

CHAPITRE

1

MICROBIOLOGIE PRÉVISIONNELLE

La microbiologie est souvent définie comme l'étude d'organismes trop petits pour être visibles à l'oeil nu : les micro-organismes. Elle a d'abord concerné les organismes d'un diamètre inférieur à 1mm et qui, pour être observés, doivent être regardés au microscope. De nombreuses branches des êtres vivants entrent dans cette catégorie : bactéries, algues, mycètes ou protozoaires mais aussi des structures acellulaires comme les virus. L'invisibilité à l'oeil nu n'est pas toujours une bonne définition pour les micro-organismes. En effet, certains sont un peu plus grands et visibles à l'oeil nu tels que les moisissures du pain ou les algues filamenteuses. Ils n'en restent pas moins étudiés par les microbiologistes pour des questions techniques. **Les difficultés d'établir les limites de la microbiologie ont conduit à dire que ce domaine est défini non seulement en terme de taille, mais encore en terme de techniques à utiliser.** Un microbiologiste isole d'abord un micro-organisme spécifique d'une population et le cultive : il utilise la stérilisation et des milieux de culture [6].

Les micro-organismes représentent une grande part de la biomasse (50 pour cent du carbone biologique et 90 pour cent de l'azote biologique) et leur grande diversité métabolique leur permet de se développer dans tous les milieux même les plus extrêmes (Cours RAB31). Ainsi, des espèces extrêmophiles vivent dans des milieux à forte concentration en sel (lac salés) ou à forte température et forte pression (dorsales océaniques). D'autres espèces peuvent vivre et se développer en collaboration ou au dépend d'un hôte [6]. Les micro-organismes sont aussi impliqués dans la fermentation des aliments ou encore dans leur dégradation.

La microbiologie prévisionnelle est une science qui établit des modèles mathématiques de croissance ou de décroissance des micro-organismes en fonction des conditions de culture.

PLAN DU COURS

1 Microbiologie prévisionnelle	2
1.1 Notion de modèles	4
1.1.1 Définition d'un modèle	4
1.1.1.1 Définitions	4
1.1.1.2 Les modèles déjà évoqués en L1	4
1.1.2 Apports de la Modélisation	4
1.1.2.1 Sécurité des aliments : définir la réglementation	4
1.1.2.2 Santé : Modéliser l'élimination d'un pathogène	5
1.1.2.3 Étude fondamentale	5
1.1.3 Les hypothèses de construction des modèles	5
1.1.4 Approches mathématiques en modélisation	6
1.1.5 Trois types de modèles	6
1.2 Croissance cellulaire et microbiologie prédictive	6
1.2.1 Mesurer la croissance = mesurer la population	7
1.2.1.1 Le cycle cellulaire Procaryote (RAB32)	7
1.2.1.2 Les milieux de croissance	7
1.2.1.3 Suivi et quantification de la croissance	9
1.2.2 Proposition de plusieurs modèles primaires de croissance	16
1.2.3 Modèles secondaires de croissance	19
1.2.3.1 Paramètres physico-chimiques de la croissance	19
1.2.3.2 Modèles secondaires pour la vitesse de croissance	19
1.2.3.3 Les modèles secondaires pour la phase de latence	20
1.2.4 Les modèles tertiaires	21
1.3 Contrôle de la croissance des micro-organismes	23
1.3.1 Les techniques de contrôle de la croissance des micro-organismes	24
1.3.2 Les modèles de contrôle de la croissance des micro-organismes	24
1.3.2.1 Les modèles primaires	24
1.3.2.2 Les modèles secondaire	25
Whole bibliography	27

I. Notion de modèles

A. Définition d'un modèle

1 Définitions

Définition 1 : Un modèle est la **représentation d'un phénomène** rendant compte **au mieux** de ses propriétés **connues**. Un modèle peut être mathématique, physique analogique [Foucault].

Comment fonctionne un modèle ?

- ◇ Utilisation de paramètres d'entrée (données)
- ◇ Utilisation d'une représentation mathématique, physique, analogique
- ◇ Donne des paramètres de sortie inconnus auparavant

Les limites d'un modèle

- ◇ référentiel dans lequel la représentation choisie est valable. Par exemple :
 - ◇ la phase de la réaction (phase stationnaire - équilibre de la réaction)
 - ◇ la phase de croissance (latence - maximale)

2 Les modèles déjà évoqués en L1

En géologie

- ◇ le modèle PREM en géologie
- ◇ la température d'équilibre de la Terre
- ◇ les modèles climatiques

En biochimie

- ◇ Modèle de Mickaëlis et Menten (RAB11)
- ◇ Modèle de croissance exponentielle des cellules (RAB11)

B. Apports de la Modélisation

1 Sécurité des aliments : définir la réglementation

- ◇ Les plans HACCP : Analyse des Dangers - Points Critiques pour leur Maitrise
- ◇ Appréciation Quantitative de Risque : Prévion de l'évolution d'une population de micro-organismes risque pathogène.
- ◇ la détermination de la durée de vie d'un aliment
- ◇ le développement d'un nouveau produit ou d'un nouveau procédé
- ◇ mise au point d'une nouvelle formulation d'un produit sur l'évolution des micro-organismes

- ◇ la planification d'expériences (définition des intervalles entre chaque échantillonnage et nombre d'échantillons à prélever)
- ◇ Mise au point des conditions de stérilisation

[5]

2 Santé : Modéliser l'élimination d'un pathogène

- ◇ Multiplication dans l'hôte peut accessible mais modélisable
- ◇ Estimation de l'effet des antibiotiques

[5]

3 Étude fondamentale

Quelque soit le sujet d'étude sur les micro-organismes, les cultiver est une étape indispensable et les paramètres de croissance sont toujours les paramètres étudiés dans un premier temps.

C. Les hypothèses de construction des modèles

Hypothèse 1 : les populations de micro-organismes répondent de façon reproductible à des conditions environnementales identiques. L'évolution des populations est donc prédictible (remplace un suivi expérimental lourd)[5]

Hypothèse 2 : le profil de croissance suit toujours la même courbe ce qui permet de définir des phases de croissance : latence, accélération, exponentielle, décélération, stationnaire. [5]

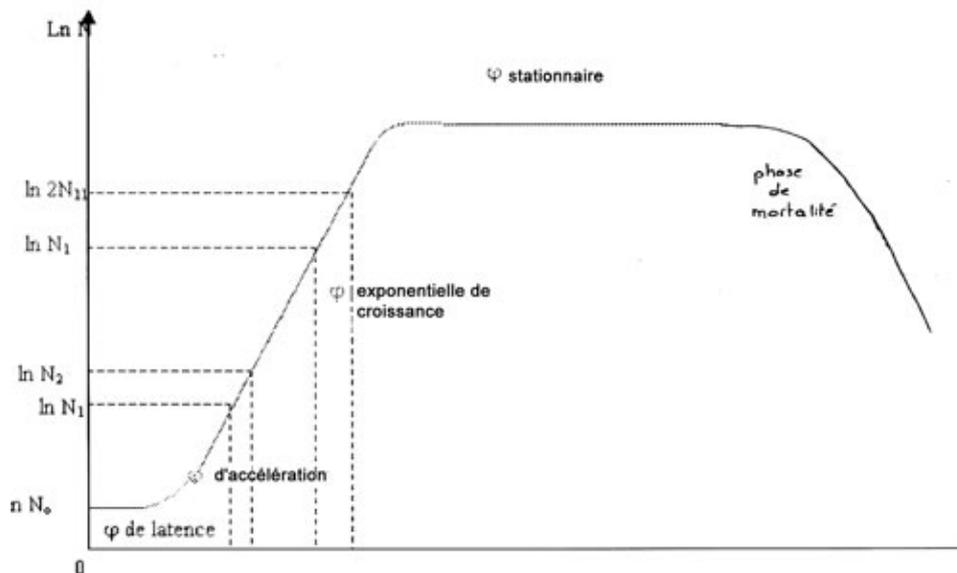


FIGURE 1.1 – Cinétique de Croissance

D. Approches mathématiques en modélisation

Modèles empiriques : objectif : ajuster au mieux les modèles mathématique aux données observées. Aucune explication du phénomène, pas forcément de sens biologique aux équations utilisées.

Modèles mécanistes : s'appuient sur des théories ou des hypothèses et permettent d'expliquer la réponse.

⇒ **Les modèles en microbiologie prévisionnelle sont souvent semi-mécanistes** car tous les mécanismes à la base de la croissance ne sont pas encore compris : l'équation peut être empirique mais les paramètres ont un sens biologique.

[5]

E. Trois types de modèles

Modèle primaire : reproduire l'évolution dans le temps de la population microbienne.

Modèle secondaire : modéliser l'influence des facteurs environnementaux sur les paramètres du modèle primaire (taux de croissance par exemple)

Modèle tertiaire : Établi des relations entre modèles primaires et secondaires.

Ces trois types de modèles peuvent être définis dans de nombreux autres types de modélisation.

II. Croissance cellulaire et microbiologie prédictive

A. Mesurer la croissance = mesurer la population

1 Le cycle cellulaire Procaryote (RAB32)

Le cycle cellulaire des eucaryotes a été vu en biologie cellulaire première année et ces connaissances sont complétées dans le cours de biologie cellulaire de deuxième année. Le cycle cellulaire des procaryotes contient un mode de division particulier : la scissiparité.

D'un point de vue mathématique et technique, le type de cycle cellulaire ne change rien au profil général de croissance qui est le même pour les micro-organismes procaryotes ou eucaryotes ou même pour des cellules eucaryotes isolées. En effet, **le terme croissance pour les micro-organismes ou pour des cellules isolées désigne l'augmentation de la population et non une croissance en taille de chaque cellule qui est pourtant une étape de leur cycle cellulaire.**

2 Les milieux de croissance

a. Les besoins des micro-organismes

Les besoins des micro-organismes vont varier selon le type trophique mais il existe un certain nombre de constantes [6].

Neuf **macroéléments**, sont nécessaires en larges quantités à tous les micro-organismes. Les six premiers sont les constituants des molécules organiques : C, O, H, N, S et P. Les quatre autres sont des cations dont les fonctions cellulaires sont variées (de la signalisation à la catalyse enzymatique) : K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} et $Fe^{2+/3+}$. La forme sous laquelle ces éléments seront apporté va dépendre du type trophique de l'organisme [6].

D'autres éléments sont nécessaires en petite quantité : les **microéléments** ou éléments traces. Six d'entre eux sont nécessaires à la majorité des cellules : le manganèse, le zinc, le cobalt, la molybdène, le nickel et le cuivre. La plupart de ces éléments sont nécessaires à des catalyses enzymatiques et les concentrations présentes dans l'eau sont en général suffisantes. Ils sont rarement limitant pour la croissance [6].

Certains éléments peuvent être des **besoins spécifiques** pour certaines espèces : des silicates pour les diatomées ou de forte concentrations en sodium pour les halophiles extrêmes. Certains micro-organismes nécessitent des facteurs de croissance : acides aminés, bases azotées ou vitamines [6].

Tous ces éléments ne peuvent entrer dans les cellules que si le transporteur adéquat existe dans la membrane.

b. Les types de milieux

Les milieux de croissance complexes sont des milieux dont la composition exacte est inconnue car ils sont en général issus de la dégradation de matériel organique. Des mélanges complexes seront des sources de carbone (farines de blé, de froment, d'orge, la mélasse, le méthanol, les eaux usées, les alcanes, la vinasse) d'autres des sources d'azote (la farine de viande ou de poisson,

Table 5.4		Types of Media	
Physical Nature	Chemical Composition	Functional Type	
Liquid	Defined (synthetic)	Supportive (general purpose)	
Semisolid	Complex	Enriched	
Solid		Selective	
		Differential	

FIGURE 1.2 – Les types de milieux

de coton, de colza, de soja, de tournesol, les extraits de levure, les hydrolysats de caséines, de peptones, de tryptones). A partir de ces sources, le milieu complexe est fabriqué. Par exemple le milieu LB (Lysogenique Broth) est composé d'extraits de levure, de tryptones de NaCl et d'eau [6].

Les milieux de croissance synthétiques sont fabriqués à partir de substances purifiées comme du glucose, du sel (NaCl), des acides aminés et de l'ammoniac. Ces milieux synthétiques nécessitent d'être mis au point pour optimiser la croissance [6].

Les milieux peuvent se présenter sous deux formes physiques :

- **Les milieux gélosés** solides ou semi-solides contiennent de l'agar. Ils peuvent être coulés dans des tubes mais le plus souvent ils sont coulés sur des boîtes de pétri. Ce sont des milieux permettant d'isoler des colonies (groupe de cellules issues de la division d'une unique cellule mère) [6].
- **Les milieux liquides** ne contiennent pas d'agar. Ils sont destinés soit à enrichir un prélèvement en micro-organismes avant d'isoler les cellules sur des milieux gélosés soit à obtenir de larges quantités d'une souche purifiée [6].

Les milieux peuvent avoir des fonctions variables. Certains milieux sont des **milieux de support** : classiquement utilisés pour faire croître la plupart des souches (LB, supportive). D'autres sont dits **enrichis** : souvent ils sont destinés à faciliter la croissance d'une espèce. Les géloses au sang, par exemple, favorisent les pathogènes sanguins. Les **milieux spécifiques** ne laissent pousser qu'un groupe de bactéries. Les géloses MacConkey contiennent des sels biliaires et du crystal violet qui bloquent la croissance des bactéries gram positives. Les **milieux de différenciation** permettent de distinguer deux groupes de microorganismes. Les géloses au sang sont enrichies et différenciatives : elles permettent de distinguer les micro-organismes hémolytiques ainsi que le type d'hémolyse. Elles sont souvent utilisées pour les Streptocoques [6].

c. Les techniques d'isolement

Les milieux gélosés sur boîte de pétri permettent d'isoler des clones cellulaires. Au début, ces milieux étaient solidifiés grâce à de la gélatine mais celle-ci était digérée par les micro-organismes. L'utilisation de l'AGAR, extrait d'algues, a révolutionné la microbiologie : nous étions capables d'isoler un clone d'un micro-organisme ([6].

Il est nécessaire de correctement isoler chaque cellule sur le milieu sinon elles forment un tapis uniforme. Il existe deux façons d'isoler les cellules :

- Une suspension contenant une faible concentration de cellules est prélevée déposée sur un milieu

Table 5.6 Some Common Complex Media	
Nutrient Broth	Amount (g/liter)
Peptone (gelatin hydrolysate)	5
Beef extract	3
Tryptic Soy Broth	
Tryptone (pancreatic digest of casein)	17
Peptone (soybean digest)	3
Glucose	2.5
Sodium chloride	5
Dipotassium phosphate	2.5
MacConkey Agar	
Pancreatic digest of gelatin	17.0
Pancreatic digest of casein	1.5
Peptic digest of animal tissue	1.5
Lactose	10.0
Bile salts	1.5
Sodium chloride	5.0
Neutral red	0.03
Crystal violet	0.001
Agar	13.5

Table 5.5 Examples of Defined Media	
BG-11 Medium for Cyanobacteria	Amount (g/liter)
NaNO ₃	1.5
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	0.04
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.075
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.036
Citric acid	0.006
Ferric ammonium citrate	0.006
EDTA (Na ₂ Mg salt)	0.001
Na ₂ CO ₃	0.02
Trace metal solution ^a	1.0 ml/liter
Final pH 7.4	
Medium for <i>Escherichia coli</i>	
Amount (g/liter)	
Glucose	1.0
Na ₂ HPO ₄	16.4
KH ₂ PO ₄	1.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	200.0 mg
CaCl ₂	10.0 mg
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 mg
Final pH 6.8–7.0	
Sources: Data from Rippka, et al. <i>Journal of General Microbiology</i> , 111:1–61, 1979; and S. S. Cohen, and R. Arbogast, <i>Journal of Experimental Medicine</i> , 91:619, 1950.	
^a The trace metal solution contains H ₃ BO ₃ , MnCl ₂ · 4H ₂ O, ZnSO ₄ · 7H ₂ O, Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O, CuSO ₄ · 5H ₂ O, and Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O.	

FIGURE 1.3 – Exemples de milieux complexes et synthétiques (defined) [6]

solide en boîte de pétri puis la goutte est étalée à l'aide d'un râteau. Dans ce cas, chaque cellule de la suspension sera isolée des autres et se divisera pour donner une colonie. La réussite dépend de la concentration de la suspension de départ (1,2).

- Une colonie ou une goutte d'une suspension de microorganismes concentrée sont séparées par épuisement. Dans ce cas, seules quelques colonies seront isolées des autres [6].

3 Suivi et quantification de la croissance

a. Mesure de la quantité de micro-organismes dans un milieu liquide

Mesurer la quantité de microorganismes peut permettre de suivre la croissance dans un milieu liquide mais aussi de dénombrer des microorganismes dans n'importe quel échantillon. Selon les méthodes, seuls les microorganismes vivants seront quantifiés ou vivants et morts ne seront pas distingués [6].

- **la mesure de densité optique (turbidité)** : la DO d'un millilitre de culture bactérienne est mesurée, éventuellement après dilution(s) car on considère qu'une mesure de DO supérieure à 1 n'est pas fiable (risque de saturation du spectrophotomètre). Cette méthode directe permet d'estimer la biomasse (vivante et morte). Ceci n'est pas très précis pour les souches filamenteuses ou qui forment des amas [6].

- **Cellule de Malassez** : c'est une lame de microscope particulière qui est quadrillée. On dépose du milieu contenant des bactéries puis on place une lamelle. Pour chaque quadrant, on connaît le volume de liquide. Les bactéries présentes sont comptées dans plusieurs quadrants. Connaissant le volume de liquide, on obtient une concentration. Les bactéries mortes peuvent être marquées de

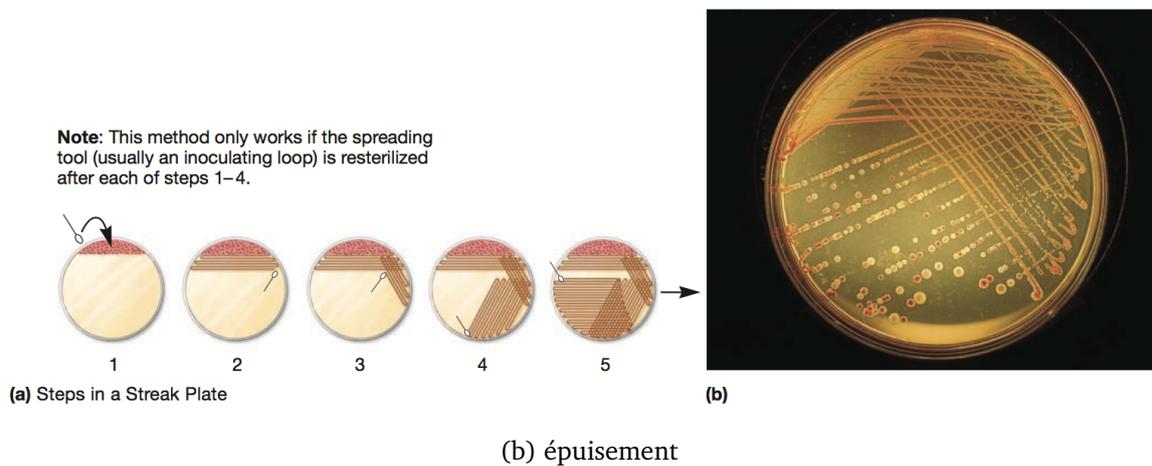
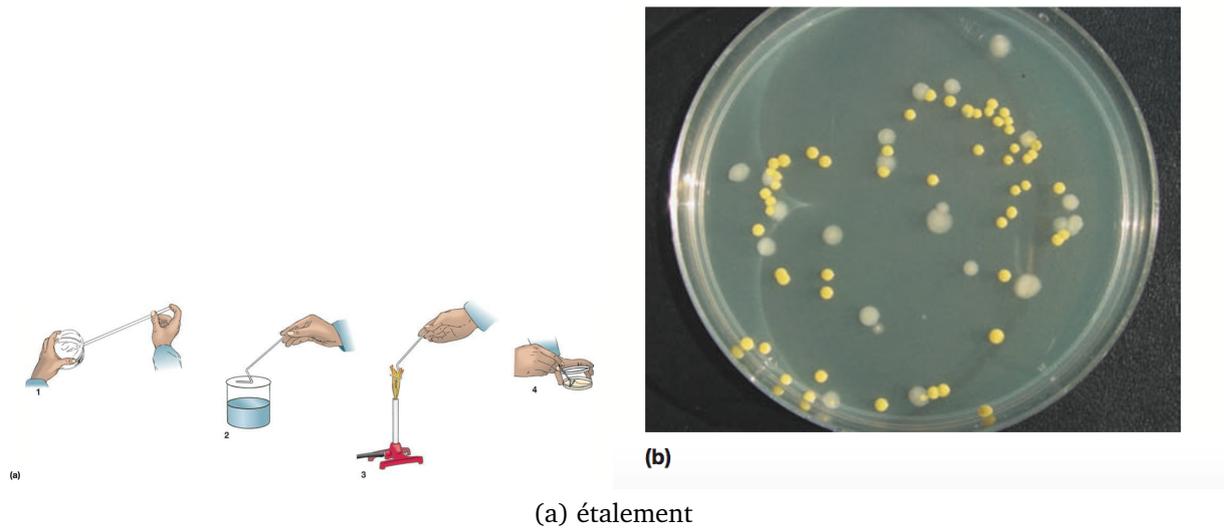


FIGURE 1.4 – Techniques d'isolement [6]

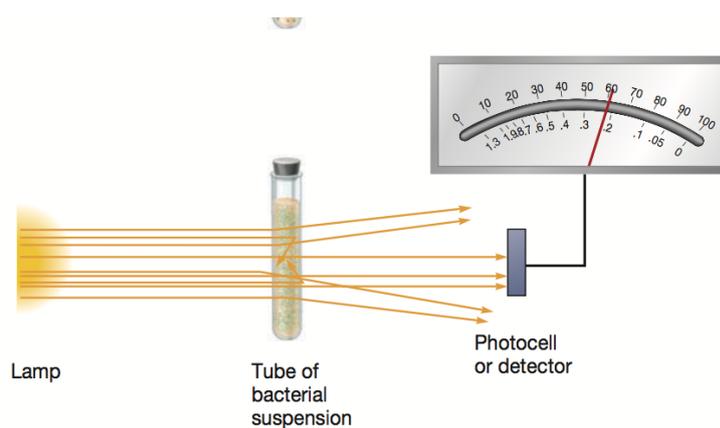


FIGURE 1.5 – Mesure de la turbidité [6] : méthode directe qui ne différencie pas vivants et morts

façon à ne compter que les vivantes. C'est une méthode directe

- **Mesure en milieu liquide** : méthode du nombre le plus probable (NPP). Pour cela, des dilutions en cascade sont réalisées et les résultats sont analysés à l'aide d'une table statistique appelée table

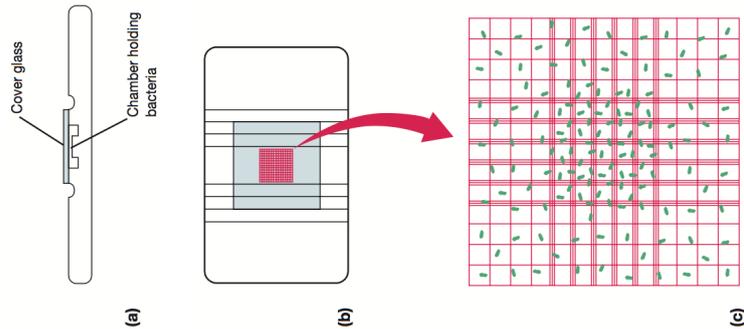


FIGURE 1.6 – Comptage sur cellule de Malassez [6] : méthode directe permettant de compter vivants et morts

de Mc Grady. A partir de la culture liquide d'origine, des dilutions en cascade de la culture sont réalisées en plusieurs exemplaires. Le nombre de tubes positifs pour chaque dilution est compté. Un code est obtenu en partant de la dernière dilution pour laquelle tous les tubes sont positifs. En fonction du code obtenu, la table donne le Nombre le plus probable de bactéries dans chaque tube de la plus forte dilution considérée. La concentration en bactérie sera le NPP/(dilution la plus grande considérée). C'est une méthode indirecte qui ne permet de mesurer que les cellules vivantes.

Nombre de tubes positifs	NPP						
0 0 0		1 0 0	2.0	2 0 0	4.5	3 0 0	7.8
0 0 1	1.8	1 0 1	4.0	2 0 1	6.8	3 0 1	11
0 0 2	3.6	1 0 2	6.0	2 0 2	9.1	3 0 2	13
0 0 3	5.4	1 0 3	8.0	2 0 3	12	3 0 3	16
0 0 4	7.2	1 0 4	10	2 0 4	14	3 0 4	20
0 0 5	9.0	1 0 5	12	2 0 5	16	3 0 5	23
0 1 0	1.8	1 1 0	4	2 1 0	6.8	3 1 0	11
0 1 1	3.6	1 1 1	6.1	2 1 1	9.2	3 1 1	14
0 1 2	5.5	1 1 2	8.1	2 1 2	12	3 1 2	17
0 1 3	7.3	1 1 3	10	2 1 3	14	3 1 3	20
0 1 4	9.1	1 1 4	12	2 1 4	17	3 1 4	23
0 1 5	11	1 1 5	14	2 1 5	19	3 1 5	27
0 2 0	3.7	1 2 0	6.1	2 2 0	9.3	3 2 0	14
0 2 1	5.5	1 2 1	8.2	2 2 1	12	3 2 1	17
0 2 2	7.4	1 2 2	10	2 2 2	14	3 2 2	20
0 2 3	9.2	1 2 3	12	2 2 3	17	3 2 3	24
0 2 4	11	1 2 4	15	2 2 4	19	3 2 4	27
0 2 5	13	1 2 5	17	2 2 5	22	3 2 5	31
0 3 0	5.6	1 3 0	8.3	2 3 0	12	3 3 0	17
0 3 1	7.4	1 3 1	10	2 3 1	14	3 3 1	21
0 3 2	9.3	1 3 2	13	2 3 2	17	3 3 2	24

FIGURE 1.7 – Table de Mc Grady pour le NPP : méthode indirecte et statistique permettant d'estimer les cellules vivantes

- **Dilutions/étalements** : un prélèvement de la culture bactérienne est soumis à une série de dilutions séquentielles (dilution 10 fois = 10^{-1} ; dilution 100 fois = 10^{-2} ; ...), après quoi, pour chaque

dilution testée, une quantité donnée est étalée sur un milieu nutritif solide. Après croissance, les colonies sont comptées (on considère que les comptes sont fiables s'il y a au moins trente colonies sur la boîte, et pas plus de trois cent), et un calcul intégrant quantité d'échantillon étalée et facteur de dilution permet d'obtenir un nombre théorique de bactéries dans l'échantillon prélevé, exprimé en UFC/ml (Unités Formant Colonies). Cette méthode indirecte permet d'effectuer des comptages de cellules viables [6].

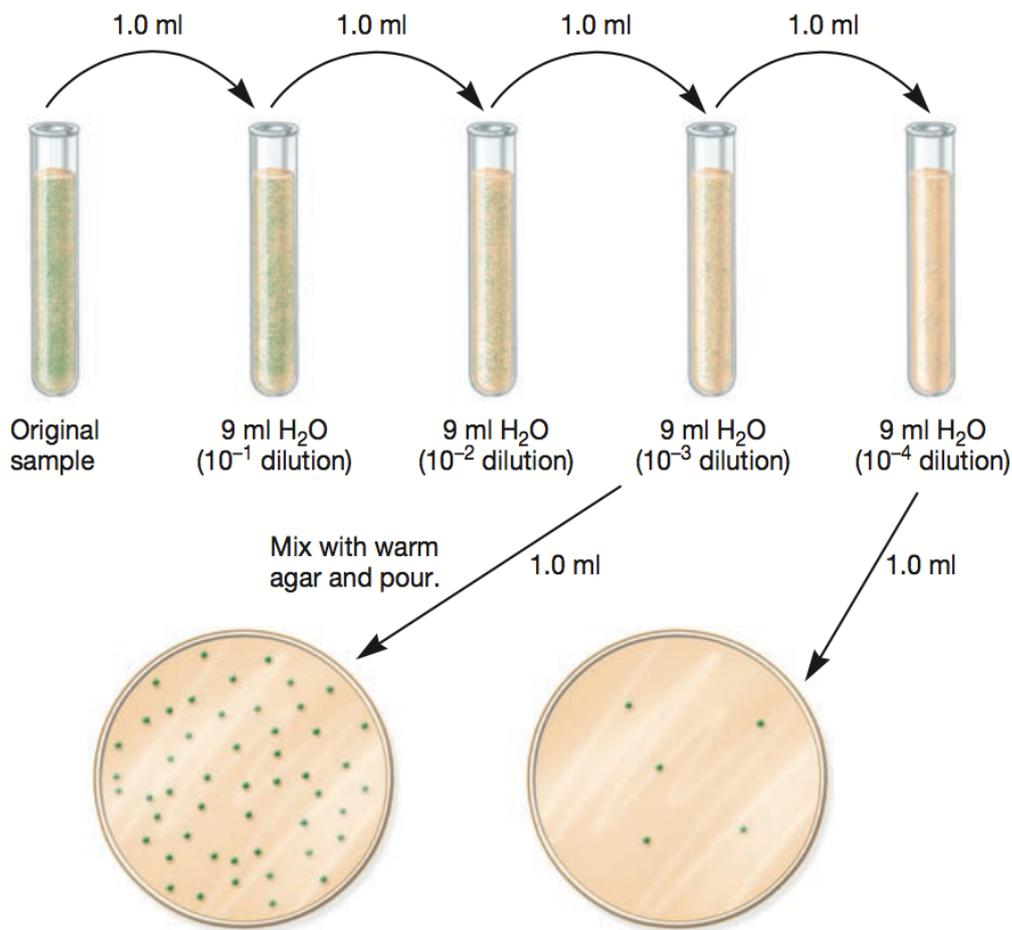


FIGURE 1.8 – Dénombrement sur milieu gélosé après dilution et étalement : méthode indirecte ne permettant de compter que les vivants [6]

- **Dénombrement après filtration** : une culture liquide est passée sur un filtre à faible porosité ($2\mu\text{m}$) puis le filtre est déposé soit dans un peu de milieu liquide soit sur un milieu gélosé (qui peut être sélectif). Chaque bactérie viable donne une colonie, chaque bactérie capable de croître est une unité formant colonie.

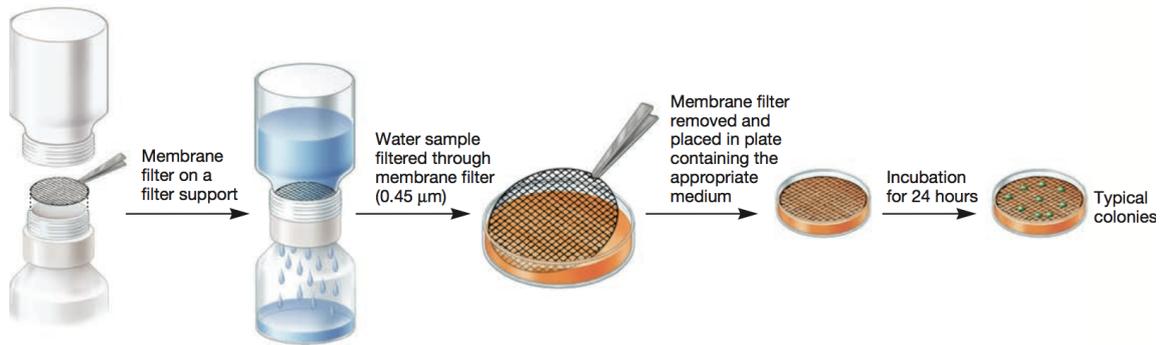


FIGURE 1.9 – Dénombrement sur filtre : méthode indirecte permettant de dénombrer les vivants souvent utilisée pour des échantillons de grands volumes et faible concentration en micro-organisme [6]

Exercice 1 : Étude de l'eau d'une rivière

Afin d'analyser la contamination biologique d'une eau de rivière, des dilutions en cascade de cette eau dans une eau physiologique stérile sont réalisés :

- Dilution 1 : 10 mL d'eau de rivière + 90 mL d'eau physiologique stérile
- Dilution 2 : 1 mL de la dilution 1 + 9 mL d'eau physiologique stérile
- Dilution 3 : 1 mL de la dilution 2 + 9 mL d'eau physiologique stérile
- Dilution 4 : 1 mL de dilution 3 + 9 mL d'eau physiologique stérile
- Dilution 5 : 0,1 mL de la dilution 4 + 0,9 mL d'eau physiologique stérile

Pour chacune de ces dilutions (1 à 5), on prélève 0,1 mL qu'on étale sur un milieu de culture solide en boîte de pétri. Au bout de 24h, on compte le nombre de colonies sur chaque boîte :

- Dilution 1 : Indéterminable
- Dilution 2 : 350
- Dilution 3 : 79
- Dilution 4 : 25
- Dilution 5 : 3

Faites un schéma du protocole et déterminez le nombre de CFUs dans les 100mL d'échantillon d'eau de rivière en tenant compte de toutes les mesures

Schéma bilan 1 : Mesure de la quantité de micro-organismes

Préparez un schéma bilan sur les différents types de mesure de la quantité de micro-organismes en indiquant si c'est une méthode directe ou indirecte, si elle permet de différencier les morts de vivants et le type de milieux possible pour ce type de mesures.

b. Culture en batch ou culture discontinue

C'est un procédé dans lequel les cellules sont placées dans un milieu complet et la croissance se déroule jusqu'à épuisement du milieu ou apparition d'un élément toxique. C'est la méthode la plus classiquement utilisée pour caractériser les caractéristiques de croissance des cellules.

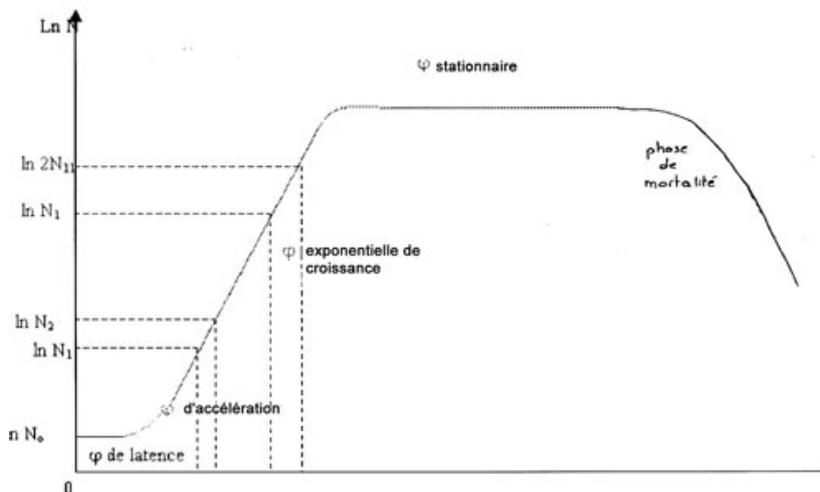
PHASES

La croissance est ici représentée en nombre de cellules en fonction du temps. Quatre phases principales sont décrites :

- **la phase de latence** permet la production de nouveaux composants cellulaires pour préparer la division. Sa durée dépend de l'âge des cellules, l'adaptation des cellules (rôle du milieu), un possible changement de milieux (facteurs de croissance ; cas des milieux synthétiques).
- **la phase exponentielle de croissance** est la phase de division à vitesse maximale. La vitesse de croissance est une constante : les organismes se divisent et doublent à intervalle de temps régulier. Chaque organisme se divise à un moment légèrement différent, ce qui donne lieu à une augmentation régulière de la population et non à un palier. La population est presque uniforme en termes de propriétés physiques et physiologiques.
- **la phase stationnaire** est le stade de fin de croissance. Cette phase est atteinte vers 10^9 cellules/mL pour la plupart des bactéries. Ce chiffre est plus bas pour les autres types de culture : une culture de protiste atteint par exemple plutôt 10^6 cellules/mL. Le nombre de microorganismes viables est alors constant. Plusieurs raisons conditionnent l'entrée en phase stationnaire : épuisement du milieu en éléments nutritifs, l'accumulation de déchets toxiques, l'évolution défavorable de l'environnement physique (pH). Les bactéries sont souvent soumises dans l'environnement à des étapes de starvation et sont capables d'adapter leur métabolisme à cette situation : diminution de la taille, condensation du chromosome, production de protéines de starvation (Dps pour protection ADN, chaperonnes pour protéger les protéines), renforcement de l'épaisseur et de la résistance du peptidoglycane. Ces cellules sont plus résistantes et parfois plus virulentes pour certains pathogènes (*Salmonella typhimurium*) suite à une starvation.
- **la phase de mortalité** est un stade de diminution du nombre de cellules viables. La mortalité est logarithmique : une proportion constante de cellules meurent par heure. Pour estimer si une cellule est morte, il faut de nouveau l'incuber dans un milieu frais et voir si elle se divise. Cette vision du devenir des cellules et notamment des bactéries en phase de mortalité est en pleine évolution. En effet, certains microbiologistes estiment que ce n'est pas parce que certaines bactéries straving ne semblent pas pouvoir se diviser en laboratoire qu'elle ne pourront plus repartir : **elles seraient viables mais non cultivables (VBNC)**. Ce serait une forme de survie qui permettrait aux cellules de repartir dans des conditions différentes. Ces VBNC, difficiles à identifier, seraient un enjeu de santé public important. Une seconde hypothèse est l'existence d'**une mort cellulaire programmée**.

Une fraction de la population subirait un programme génétique menant à un suicide cellulaire pour le bien de la communauté. Ces cellules seraient non cultivables mais aussi non viables. **Cette phase de déclin peut durer des mois voire des années.** Elle se caractérise par la succession de reprise de croissance de bactéries les mieux adaptées aux nutriments laissés par les bactéries qui viennent de mourir et les plus résistantes aux toxines présentes. Des phénotypes se succèdent ainsi et la population continue d'évoluer. Cette étape se caractérise par la succession de vagues de variants génétiquement différents.

A cause de l'équation mathématique des phases exponentielles et de mortalité, les courbes de croissance sont représentées le plus souvent en échelle semi-logarithmique en fonction du temps.



(a) Courbe de croissance en échelle semi-log

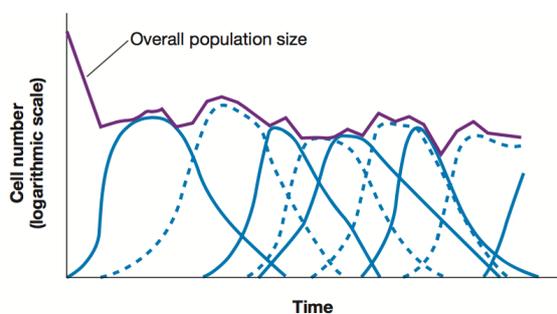


Figure 6.9 Prolonged Decline in Growth. Instead of a distinct death phase, successive waves of genetically distinct subpopulations of microbes better able to use the released nutrients and accumulated toxins survive. Each successive solid or dashed curve represents the growth of a new subpopulation.

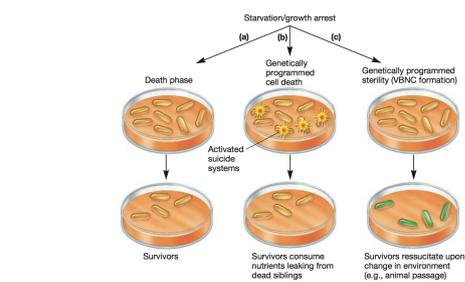


Figure 6.8 Loss of Viability. (a) It has long been assumed that as cells leave stationary phase due to starvation or toxic waste accumulation, the exponential decline in culturability is due to cellular death. (b) Some believe that a fraction of a microbial population dies due to activation of programmed cell death genes. The nutrients that are released by dying cells supports the growth of other cells. (c) The viable but nonculturable (VBNC) hypothesis posits that when cells are starved, they become temporarily nonculturable under laboratory conditions. When exposed to appropriate conditions, some cells will regain the capacity to reproduce.

(b) Etat des cellules en phase de déclin

(c) Les vagues de variants en déclin prolongé

FIGURE 1.10 – Courbe de croissance : (a) Croissance en Batch (b) caractéristiques des cellules en phase de déclin (c) le déclin prolongé [6]

c. Semi-continue ou Fed batch

: Les cellules sont mises en culture dans un milieu synthétique avec une quantité de substrat limité (par exemple du glucose). Lorsqu'elles entrent en phase exponentielle du glucose est ajouté à une vitesse qui permet d'imposer le taux de croissance.

d. Continue ou chemostat

: Du milieu frais stérile est apporté selon un débit donné à une suspension cellulaire en phase exponentielle de manière à ce qu'elle se reproduise. Simultanément, de la suspension est prélevée exactement en même débit.

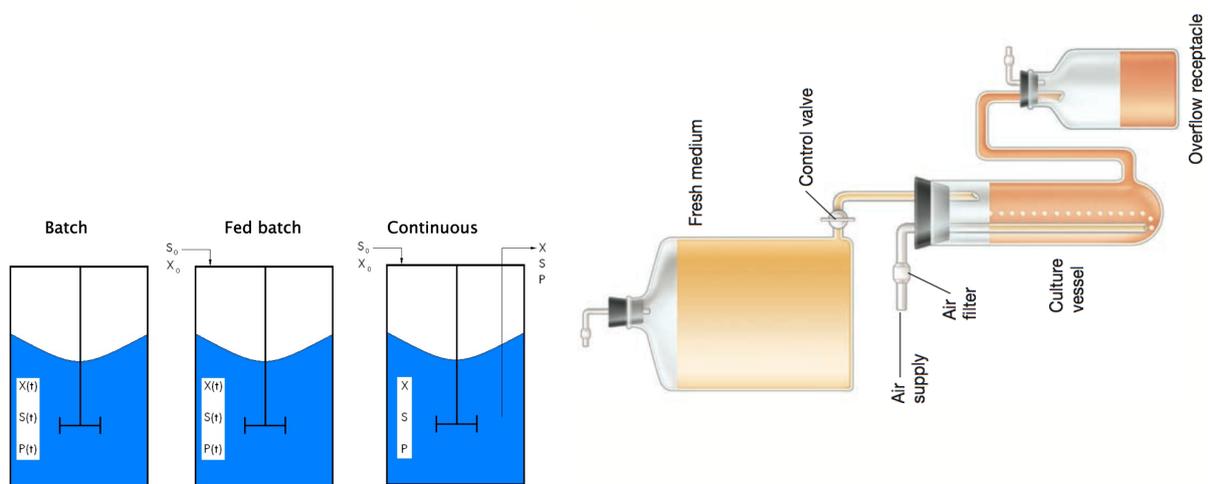


FIGURE 1.11 – Les types de culture (à gauche) et montage d'un chemostat (à droite) [6]

B. Proposition de plusieurs modèles primaires de croissance

Modèles déterministe : Évolution du nombre de cellules peut être décrite par un ensemble de paramètres : description au niveau de la population.

Modèles stochastiques ou probabilistes : les paramètres sont des variables à distribution aléatoire représentant l'ensemble de la population bactérienne : les différences au sein de la population sont prises en compte.

a. Le modèle exponentiel de Buchanan, [3]

Référentiel du modèle :

- ◇ En phase exponentielle
- ◇ Hypothèse : toutes les cellules se multiplient à vitesse maximale.

$$N_t = N_0 * \exp(\mu * t) \text{ avec } \mu = \frac{\ln(2)}{G}$$

Limites : surestimation du nombre de cellules

DÉMONSTRATION DU MODÈLE DE CROISSANCE EXPONENTIELLE

Soit n le nombre de générations que réalise une population de cellule pendant un temps t .
Soit X_0 le nombre de bactéries à $t = 0$ et X_t le nombre de bactéries à t .

$$X_t = X_0 * 2^n \quad (1.1)$$

$$\rightarrow \log(X_t) = \log(X_0 * 2^n) \quad (1.2)$$

$$\leftrightarrow \log(X_t) = \log(X_0) + n * \log(2) \quad (1.3)$$

$$\leftrightarrow n = \frac{\log(X_t) - \log(X_0)}{\log(2)} \quad (1.4)$$

Soit k , le taux horaire de croissance :

$$k = \frac{n}{t} \leftrightarrow k = \frac{\log(X_t) - \log(X_0)}{t * \log(2)} \quad (1.5)$$

Le temps de génération G est le temps pour lequel la population double. Donc, pour $t = G$, on a $X_t = 2X_0$. Donc :

$$k = \frac{\log(2 * X_0) - \log(X_0)}{g * \log(2)} \quad (1.6)$$

$$\leftrightarrow k = \frac{1}{G} \quad (1.7)$$

MATHÉMATIQUE DE LA CROISSANCE EN LOGARITHME NÉPÉRIEN

Le raisonnement est exactement le même en passant par le logarithme népérien.

$$X_t = X_0 * 2^n \quad (1.8)$$

$$\leftrightarrow \ln(X_t) = \ln(X_0) + n * \ln(2) \quad (1.9)$$

$$n = \frac{t}{G} \leftrightarrow \ln(X_t) = \ln(X_0) + \frac{t * \ln(2)}{G} \quad (1.10)$$

$$\leftrightarrow \ln(X_t) = \ln(X_0) + \frac{\ln(2)}{G} * t \quad (1.11)$$

Soit $\mu = \frac{\ln(2)}{G}$, **le taux de croissance népérien de la souche.**

$$\leftrightarrow \ln(X_t) = \ln(X_0) + \mu * t \quad (1.12)$$

b. Le modèle linéaire en trois phases [4]

Référentiel du modèle :

- ◇ pas de possibilité de croissance en latence/ stationnaire

- ◇ Démarrage et freinage brusque de la croissance
- ◇ Hypothèse : toutes les cellules se multiplient à vitesse maximale en phase exponentielle.

$$\ln(N_t) = \ln(N_0) \text{ si } t \leq \lambda$$

$$\ln(N_t) = \ln(N_0) + \mu(t - \lambda) \text{ si } t > \lambda \text{ et } N(t) < N_{max} \text{ avec } \mu = \frac{\ln(2)}{G}$$

$$\ln(N_t) = \ln(N_{max}) \text{ si } N(t) \geq N_{max}$$

Limites : mauvais ajustement des données expérimentales

c. Le modèle non linéaire (fonctions sigmoïdes) : modèle logistique (Rosso et al., 1995)

Référentiel du modèle :

- ◇ pas de possibilité de croissance en latence
- ◇ pas de transition entre latence et exponentielle
- ◇ Hypothèse : toutes les cellules se multiplient à vitesse maximale en phase exponentielle.

$$\ln[N(t)] = \ln(N_0) \text{ si } t \leq \lambda$$

$$\ln[N(t)] = \ln(N_{max}) - \ln\left(1 + \left(\frac{N_{max}}{N_0} - 1\right)e^{-\mu(t-\lambda)}\right) \text{ si } t > \lambda$$

Limites : mauvais ajustement des données expérimentales entre latence et exponentielle

d. Le modèle non linéaire [1]

Référentiel du modèle :

- ◇ équation différentielle en phase exponentielle
- ◇ une fonction d'ajustement pour la transition latence exponentiel avec un paramètre entre 0 et 1 de l'état physiologique des bactéries
- ◇ une fonction d'ajustement pour décrire la phase d'inhibition basée sur la diminution des nutriments.

$$\ln[N(t)] = \ln(N_0) + \mu A(t) - \ln\left[1 + \frac{e^{\mu A(t)} - 1}{e^{N_{max} - N_0}}\right]$$

$$\text{avec } A(t) = t + \frac{\ln(e^{-\mu t} + e^{-\mu lag} - e^{-\mu t - \mu lag})}{\mu}$$

Limites : bon ajustement des données expérimentales entre latence et exponentielle

⇒ Logiciel Gratuit d'ajustement DMFit : [disponible ici](#)

Résultats obtenus : *Listeria monocytogenes* dans de la viande hachée de porc irradiée et conditionnée sous film étirable à une température de 10 °C (Delhalle et al., 2009)

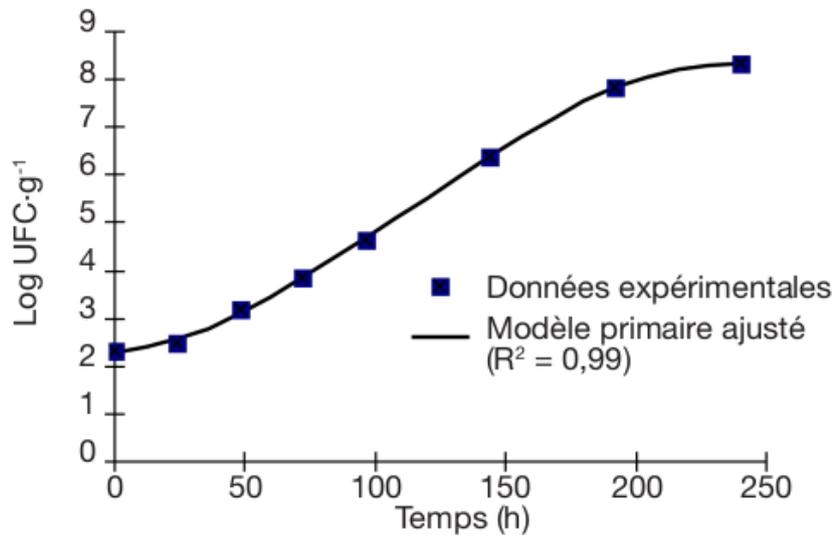


Figure 2. Ajustement d'un modèle primaire aux données obtenues lors d'un test de croissance — *Fitting of a primary model with data obtained during a challenge test.*

Exercice 2 : Croissance d'une souche d'*Acetobacter*

A partir des données du tableau situé sous cet encart, tracez la courbe de croissance en échelle logarithmique, déterminez le taux de croissance népérien ainsi que le temps de génération.

TABLE 1.1 – Croissance d'une souche d'*Acetobacter*

t (heures)	N						
0	10^5	5	$2,51 \cdot 10^5$	10	$1,51 \cdot 10^7$	15	$5,01 \cdot 10^7$
1	10^5	6	$5,75 \cdot 10^5$	11	$2,51 \cdot 10^7$	16	$5,25 \cdot 10^7$
2	10^5	7	$1,32 \cdot 10^6$	12	$3,63 \cdot 10^7$	17	$5,25 \cdot 10^7$
3	10^5	8	$3,02 \cdot 10^6$	13	$4,17 \cdot 10^7$		
4	$1,38 \cdot 10^5$	9	$6,92 \cdot 10^6$	14	$4,57 \cdot 10^7$		

C. Modèles secondaires de croissance

1 Paramètres physico-chimiques de la croissance

La croissance de bactéries dépend des nutriments mais aussi des conditions physico-chimiques. Selon les espèces, les optima de croissance ne sont pas les mêmes.

2 Modèles secondaires pour la vitesse de croissance

Le gamma concept :

◇ Tous les facteurs sont indépendants et multiplicatifs :

$$\mu = f(temp) * f(a_w) * \dots$$

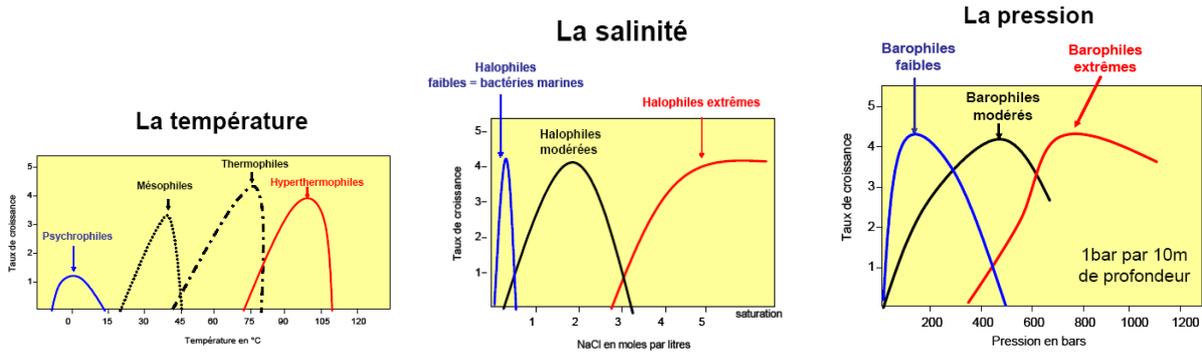


FIGURE 1.12 – Les conditions physico-chimiques de la croissance des procaryotes [6]

◇ l'effet de chaque facteur est une fraction du taux de croissance max

$$\gamma = \frac{\mu}{\mu_{max}} \text{ entre 0 et 1}$$

Modèles de type racine carrée :

◇ Purement empiriques basé sur l'effet de la température :

$$\sqrt{\mu} = b(T - T_{min}) \quad b \text{ paramètre du modèle obtenu par régression.}$$

◇ extensions :

$$\mu = b(T - T_{min})(a_w - a_{wmin})(pH - pH_{min})(pH - pH_{max})$$

◇ utilisation possible de ce modèle dans le gamma concept :

$$\gamma(a_w) = \frac{a_w - a_{wmin}}{1 - a_{wmin}}$$

Modèle cardinal :

◇ Empiriques mais paramètres a une signification biologique

$$\mu = \mu_{opt} C M_n(X) \quad CM \text{ pour Cardinal Model, } X \text{ un facteur environnemental.}$$

◇ le modèle cardinal peut tenir d'un phénomène biphasique dans la modélisation.

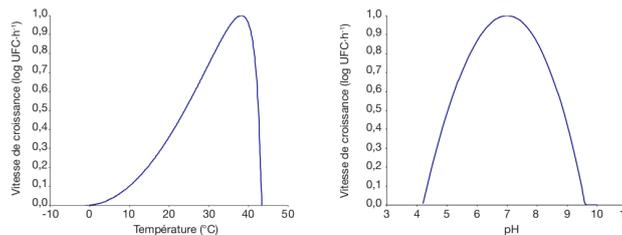


Figure 3. Simulation de la vitesse de croissance en fonction de la température et du pH par le modèle cardinal établi pour *Listeria monocytogenes* — Simulation of the growth rate in function of temperature and pH by the cardinal model established for *Listeria monocytogenes*.

Modèle polynomial ou modèle bulldozers :

$$\mu = ax + by + cz + dx + \dots \dots \dots fz^n$$

⇒ Très bon ajustement au jeu de données.

3 Les modèles secondaires pour la phase de latence

Définition 2 : La définition communément admise est le temps correspondant à l'intersection entre la tangente au point d'inflexion de la phase exponentielle de la courbe de croissance et l'horizontale passant par l'ordonnée à l'origine de la courbe de croissance [2]

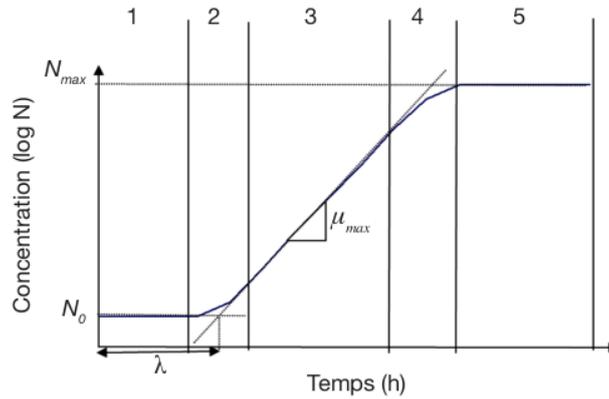


Figure 1. Courbe de croissance d'une culture bactérienne avec ses différentes phases — *Growth curve of bacterial culture with its different phases.*

La latence dépend des conditions avant et après le temps de latence. Le développement de modèles est complexe

- ◇ **Approche 1** temps de latence et vitesse de croissance modélisées séparément
- ◇ **Approche 2** : temps de latence proportionnel au temps de génération.

Conditions de pré-incubations identiques :

$\lambda * \mu_{max} = k$ où k est une constante pour des conditions de préincubations données.

Lorsque les conditions sont optimales alors de temps de latence est minimal :

$$\lambda_{min} * \mu_{opt} = k$$

donc $\lambda_{min} * \mu_{opt} = \lambda * \mu_{max}$

Le temps de latence est très variable tandis que la constante k est assez stable.

D. Les modèles tertiaires

Définition 3 : Les modèles utilisant des systèmes experts et des bases de données pour faire le lien entre les modèles primaires et secondaires sont appelés modèles tertiaires.

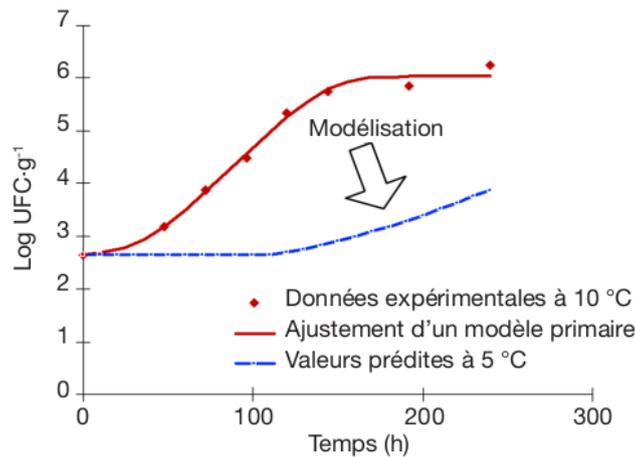


Figure 4. Évolution de la concentration en *Listeria monocytogenes* dans une viande hachée de porc conditionnée sous film étirable mesurée à 10 °C et prédite à 5 °C par un modèle tertiaire de croissance — Evolution of *Listeria monocytogenes* concentration in ground pork meat packaged in stretch wrap measured at 10°C and predicted at 5°C by a tertiary growth model.

Les logiciels :

- [ComBase](#) : Contient trois logiciels de prédiction : ComBase Predictor, Perfringens predictor et DMFit.
- [Foodrisk.org](#) : Analyse de risque
- [Pathogen Modeling Program](#)

Exercice 3 : Calcul de la DLC d'une compote de fruit Une compote de fruit est conta-

minée par *Bacillus cereus* à 1 spore/g. La Dose Minimale infectieuse (DMI) est de 10^5 spores par gramme. Le modèle primaire utilisé est : $X_t = X_0 \times \exp(\mu \times (t))$

et le modèle secondaire est :

$$\sqrt{\mu} = 0,03 \times T \text{ avec } T \text{ en degré celcius et } \mu \text{ en } h^{-1}$$

Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous. remplissez le tableau puis répondez à la question suivante : Si la Date Limite de Consommation du produit doit être 3 jours avant d'atteindre cette DMI, pendant combien de temps le consommateur peut consommer la compote ?

TABLE 1.2 – Tableau des valeurs

Étape	Température (°C)	μ	Durée (j)	X_0	X
Usine	3		2		
Détaillant	4		2		
Consommateur	7				DMI

Schéma bilan 2 : Modèles de croissance

Faites un schéma/organigramme bilan de façon à présenter l'ensemble des modèles de croissance ainsi que les liens entre eux, les hypothèses et les limites de chaque modèle. Vous ferez le détail du modèle de croissance de Buchanan avec les étapes de la croissance en Batch et les mathématiques associées.

III. Contrôle de la croissance des micro-organismes

A. Les techniques de contrôle de la croissance des micro-organismes

La croissance des micro-organismes doit être contrôlée, la stérilité est une condition synéquanonne pour pouvoir utiliser du matériel en microbiologie. L'ensemble des méthodes est résumée dans la figure ci-dessous. Cet aspect sera détaillée au second semestre en génie biochimique.

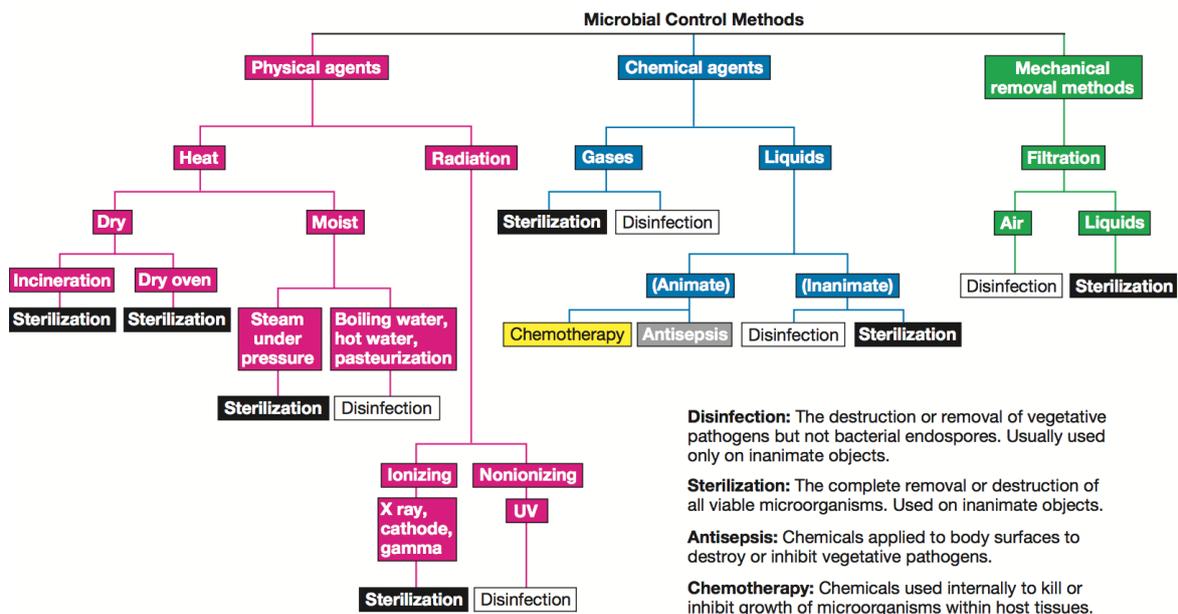


FIGURE 1.13 – Contrôle de la croissance [6]

B. Les modèles de contrôle de la croissance des micro-organismes

Nous ne ferons ici qu'une approche succincte de ces modèles car ils seront revus au second semestre.

1 Les modèles primaires

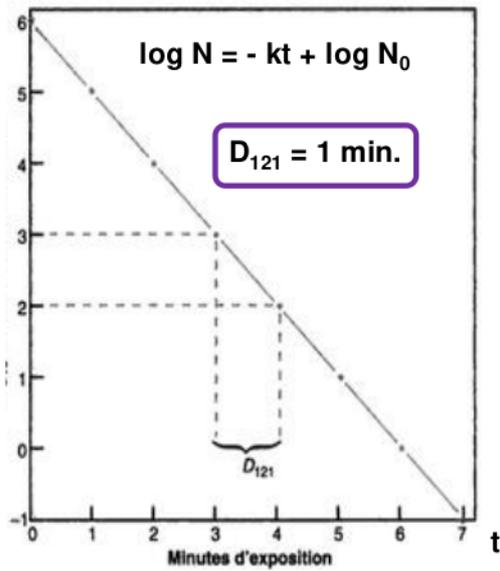
Tout comme la croissance, la décroissance de la quantité de micro-organismes sous l'effet d'un traitement est modélisable en fonction du temps de traitement. Le traitement peut être un traitement chimique ajouté à une culture de micro-organisme ou un traitement physique. La mesure des micro-organismes restant au bout de différents temps d'exposition permet de suivre la décroissance. La valeur caractéristique calculée est D, le temps de réduction décimal :

Définition 4 : Temps de Réduction Décimal, D : soit le temps d'exposition nécessaire pour réduire d'un facteur 10 la population de micro-organisme.

Le modèle est aussi un modèle exponentiel qui est souvent traité en logarithme décimal.

$$\log(N) = \log(N_0) - kt$$

Log₁₀ N (Nombre de survivants)



Si $(\log N_2 - \log N_1) = -1$
alors, $(t_2 - t_1) = D_T$

2 Les modèles secondaire

Les modèles secondaires consistent à exprimer la constante D en fonction de la température ou de la concentration en traitement chimique. Dans le cas d'un traitement thermique, il est possible de déterminer z.

Définition 5 : valeur d'inactivation thermique, z : soit l'augmentation de température à réaliser pour diminuer par 10 la valeur de D_T

Exercice 4 : Effet de la température sur une culture de levures

Une culture de levure en phase stationnaire est répartie dans 6 tubes à hémolyse (500 μ L par tube). Toutes les deux minutes un prélèvement des tube est transféré dans la glace. Après une dilution à demi dans le bleu de funk, les cellules vivantes sont comptées en cellule de Mallassez (4 rectangles à raison de 10 μ L de mélange par rectangle). Les résultats sont présentés dans le tableau situé sous l'encart. Calculer et présenter sous forme de tableau (tableur-grapheur) : (chaque calcul étant justifié par l'équation aux grandeurs et aux unités)

- la concentration en nombre CN(levures vivantes) en levures/mL-1
- le nombre total de levures vivantes dans les 4 rectangles de comptages
- la concentration en nombre CN(levures vivantes; suspension avant autoclavage) en levures/mL-1 en effectuant les calculs dans les cellules du tableur)
- le logarithme décimal de la concentration en nombre de levures (en effectuant les calculs dans les cellules du tableur)
- le facteur de réduction de la population (par rapport à la concentration initiale).

TABLE 1.3 – Résultat du comptage des levures en cellule de Mallasez

durée de chauffage (min)	2	4	6	8	10	12
Levures vivantes comptée	110	89	61	48	32	20

WHOLE BIBLIOGRAPHY

- [1] J. BARANYI et al. "Modeling bacterial growth responses". en. In : *Journal of Industrial Microbiology* 12.3-5 (sept. 1993), p. 190-194. ISSN : 0169-4146, 1476-5535. DOI : 10.1007/BF01584189. URL : <https://academic.oup.com/jimb/article/12/3-5/190/5987851> (visité le 23/07/2023).
- [2] Stanley BRUL, éd. *Modelling microorganisms in food*. eng. Woodhead publishing in food science, technology and nutrition. Abington Cambridge : Woodhead Publ. Limited, 2007. ISBN : 978-1-84569-006-9 978-0-8493-9149-1.
- [3] R. E. BUCHANAN. "Life Phases in a Bacterial Culture". en. In : *Journal of Infectious Diseases* 23.2 (août 1918), p. 109-125. ISSN : 0022-1899, 1537-6613. DOI : 10.1086/infdis/23.2.109. URL : <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/infdis/23.2.109> (visité le 23/07/2023).
- [4] R.L BUCHANAN, R.C WHITING et W.C DAMERT. "When is simple good enough : a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves". en. In : *Food Microbiology* 14.4 (août 1997), p. 313-326. ISSN : 07400020. DOI : 10.1006/fmic.1997.0125. URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002097901258> (visité le 23/07/2023).
- [5] LAURENT DELHALLE et al. "Les modèles de croissance en microbiologie prévisionnelle pour la maîtrise de la sécurité des aliments (synthèse bibliographique)". In : *Biotechnol. Agron. Soc. Environ. Modele-SV* 16.3 (2012), p. 369-381.
- [6] Joanne M. WILLEY et al. *Prescott, Harley, and Klein's microbiology*. 7th ed. OCLC : ocm71044581. New York : McGraw-Hill Higher Education, 2008. ISBN : 978-0-07-299291-5 978-0-07-330208-9.

Temporary page!

\LaTeX was unable to guess the total number of pages correctly. As there was some unprocessed data that should have been added to the final page this extra page has been added to receive it.

If you rerun the document (without altering it) this surplus page will go away, because \LaTeX now knows how many pages to expect for this document.