

**THESE  
POUR LE DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenue publiquement le 11 juillet 2018**

**Par Mme Eva CARRARA**

---

**TOXICITÉ DE L'ACRYLAMIDE :  
LES LACTOBACILLES, POSSIBLE RÔLE PROTECTEUR ?**

---

**Membres du jury :**

**Président :**

Monsieur le Professeur Benoît FOLIGNÉ, professeur en bactériologie  
Faculté de Pharmacie, Université de Lille

**Directeur, conseiller de thèse :**

Madame Anne PLATEL, maître de conférences en toxicologie  
Faculté de Pharmacie, Université de Lille

**Assesseur(s) :**

Docteur Michel LAURENTIE, directeur de recherches d'unité Expérimentation, modélisation  
et analyse de données (EMAD)

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, Laboratoire de Fougères

Docteur Éric FOULON, Pharmacien titulaire d'officine  
Pharmacie Carnot, Faches-Thumesnil

Docteur Christelle ELIAS, experte de la surveillance de la consommation des antibiotiques  
European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm

## Faculté de Pharmacie de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

### Université de Lille

Président :	Jean-Christophe CAMART
Premier Vice-président :	Damien CUNY
Vice-présidente Formation :	Lynne FRANJIE
Vice-président Recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président Relations Internationales :	François-Olivier SEYS
Directeur Général des Services :	Pierre-Marie ROBERT
Directrice Générale des Services Adjointe :	Marie-Dominique SAVINA

### Faculté de Pharmacie

Doyen :	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-Doyen et Assesseur à la Recherche :	Patricia MELNYK
Assesseur aux Relations Internationales :	Philippe CHAVATTE
Assesseur à la Vie de la Faculté et aux Relations avec le Monde Professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la Pédagogie :	Benjamin BERTIN
Assesseur à la Scolarité :	Christophe BOCHU
Responsable des Services :	Cyrille PORTA

### Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	ICPAL
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire

### Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Onco et Neurochimie
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	ICPAL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Lab. de Médicaments et Molécules
Mme	DEPREZ	Rebecca	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNE	Benoît	Bactériologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Onco et Neurochimie
M.	MILLET	Régis	ICPAL
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY	Anne Catherine	Législation
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHÉRAERT	Eric	Législation
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Lab. de Médicaments et Molécules

### Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

## Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie
Mme	CHARTON	Julie	Lab. de Médicaments et Molécules
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
Mme	DUTOUT-AGOURIDAS	Laurence	Onco et Neurochimie
M.	EL BAKALI	Jamal	Onco et Neurochimie
M.	FARCE	Amaury	ICPAL
Mme	FLIPO	Marion	Lab. de Médicaments et Molécules
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	FURMAN	Christophe	ICPAL
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacie Galénique
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	ICPAL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Onco et Neurochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation
Mme	LELEU-CHAVAIN	Natascha	ICPAL

Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RAVEZ	Séverine	Onco et Neurochimie
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	YOUS	Saïd	Onco et Neurochimie
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

### Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

### Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DAO PHAN	Hai Pascal	Lab. Médicaments et Molécules
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie Pharmaceutique

### Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques

## AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie

***Faculté de Pharmacie de Lille***

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

**L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.**

## REMERCIEMENTS

À Monsieur le Professeur Foligné,

Vous me faites l'honneur de présider mon jury de thèse. Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté à mon sujet, pour vos bons conseils et vos encouragements. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

À Madame Platel,

Anne, tu as accepté dès le début de me suivre dans cette dernière aventure qu'est la thèse d'exercice. Merci pour ton regard critique sur le choix du sujet ainsi que de m'avoir accordé de ton temps précieux pour superviser mon travail.

À Monsieur Laurentie,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Soyez assuré de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

À Monsieur Foulon,

Vous m'avez accueilli les bras ouverts dans votre officine dès mon stage de deuxième année pour me former au métier de pharmacien. J'ai beaucoup appris grâce à vous (et grâce à Juliette), vous m'avez permis d'évoluer lors de ces années passées à la Pharmacie Carnot. Je vous suis particulièrement reconnaissante de tout ce que vous avez fait pour moi.

À Christelle,

J'ai eu la chance de te rencontrer lors du stage à la pharmacie hospitalière de Lariboisière, et j'ai été impressionnée par la qualité de ton travail et par ton immense gentillesse. Depuis, notre amitié perdure : elle est précieuse à mes yeux. Merci de faire partie de mon jury de thèse.

À ma famille,

Merci à mes parents d'avoir cru en moi malgré les épreuves qui ont jalonné ces longues études de pharmacie, et de m'avoir permis de réaliser un de mes rêves, qui m'a tant apporté sur le plan personnel : celui de partir en Erasmus. Mes sœurs, j'espère qu'aujourd'hui vous êtes aussi fières de votre « druide » que je suis fière de vous. Mes grands-parents, mamie et nonno, merci de m'avoir soutenue tout au long de mes études, dont voici le point final. *Avis de Barcelona: avi i avia, esteu lluny però sempre penso en vosaltres.*

À mon Ju,

Tu m'as encouragée, épaulée, redonné confiance, pour la pharmacie et pour les autres projets fous. Merci pour ta patience, ton soutien, ton amour. À tes côtés, la vie est si douce. J'espère te rendre fier par ce dernier travail.

À mes amis,

Et en particulier à ceux qui seront présents lors de la soutenance, cela me tient beaucoup à cœur de vous avoir auprès de moi pour cette dernière épreuve. Merci d'être là.

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

**AA** : acrylamide

**AAMA** : N-acétyl-S-(2-carbamoyléthyl)cystéine

**ADN** : acide désoxyribo-nucléique

**ANIA** : Association nationale des industries alimentaires

**ANSES** : agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

**AT** : acides teichoïques

**BMD** : *benchmark dose*

**BMDL** : *benchmark dose lower confidence limit*

**CIRC** : Centre international de recherche sur le cancer

**CL** : chromatographie en phase liquide

**CLHP** : chromatographie liquide haute performance

**CLUP** : chromatographie liquide ultra-performance

**CONTAM** : groupe scientifique de l'ANSES sur les contaminants de la chaîne alimentaire

**CPG** : chromatographie en phase gazeuse

**DGCCRF** : direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes

**DJA** : dose journalière acceptable (autre appellation : DJT)

**DJE** : dose journalière d'exposition

**DJT** : dose journalière tolérable (autre appellation : DJA)

**EAT** : étude de l'alimentation totale

**EFSA** : *European food safety administration*, Autorité européenne de sécurité des aliments

**ELISA** : *enzyme linked immunosorbent assay*, technique immuno-enzymatique de détection

**ERI** : estimation du risque individuel

**FAO** : *food and agriculture organisation*, Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

**GAMA** : N-acétyl-S-(2-carbamoyl-2-hydroxyéthyl)cystéine

**HAP** : hydrocarbures aromatiques polycycliques

**HMF** : hydroxyméthyl-furfural

**INERIS** : Institut national de l'environnement industriel et des risques

**INRA** : Institut national de la recherche agronomique

**INRS** : Institut national de recherche et de sécurité

**JECFA** : comité d'experts FAO/OMS sur les additifs alimentaires

**LMR** : limite maximale de résidus

**LOD** : *limit of detection*, limite de détection

**LOQ** : *limit of quantification*, limite de quantification

**ME** : marge d'exposition

**MetaHIT** : *metagenomics of the human intestine tract*

**NOD** : *nucleotid-binding oligomerization domain proteins*

**NRC** : *National research council*, conseil national de recherche aux États-Unis

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**PCB** : polychlorobiphényles

**PRM** : produits de la réaction de Maillard

**QD** : quotient de danger

**SM** : spectrométrie de masse

**SNFA** : *Swedish national food administration*, Agence suédoise de l'alimentation

**TLR** : toll-like receptor

**UE** : Union Européenne

**VTR** : valeur toxicologique de référence

**WHO** : *World Health Organization*, Organisation mondiale de la santé

## TABLES DES MATIÈRES

INTRODUCTION.....	14
<b>PARTIE 1</b>	
I. Contaminants alimentaires.....	15
1. Sources de contamination chimiques des denrées alimentaires.....	15
2. Composés néoformés.....	17
A) Définition.....	17
B) Processus d'évaluation des risques sanitaires.....	18
C) Contexte réglementaire.....	22
II. Acrylamide.....	23
1. Propriétés physico-chimiques.....	23
2. Production et utilisations industrielles.....	24
3. Formation dans les aliments.....	25
4. Dosage dans les aliments.....	27
A) Méthodes standard pour la détection d'acrylamide dans les aliments.....	28
B) Méthodes de détection rapide.....	30
5. Toxicocinétique.....	32
A) Absorption.....	32
B) Distribution.....	32
C) Métabolisme.....	32
D) Élimination.....	35
6. Contexte réglementaire.....	35
A) Évaluation du risque lié à la présence d'acrylamide dans les aliments.....	36
B) Gestion du risque et réglementation en vigueur.....	41
<b>PARTIE 2</b>	
I. Définition et présentation.....	49
1. Composition du microbiote intestinal.....	49
2. Entérotypes.....	52
3. Méthodes d'analyse.....	52
II. Mise en place et développement.....	54
1. Naissance, allaitement et enfance.....	54
2. Adulte.....	55
3. Adulte âgé (>65 ans).....	55
III. Facteurs influençant la colonisation bactérienne.....	57
1. Terrain génétique.....	57
2. Terme de naissance et mode d'accouchement.....	57
3. Alimentation.....	59
4. Traitements médicamenteux.....	60
IV. Fonctions.....	62
1. Fonctions métaboliques et nutritionnelles.....	62
2. Rôle protecteur.....	62
3. Fonction immunitaire.....	63
4. Fonctions émergentes.....	63
5. Fonction détoxifiante/détoxifiante.....	64
VI. Les lactobacilles : un rôle dans la prise en charge de l'acrylamide alimentaire ?.....	65
1. Les lactobacilles, des acteurs particuliers.....	65
2. Des résultats expérimentaux encourageants.....	67

Article 1 .....	67
Article 2 .....	69
Article 3 .....	72
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX .....	81
BIBLIOGRAPHIE .....	83

## INTRODUCTION

Dès les années 1950, l'acrylamide est une substance chimique amplement utilisée dans l'industrie sous forme de polymère, le polyacrylamide, en particulier comme flocculant dans le traitement des eaux.

Cependant, l'acrylamide a été désigné comme « cancérogène probable » chez l'Homme (groupe 2A) par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) en 1994. En effet, ce composé également retrouvé dans la fumée de cigarette s'est avéré toxique chez l'Homme lors d'une exposition prolongée. Le Comité d'experts FAO/WHO sur les additifs alimentaires (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture / *World Health Organization*, Organisation Mondiale de la Santé ; ce Comité est également appelé JECFA, *Expert Committee on Food Additives*) a estimé qu'il existait un risque préoccupant pour la santé humaine lié à la toxicité de l'acrylamide.

Par ailleurs, en 2002, des chercheurs de l'agence suédoise de l'alimentation (*Swedish National Food Administration*, SNFA) ont décelé la présence d'acrylamide dans l'alimentation, en particulier dans des denrées consommées quotidiennement, telles que le pain de mie, les biscuits, les pommes de terre cuites, les frites.

Au niveau national, l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation (ANSES) a mis en place successivement deux études de l'alimentation totale (EAT) française, entre 2000 et 2004 puis entre 2006 et 2010 afin de rechercher plus de 400 substances susceptibles de présenter un risque pour la santé humaine, dont l'acrylamide.

Depuis, plusieurs règlements ont été instaurés pour inciter à la réduction d'acrylamide dans les denrées alimentaires.

Parmi les méthodes mises en place pour diminuer l'ingestion d'acrylamide, et avec l'intérêt croissant porté au microbiote intestinal depuis quelques années, la piste du rôle des lactobacilles est de plus en plus explorée.

Nous étudierons dans une première partie la toxicité de l'acrylamide alimentaire chez l'Homme, et dans une deuxième partie nous dresserons l'état des lieux des travaux sur le rôle des lactobacilles dans la régulation de l'absorption d'acrylamide d'origine alimentaire.

# **I. Contaminants alimentaires**

## **1. Sources de contamination chimiques des denrées alimentaires**

Selon l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), les **contaminants chimiques** alimentaires sont des **substances naturelles ou synthétiques** qui se retrouvent dans les aliments. Il peut s'agir de substances utilisées lors de la production et de la transformation des denrées mais également de substances présentes dans l'environnement de façon naturelle ou résultant d'une pollution des milieux.

Depuis la production végétale ou animale jusqu'à l'assiette du consommateur, les denrées alimentaires subissent plusieurs processus lors des procédés de transformation et de conservation, ainsi qu'au cours de la distribution (1).

Tout au long de ces processus, de nombreux contaminants peuvent se retrouver dans les aliments :

- Production végétale ou animale
  - les **toxines naturelles** : elles sont produites par des champignons, des algues, certaines mauvaises herbes et le plancton marin. Les mycotoxines et les alcaloïdes pyrrolizidiniques sont des exemples de toxines naturelles.

Les **mycotoxines** sont des métabolites produits par certaines moisissures (ou champignons) sur les cultures ou pendant leur stockage. Elles peuvent contaminer de nombreuses denrées d'origine végétale, telles que les céréales, les noix, les amandes, les pommes et les produits manufacturés (2).

Les **alcaloïdes pyrrolizidiniques** représentent un groupe important de toxines produites par plusieurs espèces végétales contenues dans les denrées alimentaires. À long terme, ces composés peuvent s'avérer préoccupants pour la santé humaine. Cela concerne particulièrement les consommateurs fréquents de grandes quantités de thé et d'infusions à base de plantes, en raison du potentiel cancérigène de ces substances, comme l'indique l'Autorité européenne de sécurité des aliments (*European Food Safety Authority, EFSA*) dans son avis de 2011 (3).

- les **contaminants environnementaux** : ce sont des produits chimiques présents dans

l'air, le sol et l'eau, tels que les dioxines et les polychlorobiphényles (PCB).

Les **dioxines et les PCB de type dioxine** proviennent essentiellement des procédés industriels mais peuvent également être générés par des sources naturelles, notamment par des feux de forêt. Ce sont des polluants organiques persistants dans l'environnement qui s'accumulent dans la chaîne alimentaire, principalement dans les graisses animales. Les dioxines étant très toxiques et omniprésentes, elles sont très surveillées par les agences nationales ainsi que par l'OMS (4).

Les **polychlorobiphényles** sont eux aussi des polluants organiques persistants, qui se désagrègent très peu dans l'environnement et s'accumulent dans différents milieux, en particulier dans le sol. Ils sont surtout présents dans les produits d'origine animale (poisson, viande, œufs, produits laitiers) destinés à l'alimentation. En 2013, le CIRC a classé les PCB comme cancérogènes certains pour l'Homme (groupe 1) (5).

- Les **métaux** tels que l'arsenic, le cadmium, le plomb et le mercure sont des composés chimiques qui existent à l'état naturel dans l'environnement, que ce soit dans le sol, l'eau ou l'atmosphère. Ils se retrouvent également sous la forme de résidus dans l'alimentation, par exemple suite à une contamination lors du traitement ou du stockage des denrées alimentaires. L'exposition à ces résidus est due à la consommation d'eau ou d'aliments contaminés. L'accumulation de ces métaux dans l'organisme peut avoir un impact délétère à long terme (6).
- Les **résidus de médicaments** : les traitements médicamenteux des animaux producteurs de denrées sont susceptibles de laisser des résidus dans les aliments (viande, poisson, lait, œufs, miel). Afin de prévenir les risques sanitaires, l'ANSES définit une « limite maximale de résidus » (LMR), en fonction de la toxicité de la substance concernée et de l'exposition du consommateur, que les producteurs doivent respecter pour commercialiser leurs denrées (7).
- Les **résidus de pesticides** : les pesticides regroupent à la fois les produits phytopharmaceutiques, utilisés en prévention des maladies ou infestations des cultures, et les biocides, qui luttent contre les agents pathogènes et les vecteurs de maladies (insectes, rats, souris). Il existe également des LMR pour les résidus de pesticides (8).

- Transformation
  - Les **contaminants liés aux processus de transformation** : ils sont générés au cours de la transformation des denrées alimentaires, par exemple sous l'effet des traitements thermiques à haute température, comme c'est le cas des furanes, des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et de l'acrylamide, mais aussi par les procédés de fermentation et de conservation. Ils sont également appelés « composés néoformés ».
  
- Conservation/stockage
  - Les **substances inorganiques** : les **sels de nitrite et de nitrate** s'utilisent comme conservateurs pour la viande et pour d'autres denrées périssables. La transformation du nitrate des aliments en nitrite dans le corps peut aboutir à la formation d'un groupe de composés, les nitrosamines, dont certains sont cancérogènes (9).
  - Les **matériaux au contact des denrées alimentaires** sont présents lors de la fabrication des aliments (plan de travail, machines, ...), dans les emballages qui les contiennent, mais également lors du stockage (bacs de rinçage, citernes...). Des particules de ces matériaux peuvent migrer du contenant vers le contenu et constituer ainsi une source potentielle de contamination chimique. Le règlement européen n°1935/2004 caractérise spécifiquement l'utilisation des matériaux et emballages destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires, ceux-ci ne devant présenter aucun risque pour le consommateur (10). Ce texte de loi dresse une liste de 17 matériaux et objets, tels que le liège, le verre, le plastique et les textiles, concernés par l'application de règles précises (11).

## 2. Composés néoformés

### A) Définition

Les composés néoformés sont des molécules qui ne sont initialement présentes ni dans les aliments ni dans l'emballage, et sont générées au cours des processus de transformation et/ou de préparation industrielle ou ménagère des denrées alimentaires. Elles peuvent apparaître lors de traitements thermiques, lors des procédés de fermentation ou pendant

les différentes étapes de conservation. Ces substances nouvellement formées représentent une source de contamination des denrées alimentaires.

Plusieurs types de réactions chimiques peuvent avoir lieu lors du processus de transformation des aliments, les plus courantes étant les traitements thermiques à hautes températures provoquant des **réactions de Maillard** ainsi que des **réactions d'oxydation**, aboutissant à la formation de nombreuses substances néoformées (12).

Les composés néoformés peuvent s'avérer toxiques, même à faible dose en raison de la répétition des expositions à ces produits, et sont susceptibles de présenter des risques pour la santé humaine (13).

Les principales substances concernées sont les furanes, les HAP, les nitrosamines, le formaldéhyde et l'acrylamide, entre autres (12). L'**acrylamide** est formé dans les aliments riches en glucides et pauvres en protéines (pommes de terre, chips, biscuits, café) lors des processus de friture, de cuisson ou de rôtissage à des températures supérieures à 120°C. C'est un composé neurotoxique pour l'animal et potentiellement cancérigène pour l'Homme (groupe 2A, CIRC). Ce composé a fait l'objet de cette thèse.

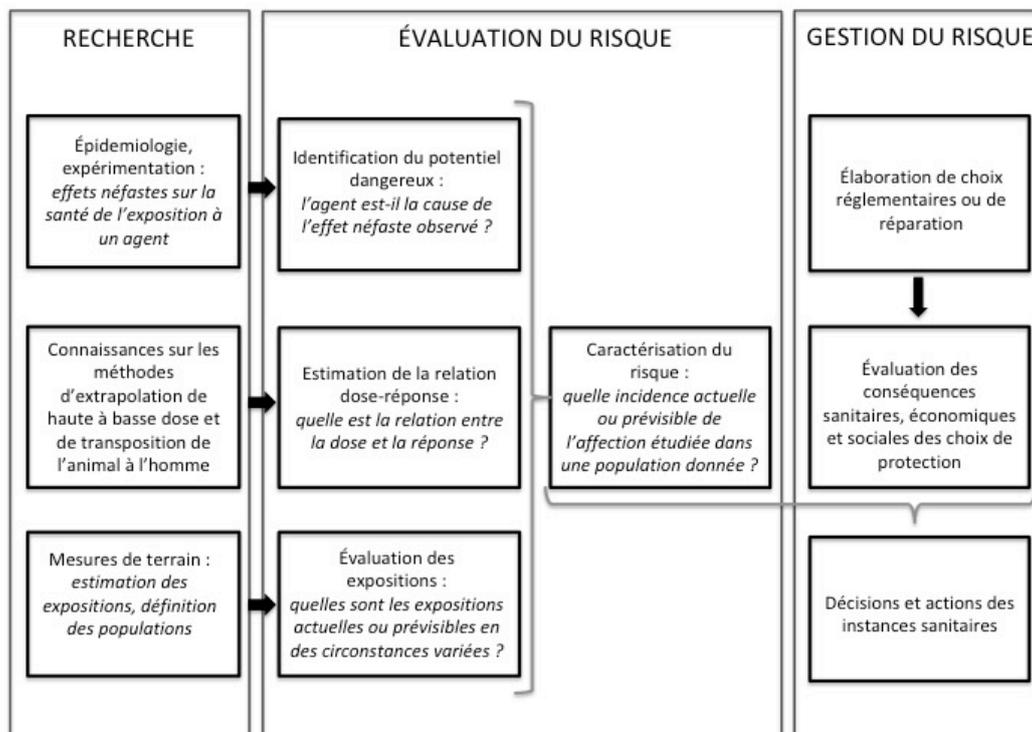
## **B) Processus d'évaluation des risques sanitaires**

D'après le Conseil national de la recherche des États-Unis (*National Research Council, NRC*), « **l'évaluation des risques désigne l'utilisation d'une base factuelle pour définir les effets sur la santé de l'exposition d'individus ou de populations à des situations ou matériaux dangereux** ». Il s'agit d'un outil d'aide à la décision qui vise, dans une situation d'incertitudes, à organiser les connaissances disponibles afin de statuer sur le niveau de risque collectif pour la santé qu'induit une exposition d'individus à des substances ou à des situations dangereuses (14).

L'évaluation des risques sanitaires des produits chimiques se décompose en quatre étapes (**Figure 1**) :

- 1. L'identification du danger** : la détermination de la nature du danger et des effets indésirables sous certaines conditions d'expositions (profil toxicologique de la substance).
- 2. L'estimation de la relation dose-réponse**
- 3. L'évaluation de l'exposition**
- 4. La caractérisation du risque**

L'évaluation du risque débouche ensuite sur la gestion du risque, qui consiste à évaluer les options réglementaires et à leur mise en application.



**Figure 1** : Évaluation des risques sanitaires selon la définition du NRC, 1983

Préalablement, une description détaillée de la structure chimique et des propriétés physico-chimiques de la substance évaluée est réalisée. En outre, les voies de synthèse et les méthodes d'analyse quantitative du composé devront être documentées et examinées.

### a) L'identification du danger

Cette étape vise à identifier la nature du danger et les effets indésirables de la substance sous certaines conditions d'exposition. Elle a pour objectif de déterminer le profil toxicologique de la substance.

La réalisation d'essais chez l'animal et, dans le cas où elle est envisageable, l'observation chez l'Homme constituent une technique particulièrement fiable pour collecter des données toxicologiques. Seuls ces essais peuvent nous informer sur les réactions au sein d'un système

complexe tel que l'organisme intact. Toutefois, un nombre suffisant d'animaux est requis pour apprécier la réalité des effets.

Ensuite, une **étude minutieuse des effets indésirables** provoqués par le composé est menée.

Les études *in vitro* jouent un rôle majeur dans la définition du mécanisme d'action d'un composé et sont souvent initiées au regard des résultats issus des essais *in vivo* chez les animaux. Les études de toxicité ne pouvant pas être menées chez l'Homme pour des raisons éthiques et légales, des cellules primaires isolées à partir de tissus d'animaux ou humains, des organites (mitochondrie, microsomes), des enzymes et des récepteurs sont utilisés pour ces études.

Les fonctions physiologiques des animaux, bien qu'assez différentes de celles des Hommes (paramètres toxicocinétiques, activité enzymatique) sont fréquemment utilisés en phase d'essais pour comprendre le mécanisme d'action des composés à étudier et pour décider de la pertinence de la transposition des résultats issus des essais sur les animaux à l'Homme (15).

#### **b) L'estimation de la relation dose-réponse**

Pour qualifier ou quantifier un risque pour la santé humaine, l'ANSES établit des « valeurs toxicologiques de référence » (VTR). Ces valeurs permettent de faire le lien entre une exposition à une substance chimique donnée et un effet sanitaire chez l'Homme (« relation dose-réponse »). Chaque VTR est propre à une substance, à la durée d'exposition et à la voie d'exposition (16).

#### **c) L'évaluation de l'exposition**

L'exposition à une substance chimique est « le contact entre la substance et l'organisme humain », par inhalation, ingestion ou contact cutané. Selon le NRC, l'évaluation de l'exposition consiste à mesurer ou estimer l'intensité, la fréquence et la durée de l'exposition humaine à une substance présente dans l'environnement. Pour les substances ingérées, le résultat de cette évaluation permet le calcul de la « dose journalière d'exposition » (DJE), en µg ou mg par kg de poids corporel par jour (17).

L'évaluation de l'exposition par l'alimentation dépend également de la connaissance des

habitudes et des schémas de consommation alimentaire. En Europe, l'EFSA tient une base de données exhaustive sur la consommation alimentaire européenne (18). Elle permet l'identification de groupes de consommateurs présentant un risque particulier.

#### **d) Caractérisation du risque**

L'objectif de cette étape est de synthétiser les données provenant de l'évaluation des expositions et de la toxicité. Elle définit l'expression quantitative et qualitative du risque selon les substances et les voies d'exposition contributrices, des modes de contamination et des populations humaines concernées.

La caractérisation du risque s'effectue en deux temps :

##### **- La quantification du risque**

→ Cas des **substances à « effet de seuil »**, c'est-à-dire pour les substances provoquant, au delà d'une certaine dose, des dommages dont la sévérité augmente avec la dose absorbée. Sont classés dans cette catégorie principalement les effets non cancérogènes et cancérogènes non génotoxiques directs. On calcule un quotient de danger (QD) qui estime la probabilité de survenue d'effets toxiques associés à la substance du fait de l'exposition considérée. Il est calculé suivant cette formule :  $QD = DJE/VTR$ .

→ Cas des **substances à « effet sans seuil »** : c'est-à-dire pour les substances pour lesquelles l'effet peut apparaître quelle que soit la dose reçue et où la probabilité de survenue augmente avec la dose. Il s'agit, pour l'essentiel, des effets cancérogènes génotoxiques directs. On calcule un excès de risque individuel (ERI) qui correspond à l'augmentation de la probabilité, par rapport à un sujet non exposé, qu'un individu exposé lors de sa vie entière à une unité de dose de la substance développe une pathologie. Il se calcule de la façon suivante :  $ERI = DJE \times ERU$ , où ERU désigne l'excès de risque unitaire.

- **L'évaluation des incertitudes** : elle intègre à la caractérisation du risque l'impact des incertitudes sur les résultats. Elle concerne toutes les étapes de la démarche (17).

## C) Contexte réglementaire

Compte-tenu des effets indésirables potentiels des contaminants alimentaires sur la santé du consommateur, une réglementation spécifique a été nécessaire dans l'intérêt de la protection de la santé publique.

La réglementation relative aux contaminants dans les denrées alimentaires est établie au niveau de l'Union Européenne par le règlement n°1881/2006 modifié de la Commission du 19 décembre 2006, qui fixe les teneurs maximales pour certains contaminants alimentaires (19).

Les grandes familles de contaminants alimentaires traités dans ce texte de loi sont les nitrates, les mycotoxines (aflatoxine), les métaux (plomb, cadmium, mercure), les dioxines et les PCB, et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (benzo(a)pyrène).

Ce règlement souligne l'importance de la mise en place des mesures communautaires afin de garantir l'unicité du marché face aux disparités existant pour certains contaminants.

Ce document précise que, pour les contaminants alimentaires considérés comme étant des cancérogènes génotoxiques ou lorsque l'exposition actuelle de la population avoisine ou dépasse la dose tolérable, il convient de fixer des teneurs maximales à un niveau aussi bas que raisonnablement possible (principe de l'ALARA, « *as low as reasonably achievable* »).

Pour assurer une protection efficace en termes de santé publique, « les produits dont les teneurs en contaminants excèdent les teneurs maximales ne doivent être mis sur le marché ni en tant que tels, ni après mélange avec d'autres denrées alimentaires, ni comme ingrédients d'autres denrées alimentaires » (19).

Les taux de contaminants alimentaires présents dans l'alimentation humaine et animale sont contrôlés au niveau européen par l'EFSA. Depuis 2010, elle collecte ces données auprès de tous les pays de l'UE sauf la Croatie à partir de la « description type des échantillons » (« *Standard Sample Description* »), qui standardise et harmonise la transmission de données analytiques. Cela contribue à une meilleure estimation de l'exposition de la population et de l'identification des groupes les plus exposés à l'échelle européenne. Cela conduit à la mise en place de programmes de prévention, de réduction et de contrôle de la contamination des denrées alimentaires (20).

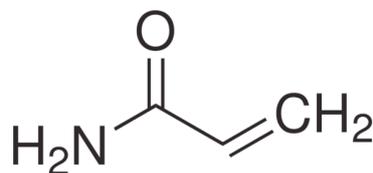
## II. Acrylamide

Dès 1994, l'acrylamide est reconnu comme cancérogène avéré pour l'animal, et possible pour l'Homme (groupe 2A) par le CIRC (21). Auparavant, l'acrylamide était considéré comme un danger de par sa manipulation dans l'environnement industriel ou *via* l'exposition à la fumée de cigarette.

En 2002, des chercheurs de l'Agence nationale suédoise de l'alimentation (*Swedish National Food Administration*) ont découvert la présence d'acrylamide dans un certain nombre de denrées alimentaires riches en amidon et en asparagine telles que les céréales, le pain de mie, lorsque leur température de cuisson dépassait les 120°C (22). Ce constat a généré de multiples recherches, tant au niveau français qu'au niveau international, afin d'évaluer les risques sanitaires pour l'Homme.

### 1. Propriétés physico-chimiques

L'acrylamide (également appelé 2-propénamide ou amide acrylique ou éthylène carboxamide) est un composé organique de formule brute  $C_3H_5NO$  (Figure 2). Il se présente sous la forme de poudre de cristaux inodores, dont la couleur peut varier (incolore ou blanchâtre à blanche) et qui se sublime lentement à température ambiante. Il est très soluble dans l'eau ainsi que dans de nombreux solvants organiques, tels que le méthanol, l'éthanol ou l'acétone. L'acrylamide se caractérise par une masse moléculaire de 71,09 g/mol, une densité de 1,125 à 30°C et un point de fusion de 84,5°C.



**Figure 2** : Formule développée de l'acrylamide

Il peut se polymériser en polyacrylamide en fonction de certains paramètres (humidité, températures supérieures à 80 °C, exposition à la lumière, présence d'initiateurs tels que les

peroxydes, déclenchant une réaction violente exothermique. Pour éviter cela, la combinaison d'inhibiteurs de polymérisation (cuivre, hydroquinone, tert-butylpyrocatechol) et d'oxygène permet de stabiliser les solutions aqueuses (23).

## **2. Production et utilisations industrielles**

### Production

Dans les années 1960, la production d'acrylamide sous forme de polymère se faisait *via* une réaction d'hydratation de l'acrylonitrile à partir de l'acide sulfurique et de catalyseurs de cuivre, générant une pollution importante. En 1980, les industriels de la société *Nitto Chemical Industry* au Japon découvrirent la nitrile hydratase, une enzyme capable de produire de l'acrylamide à partir d'acrylonitrile, remplaçant aussitôt la technique précédente. Depuis, plusieurs générations de cette enzyme ont vu le jour, permettant d'améliorer les rendements de production et de réduire l'énergie consommée au cours de la production de 80% par rapport à la technique initiale.

Depuis les années 1990, l'utilisation d'un micro-organisme, *Rhodococcus rhodochrous*, dans la production d'acrylamide a été mise en évidence. Cette souche transforme l'acrylonitrile en acrylamide grâce à une production d'une nitrile hydratase intrinsèque (24,25).

### Utilisations industrielles

L'utilisation de l'acrylamide est largement répandue dans la fabrication des polyacrylamides, polymères de haut poids moléculaire (26). Les applications industrielles sont nombreuses :

- agent flocculant dans le traitement de l'eau et dans celui des minéraux, pour faciliter la précipitation des solides dans les solutions aqueuses
- adjuvant de fabrication dans l'industrie du papier
- préparation des gels d'électrophorèse
- agent d'étanchéité dans la construction de tunnels et barrages
- agent de fixation dans l'industrie des peintures et vernis pour améliorer leur tenue
- imperméabilisant dans l'industrie textile
- liant dans l'industrie cosmétique
- modificateur de viscosité dans l'industrie pétrolière
- fertilisants dans l'agriculture

### 3. Formation dans les aliments

En 1911, le scientifique français Louis Camille Maillard (**Figure 3**) découvre la réaction de brunissement non enzymatique des aliments qui leur confère l'arôme de grillé (appelés « arômes de Maillard » dans l'industrie agroalimentaire) et leur aspect doré caractéristique révélant la formation de pigments bruns (mélanoidines). Elle se produit lors des processus de cuisson des aliments à plus de 120°C (fritures, grillades, ...) lorsque ceux-ci sont composés de sucres réducteurs et d'acides aminés. Louis Camille Maillard expose succinctement en 1912 ces réactions entre les sucres et les acides aminés, puis de manière plus détaillée en 1916. C'est cette réaction que l'on connaît aujourd'hui sous le nom de « réaction de Maillard » (27).

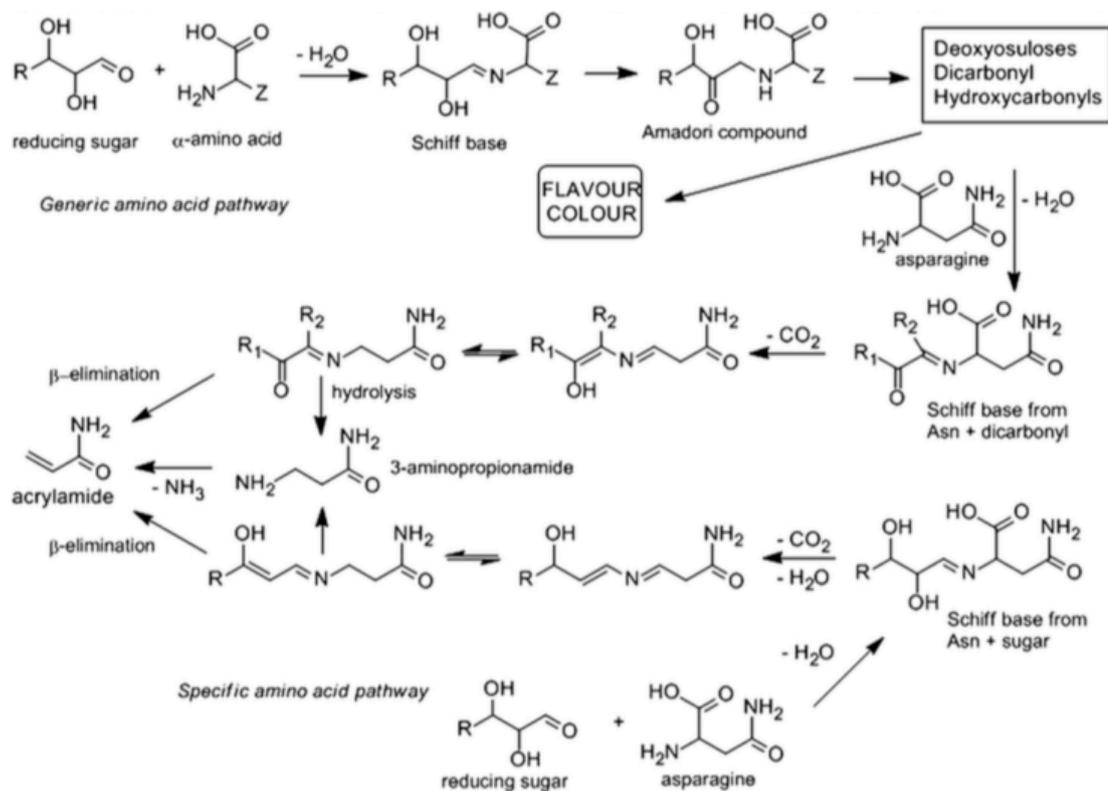


**Figure 3** : Louis Camille Maillard (1910)

L'un des produits de la réaction de Maillard, l'**acrylamide**, particulièrement présent dans les céréales du petit déjeuner, le pain grillé, les chips, le café, la chicorée, peut s'avérer toxique.

→ La réaction de Maillard se fait en trois temps :

- la condensation de Maillard : condensation de la fonction amine de l'acide aminé sur la fonction carbonyle d'un sucre réducteur pour donner une base de Schiff
- le réarrangement d'Amadori pour les aldoses (ou d'Hyens pour les cétooses) : isomérisation irréversible de la base de Schiff (par condensation de l'aldose avec l'acide aminé pour donner des produits plus stables)
- synthèse d'une réductone : énoisation



**Figure 4 :** La réaction de Maillard aboutissant à la formation d'acrylamide (adaptée de Parker *et al.*, 2012)

La vitesse et les voies de réaction sont sous l'influence de plusieurs paramètres :

- la nature des réactifs : plus le nombre de carbones est faible, plus l'ose est réactif. Les pentoses sont donc plus réactifs que les hexoses. Plus la fonction amine est éloignée de la fonction carboxylique, plus l'acide aminé est réactif. Par ordre décroissant de réactivité : lysine, arginine, méthionine, cystéine, acide glutamique, proline, asparagine.
- La température : la vitesse de réaction est quasiment doublée lorsque la température augmente de 10 °C.
- le pH : la réaction est optimale lorsque le pH est compris entre 6 et 10 (alcalin). En effet, le réarrangement d'Amadori se produit sous pH acide, tandis que la synthèse des réductones a lieu à pH basique.
- la teneur en eau : lorsque l'eau est en quantité abondante, le milieu aqueux empêchera les réactions de déshydratation, jusqu'à inhiber les réactions de brunissement. Les milieux à humidité intermédiaire sont donc les plus favorables au développement de la réaction (28).

#### 4. Dosage dans les aliments

Depuis sa découverte dans les aliments par des chercheurs suédois en 2002, les méthodes analytiques de dosage de l'acrylamide dans les aliments sont la chromatographie liquide et la chromatographie en phase gazeuse, chacune couplée à la spectrométrie de masse. Leur haute sensibilité et sélectivité, leur stabilité et leur répétabilité en font des méthodes de référence. Toutefois, elles nécessitent un équipement onéreux, des techniciens de laboratoire spécialisés et génèrent des coûts d'analyse importants.

L'EAT2 menée par l'ANSES de 2006 à 2010 a révélé les teneurs moyennes en acrylamide dans une liste de produits de l'alimentation quotidienne (**Tableau 1**) (29).

**Tableau 1** : Estimation de la teneur en acrylamide des aliments ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  ou  $\mu\text{g}/\text{L}$ ), de l'exposition (moyenne et P95) de la **population française** ( $\text{ng}/\text{kg}$  pc/jour) adulte et enfant, et contribution des aliments (%) (d'après EAT2, tome 2, ANSES, 2011)

Aliments	Type	n	Teneur moyenne	Exposition					
				Adultes			Enfants		
				Moyenne	P95	Contrib	Moyenne	P95	Contrib
Pain et panification sèche	N	14	34,3	24,4	69,8	5,7	20,2	58,7	2,9
Céréales pour petit déjeuner	N	6	16,2	0,8	18,0	0,2	5,7	29,2	0,8
Viennoiserie	N	6	22,2	2,8	21,0	0,6	9,6	43,7	1,4
Biscuits sucrés ou salés et barres			729,2	40,2		9,4	130,0		18,8
<i>dont Pomme de terre chips salées</i>	R	16	954,5	10,2	261,4	2,4	27,8	357,8	4,0
<i>dont Autres biscuits salés</i>	N	2	697,6	13,1	181,2	3,0	27,1	362,4	3,9
<i>dont Biscuits sucrés</i>	N	6	139,0	17,0	157,7	3,9	75,1	279,6	10,9
Pâtisseries et gâteaux	N	16	25,7	12,7	48,2	3,0	26,3	400,8	3,8
Volaille et gibier	R	6	10,9	2,2	9,8	0,5	3,6	15,4	0,5
Poissons	R	16	11,1	0,6	9,9	0,1	2,4	19,2	0,3
Pommes de terre sautées et frites	R	16	724,1	192,6	729,2	44,8	421,0	1447,4	60,8
Chocolat	N	9	80,0	5,0	36,8	1,2	17,1	70,6	2,5
Café/chicorée			68,0	126,8		29,5	3,7		0,5
<i>dont Café noir</i>	R	3	37,3	119,3	456,1	27,7	3,6	222,7	0,5
<i>dont Café soluble reconstitué prêt à boire</i>	R	15	74,2	7,6	565,2	1,8	0,1	165,5	0,0
Autres boissons chaudes	R	14	21,8	2,7	65,6	0,6	10,6	84,5	1,5
Pizzas, quiches et pâtisseries salées	R	4	41,0	12,9	82,6	3,0	22,6	125,8	3,3
Sandwichs, casse-croûte	R	15	10,5	2,0	21,1	0,5	2,7	21,8	0,4
Plats composés		12	13,7	2,8		0,7	10,7		1,5
<i>dont Cordon bleu de volaille</i>	R	2	33,9	1,2	25,1	0,3	6,2	48,7	0,9
Entremets, crèmes desserts et laits gélifiés	N	12	7,3	1,4	15,7	0,3	4,9	35,0	0,7
Compotes et fruits cuits	N	4	2,0	0,3	3,6	0,1	0,9	7,8	0,1
<b>TOTAL</b>				<b>430,2</b>	<b>1024,0</b>	<b>100</b>	<b>691,9</b>	<b>1803,0</b>	<b>100</b>

D'après cette étude, **les aliments les plus riches en acrylamide sont les chips à base de pommes de terre** (954 µg d'acrylamide/kg de produit), **les pommes de terre sautées et frites** (724 µg d'acrylamide/kg de produit) **et autres biscuits salés apéritif** (697 µg d'acrylamide/kg de produit).

De nouvelles méthodes de détection rapide, plus simples et plus pratiques, telles que l'analyse informatique, l'ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), la biodétection électrochimique et la biodétection par fluorescence, suscitent un intérêt croissant auprès des chercheurs. Les travaux de recherche sur ces méthodes ont démontré une sensibilité et une sélectivité similaires par rapport aux méthodes standard, ainsi que des gains de temps et de coûts grâce à l'utilisation de nanomatériaux et de biomolécules ayant une grande affinité pour l'acrylamide. Ces progrès s'avèrent donc prometteurs dans la détection plus fine de la quantité d'acrylamide dans les denrées alimentaires.

Quelle que soit la méthode utilisée, deux étapes préalables sont indispensables :

- **l'échantillonnage** : il peut y avoir une forte variabilité d'un aliment à l'autre, et même des concentrations plus élevées à certains endroits d'un même aliment. L'ensemble des aliments à analyser devra être homogénéisé avant d'en prélever une portion représentative.
- **l'extraction** : il est préférable d'ajouter un standard interne à l'échantillon préalablement à l'analyse, afin de compenser les éventuelles pertes au cours du processus d'analyse et garantir la fiabilité des résultats.

#### **A) Méthodes standards pour la détection d'acrylamide dans les aliments**

- **La chromatographie liquide (CL) et la chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplées à la spectrométrie de masse (SM)** sont les méthodes les plus utilisées pour l'extraction et la quantification de l'acrylamide dans les aliments, par leur sensibilité et leur sélectivité. Suite à l'apparition d'un artefact lors de la procédure de bromation, la méthode CL-SM/SM a été développée pour l'analyse directe sans nécessité de dérivation.

La bromation est une opération de dérivation utilisée lors de la chromatographie en phase gazeuse pour améliorer la sensibilité, la stabilité et la détectabilité des

composés à analyser. Par réaction chimique à partir de l'analyte initial, le produit obtenu aura une meilleure affinité électronique.

- **La chromatographie liquide ultra-performance (CLUP)** permet une meilleure extraction de l'acrylamide dans les matrices alimentaires avec un temps de rétention plus faible et une sensibilité plus élevée.
- **Les chromatographies en phase gazeuse (CPG) avec et sans dérivation** ont été développées, démontrant des résultats concordants avec la technique de CL-SM dans la détection d'acrylamide dans plusieurs denrées alimentaires. Il est à noter que même si l'acrylamide peut être analysé tel quel sans dérivation, lorsqu'on utilise la CPG-SM, la molécule est normalement bromée pour former ainsi un dérivé ayant des propriétés améliorées pour la CPG. Le dérivé d'acrylamide est identifié par son temps de rétention et par le ratio des ions caractéristiques.

D'après les recommandations européennes, les méthodes analytiques pour la détection d'acrylamide devraient garantir des « limites de quantification » (« *Limit of Quantification* », LOQ) de 30 µg/kg pour le pain et les aliments pour enfants, et 50 µg/kg pour les produits à base de pomme de terre, de céréales, le café.

Lors des résultats de l'EAT2, 11% des échantillons analysés présentaient une concentration en acrylamide inférieure à la LOD (LOD : 4µg/kg) , et 15% présentaient une concentration inférieure à la LOQ (LOQ : 10 µg/kg) (29).

Les méthodes standards telles que la chromatographie liquide (CLHP et CLUP) ainsi que la chromatographie en phase gazeuse couplées à la spectrométrie de masse ont une limite de quantification de 10 à 30 µg/kg. L'ensemble de ces valeurs est détaillé dans le **tableau 2** (30).

La plupart des organisations et gouvernements a également recommandé l'utilisation de ces méthodes en tant que méthodes standards pour la détection d'acrylamide dans les denrées alimentaires industrielles. Toutefois, aucune n'a été complètement validée par les essais collaboratifs interlaboratoires. Il est considéré que l'incertitude de mesure est faible par rapport à l'importante variabilité qui existe même entre les différents lots d'un même produit (31).

## B) Méthodes de détection rapide

Contrairement aux méthodes standards, les méthodes de détection rapides sont principalement basées sur les propriétés biochimiques de l'acrylamide et des biomatériaux ayant une interaction spécifique et élevée avec l'acrylamide, ou des changements de propriétés physicochimiques des aliments.

- **Méthode colorimétrique couplée à l'analyse informatique** : cette méthode se base sur le brunissement des aliments dû à la réaction de Maillard. Des études (32) ont montré une corrélation entre les niveaux de brunissement et la concentration d'acrylamide dans différents aliments tels que les frites et le café. Pour certains types d'aliments, l'analyse colorimétrique se fait informatiquement, permettant ainsi une observation en haut débit et en temps réel. Des valeurs seuil sont définies selon les types d'aliments analysés.
  
- **Méthode immuno-enzymatique** : dosage d'immunoabsorption par enzyme liée « ELISA ». Il s'agit d'une technique biochimique utilisant un ou deux anticorps, dont l'un d'eux est spécifique de l'antigène, tandis que l'autre réagit aux complexes immuns (antigène-anticorps). Ce dernier est couplé à une enzyme et génère l'émission d'un signal détectable via un substrat chromogène ou fluorogène. L'utilisation de l'ELISA s'est développée dans la détection de l'acrylamide contenu dans les denrées alimentaires. Toutefois, l'acrylamide ne possédant pas d'immunogénicité du fait de son faible poids moléculaire, l'antigène devra d'abord être complètement synthétisé en le conjuguant à une protéine de transport immuno-stimulante. Par rapport aux méthodes standards, la méthode ELISA révèle une sensibilité similaire, un coût plus faible, un temps de détection réduit et ne requiert pas d'équipement onéreux ni d'une préparation d'échantillon complexe. De plus, présentant le meilleur rendement et la meilleure polyvalence, elle est applicable à différents types d'aliments. Le principal axe d'amélioration concerne l'obtention d'anticorps d'acrylamide stable et de haute affinité.
  
- **Méthode de biodétection électrochimique** : un biocapteur est un appareil utilisé pour détecter un analyte combinant un composé biologique (biorécepteur) à un détecteur physico-chimique (transducteur). Ces biocapteurs électrochimiques

produisent un signal électrique (courant et potentiel d'action).

Parmi les nouvelles techniques, la méthode de biodétection électrochimique est celle qui présente la meilleure sensibilité et la plus large gamme de détection d'acrylamide

- **Méthode de détection par fluorescence** : cette méthode récente se base sur la polymérisation de l'acrylamide et l'utilisation de sondes fluorescentes pour détecter la concentration d'acrylamide dans les aliments (33).

De toutes ces nouvelles méthodes, l'analyse informatique et la méthode colorimétrique sont les deux seules techniques qui englobent la détection en ligne et en temps réel des taux d'acrylamide au cours de la transformation des aliments. Ces caractéristiques en font des méthodes appropriées pour effectuer un premier tri d'aliments aux concentrations d'acrylamide importantes (**Tableau 2**).

**Tableau 2** : Application des méthodes de détection de l'acrylamide dans les aliments industriels (d'après *Rapid methods for detecting acrylamide in thermally processed foods: A review*, Q. Hu et al., 2014)

Method	Sample	Linear range	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Recovery	RSD	Reference	
Standard Methods	LC-MS/MS	Potato chips	1 ~ 200	1	3	81.6–99.0%	0.4–4.5%	(Zhang et al., 2007)
	(HPLC, UPLC)	Coffee	2 ~ 100	5	16	92–95%	<5%	(Bortolomeazzi et al., 2012)
		Cereal-based foods (breakfast cereal, cookies)	1 ~ 2,000	6	18	90.6–98.5%	1.8% (mean)	(Şenyuva & Gökmen, 2006)
	GC-MS (GC based)	Tea	1 ~ 20	1	5	74–79%	1.6–8.3%	(Liu, Zhao, Yuan, Chen, & Hu, 2008)
		Infant foods	0.1–200	1	3	87–96%	<6.5%	(Zhang et al., 2005)
		Potato chips	10 ~ 1,000	5	–	81.9–95.7%	5.3–13.4%	(Yamazaki et al., 2012)
		Coffee	0 ~ 1,500	5	10	84–97%	2–10%	(Soares, Alves, Casal, Oliveira, & Fernandes, 2010)
		Cereal-based foods (biscuits, cracker, breakfast cereals)	5 ~ 50,000	2	36	91–99%	<4%	(De Vleeschouwer et al., 2007)
		French fries	30–10,000	1	25	>96%	<2%	(Notardonato, Avino, Centola, Cinelli, & Russo, 2013)
	Rapid Methods	Electrochemical Biosensors	Instant noodles	10 ~ 5,000	5.1	13	87.3% (mean)	1.6%
Potato crisps			$9.2 \times 10^{-4}$ ~ $3.4 \times 10^3$	$8.5 \times 10^{-3}$	–	–	–	(Stobiecka et al., 2007)
ELISA		Potato crisps	$0.35$ – $5.3 \times 10^6$	$1.4 \times 10^{-2}$	–	95.40–97.56%	–	(Batra, Lata, Sharma et al., 2013)
		No food detected	0.71–710	2.84	7.1	–	–	(Garabagiu & Mihailescu, 2011)
		Pringles crisps	51.76–3,311.5	65.7	–	–	–	(Preston et al., 2008)
Fluorescence		Mashed potatoes	50 ~ 1,280	50	350	92.6–95.5%	–	(Fu et al., 2011)
		Potato crisps, instant noodles, biscuits, and cakes	26.3 ~ 221.1	18.6	60.6	74.4–98.1%	–	(Quan et al., 2011)
Computer vision		Potato fries, biscuits	10 ~ 100,000	6	–	90–110%	6.3–9.9%	(Zhou et al., 2008)
		Potato chips, cookies, and coffee	0.25 ~ 24.15	0.036	–	73.7–107.7%	3.6–19.2%	(Wu et al., 2014)
		Potato chips	35 ~ 350,000	35	–	–	–	(Hu et al., 2014)
Computer vision		French fries, fried puffs, fried chicken roll, bread, biscuits	50 ~ 20,000	15	–	66.0–110.6%	–	(Liu et al., 2014)
		Potato chips	<b>Correlation coefficient</b>		<b>Prediction accuracy</b>		<b>Reference</b>	
		Cookies	0.989	0.946	98% at a threshold of 1000 $\mu\text{g/kg}$	100% at a threshold of 150 $\mu\text{g/kg}$	(Gökmen et al., 2006)	(Gökmen et al., 2008)

## 5. Toxicocinétique

### A) Absorption

Chez l'Homme, les voies d'exposition à l'acrylamide sont nombreuses : la voie orale *via* l'eau et l'alimentation, la voie respiratoire *via* la fumée de cigarette, mais aussi la voie cutanée dans un environnement professionnel (23).

Quelle que soit la voie d'exposition, l'acrylamide est rapidement absorbé. Toutefois, c'est par la voie orale que l'absorption est la plus rapide ; l'acrylamide étant presque totalement absorbé par la paroi intestinale (34,35).

### B) Distribution

En l'état des recherches actuelles, il n'existe pas de données quant à la distribution chez l'Homme. Cependant, les résultats issus de plusieurs études chez des **mammifères** (principalement rats mâles souris, chien, cochon), indiquent que l'acrylamide identifié par marqueur radioactif est rapidement distribué sous sa forme libre dans tous les tissus (foie, reins, poumons, muscles, cerveau, nerf sciatique, moelle épinière, peau, tissu adipeux, intestin) ainsi qu'au niveau du fœtus et du lait maternel (35).

Néanmoins, une accumulation spécifique a lieu dans les globules rouges, où les métabolites forment des **adduits** à l'hémoglobine, et se lient également aux acides nucléiques et aux protéines (36).

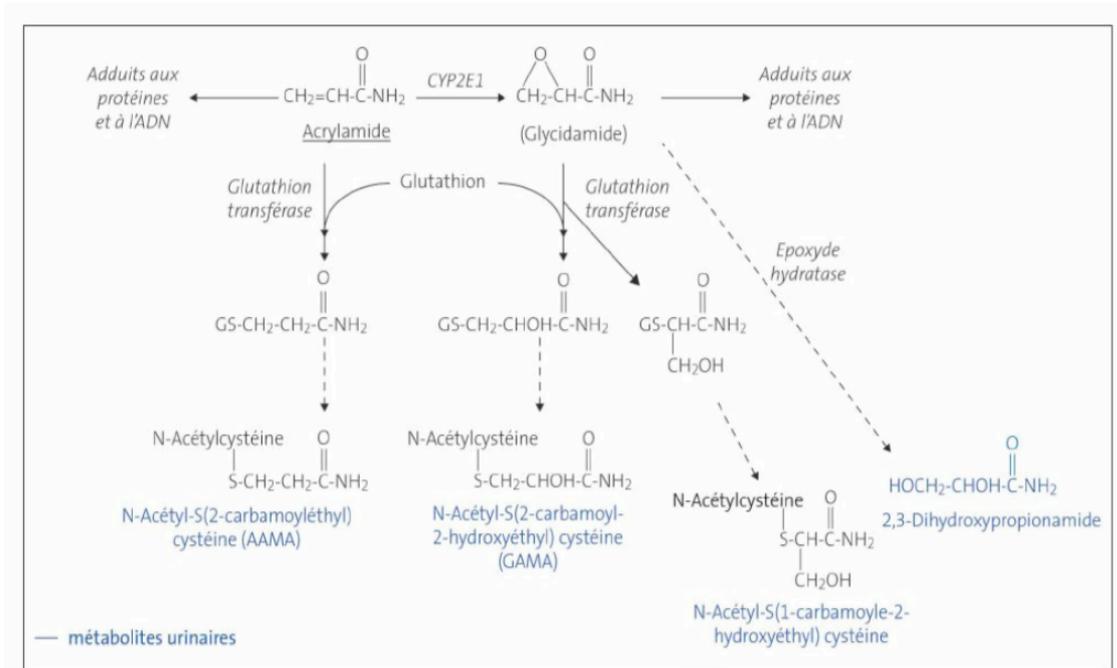
### C) Métabolisme

Il existe deux voies de métabolisation chez l'Homme :

- La principale voie est celle de la **conjugaison au glutathion**, catalysée par la glutathion-S-transférase hépatique aboutissant à deux métabolites urinaires principaux sous forme de dérivés mercapturiques : N-acétyl-S-(2-carbamoyléthyl)cystéine (AAMA) et N-acétyl-S-(2-carbamoyl-2-hydroxyéthyl)cystéine (GAMA), représentant respectivement 52% et 5 % de la dose (23).
- L'autre voie de métabolisation est celle de l'**époxydation en glycidamide** par des mono-oxygénases dépendantes du cytochrome P450 2E1 mais elle est beaucoup moins importante chez l'Homme que chez les rongeurs (37). Chez l'animal, le glycidamide aurait des propriétés cancérogènes et génotoxiques plus importantes

que l'acrylamide. Le glycidamide est ensuite hydrolysé par une époxyde hydrolase en dihydroxypropionamide.

Ces composés issus de la métabolisation de l'acrylamide peuvent générer des mutations cellulaires ou moléculaires, responsables de mutagenèse ou de cancérogenèse.



**Figure 5 :** Schéma métabolique de l'acrylamide (*Fiche toxicologique de l'acrylamide, INRS*)

Pour extrapoler des données toxicologiques de l'animal à l'Homme, il est indispensable de tenir compte des différences métaboliques qualitatives et quantitatives en raison d'une variabilité génétique inter-espèces importante au niveau des mono-oxygénases et des glutathion-S-transférases.

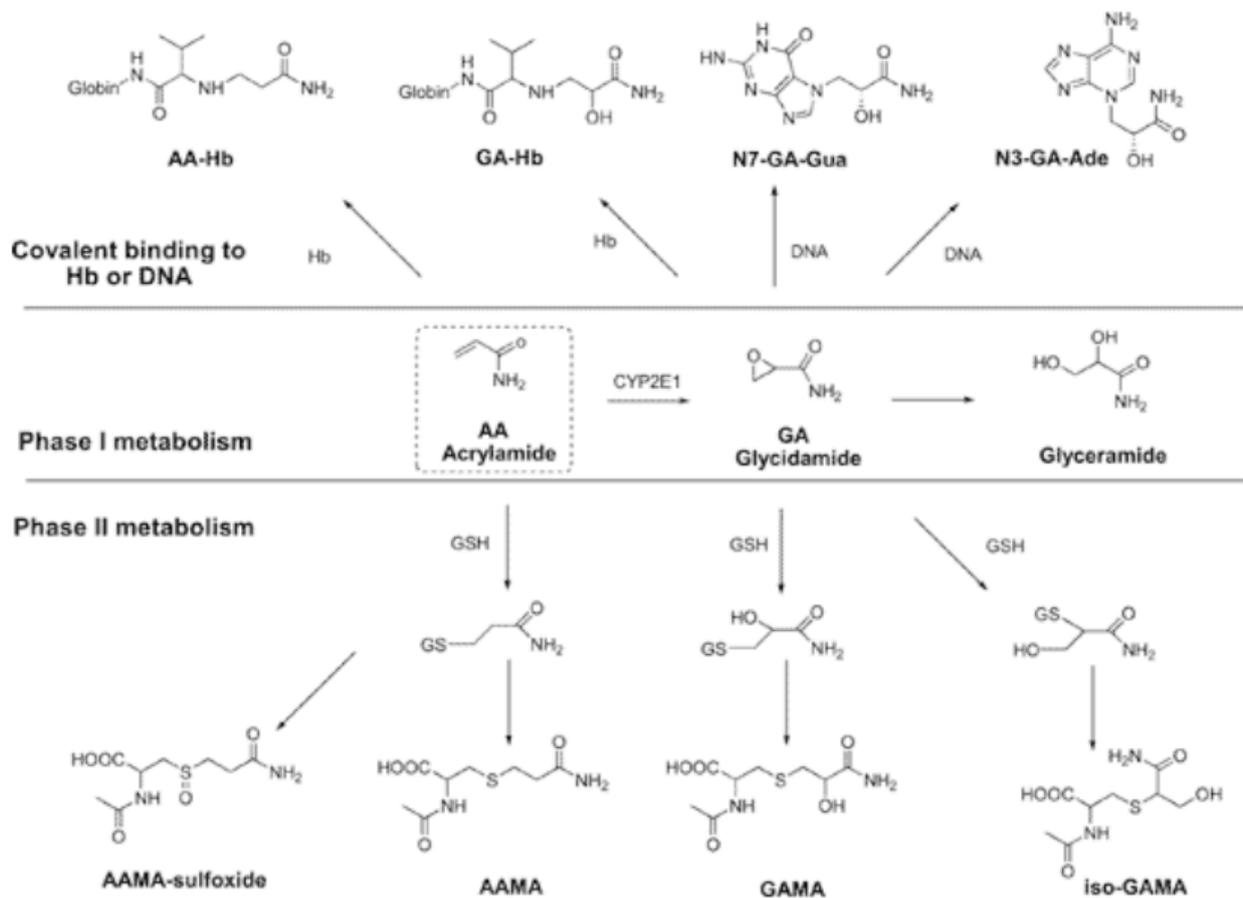
Des différences interindividuelles peuvent également s'appliquer en fonction du genre, de l'âge, du tabagisme, de la consommation d'alcool ou de pathologies métaboliques, impactant ainsi les voies métaboliques. De plus, le métabolisme chez l'Homme peut être davantage prédisposé à la glutathion-conjugaison (phase II) que la transformation en glycidamide (phase I) (38).

## Formation d'adduits

La métabolisation de l'acrylamide aboutit à divers métabolites, dont le glycidamide, le plus toxique d'entre eux. Il est capable de réagir avec les acides nucléiques de l'ADN, en formant des adduits, conduisant à l'induction de mutations. L'acrylamide peut rarement se lier à l'ADN pour former des adduits étant donné sa faible réactivité pour les bases azotées (34).

Les adduits à l'hémoglobine et l'acide mercapturique urinaire ont tous deux été utilisés en tant que biomarqueurs dans l'évaluation du risque de l'acrylamide (39).

En outre, l'acrylamide et le glycidamide ont également une forte propension à se lier aux protéines. Ainsi, ils peuvent s'associer avec un résidu de valine (AA Val ou GA Val) en formant d'autres adduits (**Figure 6**).



**Figure 6** : Métabolisme de l'acrylamide et formation d'adduits (d'après *Metabolism of acrylamide*, D. Li et al., 2016)

## D) Élimination

Chez l'Homme, 60% de la dose d'acrylamide administrée par voie orale et ses métabolites, dont environ 86% conjugués au glutathion, se retrouvent dans les urines au bout de 24 heures (35). L'acrylamide sous forme inchangée représente un peu plus de 4% de la dose initiale ingérée. Le devenir des 40% restants de la dose initiale n'a pas encore été élucidé. Il est envisageable qu'une partie contribue à la formation d'adduits avec les macromolécules, telles que l'ADN et les protéines (34).

## 6. Contexte réglementaire

En juin 2015, l'EFSA a publié sa première évaluation complète des risques associés à l'acrylamide dans les aliments. Des experts des contaminants de la chaîne alimentaire (groupe CONTAM) ont corroboré les résultats publiés indiquant que la présence d'acrylamide dans les aliments favoriserait le risque de développement d'un cancer pour les consommateurs de tous les âges.

Les études menées sur des modèles animaux montrent que l'acrylamide et son métabolite, le glycidamide, sont génotoxiques et cancérogènes. Les études sur des modèles humains n'ont pas encore apporté de preuves suffisantes quant à la corrélation entre acrylamide et apparition de cancer.

Nous avons vu précédemment que l'acrylamide est omniprésent dans de nombreux produits de l'alimentation quotidienne (**Tableau 1**), notamment dans les produits frits à base de pommes de terre, le café, les biscuits, les biscuits salés, les pains grillés, les biscottes et le pain de mie. Tous les consommateurs sont donc concernés, et la population infantile est particulièrement exposée, proportionnellement au poids corporel (35).

Ainsi, la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) a constitué un groupe de travail afin de définir des recommandations simples de préparation des aliments pour en réduire les quantités d'acrylamide, et une campagne de sensibilisation des consommateurs au danger « acrylamide ». Ces travaux viennent d'être achevés.

Un plan de surveillance et de contrôle de la contamination des denrées alimentaires par des composés néoformés dont l'acrylamide a été mis en place en 2016 dans tous les États

membres de l'Union Européenne. Ces contrôles réguliers se basent sur la **recommandation 20136/647/UE** fixant des valeurs indicatives en acrylamide qui ne constituent ni des limites de sécurité, ni des limites réglementaires. Si les teneurs dépassent ces valeurs, cela signifie que la teneur en acrylamide dosée dans le produit analysé est supérieure aux teneurs habituellement retrouvées dans cette classe de produit. Une enquête sera menée auprès du fabricant pour vérifier la mise en place effective des mesures de réduction d'acrylamide au niveau industriel (40).

En novembre dernier, le **règlement UE 2017/2158** a été publié au Journal Officiel de l'Union Européenne. Il instaure des mesures d'atténuation et des teneurs de référence pour la réduction de la présence d'acrylamide dans les denrées alimentaires, et est **entré en application le 11 avril 2018**. Ce règlement impose aux exploitants du secteur alimentaire de mettre en place les mesures d'atténuation de la présence d'acrylamide, adaptées à la taille et à la nature de leur établissement. Il fixe un référentiel de valeurs qui permettra de vérifier l'efficacité de ces mesures à l'aide de l'échantillonnage et de l'analyse, l'objectif étant « d'atteindre des teneurs en acrylamide aussi faibles que raisonnablement possible et inférieures aux teneurs de référence » indiquées dans l'annexe de ce même règlement.

## **A) Évaluation du risque lié à la présence d'acrylamide dans les aliments**

### **a) Identification du danger**

Les craintes liées à la formation et à l'accumulation d'acrylamide dans les aliments ont conduit à prêter une attention plus importante à sa toxicité. À ce jour, la plupart des recherches sur la toxicité se sont concentrées sur la cancérogenèse, la génotoxicité, la neurotoxicité et la reprotoxicité.

- **Cancérogenèse** : en 1994, le CIRC a classé l'acrylamide comme « probablement cancérogène chez l'humain », considérant les preuves de la cancérogenèse comme suffisantes chez l'animal mais inadéquates chez l'Homme.

Hogervorst *et al.* ont étudié les risques de cancer de plusieurs organes en se basant sur des questionnaires de fréquence de consommation d'aliments (*Food frequency questionnaires*, « FFQ »). Les résultats ont conclu à une augmentation du risque de cancer de l'endomètre et de l'ovaire mais pas de corrélation entre le cancer du sein et la consommation d'acrylamide (41–43).

Toutefois, d'un point de vue épidémiologique, aucune relation convaincante entre l'exposition à l'acrylamide et la formation de tumeurs n'a été établie (44).

Les résultats des études toxicologiques et épidémiologiques sont insuffisants pour affirmer que les quantités d'acrylamide consommées au cours d'un régime alimentaire normal sont associées à un risque de cancer. À ce jour, le mode d'action précis de la cancérogenèse de l'acrylamide reste encore à élucider (45).

- **Génotoxicité** : dans les cellules mammaliennes et humaines, l'acrylamide peut être transformé en glycidamide par le cytochrome P450 2E1. Le glycidamide est un mutagène puissant avec une haute affinité pour l'ADN, induisant principalement des mutations ponctuelle (46,47). Les résultats ont montré que le glycidamide induit une altération de la cinétique de prolifération cellulaire et la diminution de la viabilité des cellules exposées à de fortes concentrations de glycidamide par des mécanismes n'impliquant pas le stress oxydatif. Les études confirment donc que les cellules mammaliennes et humaines sont sensibles à la toxicité du glycidamide (46).
- **Neurotoxicité** : d'après l'OMS, il est évident que l'acrylamide est toxique pour l'Homme. Toutefois, les effets neurotoxiques (ataxie, faiblesse des muscles squelettiques, troubles de cognition) n'apparaissent qu'après des expositions répétées à l'acrylamide. Les plus bas niveaux d'exposition estimés dans l'alimentation ne sont pas associés à des effets neurotoxiques chez l'Homme mais des études plus approfondies sont encore nécessaires pour explorer les effets cumulatifs de l'acrylamide sur le système nerveux (48).
- **Reprotoxicité et tératogenèse** : la reprotoxicité et la tératogenèse de l'acrylamide ont été rapportées chez des animaux de laboratoire. Néanmoins, il n'y a pas encore de données quant à la potentielle reprotoxicité ou à la tératogenèse chez l'Homme (49).

#### **b) Estimation de la relation dose-réponse**

« Tout niveau d'exposition à une substance génotoxique peut potentiellement endommager l'ADN et provoquer un cancer » (35). L'acrylamide et son métabolite, le glycidamide, sont directement concernés, étant tous les deux des agents génotoxiques et cancérogènes. Il n'est donc pas possible de déterminer une dose journalière tolérable (ou « DJT ») d'acrylamide dans les denrées alimentaires. Toutefois, les experts de l'EFSA ont calculé une

dose pour laquelle l'acrylamide est susceptible d'entraîner un effet faible mais mesurable de tumeur (appelé « effet néoplasique ») ou d'autres effets potentiellement néfastes (sur le système nerveux, le développement pré et post-natal et la reproduction masculine). Cette dose, appelée « benchmark dose » (BMD), est la dose produisant un effet non nul, correspondant à une modification du niveau de réponse par rapport à un groupe témoin. Le plus souvent, ce n'est pas directement la BMD qui est utilisée, mais la limite inférieure de son intervalle de confiance à 95% (Benchmark Dose Lower Confidence Limit). La BMDL<sub>10</sub> est définie comme la dose qui engendre une augmentation de 10% de l'incidence de la réponse observée dans le groupe exposé par rapport au témoin.

Le comité d'experts de l'EFSA a établi :

- pour les **tumeurs** : une BMDL<sub>10</sub> de 0,17 mg/kg de poids corporel/jour
- pour les **autres effets** : les changements neurologiques ont été considérés comme les plus pertinents avec une BMDL<sub>10</sub> de 0,43 mg/kg de poids corporel /jour.

La comparaison de la BMDL<sub>10</sub> à l'exposition alimentaire de l'Homme à l'acrylamide permet aux scientifiques d'estimer un « niveau de préoccupation sanitaire », connu sous le nom de « marge d'exposition » (35).

### c) Évaluation des expositions

L'évaluation de l'exposition consiste à **estimer ou mesurer l'ampleur, la fréquence et la durée de l'exposition à l'acrylamide, ainsi que l'importance et les caractéristiques de la population exposée.**

Il existe en France une veille réglementaire de la contamination des aliments. Les données de consommation alimentaire (études INCA : études individuelles nationales des consommations alimentaires) ont permis de déterminer les contaminants auxquels étaient exposés les consommateurs. Ces estimations sont primordiales pour évaluer les risques de la population et orienter la gestion de ces risques au niveau national. Elles peuvent être corroborées par des EAT dont l'objectif est d'évaluer les expositions par voie alimentaire aux agents microbiologiques, chimiques et physiques dans les aliments « tels que consommés ». Ces études s'appuient sur une méthode standardisée et validée par l'OMS.

En 2006, l'ANSES a mis en place une étude de l'alimentation totale, l'EAT2. L'acrylamide faisait partie des 445 substances recherchées dans l'alimentation française lors de cette étude, de 2006 à 2010 (50).

Les résultats de l'EAT2 ont révélé la présence d'acrylamide dans 11% des 192 échantillons analysés et ils n'ont pas permis d'écartier un risque pour certains groupes de consommateurs. Ainsi, de nouvelles études épidémiologiques s'avèrent indispensables pour continuer la surveillance de l'exposition à l'acrylamide.

Par ailleurs, d'autres études ont montré que le lait maternel contenait également de l'acrylamide, et que 10 à 50% de l'acrylamide alimentaire chez les femmes enceintes était transféré *via* la circulation sanguine jusqu'au placenta et au fœtus (51).

En Europe, la moyenne ajustée d'acrylamide consommé varie de 13 à 47 µg/jour chez les hommes et de 12 à 39 µg/jour chez les femmes. Sur la base de la quantité consommée par kilogramme de poids corporel, les enfants représenteraient davantage une population à risque que les adultes (52). Plus de la moitié de l'exposition à l'acrylamide en Europe provient de la consommation de pain, de pain suédois, de biscottes, de café et des pommes de terre (49).

Toutefois, ces méthodes d'estimation des expositions présentent des limites. La majorité des études épidémiologiques se sont basées sur des questionnaires de fréquence alimentaire, traduisant des expositions ponctuelles et pas nécessairement stables au cours du temps, d'autant plus que les habitudes de consommation peuvent varier en fonction de la saisonnalité, des prix, et des nouveaux aliments qui arrivent sur le marché chaque année. Ces questionnaires peuvent donc conduire à des biais d'analyse et produire des erreurs de classification.

Pour les longues maladies comme le cancer, les méthodes d'évaluation de l'exposition capables de refléter les expositions à long terme sont vivement recommandées. Les futures études d'évaluation de l'exposition à l'acrylamide d'origine alimentaire, incluant la recherche des adduits à l'hémoglobine tous les trois mois, en parallèle d'outils d'évaluation alimentaire améliorés sont fortement préconisées. Avant d'avoir des méthodes améliorées d'évaluation d'exposition, les études épidémiologiques évaluant la relation entre l'acrylamide alimentaire et le cancer ne permettront pas d'interprétations significatives (53).

#### **d) Caractérisation du risque**

La caractérisation de risque repose sur la collecte et la fusion de toutes les informations provenant des étapes précédentes pour déterminer le risque actuel d'exposition à l'acrylamide. Cette étape se base sur l'expertise de l'évaluateur dans l'analyse de l'information. Cela reflète une combinaison d'exposition et d'évaluation de dose-réponse, et représente une étape intermédiaire entre l'évaluation du risque et la gestion de risque. L'exposition est comparée à la Dose Journalière Admissible (DJA).

En comparant la  $BMDL_{10}$  à l'exposition alimentaire de l'Homme à l'acrylamide, les scientifiques peuvent indiquer un niveau de préoccupation sanitaire connu sous le nom de « marge d'exposition » (ME). L'estimation de la ME ne permet pas, toutefois, de quantifier le risque avec précision.

L'utilisation de la ME constitue un outil d'aide de gestion de risque pour définir les éventuelles actions nécessaires afin de maintenir l'exposition à ces substances à un niveau aussi bas que possible.

Concernant les substances **généotoxiques et cancérigènes**, les experts de l'EFSA ont stipulé qu'une ME de 10.000 ou plus est peu préoccupante pour la santé humaine. Pour l'acrylamide, les ME en matière de cancer varient de 425 pour les consommateurs adultes moyens à 50 pour les enfants en bas âge avec une consommation élevée. Ces données confirment donc une préoccupation pour la santé publique.

Quant aux substances **non génotoxiques**, une ME de 100 ou plus indique normalement qu'il n'y a pas de préoccupation à avoir pour la santé publique. L'intervalle des ME pour les effets neurologiques est compris entre 1075 pour les consommateurs adultes moyens et 126 pour les enfants en bas âge ayant une consommation élevée.

Finalement, en se basant sur les données de caractérisation du risque, l'EFSA a indiqué que les effets nocifs possibles de l'acrylamide sur le système nerveux, sur le développement pré- et post-natal et sur le système reproducteur masculin ne sont pas considérés comme préoccupants aux niveaux actuels d'expositions. Cependant, les enfants et les enfants en bas âge présentant une exposition alimentaire élevée, la ME est proche des valeurs qui pourraient être préoccupantes en rapport avec ces effets (35).

## **B) Gestion du risque et réglementation en vigueur**

Jusqu'à il y a peu de temps, la gestion de risque de l'acrylamide dans les denrées alimentaires reposait sur un principe de collaboration volontaire impliquant les agences de sécurité réglementaires européennes et des entreprises productrices d'aliments contenant de l'acrylamide.

Désormais, le **règlement européen UE 2017/2158** établi en novembre 2017, et applicable depuis avril 2018, définit les teneurs de référence pour la présence d'acrylamide dans les denrées alimentaires (**Tableau 3**) (54).

**Tableau 3** : Teneurs de référence en acrylamide dans les denrées alimentaires (d'après le règlement UE 2017/2158 du 20 novembre 2017, Journal Officiel de l'Union Européenne)

Denrée alimentaire	Teneurs de référence [µg/kg]
Frites (prêtes à la consommation)	500
Chips obtenues à partir de pommes de terre fraîches et de pâte de pommes de terre	750
Crackers à base de pommes de terre	
Autres produits à base de pommes de terre obtenus à partir de pâte de pommes de terre	
Pain (panification humide)	
a) Pain à base de blé	50
b) Pain (panification humide) autre que le pain à base de blé	100
Céréales pour petit-déjeuner (à l'exception du porridge)	
— produits à base de son et céréales complètes, grains soufflés au pistolet	300
— produits à base de blé et de seigle <sup>(1)</sup>	300
— produits à base de maïs, d'avoine, d'épeautre, d'orge et de riz <sup>(1)</sup>	150
Biscuits et gaufrettes	350
Crackers, à l'exception des crackers à base de pommes de terre	400
Pain croustillant	350
Pain d'épice	800
Produits comparables aux autres produits appartenant à cette catégorie	300
Café torréfié	400
Café instantané (soluble)	850
Succédanés de café	
a) Succédanés de café obtenus uniquement à partir de céréales	500
b) Succédanés de café obtenus à partir d'un mélange de céréales et de chicorée <sup>(2)</sup>	
c) Succédanés de café obtenus uniquement à partir de chicorée	4 000
Denrées alimentaires pour bébés, préparations à base de céréales destinées aux nourrissons et aux enfants en bas âge, à l'exception des biscuits et des biscottes <sup>(3)</sup>	40
Biscuits et biscottes pour nourrissons et enfants en bas âge <sup>(3)</sup>	150

En vue de respecter ces teneurs, les exploitants du secteur alimentaire sont tenus de mettre en place les procédures nécessaires, en modifiant les procédés de fabrication ou en changeant les paramètres de production et/ou la composition de leurs produits, sans toutefois compromettre la qualité et le prix de leurs aliments.

En effet, l'acrylamide, produit de la réaction de Maillard, est indispensable à la couleur, au goût, à la saveur et à la texture des aliments. Réduire sa présence dans les aliments autant que possible tout en maintenant leurs caractéristiques qualitatives et gustatives constitue un important défi pour de nombreux industriels (49).

En outre, il est essentiel d'admettre que l'éviction totale de l'acrylamide des aliments est quasiment impossible ; le principal objectif doit être la diminution des quantités d'acrylamide formé dans un produit donné. Toutefois, la connaissance actuelle indique que pour certains types de produits, le résultat final dépend fortement des variations naturelles des matières premières utilisées.

Dès la découverte de la présence d'acrylamide dans l'alimentation, les industriels du secteur alimentaire et les instances de réglementation ont réalisé une « boîte à outils » afin de lister et détailler les méthodes possibles pour réduire la quantité d'acrylamide dans leurs produits. Ce projet a été coordonné par la fédération européenne de l'industrie agroalimentaire (*Food Drink Europe*) et a vu le jour en 2011. Cette boîte à outils est destinée aux opérateurs pour qu'ils puissent choisir la méthode la plus adaptée en fonction de la denrée considérée (**Tableau 4**).

Il existe **quatre** types de méthodes (**Figure 7**) :

- la sélection de matières premières contenant des teneurs réduites en précurseurs d'acrylamide
- l'adaptation de la recette
- l'adaptation du procédé de fabrication
- la mise en place de recommandations de préparation finale de la denrée par le restaurateur ou le consommateur

**Tableau 4 : Méthodes de réduction pour les biscuits, crackers et les pains croustillants**

(d'après *Toolbox, Food Drink Europe, 2011*)

Sélection des matières premières	Conception de la recette	Conception du process	Qualité des produits finis
<ul style="list-style-type: none"> <li>La composition en sucres des céréales n'est pas un facteur déterminant dans la formation d'acrylamide</li> <li>Les sols ne contenant pas de soufre ont un impact important sur la concentration en asparagine libre de certaines cultures céréalières. Une baisse du soufre dans le sol a pour conséquence d'augmenter la concentration en asparagine des cultures et donc augmente donc le risque de formation d'acrylamide. Le blé cuit préparé à partir de farine pauvre en soufre peut impacter sur le spectre des composés aromatiques et donc sur les propriétés organoleptiques du produit.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Certains ingrédients prétraités peuvent déjà contenir des niveaux élevés en acrylamide et pourraient donc avoir une incidence sur la concentration en AA dans le produit fini.</li> <li>Lorsqu'on utilise des poudres à lever, par exemple dans les biscuits sucrés, le remplacement du bicarbonate d'ammonium peut parfois fonctionner. Les alternatives sont le carbonate de potassium avec du tartrate de potassium ou du diphosphate disodique avec du bicarbonate de sodium.</li> <li>L'asparaginase est à tester par exemple pour certains produits comme le pain d'épice, les pains croustillants et les petits biscuits sucrés.</li> <li>Le fructose utilisé dans des produits tels que le pain d'épice devrait être remplacé par du glucose. Seuls les sirops faibles en glucose et fructose doivent être utilisés.</li> <li>Moins il y a de farine complète dans la recette et moins d'acrylamide sera formé dans le produit fini.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Une cuisson plus longue à basse température aboutissant à une même humidité finale est efficace pour réduire l'acrylamide dans certains produits. Le temps de cuisson des produits sur les lignes dépendra du taux d'humidité.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Il peut y avoir un impact sur la perte d'épaisseur, sur la saveur ou sur la texture. Si des sels de sodium sont utilisés comme alternative il faut porter attention à ne pas se retrouver avec un excès de sodium dans le produit fini.</li> <li>Le produit sera inévitablement moins coloré, et aura une couleur moins dorés.</li> <li>Prenez soin de cuire suffisamment le produit car sinon cela peut engendrer des problèmes microbiologiques pendant le stockage.</li> <li>Les produits à base de farine complète sont souhaitables sur le plan nutritionnel et également sur l'aspect organoleptique.</li> </ul>

Des brochures récapitulatives ont été publiées dans toutes les langues de l'Union Européenne. Elles sont mises à jour régulièrement selon l'évolution des connaissances.

Les quatre méthodes élaborées et listées dans la boîte à outils permettant de réduire l'acrylamide dans l'alimentation sont détaillées ci-après (55) :

- **la sélection de matières premières contenant des teneurs réduites en précurseurs d'acrylamide** : l'effet va dépendre des niveaux relatifs en précurseurs. En effet, il a été montré que la formation d'acrylamide est proportionnelle à la concentration en sucres réducteurs contenus dans la pomme de terre tandis que dans les céréales, telles que le seigle et le blé, la formation d'acrylamide est proportionnelle à la teneur en asparagine.

D'autres paramètres peuvent modifier les teneurs en précurseurs dans les matières premières. Le stockage des matières premières peut amplifier les quantités de sucres réducteurs, comme c'est le cas pour les pommes de terre ayant été conservées à de basses températures. L'usage d'engrais azotés et soufrés impacte à la fois les concentrations en sucres réducteurs et en asparagine dans les pommes de terre ainsi que dans les céréales.

- **l'adaptation de la recette** : modification du pH et des ingrédients, dans la mesure du possible

## - l'adaptation du procédé de fabrication :

→ Sur le procédé en tant que tel : la réduction de la température de cuisson a été envisagée pour diminuer la quantité d'acrylamide produit. Toutefois, la réaction de Maillard étant à l'origine de la saveur appétissante des aliments cuits, les propriétés organoleptiques peuvent être impactées négativement lorsque le temps de cuisson est sensiblement réduit.

Outre la température de cuisson, le pH jouant également un rôle important, plusieurs études ont cherché à **réduire le pH** par l'adjonction d'acide citrique. Si la formation d'acrylamide a effectivement baissé, la qualité du produit final l'a également été.

→ Utilisation d'additifs : la **glycine ajoutée** avant chauffage va rivaliser avec l'asparagine pour diminuer la quantité finale d'acrylamide. Cependant, cette méthode a également des effets négatifs quant aux propriétés organoleptiques du produit, puisque la glycine va réagir avec les sucres réducteurs pour augmenter les taux de molécules responsables de l'odeur.

L'ajout de cations divalents tels que le calcium  $\text{Ca}^{2+}$ , et d'ions monovalents comme le sodium  $\text{Na}^+$  à de faibles concentrations est également susceptible de réduire la concentration finale d'acrylamide. L'ajout d'antioxydants a été étudié, mais a produit des effets variables, en raison de la grande diversité d'antioxydants disponibles.

→ Méthodes de fermentation : elles se basent sur l'utilisation de micro-organismes spécifiques pour consommer l'asparagine ou les sucres réducteurs avant l'étape de fabrication. En plus de diminuer le pH, les bactéries lactiques vont réduire la teneur en sucres réducteurs dans la préparation. La température et le pH doivent être contrôlés afin de maximiser l'activité du micro-organisme.

Cette approche est considérée comme efficace puisque l'asparagine n'est pas essentielle à l'obtention de la couleur et de la saveur finales des produits ; les caractères organoleptiques seraient donc conservés.

- **l'utilisation de procédés de post-production** et la mise en place de recommandations de préparation finale de la denrée par le restaurateur ou le consommateur

L'**asparaginase** (L-asparagine amidohydrolase) est une enzyme largement répandue chez les animaux, les plantes et les organismes vivants, et transforme l'asparagine en acide aspartique. L'utilisation d'asparaginase constitue un moyen efficace dans la réduction d'acrylamide dans l'industrie agro-alimentaire. Les effets indésirables du

traitement par asparaginase sur les propriétés organoleptiques des aliments et la nécessité d'obtenir une quantité suffisante d'enzyme sont des perspectives de recherches futures (52).

En effet, la production d'asparaginase est complexe et son rendement faible. Jusqu'à présent, aucun moyen n'a été spécifiquement établi pour une production optimale d'asparaginase à partir de différents micro-organismes. La production d'enzyme est spécifique à chaque organisme et dépend de l'optimisation de certaines conditions (55).

Il est possible d'agir également sur la préparation finale destinée à la consommation en tenant compte des instructions de cuisson ainsi que sur la coloration du produit.



**Figure 7 :** Outils destinés aux industriels pour réduire la production d'acrylamide dans les denrées alimentaires (d'après webinar « *Acrylamide, une nouvelle réglementation* », Association Nationale des Industries Alimentaires, 2018)

Finalement, il revient à l'industriel de choisir les outils les mieux adaptés aux spécificités du procédé de fabrication et du produit.

En 2016, un plan de surveillance a été mis en place en France et appliqué dans 222 établissements. Lors des contrôles effectués, l'acrylamide était présent dans 148 échantillons, dont 4 présentaient une teneur en acrylamide supérieure à la valeur indicative définie par la **recommandation 2013/647/UE du 8 novembre 2013** (deux échantillons de frites prêtes à être consommées, un de chips et un de chicorée torréfiée) (56).

Ces résultats ont mené à une demande d'application de bonnes pratiques destinées à réduire la formation d'acrylamide. Les chips ayant été fabriquées en Espagne, les autorités espagnoles ont été informées du résultat des analyses. L'enquête a également permis de sensibiliser les opérateurs, restaurateurs et PME en particulier, qui méconnaissaient trop souvent ce danger.

En conclusion, depuis sa découverte dans les aliments en 2002, l'acrylamide a fait l'objet de nombreux travaux de toxicologie par les scientifiques et par les experts de l'EFSA. L'évaluation du risque lié à la présence d'acrylamide dans l'alimentation a abouti à la mise en place de recommandations européennes successives, et en novembre 2017, d'un règlement fixant la teneur en acrylamide dans les différents types de denrées concernées, ainsi qu'un plan de gestion de risque robuste pour inciter à la diminution d'acrylamide à tous les niveaux de la chaîne alimentaire afin de garantir la sécurité du consommateur final.

Parmi ces méthodes de réduction de l'acrylamide en amont de la présentation de l'aliment au consommateur, la piste du rôle du microbiote intestinal, et notamment des lactobacilles, dans la prise en charge de l'acrylamide **ingéré**, a été particulièrement étudiée depuis quelques années. C'est ce que nous allons présenter dans une deuxième partie.

## **PARTIE 2 : Microbiote intestinal : rôle des lactobacilles dans la prise en charge de l'acrylamide d'origine alimentaire**

Il y a plus de 2000 ans, Hippocrate affirmait : « toute maladie commence dans l'intestin » désignant déjà l'intestin comme un « organe » primordial pour la santé humaine. Ses 200 m<sup>2</sup> de surface, soit l'équivalent d'un court de tennis, sont le siège d'une abondante colonisation bactérienne (57). L'écosystème composé de ces bactéries commensales est appelé microbiote. Il apparaît de plus en plus clairement qu'il joue un rôle indispensable dans le maintien de la santé humaine tant au niveau local que systémique, comme nous le détaillerons ci-après.

### **I. Définition et présentation**

Le microbiote désigne l'ensemble des microorganismes (bactéries, levures, champignons, protistes) vivant en symbiose avec leur hôte (animal ou végétal). On distingue différents microbiotes en fonction de la localisation de ces microorganismes : cutané, ORL, bronchique, intestinal, vaginal, urinaire. Chaque microbiote est composé d'un grand nombre d'**espèces différentes** s'organisant en **réseau trophique**. Avec environ **100 000 milliards de microorganismes**, le **microbiote intestinal** est le plus important et le plus varié des microbiotes humains. D'un poids avoisinant les 2 kilos, il est plus lourd que notre cerveau (58).

#### **1. Composition du microbiote intestinal**

Le **microbiote intestinal** est constitué de **10<sup>14</sup> micro-organismes** (c'est-à-dire 10 fois le nombre total de cellules du corps humain) organisés en moyenne en **160 espèces bactériennes par individu**, qui sont elles-mêmes réparties en **4 phyla majeurs** : Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria et Proteobacteria. Ces phyla représentent à eux seuls 80 à 90% des espèces bactériennes du microbiote intestinal.

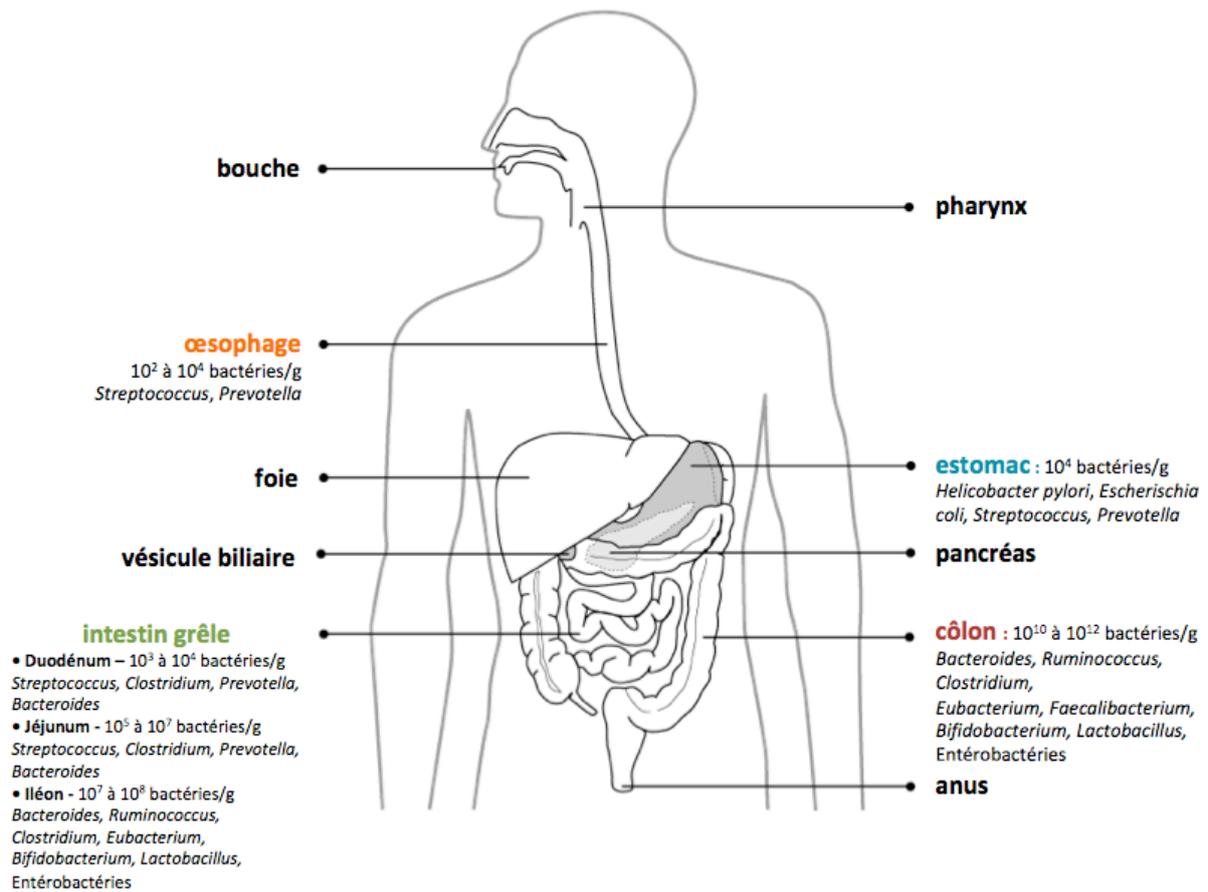
Le phylum le plus vaste est celui des **Firmicutes** comportant plus de 200 genres différents, avec notamment les genres *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*. Les Firmicutes sont des bactéries à Gram positif, anaérobies et aéro-anaérobies facultatives selon les cas, dont certaines peuvent générer des spores.

Le phylum des **Bacteroidetes** comprend des bactéries à Gram négatif, il est également important en nombre et se compose principalement des genres *Bacteroides*, *Prevotella*,

*Porphyromonas*. Celui des **Actinobacteria** est composé de bactéries à Gram positif avec comme principaux représentants le genre *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*. Les phyla Bacteroidetes et les Actinobacteria sont tous deux anaérobies mais incapables de former des spores.

Toutefois, il convient de préciser que la composition du microbiote varie tout au long du tractus digestif humain (59).

Au niveau buccal, le microbiote est très diversifié : il est constitué de bactéries aérobies et anaérobies représentant environ  $10^7$  bactéries/ml de salive. De l'œsophage à l'estomac, l'abondance du microbiote évolue progressivement de  $10^2$  à  $10^4$  bactéries par gramme de contenu. Dans l'intestin, la population bactérienne augmente au fur et à mesure que l'on avance vers l'intestin grêle jusqu'à atteindre environ  $10^8$  bactéries au niveau iléal. Entre le côlon proximal et distal, la population microbienne croît d'un facteur 100, du fait de l'augmentation des bactéries anaérobies strictes. Dans le côlon distal et dans les selles, ces bactéries sont 1000 fois plus nombreuses que les bactéries anaérobies facultatives. Il semblerait aussi qu'à ce gradient longitudinal se superpose un gradient radial avec une flore intraluminaire différente de la flore présente dans la couche muqueuse (60).



**Figure 8** : Le microbiote du tractus gastro-intestinal humain (d'après Coudeyras & Forestier, 2010)

L'acidité gastrique n'est pas propice à la colonisation des bactéries, d'où la faible concentration en bactéries au niveau de l'estomac. Au niveau du duodénum et du jéjunum, on retrouve également peu de bactéries (principalement des streptocoques), en raison de l'important péristaltisme intestinal qui empêche la fixation des bactéries. En s'approchant progressivement de l'extrémité terminale de l'intestin grêle, le microbiote devient plus fourni et diversifié. Entre le côlon proximal et distal, la quantité de bactéries est sensiblement identique, avec cependant une prédominance des bactéries anaérobies strictes telles que *Bacteroides* et *Bifidobacterium* 100 fois plus nombreuses que les bactéries anaérobies (61).

Au niveau du côlon, la plupart des bactéries sont des anaérobies strictes (*Bacteroides*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Bifidobacterium*), dont certaines espèces puisent leur énergie de la fermentation, tandis que d'autres espèces plus spécialisées recourent à des réactions d'oxydation et de réduction telles que la méthanogenèse, acétogenèse, réduction du nitrate et du sulfate. Les bactéries du côlon puisent leur énergie à partir des composés alimentaires

qui échappent à la digestion au niveau de l'estomac et de l'intestin grêle (62).

La composition et la diversité bactériennes sont non seulement influencées par leur localisation dans le tractus gastro-intestinal, mais également par d'autres facteurs qui seront détaillés plus loin dans ce travail.

## 2. Entérotypes

Le programme MetaHIT (*Metagenomics of the human intestine tract*), financé par la Commission Européenne et mis en place en 2008, a permis de déterminer trois groupes de microbiotes, appelés « entérotypes ». Un entérotype désigne un groupe de composition bactérienne spécifique chez l'humain, et ne dépend pas de l'origine géographique, ni du sexe, ni de l'état de santé, mais du type de régime alimentaire de l'individu (58). Les entérotypes identifiés sont :

- Le type 1, où les *Bacteroides* prédominent. Cet entérotype correspond au régime occidental riche en viandes.
- Le type 2, dans lequel les *Prevotella* sont présents en grand nombre. Ce profil est caractéristique des régimes riches en glucides.
- Le type 3, caractérisé par une majorité de *Ruminococcus*.

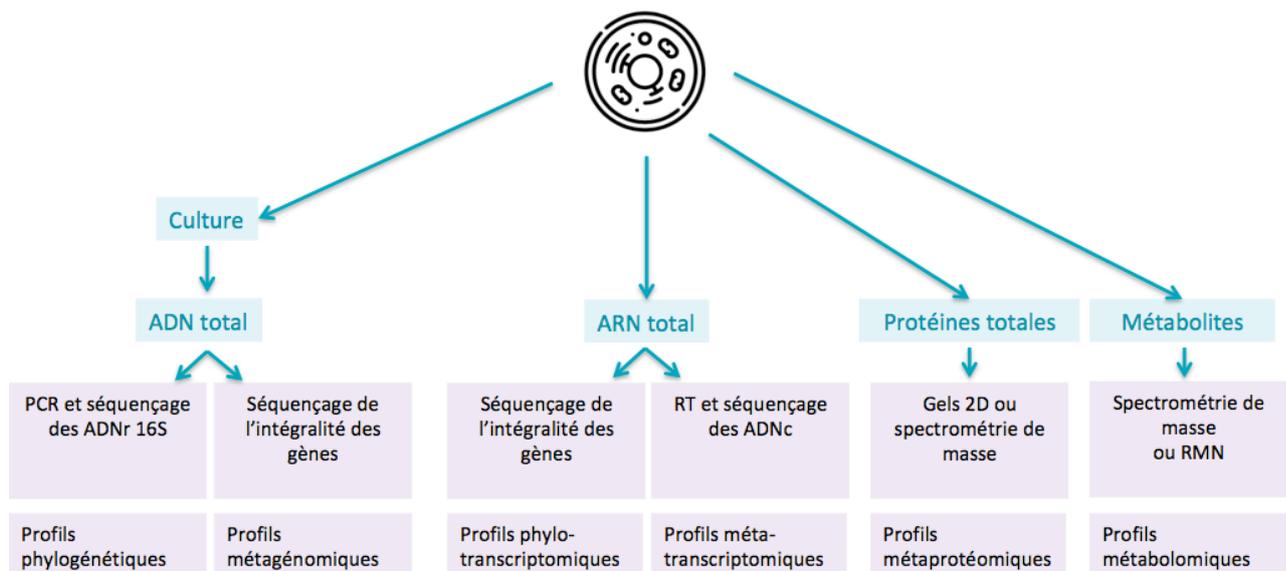
Cette classification constitue un point de départ qui permettra de mieux appréhender quelles altérations du microbiote peuvent être reliées à certaines maladies. Elle reste toutefois débattue dans la communauté scientifique (63).

## 3. Méthodes d'analyse

Au cours de ces dernières années, les avancées technologiques ont révolutionné l'étude du microbiote intestinal. Différentes techniques moléculaires indépendantes de la culture en laboratoire ont fait leur apparition afin de mieux caractériser le microbiote.

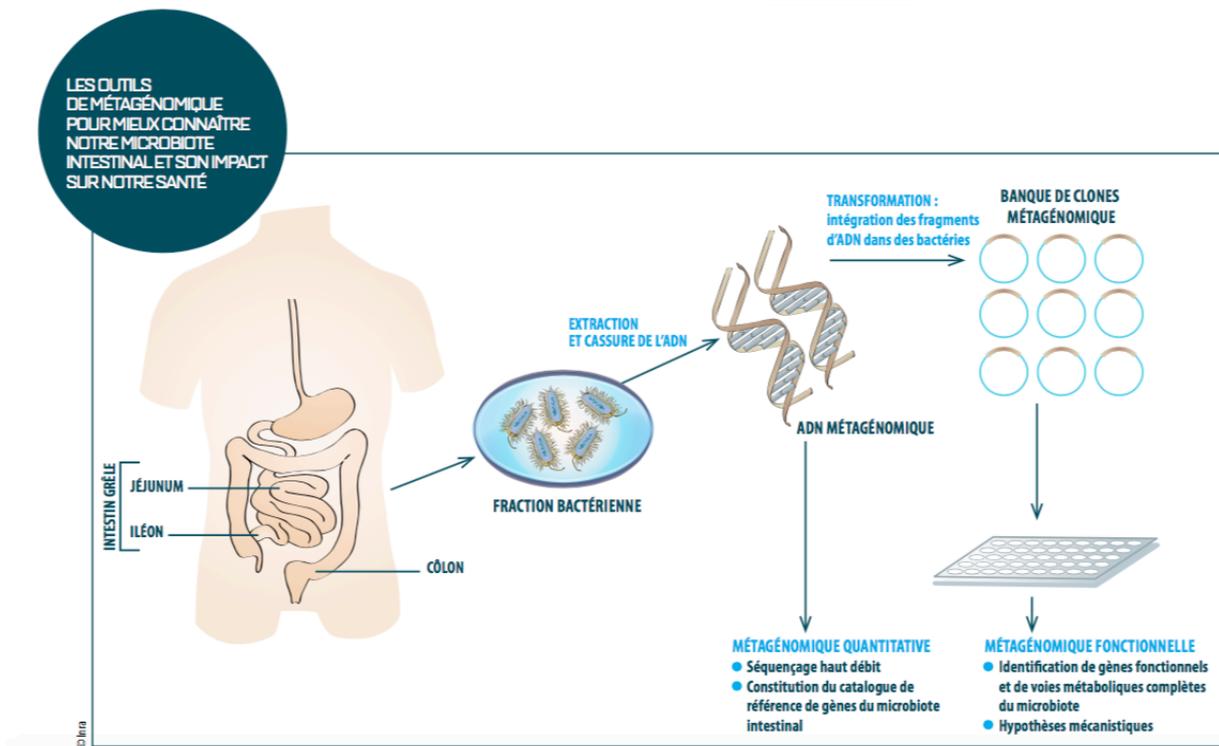
Toutefois, malgré ces progrès techniques, il est important de signaler qu'il existe toujours de nombreux biais résultant de l'extraction de l'échantillon ou des matrices moléculaires.

Les techniques d'identification et de quantification des populations bactériennes composant le microbiote se classent en quatre grandes catégories, en fonction des supports d'analyse (**Figure 9**) : ADN total, ARN total, protéines totales, métabolites.



**Figure 9** : Les différentes techniques d'analyses moléculaires du microbiote intestinal (d'après *Le microbiote intestinal : un organe à part entière*, P. Marteau & J. Doré, 2017)

Parmi ces techniques, l'approche métagénomique s'est rapidement développée grâce aux investissements majeurs en Europe avec le projet MetaHIT. Cette approche récente a révolutionné la connaissance en mettant en évidence l'ensemble des gènes du microbiote intestinal humain dominant, le deuxième génome humain. La connaissance précise de la composition du microbiote à l'échelle des gènes et des espèces par métagénomique quantitative (**Figure 10**) a été possible par le séquençage de fragments d'ADN issus de l'extrait global de l'information génétique des contenus intestinaux. Elle repose sur l'analyse informatique de tous les génomes de l'intestin et permet d'obtenir un répertoire génétique complet de micro-organismes dominants (60).



**Figure 10** : La métagénomique, une technique d'analyse révolutionnaire (d'après *La révolution intestinale*, 2017)

## II. Mise en place et développement

### 1. Naissance, allaitement et enfance

- **Naissance**

Le fœtus *in utero* se développe dans un environnement stérile. Dès la naissance, au contact des micro-organismes environnementaux, et en particulier des microbes du vagin de la mère lors d'un accouchement par voie basse ou de la peau lors d'un accouchement par césarienne, le microbiote du nourrisson se constitue par la colonisation de son intestin.

Les premières bactéries à s'implanter sont les bactéries aérobies-anaérobies facultatives (notamment des staphylocoques, des entérocoques et des entérobactéries). Elles se multiplient rapidement, en consommant de l'oxygène et provoquent ainsi une diminution du potentiel oxydo-réducteur, favorable à l'implantation des genres anaérobies strictes (*Bifidobacterium*, *Bacteroides* et *Clostridium*) dès le troisième jour de vie (64). Le microbiote est ainsi en partie hérité de la mère et en partie influencé par l'exposition environnementale au cours de la première année de vie. La composition du microbiote intestinal à ce stade est relativement simple mais va devenir plus complexe pour ressembler à celui d'un jeune

adulte. Il se stabilisera vers l'âge de deux ans (57).

Il est important de souligner que dans les pays industrialisés il existe un retard dans la colonisation du microbiote intestinal du nourrisson, à cause d'une hygiène périnatale bien plus stricte par rapport aux pays en voie de développement et donc, à un environnement bactérien moins riche et moins diversifié (61). Ces perturbations dès la naissance pourraient constituer un facteur expliquant l'augmentation des allergies et des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin par une mauvaise orientation du système immunitaire intestinal.

- **Allaitement**

L'alimentation du nourrisson conditionne également la composition du microbiote intestinal. En effet, le nouveau-né allaité présente un microbiote plus riche en bifidobactéries et moins diversifié que celui d'un bébé nourri au lait artificiel. La raison en serait la présence d'oligosaccharides bifidogènes (*Bifidobacterium*) dans le lait maternel permettant d'éduquer le système immunitaire du nourrisson (64,65).

Les entérobactéries, les *Clostridium* et les *Bacteroides* s'implantent plus tardivement chez les nourrissons allaités que chez ceux ne tétant pas le sein de leur mère. Ces différences s'équilibrent lors de la diversification alimentaire (66).

## **2. Adulte**

Chez un homme adulte non obèse, deux phyla majoritaires composent le microbiote intestinal, avec un ratio de l'ordre de 10 pour 1 entre les Firmicutes et les Bacteroidetes. Ce ratio tend à diminuer chez les personnes âgées (60).

Le microbiote intestinal chez l'Homme sain est assez stable tout au long de la vie adulte. Toutefois, de nombreux facteurs peuvent altérer la stabilité du microbiote intestinal, notamment le temps de transit des contenus, le pH, l'alimentation, la qualité des mucines endogènes, mais également les traitements médicamenteux.

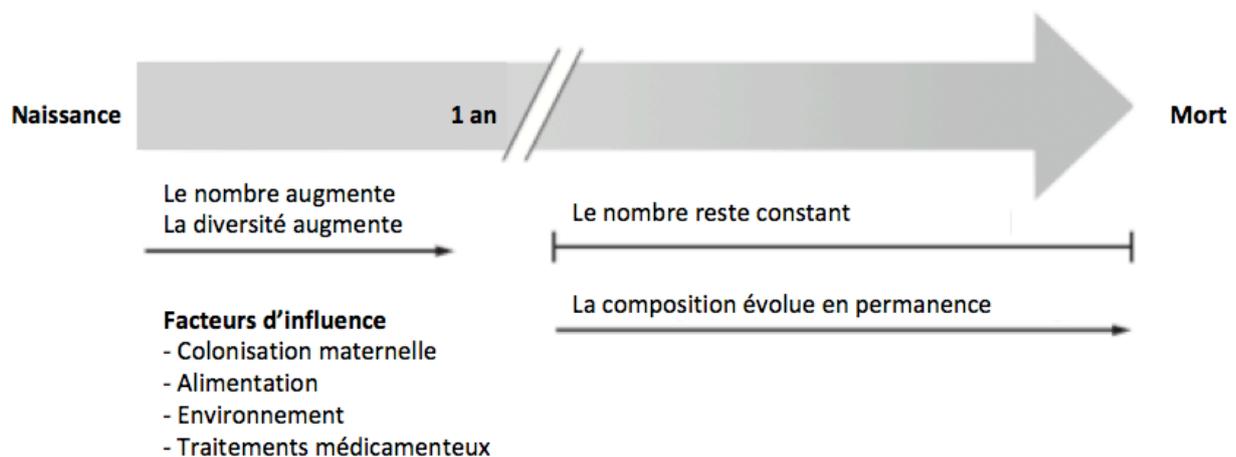
## **3. Adulte âgé (>65 ans)**

Chez les personnes âgées, le microbiote se complexifie : la perte de stabilité engendre l'apparition de nouvelles espèces. Les proportions des grands phyla se modifient : le ratio Firmicutes/Bacteroidetes diminue, tout comme la proportion des différentes espèces du

genre *Bifidobacterium*, appartenant au phyla des Actinobactéries. À partir de 65 ans, on remarque néanmoins une augmentation des *Clostridium*, des entérobactéries et des entérocoques.

La modification des habitudes alimentaires chez les sujets âgés peut influencer sur les substrats disponibles pour le microbiote intestinal et favoriser la croissance de certaines espèces au détriment d'autres.

En outre, l'immuno-sénescence et la sénescence intestinale interviennent dans la modification du microbiote. Ces changements du microbiote induisent des altérations capables de modifier l'homéostasie du système immunitaire, d'activer un état inflammatoire, et contribuer ainsi à un risque accru de maladies et de fragilité (67).



**Figure 11** : Évolution du microbiote intestinal au cours du temps et facteurs influençant la composition microbienne (d'après *Gut microbiota in health and disease*, I. Sekirov et al., 2010)

### **III. Facteurs influençant la colonisation bactérienne**

Initialement, le microbiote du nouveau-né est constitué à partir de l'exposition au microbiote de la mère et de la sélection génétique. Il existe également une proportion significative de colonisation aléatoire.

Par la suite, de nombreux paramètres viennent modifier significativement la composition du microbiote intestinal : il peut s'agir de facteurs intrinsèques (génétique, terme de naissance, mode d'accouchement) et de facteurs extrinsèques (alimentation, médicaments) (66).

#### **1. Terrain génétique**

La prédisposition génétique du microbiote intestinal est un axe de plus en plus étudié, d'autant que l'analyse des populations bactériennes a montré une plus forte similarité du microbiote intestinal chez des jumeaux monozygotes que chez des jumeaux dizygotes (68). Cependant, cette ressemblance se dissiperait avec le temps, en fonction des expositions environnementales et microbiennes de chacun (69).

#### **2. Terme de naissance et mode d'accouchement**

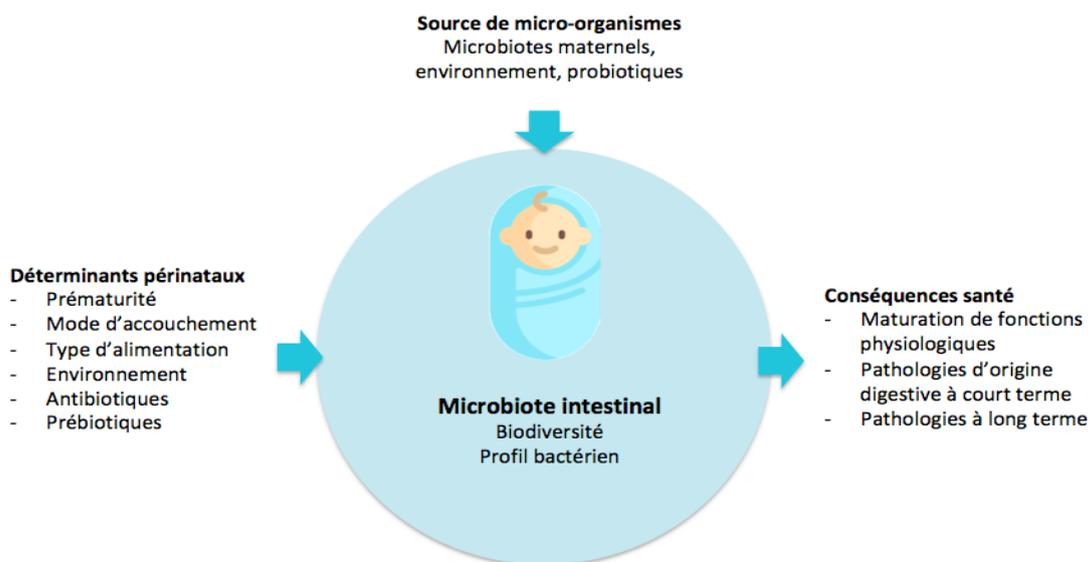
- **Terme de naissance**

Les **nourrissons prématurés** présentent un retard d'implantation de leur microbiote intestinal, et un déséquilibre entre les bactéries anaérobies strictes (normalement dominantes, avec principalement *Bacteroides* et *Bifidobacterium*) et les bactéries aérobies. En outre, ce déséquilibre s'accompagne d'une colonisation par des entérobactéries autres qu'*Escherichia coli*. Le mode d'accouchement par césarienne, plus répandu pour les naissances prématurées, puis la séparation rapide avec la mère pour la mise en couveuses aseptisées et l'antibiothérapie à large spectre souvent associée (théorie hygiéniste) contribuent à ce retard de développement du microbiote chez ces nouveaux-nés.

Ce retard d'implantation influe notamment sur la présence et la qualité des genres anaérobies stricts telles que *Bacteroides* et *Bifidobacterium*. Le profil du microbiote est intimement lié à l'âge gestationnel de naissance. Il est ainsi influencé par l'immaturité de la muqueuse intestinale qui ne permet pas l'implantation de certains genres bactériens (60).

- **Mode d'accouchement**

L'accouchement par voie naturelle permet au nourrisson d'être d'emblée en contact avec le microbiote vaginal (*Lactobacillus*, *Prevotella*) de la mère, permettant ainsi aux bactéries aérobies-anaérobies facultatives (staphylocoques, entérocoques, entérobactéries) de s'implanter en premier. Le potentiel d'oxydoréduction colique étant élevé, l'implantation des bactéries anaérobies (*Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*) semble plus difficile alors que ces bactéries sont pourtant les premières bactéries rencontrées par le nouveau-né. Lors d'un accouchement par césarienne, le nouveau-né est d'abord exposé à l'air de son environnement, d'où la colonisation par les bactéries cutanées de la mère (*Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*), puis une mise en place plus tardive (allant jusqu'à 6 mois) des groupes dominants du microbiote (*Bacteroides*, *Bifidobacterium*) (60,70).



**Figure 12** : Facteurs favorisant l'établissement du microbiote (d'après *Le microbiote intestinal : un organe à part entière*, P. Marteau & J. Doré, 2017)

### 3. Alimentation

Dès les premiers instants de vie, l'alimentation a un rôle primordial sur la composition du microbiote intestinal. L'allaitement maternel permettra une implantation plus importante de bifidobactéries chez le nourrisson, tandis que le nouveau-né nourri au lait artificiel présentera une diversification plus importante du microbiote.

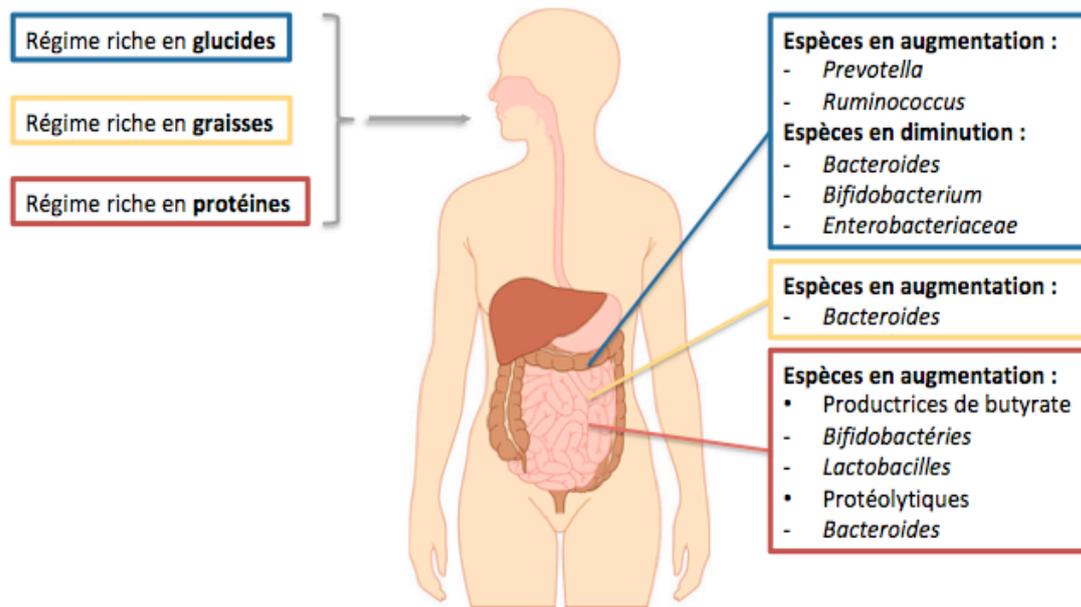
Chez l'adulte, les habitudes alimentaires sont de plus en plus considérées comme l'un des principaux facteurs de diversité de la composition du microbiote intestinal (71).

En effet, les habitudes alimentaires déterminent ce que nos bactéries commensales peuvent consommer ; cela correspond à la façon dont nous « nourrissons » notre microbiote.

Par exemple, une diète riche en polysaccharides entraîne une augmentation des bactéries fermentaires telles que *Prevotella* (**Figure 13**). Une alimentation prédominante en graisses est associée à une multiplication de Bacteroidetes et d'Actinobactéries dans l'intestin. La présence de ces mêmes bactéries est inversement corrélée à une consommation accrue de fibres végétales.

En termes de macronutriments, de nombreuses modifications liées aux diètes occidentales ont engendré une dysbiose microbienne pouvant être corrélée à une fonction cognitive altérée (72).

Néanmoins, les résultats des études divergent et les données sont souvent à interpréter avec prudence. Il existe des biais selon les modèles et les méthodologies utilisés (73,74).



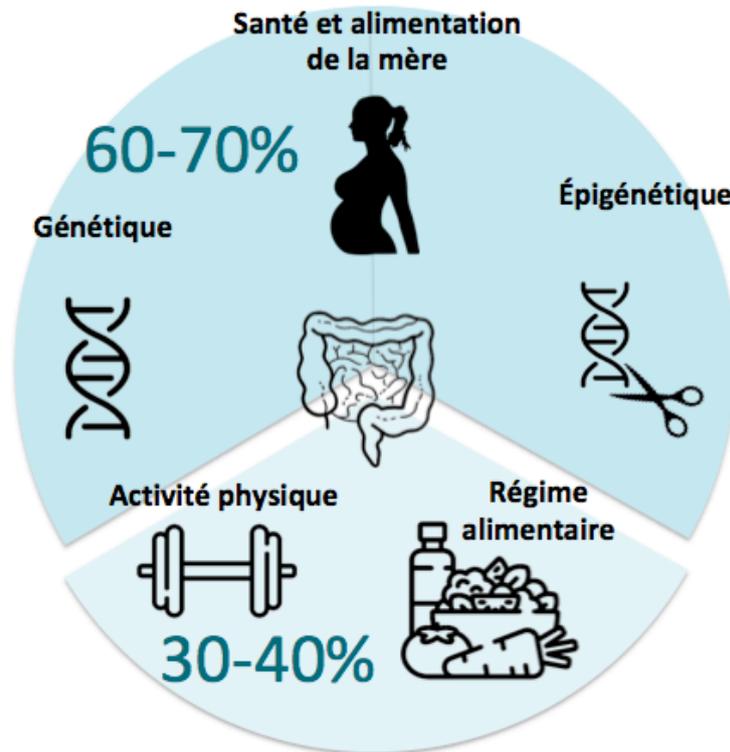
**Figure 13** : Influence de l'alimentation sur le microbiote intestinal (d'après M. Tidjani Allou et al., 2016)

Par ailleurs, de récentes études ont montré la présence de bactéries dans le liquide amniotique, dans le placenta, dans le cordon ombilical et dans le méconium. Ainsi, l'alimentation de la mère avant et pendant sa grossesse influence le développement du microbiote intestinal de son enfant (75).

#### 4. Traitements médicamenteux

Certains traitements thérapeutiques peuvent également modifier la composition bactérienne du tractus digestif. C'est le cas, par exemple, des antibiothérapies à base d'amoxicilline/acide clavulanique. Administrées chez l'Homme *per os* pendant dix jours, elles sont susceptibles de provoquer une diarrhée post-antibiotique et une diminution importante des groupes *Clostridium leptum* et *Clostridium coccoïdes*, et des bifidobactéries. À l'arrêt de l'antibiothérapie, on observe une résolution de la diarrhée et une augmentation des bactéries du genre *Clostridium*.

En outre, les agents chimiothérapeutiques et la radiothérapie ont également une incidence délétère sur l'épithélium intestinal résultant de leur activité pro-apoptotique contre les cellules cancéreuses. Non seulement elles affectent le nombre et la fonction de l'ensemble des cellules intestinales, mais elles induisent également un déséquilibre de la composition du microbiote (69).



**Figure 14** : Facteurs influençant le microbiote intestinal (d'après *Association between the gut microbiota and diet : Fetal life, early childhood, and further life*, D. Kashtanova, 2016)

## **IV. Fonctions**

Le microbiote intestinal est un organe polyvalent qui exerce des fonctions indispensables à la santé de l'hôte.

### **1. Fonctions métaboliques et nutritionnelles**

Le microbiote intestinal exerce des fonctions métaboliques considérables. Il est capable de transformer de nombreux substrats (tels que glucides, lipides et protéines) en une multitude de métabolites nécessaires au corps humain (60). Les micro-organismes extraient leur énergie à partir des glucides et des protéines contenues dans les fibres alimentaires qui, non digérées par l'hôte dans le tractus digestif supérieur, atteignent le côlon. Le régime alimentaire de l'hôte influe donc grandement sur la qualité et la quantité des substrats disponibles. L'énergie produite permet la croissance des bactéries et la production d'une large gamme de métabolites qui seront absorbés et utilisés par l'hôte (76).

### **2. Rôle protecteur**

Le microbiote intestinal assure un rôle important de barrière vis-à-vis des micro-organismes pathogènes. Il est le garant direct du maintien de la lutte efficace contre les pathogènes, *via* la mise en place de plusieurs systèmes : une compétition d'exclusion à travers l'occupation des sites d'adhésion et la consommation de nutriments, la production de substances antimicrobiennes telles que les bactériocines ainsi que la transformation des acides biliaires primaires en secondaires. Le microbiote exerce également un rôle indirect *via* l'activation des cellules de l'hôte. Cette activation permet de maintenir la couche de mucus de la surface apicale des cellules épithéliales, la production de peptides antimicrobiens produits par ces cellules, la sécrétion d'immunoglobulines A dans la lumière intestinale, ainsi que le renforcement des jonctions serrées, contribuant ainsi à la consolidation de la barrière protectrice.

Par ailleurs, le microbiote est impliqué dans le processus de réparation épithéliale grâce à la production de cytokines activant la prolifération des cellules épithéliales et la libération de facteurs cicatrisants (57,69).

### **3. Fonction immunitaire**

Le microbiote joue un rôle essentiel dans la mise en place et la maturation du système immunitaire. La muqueuse intestinale représente en effet la plus grande surface en contact permanent avec les antigènes alimentaires de la lumière intestinale, ainsi qu'avec le microbiote commensal ou en transit. En outre, la densité du tapis du microbiote intestinal recouvrant la muqueuse constitue la plus grande proportion d'antigènes présentés aux cellules immunitaires résidentes et celles stimulant les récepteurs de reconnaissance des motifs tels que TLR et NOD-like des cellules épithéliales intestinales (57,69).

Le microbiote a un rôle fondamental dans le contrôle de l'activation et la maturation des cellules immunitaires intestinales et systémiques *via* l'action des bactéries commensales sur la réponse immunitaire adaptative. Le système immunitaire est également en mesure de réguler en retour la composition et la diversité du microbiote. Ainsi, l'homéostasie repose sur le dialogue entre le microbiote et le système immunitaire inné de l'hôte. Un dérèglement de ce dialogue peut conduire au développement de nombreuses pathologies autres qu'intestinales ou allergiques.

### **4. Fonctions émergentes**

Récemment, des études comparatives entre animaux axéniques (dépourvus de microbiote intestinal et maintenus en conditions stériles) et conventionnels ont révélé que l'absence de microbiote intestinal était associée à une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique ainsi qu'à une altération de la microglie, affaiblissant ainsi les fonctions immunitaires du cerveau (69). Ces études montrent clairement l'importance du rôle des bactéries commensales du microbiote intestinal sur la fonction cérébrale et le comportement.

Par ailleurs, la dysbiose de la fonction intestinale a été associée à des troubles neurophysiques et comportementaux. Certaines bactéries de la flore intestinale auraient un rôle protecteur ou inducteur de maladies inflammatoires, métaboliques et neurologiques (77). Cependant, d'autres études cliniques *in vivo* sont nécessaires pour mieux comprendre le mécanisme du lien entre l'alimentation, le microbiote intestinal et le contrôle du comportement et de la santé mentale (72).

## 5. Fonction détoxifiante

Certains genres de micro-organismes ont fait l'objet d'études pour leur capacité détoxifiante, notamment vis-à-vis des métaux lourds retrouvés dans l'eau potable et dans l'alimentation. C'est le cas des lactobacilles, qui présentent une capacité de liaison importante à certains métaux lourds, en particulier au cadmium, au plomb et au cuivre.

La détoxification est l'aptitude à éliminer les composés toxiques, les composés mutagènes et d'autres agents nocifs au corps humain. Les lactobacilles interviennent au niveau de ce processus de détoxification en se combinant aux métaux pour empêcher leur migration dans le corps, et protéger ainsi leur hôte.

L'étude de Q. Zhai *et al.* (78) sur modèle **murin** a démontré que *Lactobacillus plantarum* est capable d'augmenter les excréctions fécales de cadmium, de réduire l'accumulation tissulaire de cadmium, de réduire la peroxydation lipidique, et de réduire les déficits en systèmes antioxydants pour atténuer la toxicité aiguë du cadmium. En outre, cette étude a montré que certains lactobacilles étaient en mesure d'augmenter l'excrétion fécale de cadmium dans les 24 heures suivant une exposition orale aiguë.

Ces conclusions donnent de nouvelles perspectives pour l'utilisation des lactobacilles chez l'Homme dans des populations soumises à la consommation quotidienne d'eau et de denrées contaminées aux métaux lourds (79).

## **VI. Les lactobacilles : un rôle dans la prise en charge de l'acrylamide alimentaire ?**

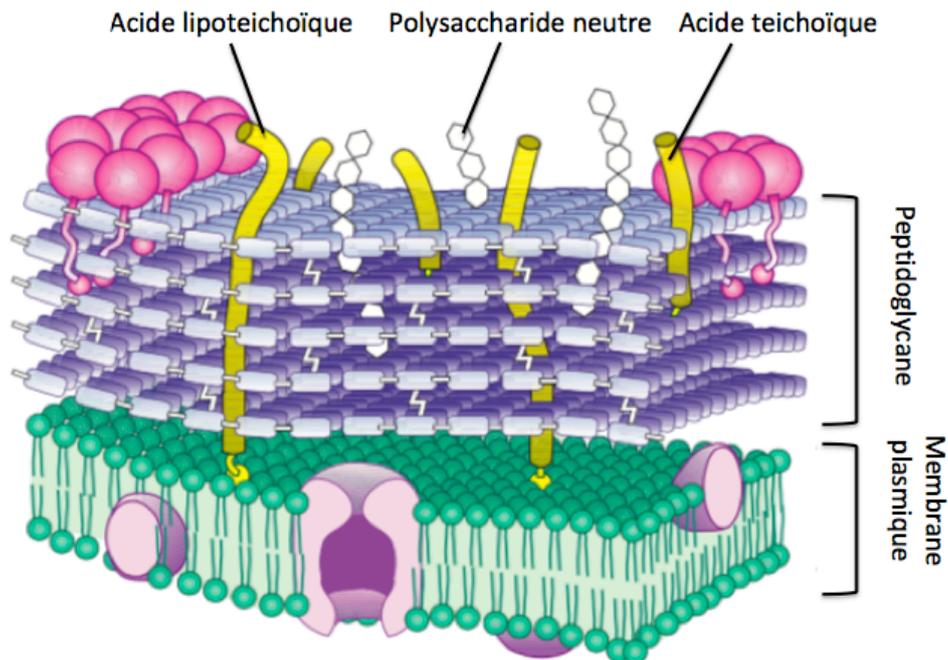
### **1. Les lactobacilles, des acteurs particuliers**

Les lactobacilles appartiennent au phyla des Firmicutes, et font partie des bactéries à Gram positif. Ce sont des bactéries lactiques qui, à quelques exceptions, ne sont pas mobiles car dépourvues de flagelle, non sporogènes, anaérobies et aux besoins nutritionnels complexes (glucides, acides aminés, peptides, lipides, sels et vitamines). Elles évoluent dans des milieux riches en substrats, notamment au niveau des muqueuses intestinales, orales et vaginales des humains et des animaux. Toutefois, si les lactobacilles sont majoritaires au niveau des muqueuses vaginales, ils ne représentent que moins de 1% du microbiote intestinal humain. On les trouve également en grande quantité dans de nombreux aliments fermentés. À ce titre, ils sont régulièrement ingérés en toute innocuité et possèdent un statut particulier reconnu par la réglementation européenne.

La diversité physiologique et fonctionnelle des différentes espèces de lactobacilles selon les niches écologiques où elles résident est très importante. Il existe environ 190 espèces de lactobacilles identifiées, dont seules 15 sont mobiles et possèdent des flagelles fonctionnels. De nombreux représentants sont dits halophiles, c'est-à-dire capables de résister à des conditions extrêmes de dessiccation et à des concentrations élevées en sels. Leurs propriétés multiples en ont fait des candidats probiotiques pour des usages bénéfiques multiples à visée immunitaire et métabolique. Une partie de ces applications repose sur la structure des parois de ces bactéries (80).

- Structure

Les bactéries à Gram positif ont une paroi caractéristique épaisse et homogène, composée majoritairement d'une macromolécule commune à toutes les parois bactériennes : le peptidoglycane. Des polysides tels que les acides teichoïques (polymères de glycérol et de ribitol) et lipoteichoïques s'enchâssent dans cette couche de peptidoglycane et contribuent au maintien de la paroi.



**Figure 15** : Composition de la paroi des bactéries à Gram+ (d'après *The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria*, J. Delcour et al., 1999)

La paroi cellulaire des lactobacilles exerce plusieurs fonctions contribuant aux propriétés bénéfiques des bactéries lactiques, comme par exemple leur liaison aux métaux lourds, évoquée précédemment, comme mécanisme de protection de l'hôte. Les lactobacilles constituent donc une piste intéressante sur le plan de la santé humaine (81).

À l'instar des interactions des lactobacilles avec les métaux lourds et de leur utilisation possible à visée de détoxification, plusieurs études se sont intéressées à l'aptitude de ce type de bactéries à prendre en charge des composés potentiellement toxiques tels que l'acrylamide.

## **2. Des résultats expérimentaux encourageants**

Parmi les études relatives à l'action des lactobacilles dans la détoxification de l'acrylamide, trois d'entre elles sont particulièrement représentatives de l'évolution scientifique de ce sujet. Ces trois études *in vitro* ont fait l'objet d'une analyse détaillée.

### **Article 1 : Metabolism of Maillard reaction products by the human gut microbiota : implications for health : a review, KM Tuohy et al., 2006**

#### **Métabolisme des produits de la réaction de Maillard par le microbiote intestinal humain : conséquences sur la santé (82)**

Le métabolisme bactérien dépend majoritairement des résidus d'aliments retrouvés dans le côlon ascendant. Il existe de plus en plus de preuves quant à l'importance du rôle des bactéries commensales du côlon dans le maintien de la santé, dans l'apport d'énergie à l'hôte, dans l'éducation du système immunitaire et dans la protection vis-à-vis de certaines maladies telles que le cancer du côlon.

Le régime alimentaire occidental est basé principalement sur la consommation d'aliments tels que le pain, les céréales et les en-cas sous forme de barres de céréales, les gâteaux, biscuits, et les pommes de terre cuites ou frites. Ces aliments sont tous issus d'un traitement thermique, au cours duquel se produit la réaction de Maillard, leur attribuant une couleur dorée et une odeur de grillé, caractéristique de la formation de mélanoidines et d'acrylamide.

Se pose alors la question du devenir de l'acrylamide dans l'intestin et l'interaction de ce composé avec les matrices alimentaires et l'impact sur sa biodisponibilité.

Une étude a montré en 2004 que la libération des monomères d'acrylamide à partir des matrices alimentaires peut être fortement modifiée par certains composés tels que l'albumine de l'œuf au niveau intestinal (83) Les auteurs ont conclu que de telles interactions pouvaient réduire l'absorption de l'acrylamide. Toutefois, la biodisponibilité de l'acrylamide au niveau du côlon demeure inconnue, au même titre que la dégradation de l'acrylamide par les micro-organismes commensaux.

Le devenir des produits de la réaction de Maillard *in vivo* concerne notamment les « Produits Terminaux de la Glycation », car ce sont des composés très réactifs et ne peuvent pas être

dégradés par la cellule : ils s'accumulent dans la cellule, pouvant ainsi entraîner un dysfonctionnement.

- **Modèles**

La mesure du métabolisme des produits de la réaction de Maillard (« PRM ») *via* le microbiote intestinal se fait grâce à des systèmes *in vitro*, variant de la simple culture en milieu anaérobie sous contrôle du pH, aux modèles de culture à trois niveaux utilisant le microbiote fécal humain comme inoculum. Ces systèmes ont l'avantage de pouvoir être utilisés pour déterminer la capacité de dégradation des PRM par le microbiote intestinal, avec un accès facilité aux métabolites finaux.

La simulation de la digestion utilise des enzymes mammaliennes amylolytiques, lipolytiques et protéolytiques, puis une dialyse à travers des membranes semi-perméables. Ces PRM digérés peuvent être ensuite utilisés comme substrats dans les systèmes de culture *in vitro*.

Les expériences *in vitro* présentent un certain nombre d'avantages par rapport aux expériences *in vivo*. Premièrement, **les systèmes de culture *in vitro* permettent la détermination des produits finaux métaboliques**, alors que ceux-ci seraient très certainement absorbés *in vivo* et non détectables dans les selles. De plus, la culture *in vitro* utilise un **inoculum humain**, contrairement aux études *in vivo* chez l'animal, qui sont des modèles présentant des différences métaboliques avec le modèle humain. Enfin, les cultures *in vitro* constituent un outil rentable pour **détecter la transformation des PRM** qui, généralement disponibles qu'en faibles quantités, sont inexploitablement pour mener des études animales ou humaines.

Les méthodes *in vitro* utilisent des cultures gnotobiotiques (c'est-à-dire n'ayant pas été en contact avec les microbes extérieurs avant d'être volontairement contaminées par un ou plusieurs micro-organismes définis). Elles permettent de s'affranchir de certaines limites des systèmes *in vitro*, puisqu'elles incluent un inoculum initial animal ou humain. De telles études ont été primordiales pour désigner le microbiote comme un acteur clé de la transformation de mutagènes en dérivés cancérigènes dans les aliments cuisinés. Ces études ont également permis de mesurer le potentiel protecteur de certains aliments contre ces mutagènes d'origine alimentaire. Toutefois, ces études ayant un coût élevé, le devenir des PRM des denrées alimentaires peut être réalisé dans un premier temps à partir d'un criblage *in vitro* directement sur des populations-cible humaines.

Contrairement aux méthodes traditionnelles de culture bactériologique, les **techniques moléculaires** reposant sur l'information phylogénétique encodée par le gène de ARNr 16S, présent chez toutes les bactéries, permettent d'identifier la diversité d'espèces microbiennes.

- **Conclusion**

La réaction de Maillard génère une grande variété de métabolites xénobiotiques de structure variée. **À ce jour, peu de données sont disponibles quant aux relations entre le microbiote intestinal et les PRM ou leurs effets biologiques. Des systèmes *in vitro* et *in vivo* sont désormais utilisés pour explorer ce domaine et élucider les interactions microbiote intestinal-PRM.**

**Article 2 : *In vitro* reduced availability of aflatoxin B1 and acrylamide by bonding interactions with teichoic acids from lactobacillus strains, JC. Serrano-Niño et al., 2015**

**Diminution de la disponibilité de l'aflatoxine B1 et de l'acrylamide *in vitro* par interaction de liaison avec les acides teichoïques de souches de lactobacilles (84)**

Nous allons traiter uniquement les données relatives à l'acrylamide.

Précédemment, plusieurs études ont mis en évidence la capacité de certaines bactéries lactiques à se lier à des composés cancérigènes issus de l'alimentation, parmi lesquels l'acrylamide. Les acides teichoïques de la paroi bactérienne semblent être impliqués dans cette liaison. Toutefois, les mécanismes exacts n'ont pas encore été élucidés.

La structure et la composition des acides teichoïques de la paroi bactérienne varient d'une souche à une autre, et sont impliqués dans la protection, dans l'adhésion des cellules hôtes, dans l'inflammation ainsi que dans l'activation immunitaire. Il a été émis l'hypothèse que ces variations structurelles pourraient expliquer les différences inter- et intra-espèces à se lier à différents xénobiotiques. Ainsi, la nature des acides teichoïques de chaque souche bactérienne définirait sa capacité de liaison aux mutagènes avec différentes affinités. Cependant, les mécanismes exacts restent encore à clarifier.

Le but de ce travail est donc d'évaluer la capacité de liaison à l'acrylamide de 14 souches de lactobacilles, et de déterminer les interactions moléculaires lors de cette liaison avec les acides teichoïques.

- **Modèles**

Les 14 souches de lactobacilles utilisées dans cette étude ont été sélectionnées soit selon leur capacité à se lier à certaines toxines alimentaires soit selon leurs propriétés probiotiques.

- **Résultats**

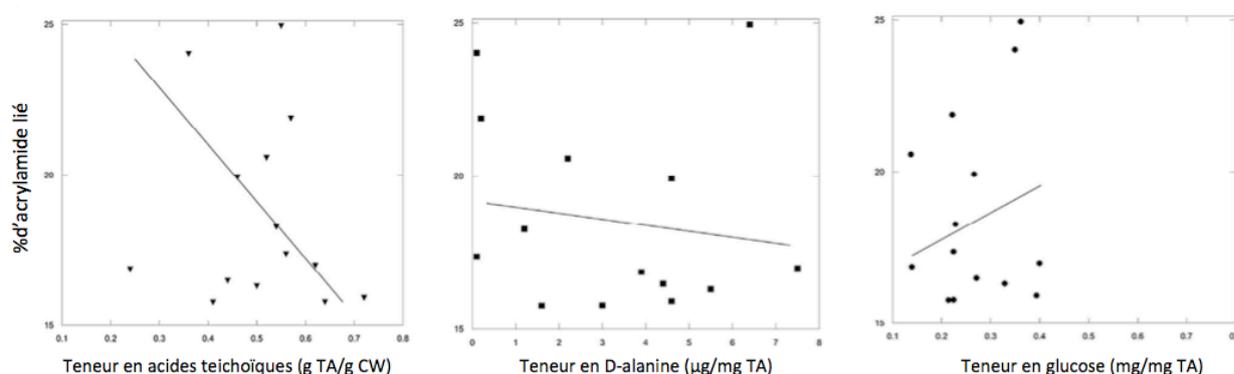
La concentration d'acrylamide libre a été quantifiée par CLHP puis par détection UV.

L'extraction des acides teichoïques (AT) a été réalisée **pendant 72h à 37°C**. Les AT ont été prélevés toutes les 24h. La proportion d'AT extraits variait entre 15 et 26%.

L'analyse de la composition a révélé que les AT issus des souches étudiées étaient constitués de ribitol, de glycérol, de glucose, de D-alanine et de phosphate.

La liaison des AT avec l'acrylamide s'est avérée souche-dépendante. Les taux d'acrylamide lié à t=0h allaient de 11,97 à 18,94%. Après 4h, la souche avec la plus haute capacité de liaison était *Lactobacillus casei* L334 avec un pourcentage de liaison de 28%, tandis que les souches *Lactobacillus reuteri* NRRL 144171 (LR), *Lactobacillus casei* Shirota (**SHI**), *Lactobacillus casei* 12A et *Lactobacillus casei* DCP présentaient **la meilleure capacité de liaison après 12h**.

Malgré un coefficient de corrélation de  $R^2=0,47$  (faible pouvoir statistique), l'analyse des données a montré une affinité à fonction négative entre les composants de la paroi (AT, D-alanine) et le pourcentage d'acrylamide lié. En effet, plus la quantité d'AT ou de D-alanine était élevée, plus le taux d'acrylamide lié diminuait (**Figure 16**).

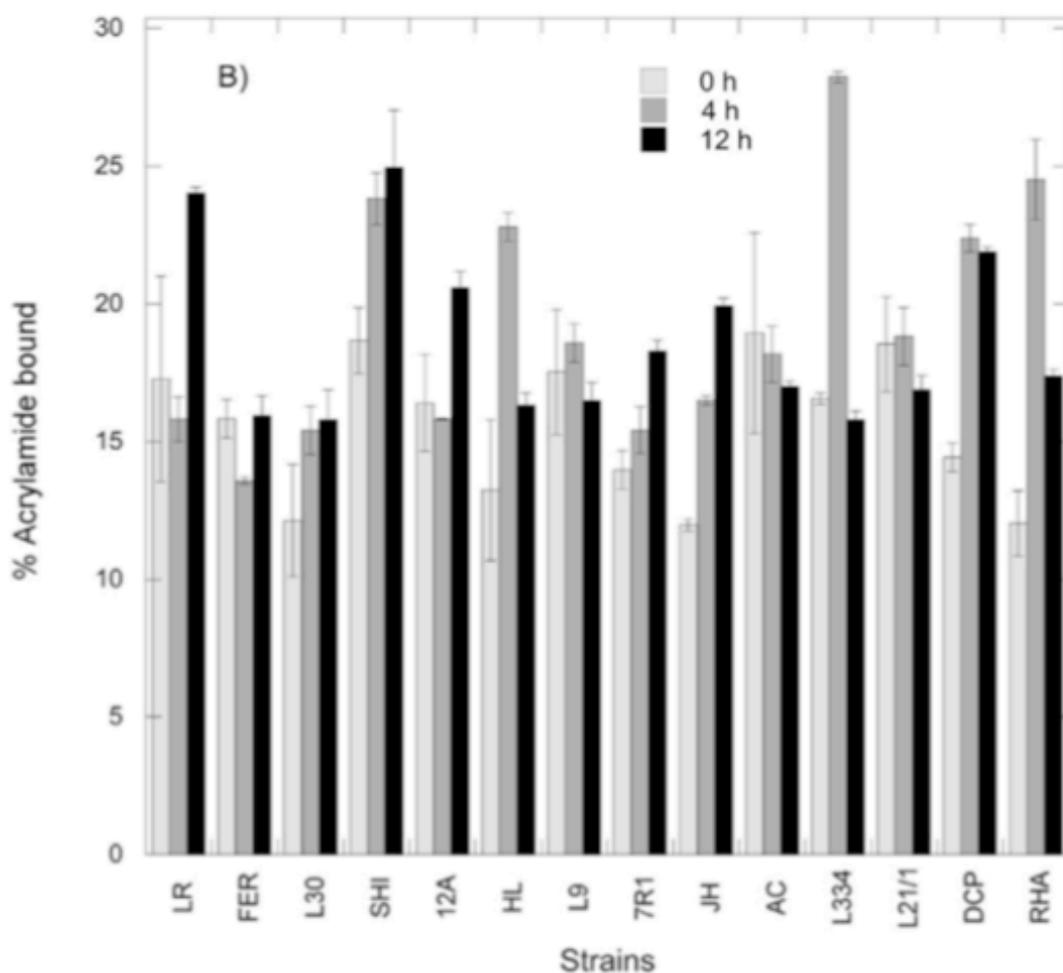


**Figure 16** : Relation entre la teneur en composants de la paroi bactérienne (acides teichoïques, D-alanine, glucose) et le pourcentage d'acrylamide lié

Il est important de noter que l'acide teichoïque constitue plus de 50% de la paroi cellulaire. Toutefois, dans cette étude, le taux maximum d'acide teichoïque extrait de la paroi était de

36%. Ce taux d'extraction peut résulter du délai nécessaire à l'extraction et/ou de la concentration en acide trichloroacétique utilisée pour cette extraction.

Les résultats illustrés dans la **figure 17** montrent que la liaison à l'acrylamide peut avoir lieu rapidement. De plus, la capacité de liaison de certaines souches à l'acrylamide peut augmenter avec le temps d'incubation (SHI, 7R1).



**Figure 17** : Pourcentage d'acrylamide lié par les différentes souches de lactobacilles incubées pendant différents temps (0, 4 et 12h) à 37°C

La paroi des lactobacilles étudiés était principalement constituée d'acides teichoïques à base de glycérol. Chez certaines espèces, la paroi était constituée d'acides teichoïques de ribitol.

Concernant la liaison entre les acides teichoïques et les unités d'acrylamide, l'hypothèse évoquée est que la liaison hydrogène peut se créer entre l'oxygène du groupement carbonyle et le groupe amine entre l'acrylamide et l'alanine du ribitol. De plus, ce groupement amine

de l'alanine pourrait interagir avec l'acrylamide par une addition de Michael.

- **Conclusion**

Les résultats de cette étude ont montré que la chaîne principale d'acides teichoïques de toutes les souches évaluées était formée de polymères de ribitol phosphate, et de quatre structures simplifiées d'acides teichoïques. De plus, une affinité a été mise en évidence entre le taux de liaison d'acrylamide et la composition de certains éléments de la paroi bactérienne tels que les acides teichoïques. Toutefois, il convient de tenir compte de la dispersion du nuage de points obtenus (**figure 16**) qui nuance la corrélation exposée.

Cette étude peut contribuer à expliquer la capacité de liaison des lactobacilles à l'acrylamide pour en réduire sa biodisponibilité.

**Article 3 : Evaluation of acrylamide-removing properties of two *Lactobacillus* strains under simulated gastrointestinal conditions using a dynamic system, L. Rivas-Jimenez et al., 2016**

**Évaluation des propriétés d'élimination de l'acrylamide de deux souches de lactobacilles sous des conditions gastro-intestinales simulées via un système dynamique (85)**

Comme nous l'avons expliqué dans la partie I, les frites et les chips sont responsables de la majorité de l'acrylamide ingéré dans les régimes occidentaux chez les adolescents.

Différentes mesures ont été identifiées pour réduire le contenu en acrylamide dans les denrées alimentaires. Les études de Serrano-Niño (2014, 2015) ont montré que certaines souches de bactéries lactiques, telles que *Lactobacillus reuteri* NRRL 14171 et *Lactobacillus casei Shirota*, avaient une capacité d'élimination de l'acrylamide dans des solutions aqueuses par liaison de la toxine à la paroi bactérienne. Toutefois, aucune étude à ce jour n'a évalué le potentiel de bactéries empêchant l'absorption de l'acrylamide dans le tube digestif.

Ainsi, le but de cette étude était d'évaluer la capacité des souches *Lactobacillus reuteri* 14171 et *Lactobacillus casei Shirota* d'éliminer l'acrylamide alimentaire au sein d'un système dynamique simulant des conditions gastro-intestinales.

- **Modèles**

Un système à trois étages reproduisant respectivement les conditions dans la cavité buccale, l'estomac et l'intestin grêle a été utilisé lors de cette étude. Le côlon n'a pas été retenu puisque l'absorption de l'acrylamide a lieu dans l'intestin grêle.

Contrairement aux études précédentes, ce modèle tient compte :

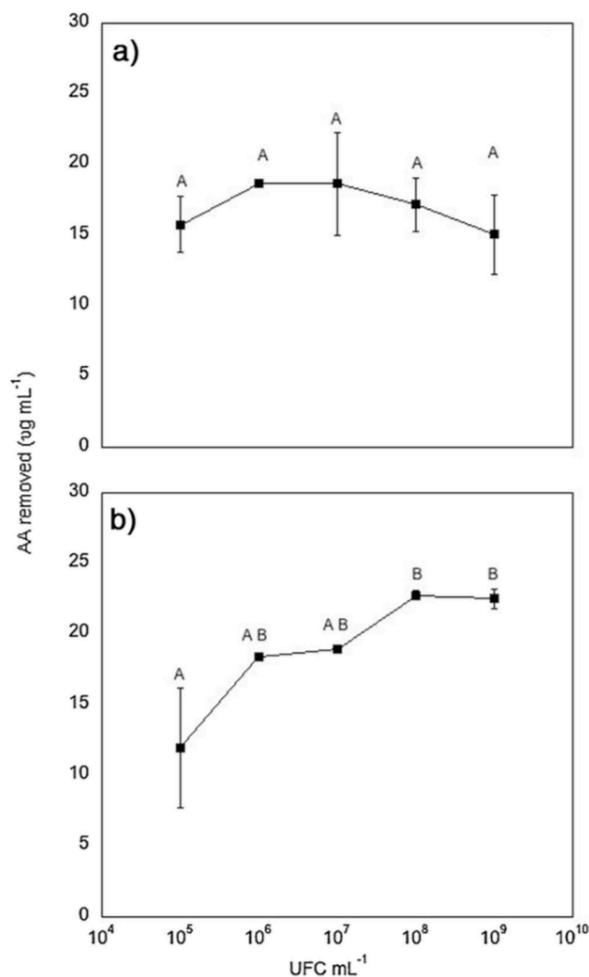
- du micro-environnement mécanique rencontré au niveau des cellules épithéliales de l'intestin
- du débit et de la proportion des sécrétions salivaires, gastriques, pancréatiques et biliaires
- du changement de pH au cours de la digestion
- du temps de transit du chyme régulé par le péristaltisme

L'étude s'est déroulée en conditions physiologiques normales, sous deux cas de figures différents : soit pendant une période de jeûn, soit en phase post-prandiale.

- **Résultats**

Globalement, les deux souches ont évolué de façon similaire : plus la concentration d'acrylamide était faible, plus le pourcentage d'acrylamide éliminé était élevé. De plus, les résultats ont montré que la souche *L. casei* Shirota éliminait plus fortement l'acrylamide que la souche *L. reuteri*, respectivement à 68% et 53%, lorsqu'elles étaient exposées aux plus faibles concentrations de toxine (10 µg d'acrylamide par mL). Aucune différence significative n'a été rapportée sur le taux de toxine éliminée lorsque la concentration d'acrylamide dépassait les 100 mg/mL.

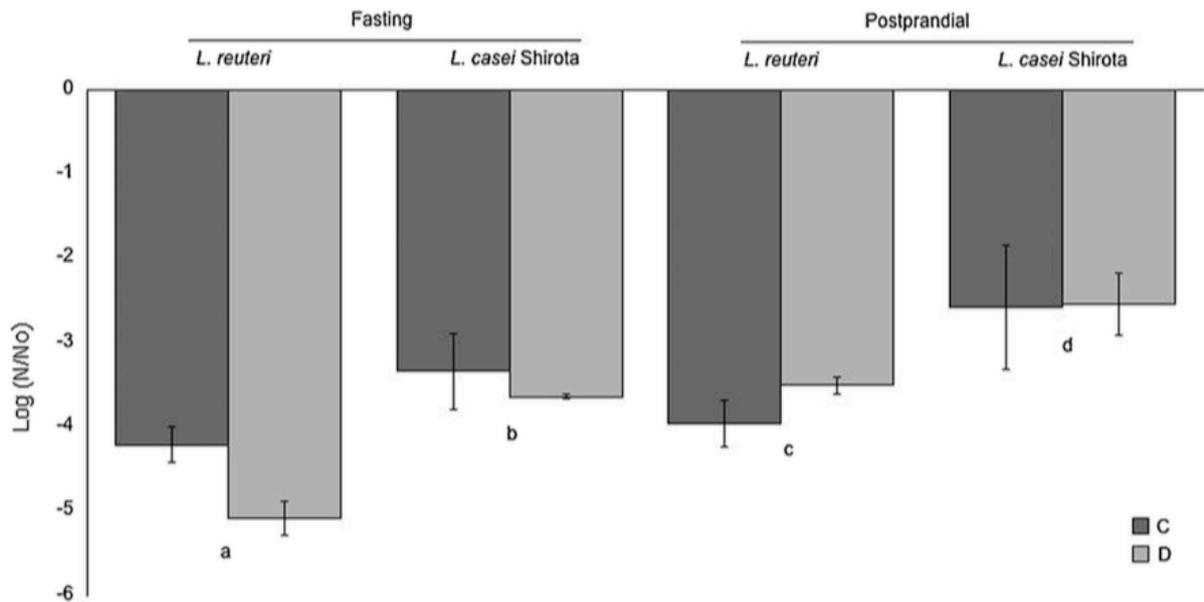
Par ailleurs, aucune différence significative n'a été observée dans la quantité d'acrylamide éliminée (15-18 µg/ml) lors de l'incubation de différentes concentrations de *L. reuteri* ( $10^5$  à  $10^9$  CFU/ml) à une concentration d'acrylamide de 50 µg/ml (**Figure 18a**). En revanche, une augmentation significative de l'élimination d'acrylamide (de 12 à 22 µg/ml) a été détectée à une concentration de *L. casei Shirota* supérieure à  $10^9$  CFU/ml (**Figure 18b**).



**Figure 18** : Effet de la concentration bactérienne sur l'élimination d'acrylamide par *L. reuteri* (a) et *L. casei Shirota* (b). Concentration initiale d'acrylamide : 50 µg/ml, 1h d'incubation à 37°C.

Les deux souches de lactobacilles ont montré des pourcentages distincts quant à la quantité d'acrylamide éliminé, de 30 à 36% pour *L. reuteri* et de 22 à 24% pour *L. casei Shirota*, à une même concentration d'acrylamide.

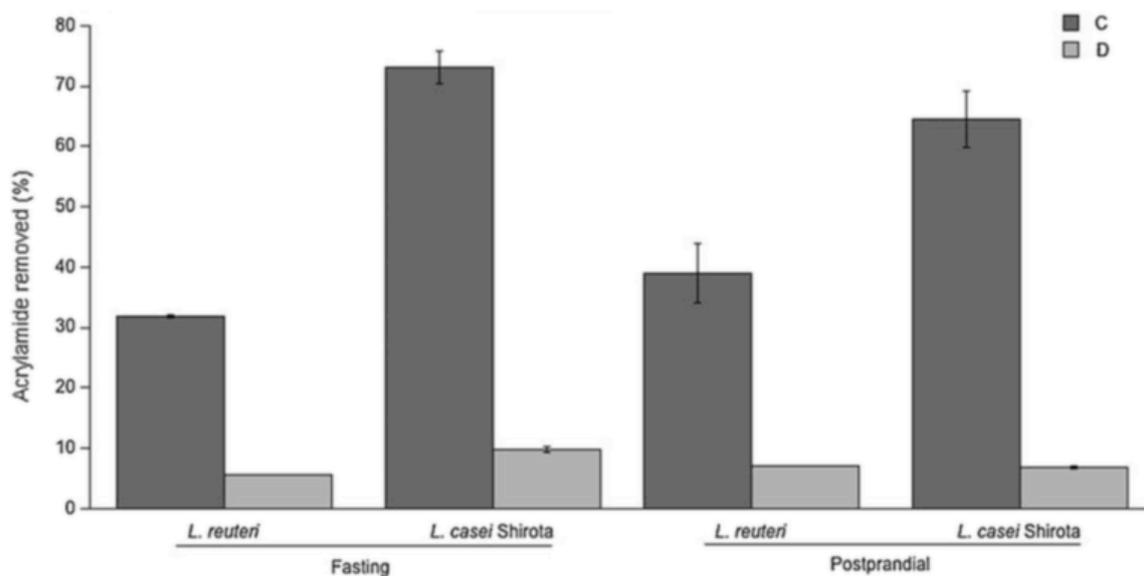
Indépendamment de la marque de pommes de terre utilisée dans cette expérience, les données traduisent une diminution évidente de la viabilité des deux souches de lactobacilles à la fin du processus à trois étages, sans toutefois descendre en dessous de 10<sup>5</sup> et 10<sup>6</sup> CFU/mL, respectivement pour *L. reuteri* et *L. casei Shirota*. *L. reuteri* a montré une plus faible résistance dans les deux situations (**figure 19**).



**Figure 19** : Diminution de la viabilité des deux souches de lactobacilles à la fin des conditions expérimentales, à jeûn et en phase post-prandiale respectivement (d'après *Rivas-Jiménez et al., 2016*)

De plus, la simulation de la période de jeûne a nettement affecté la viabilité des deux souches ; un faible taux de survie a été reporté sous ces conditions.

Les résultats ont montré que les deux souches étaient capables d'éliminer l'acrylamide à la fin du processus digestif simulé (**Figure 20**). Les capacités d'élimination de l'acrylamide sont directement liées à la souche, à la marque du produit alimentaire utilisé comme modèle ainsi qu'aux conditions de digestion.



**Figure 20** : pourcentage d'acrylamide éliminé par *L. reuteri* et *L. casei* à la fin des conditions de jeûn et post-prandiales respectivement, utilisant deux marques différentes de chips comme modèle.

- **Discussion**

Les données issues de cette étude ont mis en évidence l'impact de la concentration en acrylamide sur la capacité d'élimination de l'acrylamide par les bactéries lactiques.

Dans l'étude de Serrano-Niño de 2014, les différentes bactéries des genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* ont montré une capacité d'élimination *in vitro* entre 11,89 et 29,12% à une concentration de 5 µg d'acrylamide/mL. Toutefois, l'ensemble des souches a montré une réduction significative de la capacité de liaison à l'acrylamide lorsque la concentration de la solution s'élevait à 10 µg d'acrylamide/mL.

Ces résultats suggèrent un **phénomène de saturation** : les bactéries auraient un nombre limité de sites de liaison des toxines. D'après l'analyse des parois bactériennes, certains composés des acides teichoïques sembleraient participer à la liaison avec l'acrylamide. Il s'agirait, d'après l'étude de Serrano-Niño de 2015 de groupes hydroxyl de glucose ou de glycérol, impliqués dans les interactions avec les atomes d'oxygène des fonctions carbonyle de l'acrylamide.

Il n'y a pas d'autres études abordant la concentration de bactéries sur l'élimination de l'acrylamide par les bactéries lactiques.

Les résultats de cette étude ont révélé une diminution de la viabilité des bactéries lorsque les souches étaient soumises à une incubation séquentielle dans les sucs gastrique et duodéal. Cette diminution pourrait être attribuée aux différents facteurs de stress existant sous des conditions gastro-intestinales simulées (sécrétions salivaires, gastriques, biliaires, changements de pH, temps de transit et stress mécanique). Des études ont mis en évidence que certaines souches de bactéries lactiques pouvaient être sensibles à la salive, que le pH gastrique et le temps de transit au niveau gastrique pouvait nettement affecter la viabilité bactérienne, tandis que le temps de transit au niveau intestinal n'était pas significatif et que l'action antimicrobienne de la bile avait lieu après le changement de pH dans l'estomac.

Les résultats issus de cette étude utilisant un modèle gastro-intestinal dynamique ont montré que les deux souches de lactobacilles, en particulier *L. casei Shirota* (70% d'élimination) étaient capables d'éliminer l'acrylamide sous différentes conditions gastro-intestinales simulées. La haute capacité d'élimination de *L. casei Shirota* pourrait être due à sa faculté de survie à la fin du processus digestif.

- **Conclusion**

Dans cette étude, la teneur moyenne en acrylamide (34 162 µg/kg) dans les chips à base de pommes de terre dépassait de 34 fois les recommandations de la Commission Européenne de 2013 (valeur indicative pour les pommes chips produites à partir de pommes de terre : 1000 µg/kg). La capacité d'élimination d'acrylamide dépend directement de sa teneur ainsi que de la concentration bactérienne.

Les résultats de cette étude suggèrent que certaines souches de lactobacilles pourraient être utilisées pour réduire l'absorption de l'acrylamide d'origine alimentaire au niveau intestinal. Cependant, il est indispensable de réaliser des études sur des modèles animaux afin de valider l'hypothèse que ces bactéries peuvent agir en tant que barrières biologiques dans l'intestin et réduire la bioaccessibilité et la biodisponibilité de l'acrylamide, et ainsi éviter, ou réduire, ses effets toxiques.

Pour conclure sur l'analyse des trois articles précédents, la réaction de Maillard est à l'origine de métabolites toxiques retrouvés dans l'alimentation occidentale, en particulier dans les produits à base de pommes de terre cuites au delà d'une certaine température (frites, chips).

Ces trois articles mettent en lumière l'évolution de la prise en charge par les lactobacilles de l'acrylamide alimentaire ingéré.

Dès **2006**, une équipe de scientifiques s'est interrogée sur le rôle du microbiote intestinal dans la gestion des produits de la réaction de Maillard, en utilisant des systèmes *in vitro* destinés à mettre en évidence le rôle protecteur des bactéries intestinales vis-à-vis des composés issus de la réaction de Maillard.

En **2014**, l'équipe de Serrano-Niño explore cette piste plus en détail et étudie 14 souches de lactobacilles *in vitro*. L'objectif visait à déterminer les interactions entre les acides teichoïques, composants de la paroi bactérienne des bactéries à Gram positif, et de deux toxines, dont l'acrylamide. Deux souches, *L. reuteri* et *L. casei shirota*, se sont démarquées, en se liant plus fortement à l'acrylamide au cours de l'expérience. Par ailleurs, les auteurs ont conclu sur l'existence d'une relation entre la composition de la paroi bactérienne et l'affinité de la liaison à l'acrylamide. Ce constat a permis d'expliquer la propension des bactéries lactiques à se lier à l'acrylamide. Cet article corrobore ainsi l'hypothèse du rôle des lactobacilles dans la prise en charge de l'acrylamide d'origine alimentaire.

Enfin, en **2016** les auteurs Rivas-Jiménez *et al.* publient un article sur l'étude *in vitro* de deux souches de lactobacilles avec un système élaboré en trois étages reproduisant les conditions dans la cavité buccale, l'estomac et l'intestin grêle. Ce système tient compte de plusieurs paramètres inhérents au système digestif humain. Deux cas de figure ont été étudiés : la période de jeûne et la période post-prandiale, avec des concentrations variables d'acrylamide. *In fine*, cette étude a montré que la capacité d'élimination des deux souches de lactobacilles dépendait directement de la teneur en acrylamide ainsi que de la concentration bactérienne. Ces résultats sont encourageants et ouvrent la voie à une possible utilisation de certaines souches de lactobacilles dans la réduction de l'acrylamide alimentaire ingéré. Toutefois, il conviendrait de réaliser des études similaires *in vivo* sur des modèles animaux afin d'étayer cette hypothèse.

## CONCLUSION

L'acrylamide est un contaminant alimentaire néoformé omniprésent dans de nombreux produits de la consommation quotidienne, et en particulier dans les produits frits à base de pomme de terre, le café, les biscuits, les tartines grillées et le pain de mie.

En 2015, l'EFSA publie sa première évaluation complète des risques associés à l'acrylamide dans les aliments. Ce document mentionne que les effets nocifs de l'acrylamide sur le système nerveux, sur le développement pré et post-natal et sur le système reproducteur masculin ne sont pas considérés comme préoccupants aux niveaux actuels d'exposition, sachant que la moyenne ajustée d'acrylamide consommé en Europe est de 13 à 47 µg/jour pour les hommes, et de 12 à 39 µg/jour pour les femmes. Les enfants représentent cependant une population à risque, sur la base de la quantité consommée par kilogramme de poids corporel.

Les études de cancérogenèse menées sur des modèles animaux ont démontré la génotoxicité et la cancérogénicité de l'acrylamide et de son métabolite, le glycidamide. Toutefois, les données issues des études sur des modèles humains n'ont pas apporté de preuves suffisantes quant à la corrélation entre acrylamide et apparition de cancer, ni sur la reprotoxicité. Ces méthodes rétrospectives présentant des biais d'analyse, il conviendrait de mettre en place des méthodes d'évaluation capables de refléter les expositions à long terme pour les maladies longues telles que le cancer.

Par ailleurs, l'évaluation de risque liée à la présence d'acrylamide a abouti à l'instauration de recommandations européennes successives, et d'un règlement en novembre 2017 fixant les teneurs d'acrylamide dans différentes catégories d'aliments. Depuis 2016, un plan de gestion de risque robuste principalement destiné aux industriels pour inciter la réduction d'acrylamide alimentaire à tous les niveaux de la chaîne alimentaire est mis en place chaque année.

Parmi ces méthodes, la piste du microbiote intestinal, et en particulier des lactobacilles, dans la prise en charge de l'acrylamide ingéré, a fait l'objet de plusieurs travaux au cours de ces dernières années. Ces études *in vitro* ont révélé la capacité de deux souches de lactobacilles, *L. reuteri* et *L. casei shirota*, à se lier à l'acrylamide *via* des composants de la paroi bactérienne tels que les acides teichoïques dont l'affinité varie d'une souche à une autre. *In vitro*, cette liaison entraîne une réduction de la disponibilité de l'acrylamide. Néanmoins, des études *in vivo* sont indispensables pour corroborer ce résultat et pouvoir envisager des

applications de détoxification chez l'homme, visant au maintien de la santé humaine. Le modèle porcin, dont le système enzymatique est proche de celui de l'Homme, semble être le plus approprié pour réaliser ces études *in vivo*.

L'utilisation du génie génétique sur des modèles animaux, et dans le respect de la charte éthique de 2014, peut s'avérer utile pour mieux comprendre les processus de liaison des lactobacilles à l'acrylamide au sein d'un organisme complexe.

## LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

**Figure 1** : Évaluation des risques sanitaires selon la définition du NRC, 1983

**Figure 2** : Formule développée de l'acrylamide

**Figure 3** : Louis Camille Maillard, 1910

**Figure 4** : La réaction de Maillard aboutissant à la formation d'acrylamide

**Figure 5** : Schéma métabolique de l'acrylamide

**Figure 6** : Métabolisme de l'acrylamide et formation d'adduits

**Figure 7** : Outils destinés aux industriels pour réduire la production d'acrylamide dans les denrées alimentaires

**Figure 8** : Le microbiote du tractus gastro-intestinal

**Figure 9** : Les différentes techniques d'analyses moléculaires du microbiote intestinal

**Figure 10** : La métagénomique, une technique d'analyse révolutionnaire

**Figure 11** : Évolution du microbiote intestinal au cours du temps et facteurs influençant la composition microbienne

**Figure 12** : Facteurs favorisant l'établissement du microbiote

**Figure 13** : Influence de l'alimentation sur le microbiote intestinal

**Figure 14** : Facteurs influençant le microbiote intestinal

**Figure 15** : Composition de la paroi des bactéries à Gram+

**Figure 16** : Relation entre la teneur en composants de la paroi bactérienne (acides teichoïques, D-alanine, glucose) et le pourcentage d'acrylamide lié

**Figure 17** : Pourcentage d'acrylamide lié par les différentes souches de lactobacilles incubées pendant différents temps (0, 4 et 12h) à 37°C

**Figure 18** : Effet de la concentration bactérienne sur l'élimination d'acrylamide par *L. reuteri* (a) et *L. casei Shirota* (b). Concentration initial d'acrylamide : 50 µg/ml, 1h d'incubation à 37°C.

**Figure 19** : Diminution de la viabilité des deux souches de lactobacilles à la fin des conditions expérimentales, à jeûn et en phase post-prandiale

**Figure 20** : Pourcentage d'acrylamide éliminé par *L. reuteri* et *L. casei* à la fin des conditions de jeûn et post-prandiales respectivement

**Tableau 1 :** Estimation de la teneur en acrylamide des aliments ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  ou  $\mu\text{g}/\text{L}$ ), de l'exposition (moyenne et P95) de la population française ( $\text{ng}/\text{kg}$  pc/jour) adulte et enfant, et contribution des aliments (%)

**Tableau 2 :** Application des méthodes de détection de l'acrylamide dans les aliments industriels

**Tableau 3 :** Teneurs de référence en acrylamide dans les denrées alimentaires

## BIBLIOGRAPHIE

1. ANSES. Les contaminants chimiques de l'alimentation. 2016. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/content/les-contaminants-chimiques-de-l%E2%80%99alimentation>
2. ANSES. Le point sur les mycotoxines. 2018. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/content/le-point-sur-les-mycotoxines>
3. EFSA. Scientific Opinion on Pyrrolizidine alkaloids in food and feed. EFSA Journal. 9(11):2406.
4. OMS. Les dioxines et leurs effets sur la santé. World Health Organization. 2016. Disponible sur: <http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/dioxins-and-their-effects-on-human-health>
5. Cancer et environnement. Les polychlorobiphényles. 2017. Disponible sur: <http://www.cancer-environnement.fr/90-Polychlorobiphenyles-PCB.ce.aspx>
6. EFSA. Les métaux en tant que contaminants dans les aliments. European Food Safety Authority. 2016. Disponible sur: <http://www.efsa.europa.eu/fr/topics/topic/metals-contaminants-food>
7. ANSES. Limites maximales de résidus ou LMR de médicament vétérinaire. 2018. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/content/limites-maximales-de-r%C3%A9sidus-ou-lmr-de-m%C3%A9dicament-v%C3%A9t%C3%A9rinaire>
8. Cancer et environnement. Pesticides et cancer, risques pesticides santé, risque cancer pesticides | Cancer et environnement. 2017. Disponible sur: <http://www.cancer-environnement.fr/326-Pesticides.ce.aspx>
9. EFSA. Nitrites et nitrates ajoutés aux aliments. 2018. Disponible sur: [https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate\\_publications/files/nitrates-nitrites-170614-FR.pdf](https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/nitrates-nitrites-170614-FR.pdf)
10. ANSES. Dangers chimiques liés aux matériaux au contact des denrées alimentaires. 2014. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/system/files/GBPH2013sa0167.pdf>
11. EUR-Lex. Sécurité des aliments: des emballages sûrs. 2016. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=LEGISSUM:l21082a&from=FR>
12. ANSES. Dangers chimiques liés à la présence de substances néoformées dans les aliments. 2015. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/system/files/GBPH2014SA0036.pdf>
13. Engel E, Meurillon M, Planche C, Peyret P. Devenir des contaminants toxiques des aliments dans l'environnement digestif. Innovations Agronomiques. juin 2014;(36):135-49.

14. NRC. Risk Assessment and Its Social and Regulatory Contexts. In: Science and Judgment in Risk Assessment . National Academies Press (US); 1994. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK208260/>
15. Cartus A, Schrenk D. Current methods in risk assessment of genotoxic chemicals. Food Chem Toxicol. août 2017;106(Pt B):574-82.
16. ANSES. Valeurs toxicologiques de référence (VTR). 2018. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/content/valeurs-toxicologiques-de-r%C3%A9f%C3%A9rence-vtr>
17. INERIS. Démarche d'évaluation des risques sanitaires. La place de l'Évaluation Quantitative des Risques Sanitaires (EQRS) dans les démarches de gestion; 2009 mars.
18. EFSA. The EFSA Comprehensive European Food Consumption Database . European Food Safety Authority. . Disponible sur: <https://www.efsa.europa.eu/en/food-consumption/comprehensive-database>
19. Règlement (CE) n°1881/2006 de la Commission portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires. déc 19, 2006. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:32006R1881&from=FR>
20. EFSA. Contrôle à l'échelle européenne des contaminants dans la chaîne alimentaire. Disponible sur: [https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/efsa\\_rep/blobserver\\_assets/contaminants\\_in\\_the\\_food\\_chain\\_fr.pdf](https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/efsa_rep/blobserver_assets/contaminants_in_the_food_chain_fr.pdf)
21. Cancer et environnement. Classification du CIRC. 2018. Disponible sur: <http://www.cancer-environnement.fr/478-Classification-des-substances-cancerogenes.ce.aspx>
22. Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. J Agric Food Chem. 14 août 2002;50(17):4998-5006.
23. INRS. Acrylamide (FT 119) - Fiche toxicologique. 2007. Disponible sur: [http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX\\_119](http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_119)
24. Kamble AL, Banoth L, Meena VS, Singh A, Chisti Y, Banerjee UC. Nitrile hydratase of Rhodococcus erythropolis: characterization of the enzyme and the use of whole cells for biotransformation of nitriles. 3 Biotech. août 2013;3(4):319-30.
25. Klein C. L'acrylamide, contaminant alimentaire cancérigène méconnu ? [Nancy 1]: Faculté de Pharmacie; 2007.
26. INCHEM. Acrylamide (PIM 652). 1999. Disponible sur: <http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/pim652.htm>
27. Louis-Camille Maillard. In: Wikipédia. 2018. Disponible sur: [https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Louis-Camille\\_Maillard&oldid=148859325](https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Louis-Camille_Maillard&oldid=148859325)
28. Richard H. Réactions de Maillard et production d'arômes endogènes. :7.

29. ANSES. Étude de l'alimentation totale française 2 (EAT 2) - Tome 2. 2011. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/system/files/PASER2006sa0361Ra2.pdf>
30. Qinqin H, Xiahong X, Yingchun F, Yanbin L. Rapid methods for detecting acrylamide in thermally processed foods: A review - ScienceDirect. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713515001735>
31. FAO/WHO. Health implications of acrylamide in food. 2002. Disponible sur: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42563/9241562188.pdf?sequence=1>
32. Pedreschi F, León J, Mery D, Moyano P, Pedreschi R, Kaack K, et al. Color development and acrylamide content of pre-dried potato chips. *Journal of Food Engineering*. 1 avr 2007;79(3):786-93.
33. Hu Q, Xu X, Li Z, Zhang Y, Wang J, Fu Y, et al. Detection of acrylamide in potato chips using a fluorescent sensing method based on acrylamide polymerization-induced distance increase between quantum dots. *Biosens Bioelectron*. avr 2014;54:64-71.
34. Brisson-Gauthier B. Relation entre l'exposition à l'acrylamide par l'alimentation, les marqueurs de dose interne et les cassures à l'ADN lymphocytaire chez des adolescents montréalais [Mémoire]. [Québec]: Laval; 2012.
35. EFSA. Scientific Opinion on Acrylamide in food. *EFSA Journal*. juin 2015 ;13(6). Disponible sur: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/j.efsa.2015.4104>
36. Gamboa da Costa G, Churchwell MI, Hamilton LP, Von Tungeln LS, Beland FA, Marques MM, et al. DNA adduct formation from acrylamide via conversion to glycidamide in adult and neonatal mice. *Chem Res Toxicol*. oct 2003;16(10):1328-37.
37. Sumner SC, Fennell TR, Moore TA, Chanas B, Gonzalez F, Ghanayem BI. Role of cytochrome P450 2E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in mice. *Chem Res Toxicol*. nov 1999;12(11):1110-6.
38. Paulsson B, Warholm M, Rannug A, Törnqvist M. In vitro studies of the influence of certain enzymes on the detoxification of acrylamide and glycidamide in blood. *Adv Exp Med Biol*. 2005;561:127-33.
39. Li D, Wang P, Liu Y, Hu X, Chen F. Metabolism of Acrylamide: Interindividual and Interspecies Differences as Well as the Application as Biomarkers. *Curr Drug Metab*. 2016;17(4):317-26.
40. DGCCRF. L'acrylamide dans les aliments : une préoccupation de santé publique. Le portail des ministères économiques et financiers. 2017. Disponible sur: <https://www.economie.gouv.fr/dgccrf/lacrylamide-dans-aliments-preoccupation-sante-publique>
41. Hogervorst JG, Schouten LJ, Konings EJ, Goldbohm RA, van den Brandt PA. A prospective study of dietary acrylamide intake and the risk of endometrial, ovarian, and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. nov 2007;16(11):2304-13.
42. Hogervorst JGF, Schouten LJ, Konings EJM, Goldbohm RA, van den Brandt PA. Dietary acrylamide intake is not associated with gastrointestinal cancer risk. *J Nutr*. nov 2008;138(11):2229-36.

43. Hogervorst JGF, Schouten LJ, Konings EJM, Goldbohm RA, van den Brandt PA. Dietary acrylamide intake and brain cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* mai 2009;18(5):1663-6.
44. Lipworth L, Sonderman JS, Tarone RE, McLaughlin JK. Acrylamide: a human cancer risk? *European Journal of Cancer Prevention.* mars 2013;22(2):193-4.
45. Miao Y, Zhang H, Zhang L, Wu S, Sun Y, Shan Y, et al. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural formation in reconstituted potato chips during frying. *J Food Sci Technol.* déc 2014;51(12):4005-11.
46. Bandarra S, Fernandes AS, Magro I, Guerreiro PS, Pingarilho M, Churchwell MI, et al. Mechanistic insights into the cytotoxicity and genotoxicity induced by glycidamide in human mammary cells. *Mutagenesis.* nov 2013;28(6):721-9.
47. Von Tungeln LS, Doerge DR, da Costa GG, Marques MM, Witt WM, Koturbash I, et al. Tumorigenicity of acrylamide and its metabolite glycidamide in the neonatal mouse bioassay. *Int J Cancer.* 1 nov 2012;131(9):2008-15.
48. Lopachin RM, Gavin T. Acrylamide-induced nerve terminal damage: relevance to neurotoxic and neurodegenerative mechanisms. *J Agric Food Chem.* 13 août 2008;56(15):5994-6003.
49. Xu Y, Cui B, Ran R, Liu Y, Chen H, Kai G, et al. Risk assessment, formation, and mitigation of dietary acrylamide: Current status and future prospects. *Food and Chemical Toxicology.* juill 2014;69:1-12.
50. ANSES. Etudes alimentaires : mieux protéger les consommateurs. 2017. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/content/etudes-alimentaires-mieux-prot%C3%A9ger-les-consommateurs>
51. Sörgel F, Weissenbacher R, Kinzig-Schippers M, Hofmann A, Illauer M, Skott A, et al. Acrylamide: Increased Concentrations in Homemade Food and First Evidence of Its Variable Absorption from Food, Variable Metabolism and Placental and Breast Milk Transfer in Humans. *CHE.* 2002;48(6):267-74.
52. Pedreschi F, Mariotti MS, Granby K. Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assessment. *J Sci Food Agric.* 15 janv 2014;94(1):9-20.
53. Virk-Baker MK, Nagy TR, Barnes S, Groopman J. Dietary Acrylamide and Human Cancer: A Systematic Review of Literature. *Nutr Cancer.* 2014;66(5):774-90.
54. Règlement UE 2017/2158 de la Commission établissant des mesures d'atténuation et des teneurs de référence pour la réduction de la présence d'acrylamide dans les denrées alimentaires. nov 20, 2017.
55. Xu F, Oruna-Concha M-J, Elmore JS. The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food. *Food Chemistry.* nov 2016;210:163-71.
56. Recommandation de la Commission concernant l'étude des teneurs en acrylamide des denrées alimentaires. nov 8, 2013. Disponible sur: <http://www.cancer-environnement.fr/Portals/0/Documents%20PDF/CELEX-32013H0647-FR-TXT.pdf>

57. Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev.* juill 2010;90(3):859-904.
58. INRA. Microbiote, la révolution intestinale. janv 2017;28.
59. Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol.* janv 2016;14(1):20-32.
60. Barbut F, Joly F, Saint-Antoine H. Le microbiote intestinal : équilibre et dysbiose. nov 2010;17(6):511-20.
61. Service médico-scientifique Pilèje. Le microbiote intestinal dans tous ses états. Disponible sur: <http://pro.groupepileje.fr/IMG/pdf/lettre-scientifique-microbiote-lsmicrobiote02-hd.pdf>
62. Evans JM, Morris LS, Marchesi JR. The gut microbiome: the role of a virtual organ in the endocrinology of the host. *J Endocrinol.* sept 2013;218(3):R37-47.
63. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* 12 mai 2011;473(7346):174-80.
64. Butel M-J. Le microbiote intestinal du prématuré: ses caractéristiques, sa mise en place, ses facteurs d'influence. 2014 nov . Disponible sur: <http://docplayer.fr/16043610-Le-microbiote-intestinal-du-premature-ses-caracteristiques-sa-mise-en-place-ses-facteurs-d-influence.html>
65. Lecerf J-M. Microbiote intestinal, poids et inflammation. août 2011;14(4):166-70.
66. Simon J. Le microbiote intestinal : un « organe » méconnu. Rennes 1; 2016.
67. García-Peña C, Álvarez-Cisneros T, Quiroz-Baez R, Friedland RP. Microbiota and Aging. A Review and Commentary. *Arch Med Res.* nov 2017;48(8):681-9.
68. Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, Sutter JL, Koren O, Blekhman R, et al. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell.* 6 nov 2014;159(4):789-99.
69. Marteau P, Doré J. Le microbiote intestinal : un organe à part entière. John Libbey; 2017.
70. Kashtanova DA, Popenko AS, Tkacheva ON, Tyakht AB, Alexeev DG, Boytsov SA. Association between the gut microbiota and diet: Fetal life, early childhood, and further life. *Nutrition.* juin 2016;32(6):620-7.
71. Seiquer I, Rubio LA, Peinado MJ, Delgado-Andrade C, Navarro MP. Maillard reaction products modulate gut microbiota composition in adolescents. *Mol Nutr Food Res.* juill 2014;58(7):1552-60.
72. Oriach CS, Robertson RC, Stanton C, Cryan JF, Dinan TG. Food for thought: The role of nutrition in the microbiota-gut-brain axis. *Clinical Nutrition Experimental.* avr 2016;6:25-38.

73. Murphy EA, Velazquez KT, Herbert KM. Influence of High-Fat-Diet on Gut Microbiota: A Driving Force for Chronic Disease Risk. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. sept 2015;18(5):515-20.
74. Zhang M, Yang X-J. Effects of a high fat diet on intestinal microbiota and gastrointestinal diseases. *World J Gastroenterol*. 28 oct 2016;22(40):8905-9.
75. Tidjani Alou M, Lagier J-C, Raoult D. Diet influence on the gut microbiota and dysbiosis related to nutritional disorders. *Human Microbiome Journal*. sept 2016;1:3-11.
76. Landman C, Quévrain E. Le microbiote intestinal : description, rôle et implication physiopathologique. *La Revue de Médecine Interne*. juin 2016;37(6):418-23.
77. Service médico-scientifique Biocodex. Le microbiote intestinal. Disponible sur: <https://www.biocodexmicrobiotainstitute.com/intestinal>
78. Zhai Q, Wang G, Zhao J, Liu X, Narbad A, Chen YQ, et al. Protective Effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8610 against Chronic Cadmium Toxicity in Mice Indicate Routes of Protection besides Intestinal Sequestration. *Appl Environ Microbiol*. juill 2014;80(13):4063-71.
79. Monachese M, Burton JP, Reid G. Bioremediation and Tolerance of Humans to Heavy Metals through Microbial Processes: a Potential Role for Probiotics? *Appl Environ Microbiol*. sept 2012;78(18):6397-404.
80. Lebeer S, Bron PA, Marco ML, Van Pijkeren J-P, O'Connell Motherway M, Hill C, et al. Identification of probiotic effector molecules: present state and future perspectives. *Current Opinion in Biotechnology*. févr 2018;49:217-23.
81. Delcour J, Ferain T, Deghorain M, Palumbo E, Hols P. The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. In: Konings WN, Kuipers OP, In 't Veld JHJH, éditeurs. *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*. Dordrecht: Springer Netherlands; 1999 . p. 159-84. Disponible sur: [http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-2027-4\\_7](http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-2027-4_7)
82. Tuohy KM, Hinton DJS, Davies SJ, Crabbe MJC, Gibson GR, Ames JM. Metabolism of Maillard reaction products by the human gut microbiota – implications for health. *Molecular Nutrition & Food Research*. sept 2006;50(9):847-57.
83. Schabacker J, Schwend T, Wink M. Reduction of Acrylamide Uptake by Dietary Proteins in a Caco-2 Gut Model. *J Agric Food Chem*. 1 juin 2004;52(12):4021-5.
84. Serrano-Niño JC, Cavazos-Garduño A, Cantú-Cornelio F, González-Córdova AF, Vallejo-Córdoba B, Hernández-Mendoza A, et al. In vitro reduced availability of aflatoxin B1 and acrylamide by bonding interactions with teichoic acids from *Lactobacillus* strains. *LWT - Food Science and Technology*. déc 2015;64(2):1334-41.
85. Rivas-Jimenez L, Ramírez-Ortiz K, González-Córdova AF, Vallejo-Cordoba B, Garcia HS, Hernandez-Mendoza A. Evaluation of acrylamide-removing properties of two *Lactobacillus* strains under simulated gastrointestinal conditions using a dynamic system. *Microbiological Research*. sept 2016;190:19-26.

Université de Lille  
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE  
**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**  
Année Universitaire 2017/2018

**Nom :** CARRARA

**Prénom :** Eva

**Titre de la thèse :** Toxicité de l'acrylamide : les lactobacilles, possible rôle protecteur ?

**Mots-clés :** acrylamide – contaminants alimentaires – composés néoformés – réaction de Maillard – brunissement des aliments – toxicité – microbiote intestinal – lactobacilles – détoxification

---

**Résumé :** L'acrylamide, substance retrouvée notamment dans la fumée de cigarette, a été désignée en 1994 comme « cancérogène probable pour l'Homme » par le Centre International de Recherche sur le Cancer. Huit ans plus tard, des chercheurs de l'Agence suédoise de l'alimentation décèlent la présence de ce composé dans l'alimentation, notamment dans des denrées consommées au quotidien telles que le pain de mie, les biscuits et les frites.

Depuis, des études toxicologiques ont été menées dans le cadre de l'évaluation de risque et ont abouti à l'instauration d'un règlement en novembre 2017 fixant les teneurs d'acrylamide dans différentes catégories d'aliments. Un plan de gestion de risque a été mis en place pour inciter à la diminution d'acrylamide à tous les niveaux de la chaîne alimentaire grâce à des méthodes de réduction adaptées. Parmi ces méthodes, l'exploitation du microbiote intestinal et plus particulièrement des lactobacilles a fait l'objet de travaux de recherche dans la prise en charge de l'acrylamide ingéré. Ces études *in vitro* ont révélé la capacité de deux souches, *Lactobacillus reuteri* et *Lactobacillus casei Shirota*, à se lier à l'acrylamide *via* des composants de la paroi bactérienne. Cela constitue une piste pour envisager des applications de détoxification chez l'Homme, à corroborer toutefois par des études *in vivo*.

---

**Membres du jury :**

**Président :** Monsieur FOLIGNÉ Benoît, Professeur en bactériologie

**Assesseur(s) :** Madame PLATEL Anne, Maître de conférences en toxicologie

**Membre(s) extérieur(s) :**

- Docteur Michel LAURENTIE, Directeur de recherches d'unité Expérimentation, modélisation et analyse de données (EMAD)
- Docteur Éric FOULON, Pharmacien titulaire d'officine
- Docteur Christelle ELIAS, Experte de la surveillance de la consommation des antibiotiques