

Qualité des aliments et risques biologiques

1-Evolution des risques alimentaires:

Les maladies infectieuses transmises par l'alimentation sont consécutives à la consommation par l'homme de denrées contaminées par des agents biologiques auxquels il est sensible. Bien que progressivement, depuis l'époque pastorienne, leur incidence ait constamment diminué grâce à la progression des connaissances et à l'application des mesures sanitaires.

L'incidence de l'encéphalopathie spongiforme sub-aiguë transmissible et de la grippe aviaire au Virus H5N1, même dans les pays où elles ont touché de façon importante les espèces animales sensibles, a été très faible dans la population humaine quand on la compare, par exemple, aux milliers de morts induites par la consommation de lait de vaches tuberculeuses au cours des deux derniers siècles. Pourtant l'impression du public est qu'on assiste à une recrudescence des maladies humaines et animales, notamment des zoonoses et plus particulièrement celles transmises par l'alimentation.

Les modifications des techniques d'élevage

Il est connu que l'élevage intensif est favorable à l'émergence de maladies animales, qui le plus souvent, ne sont d'ailleurs pas transmissibles à l'homme et dont le caractère épidémique peut s'atténuer avec le temps.

Ces nouvelles techniques peuvent aussi conduire au développement épidémique d'une maladie autrefois sporadique dans une espèce : cela a été le cas par exemple des salmonelloses des volailles transmissibles à l'homme qui existaient à bas bruit depuis longtemps et qui ont progressé dans les élevages industriels en Grande Bretagne dans les années 90, jusqu'à provoquer une grave crise politique.

L'antibiothérapie peut aussi conduire à l'apparition de souches résistantes aux traitements et qui, au moins temporairement, ne pourront pas être aussi bien maîtrisées.

Les conditions de production des aliments

Alors que ce secteur était encore, à l'exception des domaines de la conserve et des boissons, plutôt le fait d'artisans et de très petites entreprises de proximité, on a vu apparaître, à partir des années 70, des entreprises agricoles et alimentaires de taille industrielle. Les conditions d'hygiène et les modes de fabrication ne se sont pas trouvés dégradés par cette évolution mais elle a eu pour conséquence d'augmenter la taille des lots de fabrication. De ce fait, en cas de d'accident de fabrication, un nombre plus important de consommateurs risque d'être touché sur un territoire plus étendu.

Les modes de consommation

De plus en plus de repas sont pris à l'extérieur, en restauration sociale du travail, de l'école, des hôpitaux et des maisons de retraite ou en restauration commerciale. En restauration sociale, ces repas sont préparés en volumes importants, souvent à l'avance, puis sont transportés dans des conditions de température qui doivent être très maîtrisées. En restauration privée,

le point le plus difficile est probablement la présence d'un personnel très temporaire dont la formation en hygiène est limitée et l'état de santé peu contrôlé. Ils peuvent donc être porteurs inapparents de maladies transmissibles par les aliments dont ils assurent la préparation.

On peut ainsi voir apparaître des toxi-infections collectives dues à la contamination des aliments par des microbes d'origine humaine ou bien, du fait d'erreurs dans la manipulation, dues à des contacts entre aliments sains et contaminés.

Les bouleversements environnementaux, politiques et sociaux

La ré-émergence d'une maladie est liée à tout ce qui favorise les déplacements de populations animales au statut sanitaire mal contrôlé. Ce peut être des conditions écologiques avec des mouvements d'animaux, notamment d'espèces sauvages, qui contamineront des espèces domestiques. Des maladies du passé peuvent également réapparaître dans un contexte politique et social troublé caractérisé par un arrêt total ou partiel des actions de police sanitaire et de prophylaxie. On constate par exemple la réémergence de deux zoonoses, la tuberculose et de la typhoïde humaine dans les pays de l'Est. Une situation politique et sociale difficile s'accompagne de plus parfois d'une immigration de population rurale accompagnée de son bétail qui disséminera des agents infectieux.

Le réchauffement climatique pourrait avoir une incidence. On peut donc penser que le réchauffement climatique entraînerait l'apparition en Europe de maladies jusqu'ici cantonnées aux régions chaudes.

1.1 Méthodes et limites

Les laboratoires disposent de méthodes de plus en plus précises de mise en évidence des agents infectieux. L'amplification génique (polymérase chaîne réaction ou PCR) notamment a considérablement fiabilisé leur identification.

On dénombre aujourd'hui plus de 200 maladies et toxi-infections d'origine alimentaire, certaines ont été découvertes récemment sans que l'on sache s'il s'agit d'une émergence ou de maladies préexistantes et méconnues. Ce fut par exemple le cas pour *Listeria monocytogenes*, longtemps considérée comme transmissible uniquement par la voie aérienne, à partir des fourrages et des ensilages, et provoquant des méningites et des avortements dont les victimes appartenaient surtout au milieu agricole. Sa transmission par les aliments a été mise en évidence grâce au perfectionnement des techniques d'analyses.

Les réseaux de surveillance et les centres de référence mis en place pour réaliser une veille analytique systématique, centraliser les données sur différents agents infectieux et lancer une alerte vers les services chargés de la gestion des risques, lorsqu'une situation qui le mérite est détectée, sont donc devenus très performants.

Ce dispositif qui est destiné à limiter les risques peut parfois donner l'impression que nous vivons de plus en plus dangereusement tant les informations apportées sont abondantes.

La lutte contre les agents infectieux n'aura probablement pas de fin : il en apparaîtra toujours de nouveaux. Au-delà de conditions de travail convenables dans les entreprises, la compétence scientifique et technique, l'amélioration des savoirs, leur incidence sera limitée par une stabilité politique et sociale, la continuité dans la décision, des relations transparentes et aisées entre les territoires et une autorité centralisée, une collaboration sans réticence des réseaux nationaux et internationaux.

2 Cytochromes P450

2.1 HISTORIQUE

Lors de l'apparition des premiers herbivores, les plantes produisirent des toxines pour survivre. Les animaux, pour éliminer ces substances chimiques élaborèrent un système de détoxification : ainsi le système P450 se développa. Le cytochrome est une protéine indispensable à la production d'énergie par les cellules. Il participe à la chaîne respiratoire des cellules fonctionnant comme transporteur d'électrons, permettant la synthèse d'ATP (Adénosine-tri-phosphate) qui est la source d'énergie pour les cellules. Certains cytochromes ont une activité enzymatique, il s'agit du groupe des cytochromes P450 (CYP P450) (8). Le CYP P450 a un premier rôle de métabolisation des composés endogènes tels que les stéroïdes, un second de détoxification des substances ingérées ou inhalées (=exogènes.) Ainsi le système P450 n'a pas été initialement développé pour aider l'homme à métaboliser les médicaments.

2.2 Présentation des cytochromes P450

2.2 .1 Définition,

Ces enzymes sont localisées au niveau du réticulum endoplasmique lisse des hépatocytes et de l'épithélium des cellules intestinales essentiellement. Plus de 200 enzymes CYP P450 existent dans la nature dont au moins 40 ont été répertoriées chez l'homme. « Le cytochrome P450 est constitué d'une chaîne polypeptidique simple et d'un groupement prosthétique, noyau tétrapyrrolique* (protoporphyrine* X) associé à un atome de fer, c'est à-dire un noyau héminique*.

Le Cytochrome P450 est donc une **hémoprotéine** contenant une molécule d'hème par molécule d'apoprotéine*. Ils doivent leur nom à leur découverte par deux japonais en 1963, SATO et OMURA, sous forme de pigments dans des fractions microsomales hépatiques et à leur spectre d'absorption à 450nm quand leur atome de fer est réduit à l'état ferreux en présence de monoxyde de carbone. D'où le terme « Cyto = Vésicule microsomiale, P = pigmented, 450 = longueur d'onde »

2.2.2. structure d'un cytochrome P450 (

La nomenclature actuelle des cytochromes P450 tient compte de leur appartenance à des familles et sous familles grâce au pourcentage d'analogie dans la séquence d'acides aminés : -S'il y a moins de 40% d'analogie dans la séquence d'acides aminés de deux cytochromes P450,

ils seront classés dans des familles différentes. -Si le pourcentage d'analogie dépasse 55% alors les deux cytochromes appartiendront à la même famille.

Chez l'homme il existe 17 familles de cytochromes et 42 sous familles.

2.2.3. Fonction des cytochromes P450

Le cytochrome P450 est un système multienzymatique qui est capable d'oxyder une substance en lui transférant directement un atome d'oxygène à partir de l'oxygène moléculaire. Il intervient dans de nombreuses réactions métaboliques. Le substrat entre dans le site actif du cytochrome où va se produire directement une interaction entre ce substrat et les acides aminés du site. Dans tous les cytochromes P450, le noyau tétrapyrrolique* est attaché au niveau de la 5ème coordinance* du fer par le soufre d'une chaîne latérale de cystéine. La 6ème coordinance est assurée par une molécule d'eau.

Les cytochromes P450 (CYP) ont pour fonction l'oxydation des molécules au moyen de réactions chimiques très diverses. Ces réactions donnent naissance à des métabolites inactifs, actifs ou toxiques. En résumé, la partie héminique du CYP (de structure tétrapyrrolique), avec un atome de fer à l'état ferreux (Fe^{2+}), est capable de fixer l'oxygène moléculaire et de l'activer. Cet oxygène activé est ensuite transféré sur le médicament fixé sur la partie protéique du CYP, qui forme une "poche", en regard de l'atome de fer alors à l'état ferrique (Fe^{3+}). Cette réaction nécessite du NADPH et des réductases, qui vont transformer l'atome de fer de l'état ferrique à l'état ferreux pour que le cycle d'oxydation puisse à nouveau fonctionner. La structure de la chaîne protéique est variable et permet de distinguer plusieurs isoenzymes du CYP, dont certaines sont caractérisées et clonées.

Les mono-oxygénases à cytochrome P450 sont également essentielles dans les phénomènes de biotransformation de substances physiologiques (stéroïdes, acides biliaires, vitamine D, acides gras, prostaglandines, leucotriènes, rétinoïdes, amines biogènes...)

Parmi les 57 CYP humains, 15 sont impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques appartenant essentiellement aux familles 1, 2 et 3. Bien que quelques substrats endogènes aient été identifiés, la grande majorité des molécules transformées sont des xénobiotiques. En effet, plus de 90 % du métabolisme des médicaments passe par l'activité des CYP et plus de 2 000 substrats ont été identifiés à ce jour.

Famille CYP1

Trois enzymes détoxifient ou activent de nombreux procarcinogènes environnementaux, des toxines et quelques médicaments. L'activité du CYP1A est induite par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), tels que ceux retrouvés dans les produits d'incinération de composés industriels, la fumée de cigarette, les viandes grillées, mais également certains végétaux crucifères (brocoli, choux de Bruxelles). Les CYP1A1, CYP1B1 et probablement CYP1A2 métabolisent des composés endogènes, tels que les prostaglandines, les œstrogènes et la mélatonine.

Famille CYP2

La famille CYP2 est la plus grande famille de CYP chez l'homme. À la différence de la famille CYP1, les membres de cette famille ne partagent pas le même système de régulation. Les spécificités de substrats et de tissus sont également très différentes.

L'isoenzyme CYP2C9 est la plus abondante, suivi par 2C8 et 2C19. En plus de transformer de nombreux composés endogènes comme l'acide arachidonique, ce système métabolise environ 25 % des médicaments utilisés en clinique. Les médicaments métabolisés par le CYP2C sont fréquemment prescrits tels que le losartan, la fluvastatine, certains anti-inflammatoires non stéroïdiens, des antidépresseurs ainsi que des produits à index thérapeutique étroit dont la warfarine et la phénytoïne. La rifampicine et les barbituriques sont des inducteurs du CYP2C.

Famille CYP2D À l'inverse, les formes avec plusieurs copies du gène, identifiées chez certains individus, aboutit à un métabolisme très rapide des médicaments [21]. En conséquence, le métabolisme de plusieurs médicaments fréquemment utilisés est affecté, dont celui des analgésiques, du dextrométorphane, des antiarythmiques, des antidépresseurs, des antihistaminiques, des inhibiteurs de l'acétylcholine estérase et des hallucinogènes comme la kétamine. Cette enzyme intervient également dans le métabolisme de composés endogènes, notamment certains neurotransmetteurs. L'expression de CYP2D pourrait également jouer un rôle dans la détoxification de polluants chimiques environnementaux tels que les pesticides.

Famille CYP3

CYP3A4 a un rôle fondamental puisqu'on estime que plus de 50 % des médicaments sont métabolisés par cette enzyme (antibiotiques, anesthésiques, antihistaminiques, corticostéroïdes, statines, inhibiteurs de la protéase du VIH, certaines benzodiazépines, immunosuppresseurs...) CYP3A4 peut ainsi être impliqué dans de nombreuses interactions médicamenteuses importantes en clinique. Des stéroïdes naturels tels que la testostérone et la progestérone sont également métabolisés par cette enzyme.

3 Glutathion transférases hépatiques

3.1 Définition :

Le **glutathion** est un pseudo-tripeptide formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine : γ -L-Glutamyl-L-cystéinyglycine. Le glutathion, qui existe sous forme oxydée et réduite, intervient dans le maintien du potentiel redox du cytoplasme de la cellule. Il intervient aussi dans un certain nombre de réactions de détoxification et d'élimination d'espèces réactives de l'oxygène. À noter que le groupement amine de la cystéine se condense avec la fonction acide carboxylique en γ de l'acide glutamique. Pratiquement toutes les cellules en contiennent une concentration élevée. On le représente de manière simplifiée par **GSH** (forme réduite) ou **GSSG** (forme oxydée), la fonction thiol lui conférant ses principales propriétés biochimiques.

3.2 .Rôle du glutathion :

Une importante documentation existe insistant sur le rôle des antioxydants dans le maintien d'une bonne santé et dans la prévention des maladies. Le glutathion sous forme réduite est l'antioxydant majeur des cellules, les protégeant notamment des radicaux libres (dérivés

actifs de l'oxygène)⁴. Sa réduction est rendue possible par la glucose-6-phosphate déshydrogénase, une enzyme de la voie des pentoses phosphates. De fait, une carence en cette enzyme peut avoir des effets similaires à une carence en glutathion au point de vue de la lutte contre les radicaux libres.

Le glutathion protège les cellules de plusieurs polluants et poisons, y compris de certains issus de la combustion de carburants et de la fumée de cigarette. Il retarde également les dommages dus aux radiations comme celles rencontrées à la suite de la diminution de la couche d'ozone⁵.

Vieillessement : Il est connu que le vieillissement est accompagné d'une chute précipitée dans nos niveaux de glutathion. De bas niveaux de glutathion sont souvent rencontrés dans plusieurs maladies associées au vieillissement telles les cataractes, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, l'artériosclérose et d'autres.

Problèmes Neurologiques : De bas niveaux de glutathion sont associés à certaines maladies neuro-dégénératives telles que la sclérose en plaques, la Sclérose latérale amyotrophique (maladie de Lou Gehrig), la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ainsi que d'autres.

Cancer : Le Glutathion joue un rôle dans la protection des cellules cancéreuses. En effet une forte concentration de glutathion offre une résistance aux molécules chimiothérapeutiques.

Maladies cardiaques et apoplexie, Cholestérol : L'élévation des niveaux de glutathion combat l'oxydation des acides gras présents dans la circulation sanguine, y compris le cholestérol, retardant ainsi le processus de formation de plaques dans les artères, ce qui est la cause sous-jacente de la plupart des problèmes cardiaques.

Diabète : Les diabétiques sont plus sujets aux infections et aux problèmes circulatoires pouvant induire des problèmes cardiaques, des lésions rénales et la cécité. Le glutathion protège des complications liées au diabète.

Maladies pulmonaires : Les médecins utilisent des médicaments précurseurs de glutathion dans plusieurs affections pulmonaires, y compris l'asthme, la bronchite chronique et l'emphysème. De nouvelles propriétés thérapeutiques ont été mises en évidence pour les dommages causés par la fumée de cigarette, la fibrose pulmonaire et d'autres maladies.

Problèmes digestifs : Le glutathion protège de l'inflammation rencontrée dans les cas de gastrite, d'ulcères stomacaux, de pancréatite et d'inflammation intestinale, y compris l'ulcère du colon et la maladie de Crohn.

Hépatite : Le foie est l'organe de stockage majeur du glutathion. Une carence en glutathion est présente dans l'hépatite alcoolique ainsi que dans les cas d'hépatite virale incluant les hépatites A, B et C. L'élévation des niveaux de glutathion restaure les fonctions du foie.

Problèmes Rénaux : Les personnes atteintes de lésions rénales nécessitant une dialyse présentent des hauts niveaux d'oxydation à la suite du stress et d'une diminution des niveaux de glutathion. L'élévation du glutathion aide à prévenir l'anémie.

Grossesse, Allaitement, Accouchement : Le rôle du glutathion dans le développement du fœtus et du placenta est crucial. Il agit dans le placenta afin de neutraliser les agents polluants avant qu'ils atteignent l'enfant en cours de développement. Plusieurs complications lors de la grossesse ont été liées à de faibles taux de glutathion.

Métabolisme N-acétylimidoquinone : Le glutathion est impliqué dans la métabolisation de N-acétylimidoquinone (métabolite toxique du paracétamol). Le glutathion est en concentration plus faible chez les personnes alcooliques (Yuan P et Paul T).

4. spores bactériennes :

Les spores de bactéries ont été étudiées pour la première fois par Cohn et Koch en 1876 (Gould, 2006). Elles font partie des formes les plus résistantes des organismes vivants. La formation des spores permet à la bactérie de survivre et résister à différents stress environnementaux tels que la chaleur, la dessiccation, les UV et les radiations, la digestion enzymatique ou encore les produits chimiques. De plus, les spores peuvent survivre pendant de très longues périodes dans des environnements pauvres en nutriments. En effet, plusieurs auteurs ont rapporté que les spores du groupe Bacillus pouvaient survivre plusieurs millions d'années dans des niches écologiques spécifiques. En raison de la persistance des spores et de l'ubiquité des microorganismes formant des spores, les spores sont des contaminants fréquents de denrées alimentaires. Les mécanismes de sporulation, germination et résistance sont beaucoup étudiés chez Bacillus avec comme modèle *B. subtilis*. En revanche, ces mécanismes le sont moins chez les bactéries anaérobies comme *Clostridium* et quasiment pas chez les thermophiles.

3.1 .Développement et risques biologiques dans les aliments

C. perfringens est un agent de toxi-infections alimentaires, principalement observées en restauration collective. La bactérie se présente sous forme de bacilles larges (1 à 1,5 µm de diamètre), immobiles, extrémités carrées, à coloration Gram positif, produit des spores et possède un métabolisme anaérobie strict, mais est aérotolérante. *C. perfringens* sporule rarement dans les milieux usuels de culture, uniquement dans des milieux spéciaux de sporulation, mais sporule assez facilement dans un milieu naturel (intestin, sol). Les cultures sont très gazogènes, et les sulfites sont réduits (colonies noires en présence de sulfite de sodium et d'alun de fer). *C. perfringens* est glucidolytique (acidification notamment du glucose, lactose, et maltose) et protéolytique.

Le plus souvent, il s'agit de préparations culinaires réalisées à l'avance et en grande quantité. L'aliment le plus typique consiste en de la viande en sauce. Les préparations à forte teneur en amidon, comme les haricots, notamment haricots en sauce, sont également à risque. *C. perfringens* est un contaminant fréquent des produits alimentaires, notamment ceux d'origine animale. Ces produits peuvent être contaminés lors d'accidents d'éviscération ou à partir de l'environnement souillé (plan de travail, contact avec aliments souillés, poussières, etc.). Les matières premières sont le plus souvent faiblement contaminées, largement en dessous de 10^5 /g. Les conditions de cuisson et de conservation ultérieures des préparations culinaires sont déterminantes sur l'évolution du niveau de contamination. La cuisson détruit la plupart des formes végétatives, mais pas ou peu les spores.

C. perfringens se multiplie rapidement dans un milieu à base de viande ou d'amidon dans un intervalle de température entre 30 et 50°C, un maintien des préparations culinaires pendant plusieurs heures dans cette gamme de température rend possible une prolifération de cette bactérie au-delà de 10^5 /g. Les principaux aliments incriminés dans les TIAC à *C. perfringens*

sont les plats cuisinés (35-36 % de l'ensemble des foyers dans lesquels *C. perfringens* a été incriminé en 2013 et 2014) et des plats à base de viande (28-29 % en 2013-2014).

4. Ecologie microbienne du tube digestif.

Le microbiote intestinal est principalement localisé dans l'intestin grêle et le côlon – l'acidité gastrique rendant la paroi de l'estomac quasi stérile. Il est réparti entre la lumière du tube digestif et le biofilm protecteur que forme le mucus intestinal sur sa paroi intérieure (l'épithélium intestinal).

La présence de micro-organismes dans l'intestin est connue depuis plus d'un siècle et on a vite présumé qu'il existait une véritable symbiose entre notre organisme et cette flore. Mais, jusque récemment, les moyens techniques permettant d'étudier les détails de cette interaction étaient limités : seule une minorité d'espèces bactériennes du microbiote pouvait être cultivée *in vitro*. La mise au point des techniques de séquençage haut débit du matériel génétique ont donné un nouvel élan à cette recherche et il existe aujourd'hui un réel engouement de la recherche pour décrire la nature des interactions hôte-microbiote, celles des micro-organismes entre eux, et leur incidence en matière de santé.

Ainsi, le rôle du microbiote intestinal est de mieux en mieux connu. On sait désormais qu'il joue un rôle dans les fonctions digestive, métabolique, immunitaire et neurologique. En conséquence, la dysbiose, c'est-à-dire l'altération qualitative et fonctionnelle de la flore intestinale, est une piste sérieuse pour comprendre l'origine de certaines maladies, notamment celles sous-tendues par des mécanismes auto-immuns ou inflammatoires. Cette thématique est devenue centrale pour la recherche biologique et médicale.

4.1. Les bienfaits du microbiote sur l'organisme :

Le microbiote intestinal assure son propre métabolisme en puisant dans nos aliments (notamment parmi les fibres alimentaires). Dans le même temps, ses micro-organismes jouent un rôle direct dans la digestion :

- ils assurent la fermentation des substrats et des résidus alimentaires non digestibles
- ils facilitent l'assimilation des nutriments grâce à un ensemble d'enzymes dont l'organisme n'est pas pourvu
- ils assurent l'hydrolyse de l'amidon, de la cellulose, des polysaccharides...
- ils participent à la synthèse de certaines vitamines (vitamine K, B12, B8)
- ils régulent plusieurs voies métaboliques : absorption des acides gras, du calcium, du magnésium...

Le microbiote intestinal participe en effet pleinement au **fonctionnement du système immunitaire intestinal** : ce dernier est indispensable au rôle barrière de la paroi intestinale, soumise dès la naissance à un flot d'antigènes d'origine alimentaire ou microbienne. Ainsi, des bactéries comme *Escherichia coli* luttent directement contre la colonisation du tube digestif par des espèces pathogènes, par phénomène de compétition et par production de substance bactéricides (bactériocines).

Parallèlement, dès les premières années de vie, le microbiote est nécessaire pour que l'immunité intestinale apprenne à distinguer espèces *amies* (commensales) et pathogènes.

Des études montrent que le système immunitaire de souris axéniques est immature et incomplet par rapport à celui de souris élevées normalement : dans l'épithélium intestinal de ces souris, les plaques de Peyer, inducteurs de l'immunité au niveau intestinal, sont immatures et les lymphocytes, effecteurs des réactions immunitaires, sont en nombre réduit. La rate et les ganglions lymphatiques, qui sont des organes immunitaires importants pour l'immunité générale de l'organisme, présentent aussi des anomalies structurelles et fonctionnelles.

Microbiote et inflammation

L'inflammation est un élément important, étroitement corrélé à l'immunité : il existe à la fois un niveau physiologique d'inflammation indispensable, contrôlant notamment le microbiote, et des réactions inflammatoires importantes déclenchées en présence d'espèces pathogènes

Les maladies intestinales chroniques inflammatoires (MICI), comme la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique, sont liées à une activation inappropriée du système immunitaire dans l'intestin. Derrière leur survenue se cachent des facteurs génétiques et environnementaux (alimentation, âge...). En parallèle, l'amélioration des symptômes de patients sous traitement antibiotique, ou encore la disparition de lésions inflammatoires intestinales chez des personnes dont la paroi intestinale n'est plus au contact des fécès (dérivation fécale), ont aussi permis de suspecter le rôle du microbiote.

Un déséquilibre du microbiote en espèces bactériennes pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, tout comme la prédominance de certaines familles de bactéries (*Entérobactéries*, *Fusobactéries*), ou la raréfaction d'autres espèces (*Clostridia*, *Faecalibacterium*) ont été décrits chez des personnes atteintes de MICI. Pour l'instant, il n'est pas possible de savoir s'il s'agit d'une cause ou d'une conséquence de ces maladies, ni de déterminer si la dysbiose à l'origine de la maladie est innée ou consécutive à un autre facteur environnemental (alimentation, médicament...). Une hypothèse séduisante est avancée : la dysbiose apparaîtrait sous l'influence de facteurs génétiques et environnementaux, mais jouerait elle-même un rôle dans l'initiation, le maintien ou la sévérité de l'inflammation, engendrant un cercle vicieux.

Le microbiote constitue une cible thérapeutique de choix dans ces maladies inflammatoires. Jusqu'à présent, les premiers essais cliniques conduits avec des probiotiques ou des prébiotiques n'ont pas été concluants.

Le diabète et l'obésité ont une origine multifactorielle, à la fois génétique, nutritionnelle et environnementale. La part respective de chacun de ces facteurs est variable d'un individu à l'autre et les mécanismes moléculaires incriminant chacun d'entre eux restent à décrire précisément.

Cependant, on sait que ces maladies métaboliques sont caractérisées par une inflammation chronique dans laquelle le microbiote est impliqué.

Ainsi, une augmentation des graisses dans l'alimentation habituelle augmente la proportion des bactéries à Gram négatif. Par conséquent, elle augmente la présence de LPS inflammatoires au niveau local puis, après passage des LPS dans la circulation sanguine, dans le foie, les tissus adipeux, musculaires... L'inflammation à bas bruit qui s'installe dans ces tissus

de façon chronique favorise l'insulinorésistance préalable au diabète et à l'obésité. Chez la souris axénique, l'implantation de microbiote provenant de souris obèses provoque d'ailleurs rapidement une prise de poids importante.

D'autres mécanismes impliquant le microbiote sont aussi probablement impliqués : outre le LPS, l'augmentation de la perméabilité épithéliale pourrait laisser passer des bactéries entières. Leur implantation durable au niveau des tissus adipeux, musculaires et hépatiques favoriserait le maintien *in situ* de l'inflammation. Parallèlement, certains métabolites bactériens circulants auraient un rôle déterminant dans le mécanisme de régulation de la pression artérielle par le rein, ou dans le développement de la plaque d'athérome.

5. Identification des microorganismes alimentaires :

5.1 Techniques moléculaires.

Les techniques de diagnostic moléculaire basées sur la détection des acides nucléiques bactériens sont de plus en plus utilisées dans le cadre de l'analyse microbiologique des aliments. L'attention est portée sur les étapes de préparation des échantillons avant l'analyse, sur les méthodes d'amplification de l'ADN par PCR (amplification en chaîne par polymérase) telles que la PCR quantitative

Cette technique fut imaginée par le scientifique américain **Karry Bank Mullis** et développée par le Dr **H.A. Herlich** avec la collaboration de la compagnie Cetus en 1985.

La PCR ou **Polymérase Chain Reaction** conduit à l'amplification in-vitro de plusieurs millions de fois une séquence spécifique d'acide nucléique qui peut être minoritaire voir très rare (10^{-2} pg). Elle exploite le processus de la réplication et fait appel, pour cela, sur la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser le brin complémentaire d'un ADN servant de matrice. Pour initier le processus, des amorces (ou *primer*) s'hybrident de part et d'autre de la séquence à amplifier. Cette configuration permet à l'ADN polymérase de répliquer les 2 monobrins dans le sens 5' vers 3' et ainsi aboutir à la synthèse de nouveaux ADN doubles brins.

La PCR s'effectue sur 3 étapes : Fig : 1

- **La dénaturation thermique de l'ADN** : à 95°C, les liaisons d'hydrogènes sont rompues et les 2 brins de l'ADN se séparent. L'ADN passe sous forme simple brin dans le milieu.
- **Hybridation des amorces** : le milieu réactionnel contient 2 amorces, chacune complémentaire d'un des 2 brins. La température permettant la fixation des amorces sur les monobrins d'ADN est comprise entre 50°C et 65°C. Les amorces en larges excès, s'hybrident dès lors qu'elles rencontrent les séquences complémentaires.
- **Extention des amorces** : intervention de la taq polymérase (ADN polymérase) qui allonge les amorces en y incorporant les désoxyribonucléiques complémentaires de la séquence de la matrice auquel elle est hybridée. Cette étape s'effectue à une température de 72°C.
- **Au deuxième cycle** : la quantité d'ADN continue de doubler et les premiers brins dont la taille est limitée par les 2 amorces font leur apparition.

- **Au troisième cycle** : Les premiers **amplicons** apparaissent (ADN double brins borné par les amorces correspondant au fragment d'ADN recherché).

En théorie, après n cycles, on augmente le nombre d'ADN intéressant de 2^n . En pratique, le nombre de brins est limité à cause de la baisse de certains réactifs, l'augmentation de la viscosité du milieu et la baisse de l'activité de l'ADN polymérase thermostable.

A l'issue de la PCR, on obtient des fragments de même taille correspondant à la distance en base qui sépare les amorces.

La technique PCR se réalise par le biais d'un appareil programmable appelé un **thermocycleur** dans lequel sont placés les microtubes contenant le mélange réactionnel. Cet appareil permet d'exposer les tubes à des températures choisies et pour des durées déterminées par l'expérimentateur. La réaction PCR est extrêmement rapide, elle ne dure que quelques heures (2 à 3 heures pour une PCR de 30 cycles).

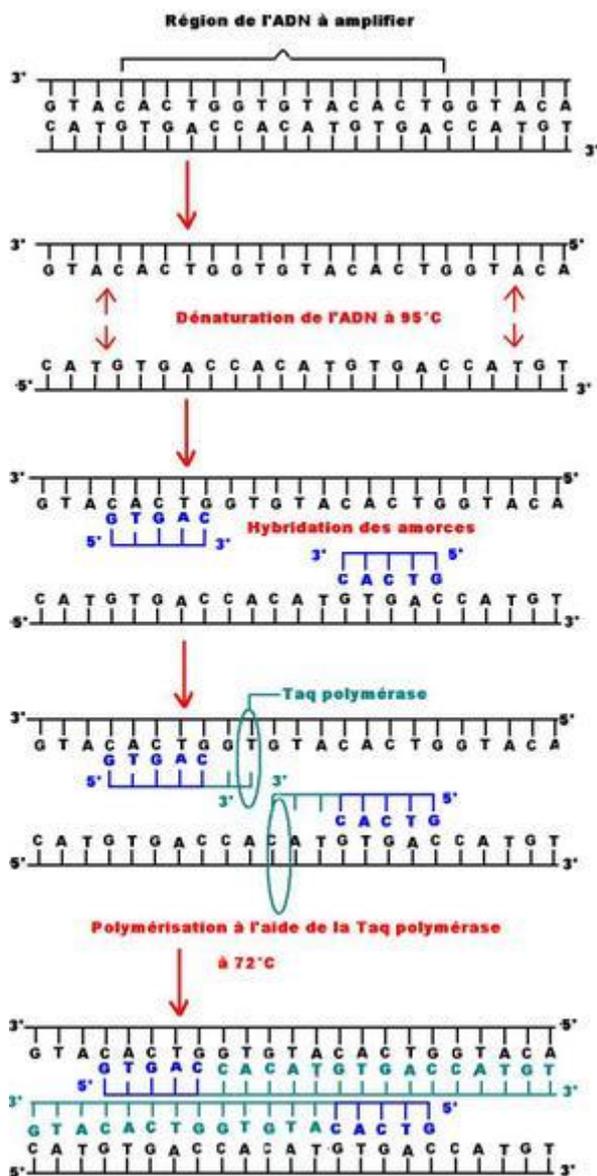


Fig 1 Schéma des différentes étapes de PCR .

La RT-PCR est une technique qui permet de faire une PCR (réaction en chaîne par polymérase) à partir d'un échantillon d'ARN. L'ARN est tout d'abord rétrotranscrit grâce à une enzyme appelée transcriptase inverse, qui permet la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc). Ce dernier est ensuite utilisé pour réaliser une PCR.

Dans la recherche scientifique, la technique de qRT-PCR, pour RT-PCR quantitative, est fréquemment utilisée. Celle-ci permet de quantifier un type d'ARN initialement présent dans un échantillon. Elle est par exemple utilisée pour connaître le niveau d'expression d'un gène dans une condition donnée. Plus un gène est exprimé, plus le nombre de molécules d'ARN synthétisées sera grand. Grâce à la qRT-PCR, les chercheurs peuvent donc comparer le niveau d'expression d'un gène donné dans deux conditions différentes.

La RT-PCR peut se faire dans un appareil particulier qui permet de visionner en temps réel la synthèse des fragments d'ADN. Pour cela, des molécules fluorescentes qui se fixent sur l'ADN sont utilisées. La fluorescence de l'échantillon augmente proportionnellement au nombre de molécules d'ADN.

6.- Mécanismes de transmission des pathogènes par les fruits et légumes.

Les fruits et légumes frais constituent un milieu favorable à la croissance des microorganismes. Ils sont à l'origine d'intoxications alimentaires suite à la consommation de produits contaminés par des germes pathogènes. Ils sont également sensibles à de nombreux microorganismes d'altération tels que les bactéries pectinolytiques, les bactéries Gram négatif saprophytes, les bactéries lactiques et les levures.

Compte-tenu de la grande diversité des conditions accompagnant la culture et la durée de vie des légumes après la récolte, le nombre de germes aérobies mésophiles* varie fortement en fonction des échantillons de produits. Les plus fortes concentrations ont été trouvées sur des pousses de salades et les plus faibles sur les feuilles intérieures des choux. Les variations sont fortes entre les échantillons d'un même légume. Il est par conséquent difficile d'en déduire des caractéristiques générales. En ce qui concerne le type de microorganismes, la majorité des bactéries Gram négatif* identifiées sont des genres : *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter spp.**, *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*, *Flavobacterium spp.*, *Xanthomonas spp.*, *Chromobacterium spp.* et *Alcaligenes spp.* Les microorganismes pectinolytiques* sont souvent cités pour estimer le nombre de microorganismes d'altération dans la mesure où la dégradation enzymatique des polymères pectiques des cellules végétales est la principale cause du pourrissement. Les bactéries pectinolytiques identifiées sont : *Pseudomonas fluorescens*, *Cytophaga spp.* et *Erwinia spp.* Parmi les bactéries lactiques les plus fréquemment trouvées sur les légumes se trouve le genre *Leuconostoc mesenteroides*. Les levures identifiées appartiennent aux genres *Cryptococcus*, *Candida*, *Rhodotorula* et *Sporobolomyces*. Les genres identifiés pour les moisissures sont : *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Phoma*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Epicoccum* et *Geotrichum*. [148]. Les microorganismes dangereux pour la santé publique : l'un des principaux indicateurs de contamination fécale est la présence d'*E. coli** mais dans la plupart des études réalisées, sa concentration est faible. Alors que certaines études associent la présence d'*E. coli*, sur les légumes crus, à une fréquence plus élevée de *Salmonella**, d'autres recherches n'ont réussi à prouver aucune relation entre ces

deux germes. Même s'ils restent moins contaminés par des organismes pathogènes que la viande, les produits laitiers et les produits de la mer, les principaux agents à l'origine d'intoxications alimentaires ont été détectés sur des légumes

Effet des microorganismes sur la qualité et la sécurité des légumes De nombreuses espèces microbiennes sont à l'origine d'altérations de légumes crus récoltés et donc de pertes de récoltes. Il existe une grande variété d'agents d'altération capables ou non de se développer au cours du stockage. Certains microorganismes d'altération s'avèrent spécifiques à quelques espèces végétales alors que d'autres, tels que *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizopus stolonifer*...peuvent s'attaquer à une large gamme de produits. L'importance relative des microorganismes d'altération varie selon les pays et les climats. La présence de microorganismes pathogènes sur les légumes peut être à l'origine d'intoxications alimentaires. Les légumes présentent en effet des conditions idéales à la survie et à la croissance de ces germes. Cela illustre bien la nécessité de pratiques hygiéniques pendant la culture et la préparation des produits. Les cas de Salmonella, E. coli O157 :H7, et de virus transmis par des fruits frais ou peu transformés viennent renforcer ce constat.

7-Contaminants environnementaux (Nitrates, pesticides, Métaux lourds, dioxines...)

- La principale voie d'exposition : l'alimentation Malgré l'ensemble des mesures réglementaires prises, certaines sources d'exposition non alimentaires subsistent, comme par exemple le plomb dans les vieilles peintures ou le mercure dans les piles électriques, mais tendent régulièrement à diminuer. Aujourd'hui, la principale voie d'exposition humaine reste l'alimentation, y compris les boissons, avec, par exemple, plus de 90 % de l'exposition pour le cadmium et 100 % pour le mercure. L'eau potable représente aussi la source d'exposition la plus forte en plomb, en dehors quelquefois de l'ingestion d'écaillés de vieilles peintures au plomb par les enfants. Les apports journaliers en métaux lourds via l'alimentation et les boissons correspondent sur le long terme pour un consommateur moyen à seulement entre un tiers et la moitié des DJA en cadmium, plomb et mercure. Les sources alimentaires en métaux lourds pouvant être les plus importantes sont : - les rognons et les moules pour le plomb, - les moules et les huîtres pour le cadmium.

- les poissons (carnivores) pour le mercure. Ce sont les denrées qui présentent, pour chacun des métaux lourds, les capacités de bioaccumulation les plus importantes. Un consommateur exclusif de thon ou d'huîtres provenant de régions contaminées pourrait alors ingérer des quantités de métaux lourds proches des DJA, respectivement en mercure ou en cadmium.

-Viandes et exposition alimentaire Parmi l'ensemble des denrées alimentaires, les fruits et légumes, les boissons, les poissons carnivores surtout, et les crustacés sont les vecteurs contribuant le plus à l'exposition des populations en métaux lourds. Les viandes ne contribuent que très peu à l'exposition alimentaire en plomb, cadmium et mercure. D'après l'étude de l'alimentation totale française réalisée par l'INRA parue en 2004, les viandes de boucherie (bovins, porcs, ovins et caprins) ne participent que pour 1,63 % à l'apport journalier total en cadmium, 0,97 % à l'apport journalier total en plomb, et 1,56 % à celui en mercure. Les abats, reins et foie de ces animaux, sont toutefois une source d'exposition plus importante en métaux lourds que les viandes. Ceci vaut spécialement pour le cadmium, qui s'accumule

dans le foie et les reins compte tenu d'une quasi-absence d'excrétion de l'organisme quand il a été absorbé par le tractus digestif. Les spécificités métaboliques du cadmium expliquent le possible dépassement des seuils maximaux tolérés dans les foies et les reins des animaux âgés pâturant dans des zones de pollution des sols. C'est en particulier le cas pour les chevaux élevés dans certaines régions géographiques de l'est de l'Europe. En conséquence, en France, les foies et les reins de tous les chevaux âgés de plus de deux ans sont systématiquement retirés de la consommation.

- les dioxines : plusieurs centaines de molécules différentes sont rassemblées. Trois familles chimiques doivent être distinguées : 1) les PCDD (polychlorodibenzo-paradioxines) ou « dioxines » au sens strict, 2) les PCDF (polychlorodibenzofuranes) ou « furanes », souvent également appelés dioxines, 3) et les PCB (polychlorobiphényles), moins toxiques que les deux premiers groupes, mais dont font partie les PCB de type dioxine ou PCB-DL (pour PCB « dioxin-like »).

Le composé le plus toxique est le composé tétrachloré : le 2,3,7,8- TCDD (2,3,7,8, tétrachlorodibenzo-paradioxine). Cette dioxine de référence est aussi appelée dioxine de Seveso (molécule responsable des problèmes de santé publique consécutifs à l'explosion de l'usine chimique de Seveso le 10 juillet 1976 en Italie. afin de tenir compte du potentiel toxicologique très différent d'un composé à l'autre, dans les différentes normes réglementaires, il leur est affecté un coefficient lié à leur toxicité appelé TEF ou i-TEF (pour international toxic equivalent factor). Par référence, la dioxine de Seveso est affectée du facteur 1, les autres dioxines et furanes sont affectés d'un facteur compris entre 0,0001 (comme par exemple l'OCDD avec huit atomes de chlore qui est dix mille fois moins toxique) et 1 pour un composé presque aussi toxique (la 1,2,3,7,8-PeCDD avec cinq atomes de chlore).

- • cancérogénicité (la 2,3,7,8 TCDD est classée comme « cancérogène complet » ou « certain » par les agences internationales) ;
- toxicité pour la fonction de reproduction, puis sur le développement neurocomportemental en y associant une neurotoxicité ;
- immunodépression favorisant les infections bactériennes, virales ou parasitaires, et indirectement certains cancers ;
- perturbations endocriniennes, en particulier sur les hormones sexuelles (notamment comme anti-œstrogène et anti-progestagène) et thyroïdiennes ;
- toxicité cutanée (chloracnée) ;
- toxicité hépatique et induction précoce d'enzymes hépatiques.

- Origine des contaminations

Contrairement aux métaux lourds, qui ont fait l'objet d'une exploitation industrielle, les dioxines et les furanes n'ont aucune utilité dans l'industrie. Il s'agit d'impuretés produites dans les réactions chimiques impliquant le chlore (les organochlorés), l'oxygène et la chaleur (combustion). Toute combustion peut ainsi produire des dioxines. Aujourd'hui, la source anthropique de contamination liée aux incinérateurs, en particulier aux usines d'incinération

des ordures ménagères ou UIOM, a considérablement diminué avec l'obligation de traitement des rejets des usines autorisées, mais il y a d'autres sources. Le chauffage au fioul ou au bois des habitations, les feux de forêts, les éruptions volcaniques, la circulation routière ou le trafic aérien produisent des dioxines. Les dioxines découlent aussi de la combustion des PCB moins toxiques.

Les PCB ont été autrefois utilisés comme diélectriques dans les appareils électriques notamment les transformateurs, les liquides hydrauliques et caloporteurs, les encres ou les peintures. Leur usage a toutefois été progressivement interdit depuis 1975. Néanmoins, des milliers de transformateurs contenant des PCB restent en service, même s'ils doivent avoir été remis aux normes européennes. Depuis 1996, une Directive européenne a prévu le retrait des équipements contenant des PCB au plus tard pour la fin de l'année 2010.

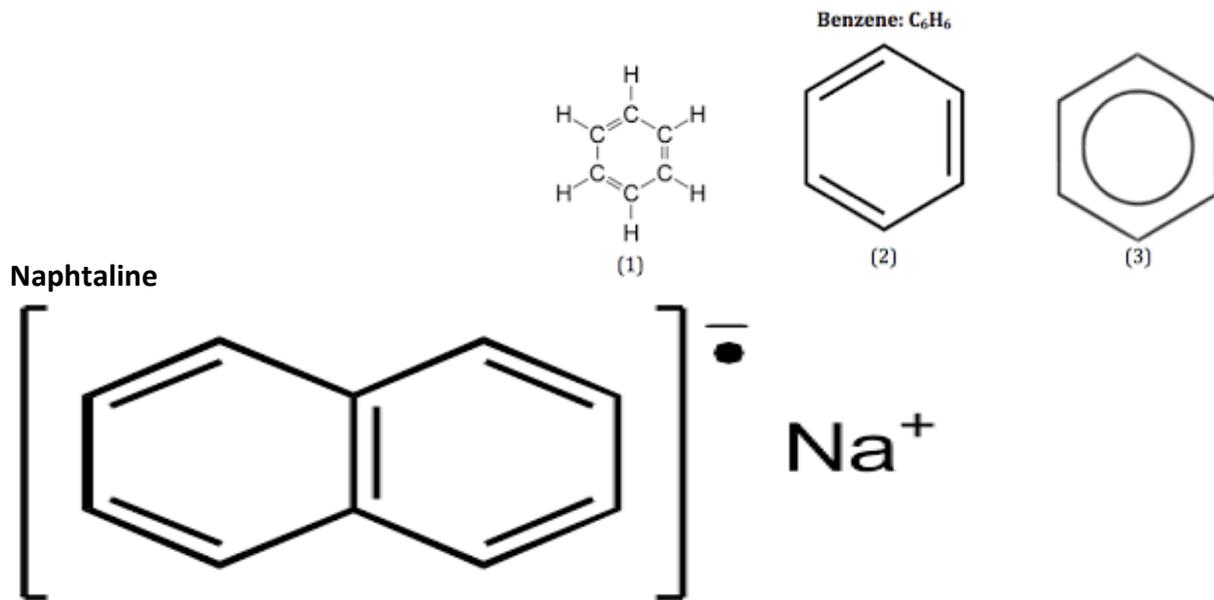
8–Hydrocarbures aromatiques polycycliques

Les produits néoformés sont des molécules qui ne sont initialement présentes ni dans les aliments, ni dans l'emballage, et qui sont générées : - soit par leur mise en contact ; - soit suite aux procédés de fabrication.

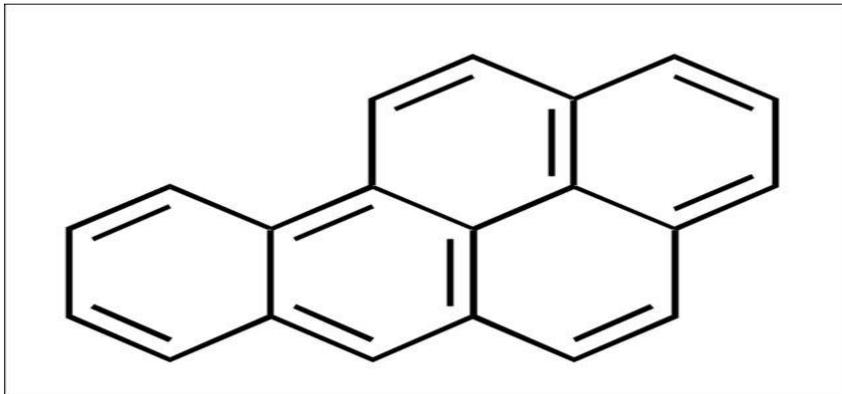
8.1. Exemple de produits néoformés au cours de traitement technologiques.

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) constituent un groupe de plus de 100 substances chimiques différentes qui se forment au cours de la combustion incomplète du charbon, de l'huile et du gaz, des ordures, ou d'autres substances organiques, comme le tabac ou la viande et le poisson grillés. Les aliments peuvent se retrouver contaminés par l'environnement (les HAP sont présents dans l'air, le sol ou l'eau) ; - pendant leur transformation et leur cuisson.

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont composés d'au moins deux cycles de benzène accolés. Le benzène est lui-même constitué de 6 atomes de carbone formant un cycle.



Benzo(a) pyrène un HAP cancérigène



Bien que les voies de formation des HAP ne soient pas exactement connues, il existe probablement différents mécanismes de formation liés aux radicaux libres générés au cours des réactions de pyrolyse et de pyrosynthèse :

- la pyrolyse (décomposition par la chaleur) de graisse fondue qui ruisselle sur une source de chaleur ou la pyrolyse d'aliments au-delà de 200° C ;
- les procédés de fumaison et les fortes combustions (< 400° C) lors desquels les gaz de combustion des bois et hydrocarbures fossiles sont susceptibles d'entrer en contact avec les produits ;
- les cuissons au contact direct de la flamme (viande et poissons grillés).

La concentration de HAP dans les aliments peut se voir réduite en évitant le contact des aliments avec les flammes pendant le barbecue et en cuisant les aliments à une température moins élevée mais pendant plus longtemps.

La cuisson au four (source de chaleur au-dessus) entraîne des concentrations plus faibles que le barbecue.

La graisse ne doit pas ruisseler sur un feu ouvert, car dans ce cas, la colonne de fumée contamine la nourriture par des HAP.

L'utilisation d'un feu moyen ou faible et le fait de placer le poisson à une plus grande distance de la source de chaleur peut permettre de limiter fortement la contamination aux HAP.

La contamination aux HAP de denrées alimentaires fumées peut être considérablement réduite en remplaçant le fumage direct (avec de la fumée qui se dégage dans la chambre de fumage) par du fumage indirect.

8.2. Toxicité des HAP La structure moléculaire de certains types de HAP les amène à être transformés dans l'organisme en composés extrêmement toxiques, appelés « époxydes ». Les époxydes réagissent très facilement avec l'ADN, ce qui peut entraîner des mutations génétiques menant parfois au cancer. Certains HAP peuvent également affecter la reproduction ou le développement foetal. Ces effets des HAP ont été démontrés en expérimentation animale, mais le risque existe également pour l'homme. Le benzo (a)pyrène est particulièrement toxique sur ce plan, puisque ses effets cancérigènes sont prouvés pour l'homme et qu'on le considère aussi comme mutagène, tératogène et toxique pour le développement.