_m	Stochastic	$N(M_{y,m}, s_y)$
$M_{y,m}$	Logical	$M_{y,m} = \min(y_{0,c} + \frac{M_{\mu_{max,c}} \times t_m}{\ln(10)} + \log_{10}[e^{-M_{\mu_{max,c}} \times t_m} \times (1 - e^{-h_{0,c}}) + e^{-h_{0,c}}], y_{max,c})$
$y_{max,c}$	Stochastic	$N(Y_{end,c}, s_y)$
$y_{0,c}$	Stochastic	$N(Y_{0,c}, s_y)$
$M_{\mu_{max,c}}$	Logical	$M_{\mu_{max,c}} = \frac{\mu_{opt-beef} \times (T_c - T_{min})^2 (T_c - T_{max})}{(T_{opt} - T_{min})(T_{opt} - T_{min})(T_c - T_{opt}) - (T_{opt} - T_{max})(T_{opt} + T_{min} - 2T_c)}$
$\ln h_{0,s}$ $\ln h_{0,c}$	Logical (B1) or stochastic (B2 and B3)	$\ln h_{0,s} \sim N(m_{\ln h_{0,s}}, s_{\ln h_{0,s}})$ $\ln h_{0,c} \sim N(m_{\ln h_{0,c}}, s_{\ln h_{0,c}})$ Model B1: $s_{\ln h_{0,s}} = s_{\ln h_{0,c}} = 0 \Rightarrow \ln h_{0,c} = m_{\ln h_{0,c}}$ Model B2: $s_{\ln h_{0,c}} = 0 \Rightarrow \ln h_{0,s} \sim N(m_{\ln h_{0,s}}, s_{\ln h_{0,s}})$ Model B3: $s_{\ln h_{0,s}} = 0 \Rightarrow \ln h_{0,c} \sim N(m_{\ln h_{0,c}}, s_{\ln h_{0,c}})$

2.3.5. Assessment of the goodness of fit of the models

In order to check the ability of each variant of Model B to describe the observed data, the parameter values sampled from the three MCMC chains were used, i.e. 15.10^3 values, and the mean of the 15.10^3 simulated values of $M_{y,m}$ corresponding to each observed log count was calculated and compared to the observed values. The DIC values of each model were also compared. The DIC (Deviance Information Criterion) is a deviance penalized by the number of “effective” parameters, developed especially to compare hierarchical models (Spiegelhalter et al., 2002).

2.4. Model validation

In order to evaluate the ability of Models B1, B2 and B3 to predict new data obtained under dynamic thermal conditions, data were collected from the literature (Thippareddi et al., 2003; Smith et al., 2004; Sanchez-Plata et al., 2005; Juneja et al., 2006a, Juneja et al., 2006b, Juneja et al., 2007). In these studies, *C. perfringens* spores were inoculated in beef and then underwent processing according to different time-temperature profiles, which all included a heat treatment (up to at least 75 °C), followed by an exponential cooling step from an initial temperature T_0 [units: °C], higher than T_{max} , down to the final one T_f [units: °C], lower than T_{min} . In this case, the cell number increase, defined as the difference between the final and initial log concentrations [units: $\log_{10} \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$], only depends on the exponential cooling rate k [units: hours^{-1}]. For each time-temperature profile, usually expressed as a duration t [units: hours] to exponentially cool beef from the initial temperature T_0 down to T_f , k was estimated by means of the equation

$T = (T_0 - T_a)\exp(-kt) + T_a$ where T_a is the asymptotic temperature, which was assumed equal to 0. For example, for data reported by Sanchez-Plata et al. (2005), an exponential cooling step from 54.5 °C down to 7.2 °C in 9 and 12 hours corresponds to respectively $k = 0.225 \text{ h}^{-1}$ and $k = 0.169 \text{ h}^{-1}$. To compare, French regulation which requires a cooling from 63 °C down to 10 °C in 2 h corresponds to $k = 0.92 \text{ h}^{-1}$. Observed growth of *C. perfringens* after these cooling steps was reported as observed log counts (initial and final) or as observed cell number increases. All data were reported in cell number increase values as a function of k -values in Table 5.

Predicted distributions of cell number increase were obtained by one dimensional Monte Carlo simulations with random sampling of parameters (T_{min} , T_{opt} , T_{max} , $\mu_{opt-beef}$, $m_{\ln h_{0,s}}$, $s_{\ln h_{0,s}}$ and $s_{\ln h_{0,c}}$) in their joint posterior distributions for Models B1, B2, B3. For simulations, the initial log count was assumed to be 2 $\log_{10} \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$, as has often been reported in collected publications, and the maximum density cell was assumed to be equal to 9 $\log_{10} \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$. Theoretical temperature profiles were built with exponential cooling rate values, k ranging from the minimal to the maximal published k values. Each temperature profile was discretized in 1 °C steps in order to integrate the primary growth model under changing conditions. For each Model B (B1, B2, B3), 15 000 simulations led to 15 000 predicted values of the cell number increase for each temperature profile. Credibility intervals (respectively at 50% and 95%) were defined, from respectively the 25th and 75th percentiles and the 2.5th and the 97.5th percentiles, and compared to observed values. These intervals are expected to contain respectively 50% and 95% of the observed values. Predicted intervals and observed values were also compared to values predicted by *Perfringens Predictor* (www.ifr.ac.uk/Safety/Growth-Predictor/).

Table 3

Prior distributions of Model A parameters.

Parameter	Distribution	Source of information
T_{min}	$N(10,2)$	Blankenship et al., 1988 Juneja et al., 1994b Juneja and Marks, 2002 De Jong et al., 2005 Le Marc et al., 2008
T_{opt}	$N(44,2)$	De Jong et al., 2005
T_{max}	$N(52,1.5)$	Blankenship et al., 1988 Juneja and Marks, 2002 De Jong et al., 2005 Le Marc et al., 2008
$\mu_{opt-prod}$ for each product	$N(4.5,1.8)$	Blankenship et al., 1988 Juneja et al., 1994b Juneja and Marks, 2002 De Jong et al., 2005 Le Marc et al., 2008
$\tau \sqrt{\mu_{max}} = \frac{1}{s_{\sqrt{\mu_{max}}}}$	$\text{Gamma}(0.001,0.001)$	No information

Table 4

Prior distributions of parameters of Models B1 (model with no variability on h_0), B2 (model with inter-study variability on h_0) and B3 (model with inter-curve variability on h_0).

Parameter	Distribution	Source of information
T_{min}	$N(11.8,1.3)$	Posterior distribution from Model A
T_{opt}	$N(44.7,0.6)$	Posterior distribution from Model A
T_{max}	$N(52.4,0.5)$	Posterior distribution from Model A
$\mu_{opt-beef}$	$N(5,0.2)$	Posterior distribution from Model A
$m_{\ln h_{0,s}}$	$N(1.95,0.3)$	Le Marc et al. (2008)
$\tau_{\ln h_{0,s}} = \frac{1}{s_{\ln h_{0,s}}^2}$ (B2)	$\text{Gamma}(0.001,0.001)$	No information
$\tau_{\ln h_{0,c}} = \frac{1}{s_{\ln h_{0,c}}^2}$ (B3)	$\text{Gamma}(0.001,0.001)$	No information
$\tau_y = \frac{1}{s_y^2}$	$\text{Gamma}(0.001,0.001)$	No information

Table 5

Collected data obtained on *C. perfringens* growth in beef in non-isothermal conditions, during exponential cooling.

References	Medium	Number of growth kinetics	Exponential cooling rate k (h^{-1})	Observed cell number increase ($\log_{10} \text{cfu} \cdot g^{-1}$)
Thippareddi et al., 2003	Beef	2	0.095	5.27
Smith et al., 2004 ^a	Beef	8	0.146	1.51
Sanchez-Plata et al., 2005	Beef	2	0.120	5.15, 5.27, 5.83
			0.140	3.19, 3.99, 5.22, 5.29, 5.01
			0.096	5.16, 5.12, 0.5.16
			0.112	3.81, 4.83, 5.15
			0.135	3.73, 2.78, 3.7
			0.169	2, 3.39, 4.88
			0.225	1.71, 0.27, 2.17
Juneja et al., 2006a	Beef	2	0.112	4.6
Juneja et al., 2006b	Beef	4	0.169	3.2
			0.096	4.7
			0.112	5
			0.135	4.5
			0.225	4.2
Juneja et al., 2007	Beef	14	0.096	4.9, 4.6
			0.112	4.6, 4.7
			0.135	4.9, 4.7, 5.4, 4.4, 5.1, 5
			0.225	3.9, 4, 4.1, 2.5
Le Marc et al., 2008	Beef	10	0.114	5.05, 4.88, 4.43
			0.164	3.01, 3.08, 2.9
			0.187	2.13, 1.91, 1.62
			0.212	1.18, 1.51, 1.27
			0.222	1.14, 1.22, 0.52
			0.254	1.49, 1.37, 1.19
			0.339	0.26, 0.29, 0.28
			0.367	0, 0.3, 0

^a Excluding experiments using bags with high oxygen permeability.

2.5. Model prediction

The aim of this study was to predict the growth of *C. perfringens* in beef-in-sauce products cooked and distributed in a French hospital. These beef-in-sauce products underwent a 1-h boiling step followed by a rapid cooling one. Then they were kept refrigerated for 2 or 3 days before their reheating and their distribution to patients. Continuous measurements of temperature in beef and sauce from the boiling step to the distribution corresponding to 16 different production days were carried out with sensors in this hospital and 217 temperature profiles were registered and used for the predictions. Each profile was discretized in 1 °C steps in order to integrate the primary growth model under changing conditions.

In order to separate variability on h_0 and on temperature profiles and uncertainty on parameters, second order Monte Carlo simulations were carried out as follows:

1. A set of parameters considered as uncertain ($T_{\min}$, T_{opt} , $T_{\max}$, $\mu_{\text{opt-beef}}$, h_0 or $m_{\text{In}h_0}$, $s_{\text{In}h_0,s}$ and $s_{\text{In}h_0,c}$) was randomly selected in their joint posterior distributions for Models B1, B2, B3.

Table 6

Statistics of prior distributions and MCMC replicates of Models A and B. For each parameter the first value represents the median value whereas values in brackets represent its 95% credibility interval.

Model	Prior distribution	A	B1: no variability on h_0	B2: inter-study variability on h_0	B3: inter-curve variability on h_0
Parameter					
$T_{\min}$	10 [6.1,13.9]	11.8 [9.4,14.2]	12 [11.6,12.4]	11.9 [11.4,12.3]	12.4 [11.8,12.8]
T_{opt}	44 [40.1,47.9]	44.7 [43.5,45.8]	45.6 [45.1,46]	45.5 [45.1,45.9]	45.5 [44.9,46.1]
$T_{\max}$	52 [49,54.9]	52.3 [51.6,53.7]	51.4 [51,51.9]	51.7 [51.2,52.3]	51.9 [51.2,52.8]
$\mu_{\text{opt-beef}}$	4.5 [1.8]	5 [4.5,5.4]	4.1 [3.8,4.4]	4.1 [3.9,4.4]	4.2 [3.9,4.4]
$m_{\text{In}h_0}$	1.9 [1.4,2.5]		1.4 [1.2,1.5]	1.6 [1.3,2.1]	1.5 [1.3,1.7]
$s_{\text{In}h_0,s}$	Non-informative			0.43 [0.18,1.2]	
$s_{\text{In}h_0,c}$	Non-informative				0.41 [0.28,0.65]
s_y	Non-informative		0.35 [0.32,0.39]	0.32 [0.29,0.36]	0.26 [0.24,0.29]

2. Given this set of parameters, 1 001 temperature profiles were selected with repeated sampling among the 217 observed ones, and, for Models B2 and B3, 1 001 h_0 values were randomly selected from their variability distribution. For each temperature profile and each h_0 value, the cell number increase was estimated in order to obtain a distribution of 1 001 cell number increase values, thus characterizing its variability. Statistics on this distribution (median and the 2.5th and the 97.5th percentiles) were evaluated and stored.
3. Steps 1 and 2 were performed 601-fold in order to obtain a distribution of each statistic described above, thus characterizing their uncertainty.

3. Results

3.1. Growth model parameters

3.1.1. Model A

Statistics of Model A MCMC replicates for parameters of interest ($T_{\min}$, T_{opt} , $T_{\max}$ and $\mu_{\text{opt-beef}}$) are shown in Table 6. Posterior distributions are much narrower than their prior ones, except for $T_{\min}$ due to the low number of growth kinetics collected in any sort of media at low temperatures.

3.1.2. Model B

Statistics of MCMC replicates obtained with each variant of Model B, as prior distributions and statistics of MCMC replicates obtained with Model A, are shown in Table 6. Posterior predictive distributions of cardinal temperatures and $\mu_{\text{opt-beef}}$ do not hugely differ from one model to another. Variability on h_0 ($s_{\text{In}h_0}$) is slightly higher in Model B2 than in Model B3. The normal error of model prediction (s_y) is lower for Model B3 than for the others.

For Model B3 (with inter-curve variability on h_0), posterior distributions are much narrower than prior ones, except for $T_{\max}$ due to the lack of growth curves above 50 °C collected in beef. Prior and posterior distributions of cardinal temperatures overlap, showing that the type of data does not strongly affect cardinal temperature estimates. Information on $T_{\min}$ was essentially given by collected growth kinetics (second dataset), whereas most of the information on $T_{\max}$ came from collected $\mu_{\max}$ values (first dataset). On the contrary, $\mu_{\text{opt-beef}}$ posterior distributions of Models A and B (Model A posterior distribution is Model B prior one) hardly overlap and $\mu_{\text{opt-beef}}$ estimated from growth kinetics is lower than the one estimated from $\mu_{\max}$ values. Some $\mu_{\max}$ values of the first dataset (GR) were estimated using the Gompertz model, which is known to overestimate $\mu_{\max}$ (Whiting and Cygnarowicz-Provost, 1992; Dalgaard, 1995; Membré et al., 1999; McKellar and Knight, 2000; Baty and Delignette-Muller, 2004) which may explain why $\mu_{\text{opt-beef}}$ estimated from these values are higher.

Goodness-of-fit graphs, portrayed on Fig. 3, show that all three models are quite adequate but data seem to have been much better

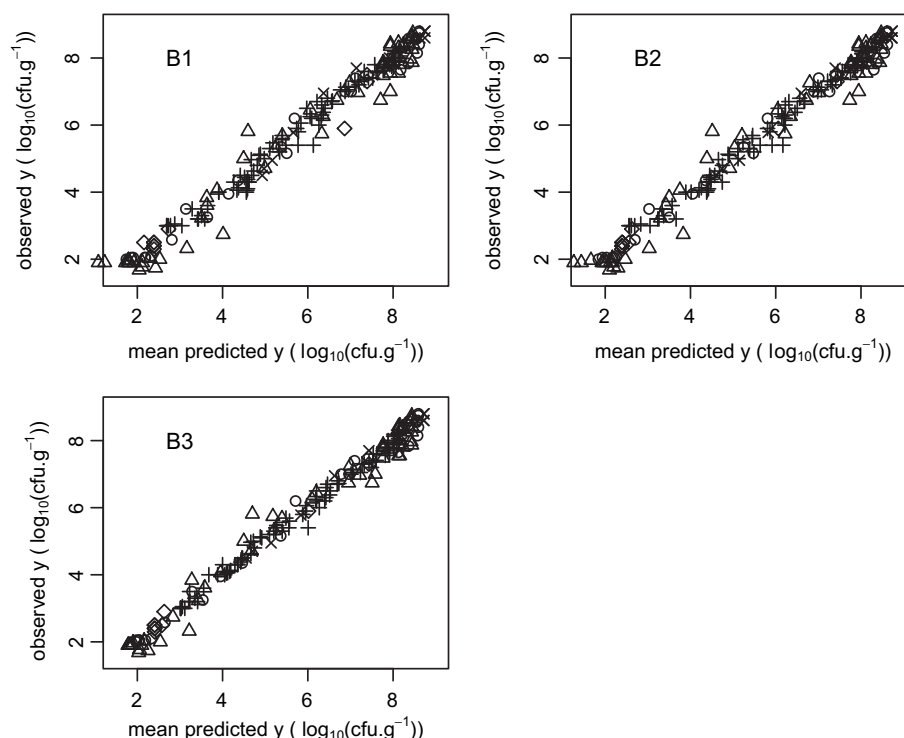


Fig. 3. Comparison of bacterial concentrations in log counts observed in beef with those predicted by Models B1, B2 and B3. Observed log counts come from Foegeding and Busta (1980) (+), Fapohunda et al. (1994) (◇), Labbé and Chang (1995) (×), Huang (2003) (Δ), Huang (2004) (○).

described by Model B3. DIC values calculated for each model corroborate this better goodness-of-fit of Model B3: namely 147, 122 and 42 respectively for Models B1, B2 and B3.

3.2. Model validation

The model built on literature data under isothermal conditions was validated on non-isothermal data. For each model and each temperature profile, 50% and 95% credibility intervals and observed data are shown in Fig. 4. Model B1 provides very narrow uncertainty intervals, centered on values close to deterministic predictions obtained by the *Perfringens* Predictor. However predictions obtained by both models do not reflect the dispersion observed in validation data, and seem to be conservative for the slow cooling scenarios but not for the rapid ones. Models with variability on h_0 (B2 and B3) provide much greater overall uncertainty intervals, which better reflect the dispersion observed in validation data. Model B3 describes the observed data particularly well. Its 95% credibility interval encompasses the major part of the observed cell number increases without ranging too wide.

3.3. Simulation of *C. perfringens* growth in the studied process

As Model B3 was chosen on the basis of goodness-of-fit and validation data, only simulations obtained with inter-curve variability on h_0 are shown in Fig. 5. Fig. 5 shows the predicted distributions of cell number increase, separating variability and uncertainty on parameters. Even taking into account the overall uncertainty, resulting from both variability and uncertainty, the predicted growth seems negligible: the median of cell number increase simulated values was estimated to be $7.8 \cdot 10^{-2} \log_{10} \text{cfu.g}^{-1}$ (95% credibility interval: $[2.4 \cdot 10^{-2}, 0.8]$) and exceeds $1 \log_{10} \text{cfu.g}^{-1}$ in only 1.1% (95% credibility interval: $[0.02\%, 3.5\%]$) of the cases. The number of cases in which the cell number increase

exceeds $2 \log_{10} \text{cfu.g}^{-1}$ was estimated to be 0% (95% credibility interval: $[0\%, 0.1\%]$).

4. Discussion and conclusion

In studies published to date, authors often used personal data to develop deterministic models for predicting *C. perfringens* growth in beef products. For the current study, a probabilistic growth model was developed. Potential sources of variability under controlled or uncontrolled experimental conditions were considered by collecting published data of various types and from various studies. A two-step Bayesian approach was chosen to estimate *C. perfringens* growth model parameters in beef from the whole dataset, while taking into account both uncertainty on parameters and potential variability on the “work to be done” (h_0) during the germination, outgrowth and lag phase. Three models differing by their description of this parameter were proposed. The model with inter-curve variability on h_0 was chosen as the most appropriate one because it provided the lowest DIC and s_y , the best description of the observed data, presented in Fig. 3, and the best prediction of non-isothermal data, presented in Fig. 4.

As shown in Fig. 4, including a potential variability on h_0 led to an important increase of the overall uncertainty on predicted growth. Thus overall uncertainty appears to be due substantially to variability on h_0 . Variability in the initial physiological state of preincubated vegetative cells has already been reported in the literature (Augustin et al., 2009; Delignette-Muller et al., 2005) and it is easy to imagine that variability on the initial physiological state of vegetative cells originating from spores after a heat shock is also great, as observed on *Clostridium botulinum* (Stringer et al., 2005, 2009; Webb et al., 2007). It would be very worthwhile to explore the causes of this variability and identify factors which might explain it.

As recommended by Smelt and Brul (2007), exploring the variability on h_0 would require a description of the effect of the

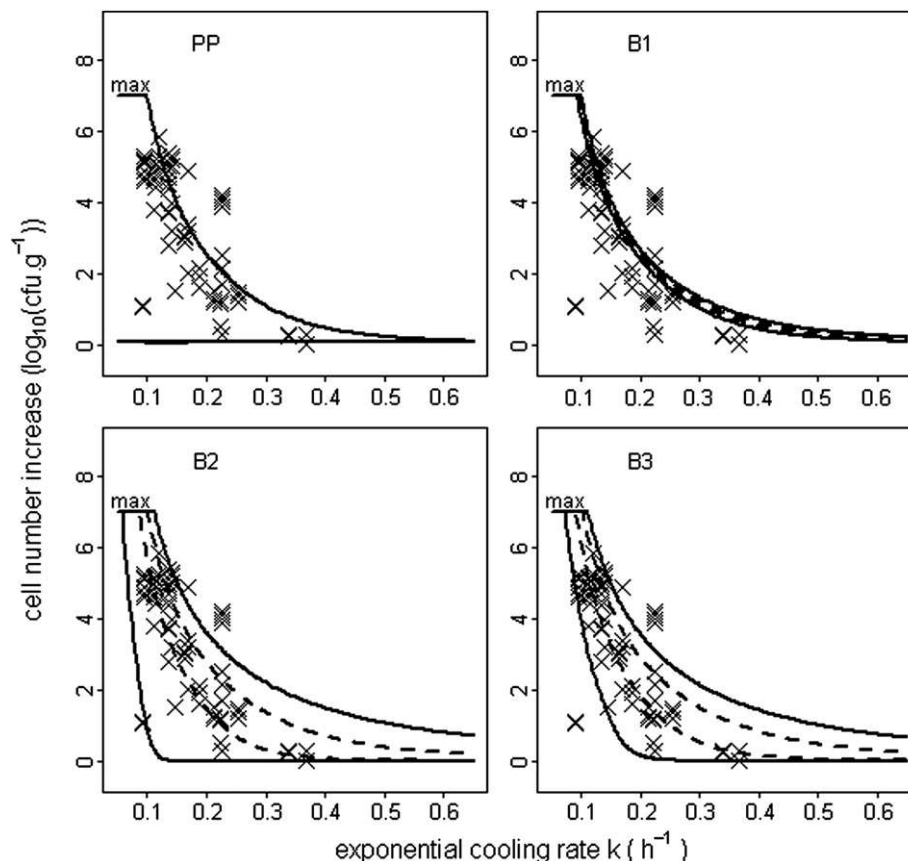


Fig. 4. Predicted and observed cell number increase values after an exponential cooling step as a function of the exponential cooling rate k . Crosses indicate published data reported in Table 5, whereas lines indicate predictions. Predictions were calculated assuming the cooling step to begin above the value of $T_{\max}$ and to stop below the value of $T_{\min}$. The PP: cell number increase predicted by Le Marc et al. (2008) using *Perfringens Predictor*, is represented by a single line. B1, B2, B3: dashed and solid lines indicate respectively the credibility intervals at 50% and 95% of predictions by Models B1 (model with no variability on h_0), B2 (model with inter-study variability on h_0) and B3 (model with inter-curve variability on h_0). Max refers to the maximum cell number increase for an inoculum size of $2 \log_{10} \text{cfu.g}^{-1}$ and a maximal cell density of $9 \log_{10} \text{cfu.g}^{-1}$.

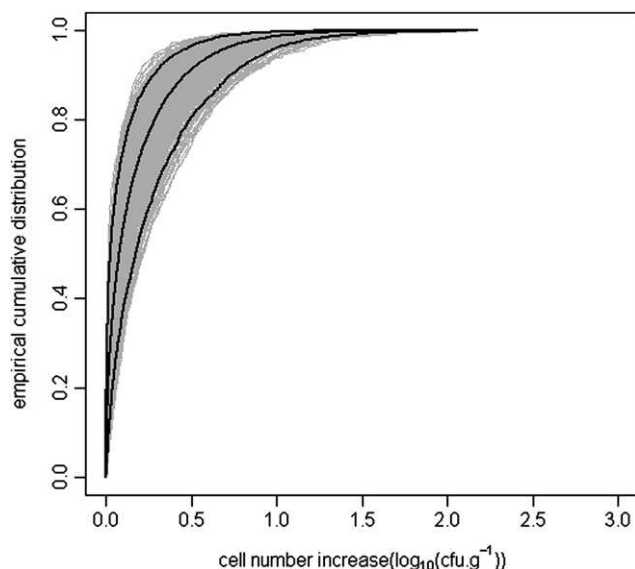


Fig. 5. Predicted variability cumulative distribution of *Clostridium perfringens* cell number increase in beef throughout the registered temperature profiles, with indication of uncertainty, calculated by second order Monte Carlo simulations. Each grey line portrays one simulation of the cumulative variability distribution of predicted cell number increase using one set of uncertain parameters. Dark lines indicate, for each percentile of variability (e.g. 50th percentile), its estimated value (central line) and its 95% credibility interval.

inoculum size on the lag phase and the effect of preincubation conditions and growth medium composition on germination and outgrowth. However in published studies, initial log counts ranged between 1 and $3 \log_{10} \text{cfu.g}^{-1}$, which is too narrow to model its effect on the lag phase. Preincubation conditions (Levinson and Hyatt, 1964; Baranyi and Roberts, 1995; McKellar, 1997; Evans et al., 1997), growth medium composition (Labbé and Chang, 1995; Aran, 2001; Thippareddi et al., 2003; Doyle, 1989; Le Marc et al., 2008) and inoculum size (Smelt and Brul, 2007) were also reported as sources of variability on h_0 . But, in published studies, information available on preincubation conditions or growth medium composition was often lacking or too sparse to allow for data selection or to model the potential effect of other factors on h_0 . Nevertheless, it was possible to exclude data on the basis of NaCl concentrations, and oxygen availability, in order to focus on optimal conditions (low NaCl concentration, anaerobiosis).

Moreover, in an initial attempt to explore sources of variability on h_0 , the model was fitted to a unique dataset, based on a unique protocol, published by Juneja et al. (1999). This dataset is made up of 65 curves observed in TPGYDC broth, after the same classical heat shock (75°C for 20 min) and with the same strain cocktail. Bayesian inference on this dataset with Model B3 led to an estimation of $s_{\ln h_0 c}$ equal to 0.5, which is even greater than 0.41, the value estimated with Model B3 on the whole growth kinetics dataset. This result shows how great the variability on h_0 may be, even in an experiment that seems to be under control. It therefore seems important to take the variability on h_0 into account for exposure

assessment, and, as observed variability on h_0 cannot be easily explained by a deterministic model, it should be modeled as a probability distribution of possible values.

Furthermore, optimal growth was modeled using data obtained under strict anaerobic conditions. In the 'real world' cooling step of the studied kitchen, there might be some oxygen available at the surface of the beef-in-sauce product, and growth would then be less than optimal. However, if the oxidation-reduction potential E_h of the medium is suitable for growth, *C. perfringens* has the ability to promote its growth by establishing intense reducing conditions (Doyle, 1989). This phenomenon amplifies in the case of dense, non-dispersed inocula (Fildes, 1929). *C. perfringens* thus seems to be able to grow in batches of processed beef, but this phenomenon, which was not described in the model in this study, is likely to delay germination and outgrowth.

Consequently the growth predictions throughout the process may be conservative, due to this phenomenon and also to the potential destruction of spores during cooking and of vegetative cells at the end of the reheating. Despite this conservatism, predictions of *C. perfringens* growth throughout the process are reasonably low, and unlikely to provoke foodborne disease, even though more than 50% of the temperature profiles described cooling steps longer than those required by French regulations. Outbreaks associated with *C. perfringens* are thus probably due to huge temperature abuses leading to significant growth in food (Holtby et al., 2008).

Acknowledgements

We would like to thank Régis Pouillot for his precious advice. We also would like to thank the ANR for providing financial support, and the COMBASE project for its contribution by the availability of the data.

References

- Afchain, A.L., Carlin, F., Nguyen-the, C., Albert, I., 2008. Improving quantitative exposure assessment by considering genetic diversity of *B. cereus* in cooked, pasteurised and chilled foods. *International Journal of Food Microbiology* 128, 165–173.
- Amezquita, A., Weller, C.L., Wang, L., Thippareddi, H., Burson, D.E., 2005. Development of an integrated model for heat transfer and dynamic growth of *Clostridium perfringens* during the cooling of cooked boneless ham. *International Journal of Food Microbiology* 101, 123–144.
- Aran, N., 2001. The effect of calcium and sodium lactates on growth from spores of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* in a 'sous-vide' beef goulash under temperature abuse. *International Journal of Food Microbiology* 63, 117–123.
- Augustin, J.-C., Bergis, H., Bourdin, G., Cornu, M., Couvert, O., Denis, C., Huchet, V., Lemonnier, S., Pinon, A., Viallette, M., Zuliani, V. and Stahl, V., 2009. Design of challenge testing experiments to assess the variability of microbial behaviors in foods. 6th International Conference Predictive Modeling in Foods, September 8–12, 2009, Washington, USA.
- Baranyi, J., Roberts, T.A., 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23, 277–294.
- Baranyi, J., Roberts, T.A., 1995. Mathematics of predictive microbiology. *International Journal of Food Microbiology* 26, 199–218.
- Baty, F., Delignette-Muller, M.-L., 2004. Estimating the bacterial lag time: which model, which precision? *International Journal of Food Microbiology* 91, 261–277.
- Bernaerts, K., Gysemans, K.P.M., Nhan Minh, T., Van Impe, J.F., 2005. Optimal experiment design for cardinal values estimation: guidelines for data collection. *International Journal of Food Microbiology* 100, 153–165.
- Blankenship, L.C., Craven, S.E., Leffler, R.G., Custer, C., 1988. Growth of *Clostridium perfringens* in cooked chili during cooling. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 1104–1108.
- Bréand, S., Fardel, G., Flandrois, J.P., Rosso, L., Tomassone, R., 1999. A model describing the relationship between regrowth lag time and mild temperature increase for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 46, 251–261.
- Brooks, S.P., Gelman, A., 1998. General Methods for Monitoring convergence of iterative simulations. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 434–455.
- Codex alimentarius, 1999. Principles and Guidelines for the Conduct of Microbiological Risk Assessment. FAO edition, Rome. Available at: http://www.codexalimentarius.net/download/standards/357/CXG_030e.pdf.
- Craven, S.E., Blankenship, C.L., McDonel, J.L., 1981. Relationship of sporulation, enterotoxin formation and spoilage during growth of *Clostridium perfringens* type A in cooked chicken. *Applied and Environmental Microbiology* 41, 1184–1191.
- Crépet, A., Stahl, V., Carlin, F., 2009. Development of a hierarchical Bayesian model to estimate the growth parameters of *Listeria monocytogenes* in minimally processed fresh leafy salads. *International Journal of Food Microbiology* 131, 112–119.
- Crouch, E., Golden, N., 2005. A Risk Assessment for *Clostridium perfringens* in Ready-To-Eat and Partially Cooked Meat and Poultry Products. USDA, Food Safety Inspection Service, September 2005.
- Dalgaard, P., 1995. Modeling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish. *International Journal of Food Microbiology* 26, 305–317.
- Delignette-Muller, M.L., Baty, F., Cornu, M., Bergis, H., 2005. Modeling the effect of a temperature shift on the lag phase duration of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 100, 77–84.
- Delignette-Muller, M.L., Cornu, M., Pouillot, R., Denis, J.B., 2006. Use of Bayesian modeling in risk assessment: application to growth of *Listeria monocytogenes* and food flora in cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology* 106, 195–208.
- Delignette-Muller, M.L., Pouillot, R., Denis, J.-B., Dutang, C., 2009. *fitdistrplus*: help to fit of a parametric distribution to non-censored or censored data. Available at: <http://cran.r-project.org/>.
- Doyle, M.P., 1989. In: Doyle, M.P., Dekker, M. (Eds.), *Foodborne Bacterial Pathogens*, USA, New York, 796 pp.
- de Jong, A.E.I., Rombouts, F.M., Beumer, R.R., 2004. Behavior of *Clostridium perfringens* at low temperatures. *International Journal of Food Microbiology* 97, 71–80.
- De Jong, A.E.I., Beumer, R.R., Zwietering, M.H., 2005. Modeling growth of *Clostridium perfringens* in pea soup during cooling. *Risk Analysis* 25, 61–73.
- EPA, 1997. Guiding principles for Monte Carlo analysis. Available at: <http://www.epa.gov/osa/raf/prawhitepaper/index.htm>.
- Evans, R.J., Russell, N.J., Gould, G.W., McClure, P.J., 1997. The germinability of a psychrotolerant non-proteolytic strain of *Clostridium botulinum* is influenced by their formation and storage temperature. *Journal of Applied Microbiology* 83, 273–280.
- FAO/WHO, 2006. Food Safety Risk Analysis. A Guide for National Food Safety Authorities. FAO Food and Nutrition. FAO/WHO, Roma. Available at: http://www.fao.org/icatalog/search/dett.asp?aries_id=108051.
- FAO/WHO, 2008. Exposure Assessment of Microbiological Hazards in Food: Guidelines. FAO Food and Nutrition. FAO/WHO, Roma. Available at: http://www.fao.org/icatalog/search/dett.asp?aries_id=109763.
- Fapohunda, A., McMillin, K.W., Marshall, D.L., Waites, W.M., 1994. Growth of selected cross-contaminating bacterial pathogens on beef and fish at 15 and 35°C. *Journal of Food Protection* 57, 337–340.
- Fildes, P., 1929. Tetanus. VIII. The positive limit of oxidation-reduction potential required for the germination of spores of *B. tetani* in vitro. *British Journal of Experimental Pathology* 10, 151–175.
- Foegeding, P.M., Busta, F.F., 1980. *Clostridium perfringens* cells and phospholipase C activity at constant and linearly rising temperatures. *Journal of Food Science* 45, 918–924.
- Holtby, I., Tebbutt, G.M., Grant, K.A., McLauchlin, J., Kett, J., Pinkney, S., 2008. A *Clostridium perfringens* food poisoning outbreak associated with consumption of chicken curry supplied by a home caterer. *Public Health* 122, 1311–1314.
- Huang, L., 2003. Growth kinetics of *Clostridium perfringens* in cooked beef. *Journal of Food Safety* 23, 91–105.
- Huang, L., 2004. Numerical analysis of the growth of *Clostridium Perfringens* in cooked beef under isothermal and dynamic conditions. *Journal of Food Safety* 24, 53–70.
- Juneja, V.K., Marmer, B.S., Miller, A.J., 1994a. Growth and sporulation potential of *Clostridium perfringens* in aerobic and vacuum-packaged cooked beef. *Journal of Food Protection* 57, 393–398.
- Juneja, V.K., Call, J.E., Marmer, B.S., Miller, A.J., 1994b. The effect of temperature abuse on *Clostridium perfringens* in cooked turkey stored under air and vacuum. *Food Microbiology* 11, 187–193.
- Juneja, V.K., Whiting, R.C., Marks, H.M., Snyder, O.P., 1999. Predictive model for growth of *Clostridium perfringens* at temperatures applicable to cooling of cooked meats. *Food Microbiology* 16, 335–349.
- Juneja, V.K., Marks, H.M., 2002. Predictive model for growth of *Clostridium perfringens* during cooling of cooked cured chicken. *Food Microbiology* 19, 313–327.
- Juneja, V.K., Thippareddi, H., Bari, L., Inatsu, Y., Kawamoto, S., Friedman, M., 2006a. Chitosan protects cooked ground beef and turkey against *Clostridium perfringens* spores during chilling. *Journal of Food Science* 71, 236–240.
- Juneja, V.K., Thippareddi, H., Friedman, M., 2006b. Control of *Clostridium perfringens* in cooked ground beef by carvacrol, cinnamaldehyde, thymol, or oregano oil during chilling. *Journal of Food Protection* 69, 1546–1551.
- Juneja, V.K., Bari, M.L., Inatsu, Y., Kawamoto, S., Friedman, M., 2007. Control of *Clostridium perfringens* spores by green tea leaf extracts during cooling of cooked ground beef, chicken, and pork. *Journal of Food Protection* 70, 1429–1433.
- Juneja, V.K., Marks, H., Thippareddi, H., 2008. Predictive model for growth of *Clostridium perfringens* during cooling of cooked uncured beef. *Food Microbiology* 25, 42–55.

- Kang, C.K., Woodburn, M., Pagenkopf, A., Cheney, R., 1969. Growth, sporulation and germination of *Clostridium perfringens* in media of controlled water activity. *Applied Microbiology* 18, 798–805.
- Labbé, R.G., Chang, C.-A., 1995. Recovery of heat-injured spores of *Clostridium perfringens* types B, C and D by lysozyme and an initiation protein. *Letters in Journal of Applied Microbiology* 21, 302–306.
- Labbé, R.G., Huang, T.H., 1995. Generation times and modeling of enterotoxin-positive and enterotoxin-negative strains of *Clostridium perfringens* in laboratory media and ground beef. *Journal of Food Protection* 58, 1303–1306.
- Le Marc, Y., Plowman, J., Aldus, C.F., Munoz-Cuevas, M., Baranyi, J., Peck, M.W., 2008. Modeling the growth of *Clostridium perfringens* during the cooling of bulk meat. *International Journal of Food Microbiology* 128, 41–50.
- Levinson, H.S., Hyatt, M.T., 1964. Effect of sporulation medium on heat resistance, chemical composition and germination of *Bacillus megaterium* spores. *Journal of Bacteriology* 87, 876–886.
- McKellar, R.C., 1997. A heterogeneous population model for the analysis of bacterial growth kinetics. *International Journal of Food Microbiology* 36, 179–186.
- McKellar, R.C., Knight, K., 2000. A combined discrete-continuous model describing the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 54, 171–180.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infection Diseases* 5, 607–625.
- Membré, J.M., Ross, T., McMeekin, T., 1999. Behavior of *Listeria monocytogenes* under combined chilling processes. *Letters in Applied Microbiology* 28, 216–220.
- Membré, J.M., Leporq, B., Vialette, M., Mettler, E., Perrier, L., Thuault, D., Zwietering, M., 2005. Temperature effect on bacterial growth rate: quantitative microbiology approach including cardinal values and variability estimates to perform growth simulations on/in food. *International Journal of Food Microbiology* 100, 179–186.
- Meyer, M., Tholozan, J.L., 1999. A new growth and in vitro sporulation medium for *Clostridium perfringens*. *Letters in Journal of Applied Microbiology* 28, 98–102.
- Nauta, M.J., 2002. Modeling bacterial growth in quantitative microbiological risk assessment: is it possible? *International Journal of Food Microbiology* 73, 297–304.
- Pinon, A., Zwietering, M., Perrier, L., Membré, J.M., Leporq, B., Mettler, E., Thuault, D., Coroller, L., Stahl, V., Vialette, M., 2004. Development and validation of experimental protocols for use of cardinal models for prediction of microorganism growth in food products. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 1081–1087.
- Plummer, M., 2009. JAGS Version 1.0.9 Manual. International Agency for Research on Cancer, Lyon. Available at: <http://www-ice.iarc.fr/~martyn/software/jags/>.
- 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, 87–104.
- R Development Core Team, 2009. R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 3-900051-07-0, <http://www.R-project.org>.
- Rey, C.R., Walker, H.W., Rohrbach, P.L., 1975. The influence of temperature on growth, sporulation and heat resistance of spores of six strains of *Clostridium perfringens*. *Journal of Milk and Food Technology* 38, 461–465.
- Robinson, T.P., Ocio, M.J., Kaloti, A., Mackey, B.M., 1998. The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 44, 83–92.
- Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S., Flandrois, J.P., 1995. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 610–616.
- Sanchez-Plata, M.X., Amezcuita, A., Blankenship, E., Burson, D.E., Juneja, V.K., Thippareddi, H., 2005. Predictive model for *Clostridium perfringens* growth in roast beef during cooling and inhibition of spore germination and outgrowth by organic acid salts. *Journal of Food Protection* 68, 2594–2605.
- Schaffner, D.W., 1994. Application of a statistical bootstrapping technique to calculate growth rate variance for modeling psychrotrophic pathogen growth. *International Journal of Food Microbiology* 24, 309–314.
- Schroder, D.J., Busta, F.F., 1971. Growth of *Clostridium perfringens* in meat loaf with and without added soybean protein. *Journal of Milk and Food Technology* 34, 215–217.
- Smelt, J.P.P.M., Brul, S., 2007. Modelling lag-time in predictive microbiology with special reference to lag phase of bacterial spores. In: Brul, S., van Gerwen, S., Zwietering, M. (Eds.), *Modelling Microorganisms in Food*. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge and CRC Press LCC, Boca Raton, pp. 67–81.
- Smith, S., Juneja, V.K., Schaffner, D.W., 2004. Influence of several methodological factors on the growth of *Clostridium perfringens* in cooling rate challenge studies. *Journal of Food Protection* 67, 1128–1132.
- Spiegelhalter, D., Best, N., Carlin, B., van der Linde, A., 2002. Bayesian measures of model complexity and fit. *Journal of the Royal Statistical Society Series B* 64, 583–639.
- Stringer, S.C., Webb, M.D., George, S.M., Pin, C., Peck, M.W., 2005. Heterogeneity of times required for germination and outgrowth from single spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 4998–5003.
- Stringer, S.C., Webb, M.D., Peck, M.W., 2009. Contrasting effects of heat treatment and incubation temperature on germination and outgrowth of individual spores of nonproteolytic *Clostridium botulinum* bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 2712–2719.
- Thippareddi, H., Juneja, V.K., Phebus, R.K., Marsden, J.L., Kastner, C.L., 2003. Control of *Clostridium perfringens* germination and outgrowth by buffered sodium citrate during chilling of roast beef and injected pork. *Journal of Food Protection* 66, 376–381.
- Vose, D., 2000. *Risk Analysis: a Quantitative Guide*. John Wiley and sons, USA, New York, 418 pp.
- Webb, M.D., Pin, C., Peck, M.W., Stringer, S.C., 2007. Historical and Contemporary NaCl concentrations affect the duration and distribution of lag times from individual spores of nonproteolytic *Clostridium botulinum*. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 2118–2127.
- Whiting, R.C., Cygnarowicz-Provost, M., 1992. A quantitative model for bacterial growth and decline. *Food Microbiology* 9, 269–277.
- WHO, 2003. Surveillance Programme for control of foodborne Infections and Intoxications in Europe 8th report 1999–2000. Available at: http://www.bfr.bund.de/internet/8threport/8threp_fr.htm.
- Willardsen, R.R., Busta, F.F., Allen, C.E., Smith, L.B., 1978. Growth and survival of *Clostridium perfringens* during constantly rising temperatures. *Journal of Food Science* 43, 470–475.
- Willardsen, R.R., Busta, F.F., Allen, C.E., 1979. Growth of *Clostridium perfringens* in three different beef media and fluid thioglycollate medium at static and constantly rising temperatures. *Journal of Food Protection* 42, 144–148.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., van't Riet, K., 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1875–1881.