



SANTÉ-ENVIRONNEMENT ET SANTÉ-TRAVAIL NOUVELLES PERSPECTIVES DE RECHERCHES

**SÉMINAIRE DE PROSPECTIVE SCIENTIFIQUE
ET DE LANCEMENT DU PROGRAMME RECHERCHE
DU PLAN NATIONAL SANTÉ ENVIRONNEMENT ET DU PLAN SANTÉ TRAVAIL**

Document d'orientation scientifique

31 mars et 1^e avril 2005

organisé par
le ministère délégué à la Recherche

le CEA, le CEE, le CNRS, la CPU, l'INED, l'INRA, l'INSERM, l'Institut Pasteur, l'IRD,

dans le cadre du Plan national santé environnement et du Plan santé travail
en liaison avec

le ministère des Solidarités, de la Santé et de la Famille, le ministère de l'Écologie
et du Développement durable, le ministère de l'Emploi, du Travail et de la Cohésion sociale

1.3

LES AGENTS BIOLOGIQUES ET LEUR DIVERSITÉ

Toute maladie, qu'elle soit humaine, animale ou végétale, infectieuse ou parasitaire, a son « histoire naturelle », c'est-à-dire qu'elle possède un agent responsable, une écologie particulière, un terrain environnemental favorable et un cursus biologique qui conditionne son apparition, voire son expansion au sein des populations d'hôtes.

Les évolutions des écosystèmes entraînent une évolution des pathogènes et de leurs hôtes.

De nombreuses questions peuvent être explorées : d'où viennent les agents pathogènes ? comment et pourquoi se développent-ils ? quels sont les dynamiques temporelles et spatiales des maladies humaines ? comment expliquer la virulence de certains agents étiologiques ? A l'échelle micro-évolutive et génomique ? A l'échelle bio-géographique des modifications environnementales ou bioclimatiques ?

Face aux problèmes récurrents des infections opportunistes et à l'émergence (ou la ré-émergence) de micro-organismes pathogènes, il est nécessaire de renforcer les connaissances. Différents milieux sont concernés : le milieu hospitaliers, urbains, péri-urbains et agricoles....

Les microorganismes, les plantes et les animaux, produisent de nombreuses toxines leur permettant de vivre dans un milieu plus ou moins agressif. Le développement des connaissances sur leur modes d'action et sur leurs impacts sur la santé humaine impliquent de mieux connaître leurs natures chimiques, le rôle des modifications de l'environnement sur leur développement.

Les zoonoses regroupent un ensemble de maladies qui sont transmises d'un animal vertébré (sauvage ou domestique) à l'homme. Divers facteurs environnementaux peuvent contribuer à l'émergence ou à la ré-émergence de certaines maladies, d'origine bactériennes ou virales. Le développement des connaissances sur leur modes d'action et sur leur mécanismes d'interactions avec leurs hôtes sont nécessaires.

Ecologie de la Santé*

Mécanismes responsables de l'émergence, du maintien et de l'évolution des agents étiologiques en santé publique, vétérinaire et végétale

J-F Guégan (IRD) & F. Renaud (CNRS)

Contexte

• Toute maladie, qu'elle soit humaine, animale ou végétale, infectieuse (due à des microparasites) ou parasitaire (due à des macroparasites), a son «histoire naturelle», c'est-à-dire qu'elle possède un agent causatif responsable, une écologie particulière, un terrain environnemental favorable et un cursus biologique, qui conditionne son apparition voire son expansion au sein des populations d'hôtes. Héritées de la pensée de Claude Bernard et de Louis Pasteur, les recherches sur les maladies en France se sont préférentiellement orientées selon une vision endogène, ou ethno-médicale, qui concerne la maladie, les troubles qu'elle peut exercer sur les individus qui en sont affectés et les représentations que s'en font les sociétés. Cependant, il existe un autre point de vue, moins abordé dans notre pays notamment, dit exogène, ou encore écologique ou épidémiologique, qui considère les interactions qui peuvent exister entre les agents étiologiques pro- ou eucaryotes (virus, bactéries, champignons, helminthes, etc...), les populations d'hôtes, de vecteurs et de réservoirs et l'environnement dans lequel circule l'ensemble de ces composants. D'une vision souvent normative entre l'agent étiologique et la maladie, on lui préfère aujourd'hui le paradigme d'une relation étroite entre systèmes dynamiques complexes et santé dans lequel les phénomènes de perturbations environnementales ou bio-climatiques ainsi que des événements liés à l'hétérogénéité démographique ou environnementale des populations d'agents étiologiques, d'hôtes naturels et/ou des réservoirs potentiels sont souvent responsables des crises épidémiques ou des émergences de nouveaux agents étiologiques. L'émergence récente d'agents pathogènes comme le SRAS, la grippe aviaire ou la légionellose nous montre, par exemple, qu'une plus grande promiscuité pour des raisons culturelles entre de possibles réservoirs animaux et les populations humaines ou des modifications d'habitats comme celles rencontrées dans des tours réfrigérées plus favorables au développement de certains groupes, ou souches, de bactéries peuvent être des facteurs importants prédisposant au transfert de ces agents vers les populations humaines. De même, en épidémiologie végétale, l'expression de la maladie est souvent schématisée par un triangle représentant les interactions entre les 3 composantes que sont la population hôte, la population pathogène et l'environnement (biotique et abiotique). L'analyse des épidémies met alors souvent en évidence une rupture de l'équilibre pathogène-hôte-environnement, soit par l'introduction de parasites « exotiques » dans des écosystèmes où les plantes ne présentent pas de résistances, contrairement à celles des zones d'origine, soit, encore, par des modifications portant sur l'hôte et/ou l'environnement comme dans le cas de nouveaux cultivars, sélectionnés pour une forme de résistance à la sécheresse mais aussi très sensibles à des races physiologiques de pathogènes très virulents. Des modifications du système de culture ou du climat sont également associés à des changements d'incidence ou de sévérité des maladies des plantes. Un exemple emprunté à l'agronomie africaine montre que le virus de la panachure jaune du riz, originaire d'Afrique de l'Est où il est présent chez des riz sauvages chez lesquels il n'occasionne pas de dégâts importants, a aujourd'hui colonisé l'ensemble du continent africain. Il représente la principale contrainte au développement de cette culture. Le développement de ce virus est étroitement lié aux changements de pratiques culturales et à l'intensification de l'agriculture du riz : culture en continue tout au long de l'année qui favorise la propagation du virus lorsque des méthodes plus traditionnelles pratiquaient l'alternance ; recours à des variétés exotiques productives mais aussi très sensibles au pathogène.

• Comprendre comment fonctionnent de tels systèmes en interaction constante - l'agent étiologique, son ou ses réservoirs, son ou ses vecteurs, son ou ses hôtes probables ou possibles, les populations d'hôtes, l'environnement dans lequel tous ces acteurs évoluent - et pourquoi ces agents étiologiques surgissant «comme de nulle part» peuvent être très souvent pathogènes pour les individus et les populations d'hôtes qui en sont affectées est un défi de taille lancé pour répondre aujourd'hui aux problèmes croissants d'épidémies, dues à des agents étiologiques que l'on pensait vaincus, à l'émergence de nouveaux agents jusqu'alors inconnus, ou encore à la résistance aux drogues médicamenteuses (antibiotiques, vaccins, insecticides,...) de nos sociétés

modernes. Existe-t-il aussi des régions, des environnements ou des localités particulières du Monde, où le risque d'émergence de nouveaux agents pathogènes est aujourd'hui plus accru ?

Principales questions

Les activités de recherche en matière d'Ecologie de la Santé peuvent être structurées autour de quelques grands axes fédérateurs transversaux et intégratifs qui sont les suivants :

- **D'où viennent les agents pathogènes ?** Recherche des facteurs déterminants les patrons de diversité en organismes microbiens et parasitaires observés dans et entre les groupes taxinomiques d'animaux (approche comparative macroscopique), et recherche des mécanismes pouvant expliquer les maladies humaines en regard de celles des grands groupes animaux (coévolution historique versus transfert d'espèces) ; liens entre diversité biologique et diversité en pro- et eucaryotes. Origine des agents pathogènes des cultures et conditions de leurs propagations.
- **Comment et pourquoi se développent-elles ?** Compréhension des relations entre diversité biologique hôte et diversité biologique en agents étiologiques (notion d'effet de dilution ou d'effet tampon exercé par la diversité biologique) ; analyses des relations entre tailles des populations hôtes et diversité biologique en agents étiologiques ; notion de taille critique des populations hôtes et probabilités de transferts latéraux vers d'autres espèces hôtes dont l'homme.
- **Quels sont les comportements temporels et spatiaux des maladies ?** Compréhension de leurs dynamiques temporelles et spatiales sur le long terme, facteurs de forçage à haute, moyenne et basse fréquences, et modélisation de leurs cinétiques ;
- **Comment expliquer la virulence de certains agents étiologiques ?** L'augmentation de la virulence est-elle toujours associée à un changement, ou à un transfert de populations ou d'espèces d'hôtes ? Quels sont les mécanismes proximaux (microévolutifs) et distaux (macroévolutifs) responsables d'une augmentation de la virulence d'un organisme pathogène, mais aussi d'une diminution de cette même virulence ? De très nombreux microorganismes ne sont pas pathogènes, mais au contraire ont une fonction essentielle comme les levures, certains groupes de champignons, certaines bactéries ou encore certains virus ; identification des circonstances environnementales prédisposant certains microorganismes à une fonction symbiotique ou à évoluer vers un organisme pathogène.
- **A l'échelle micro-évolutive, existe-t-il des éléments particuliers du génome d'un pathogène responsables de tout ou partie de cette virulence ?** Lorsqu'on compare des souches ou des populations différentes d'un même agent pathogène, existe-t-il d'un point de vue macro-évolutif, ou macroscopique, des caractéristiques déterminantes permettant de comprendre, et donc de prédire, l'évolution de la virulence ? Au contraire, l'évolution de la virulence répond-elle à des lois liées au hasard ?
- **A l'échelle biogéographique, quelle peuvent être l'importance et les effets de modifications environnementales ou bioclimatiques** sur le développement des maladies de l'homme, de l'animal et de la plante ?
- **Quelles sont les relations entre la résistance aux drogues chez les pathogènes de l'homme ou de l'animal et le contournement de résistances génétiques par des pathogènes de plantes ?** Quelles sont les incidences en termes de valeur sélective associées à ces modifications de virulence pour les agents étiologiques ?
- **A l'échelle biogéographique, quelles peuvent être l'importance et les effets de modifications environnementales ou bioclimatiques** sur le développement des maladies de l'homme, de l'animal et de la plante ?

Aperçu du potentiel de recherche

La recherche française en Ecologie de la Santé apparaît aujourd'hui dispersée au sein de la communauté scientifique. Elle est cependant bien présente dans plusieurs Instituts de recherche qui ont tradition à collaborer ou à échanger, mais encore trop sensibles aux conflits d'intérêt qui n'ont pas lieu d'être pour une vision intégrée et globale. Entre les EPST (CNRS, INSERM, IRD, INRA,...), les EPIC (CIRAD, IFREMER,...), les Universités, et les Grands établissements ou Fondations privées (EPHE, IPP et IP d'Outre-Mer), un potentiel important de recherche existe estimé à environ 250-300 enseignants-chercheurs. Le REseau Interactions Durables (REID) constitue aujourd'hui un groupement de recherche institutionnel mobilisant 120 d'entre-eux sur le

territoire national. Ce réseau REID regroupe des écologues, des généticiens et des dynamiciens de populations, des généticiens moléculaires, des bactériologistes ou virologues, des statisticiens et des modélisateurs ayant tous une excellente compétence dans leur champ scientifique et leurs modèles symbiotiques. Les villes universitaires comme Nice, Dijon, Roscoff, Grenoble, Lille, Toulouse, Montpellier, Paris, Lyon, Bordeaux, Rennes, Angers ou Avignon, où sont aussi concentrés les grands centres de recherche, constituent à elles seules 60 à 70% du potentiel de recherche de ce réseau. Les initiatives entreprises d'une meilleure intégration en sciences épidémiologiques, regroupant les anciens troncs disciplinaires de la phytopathologie, de la santé publique, vétérinaire et végétale, militent pour le renforcement et l'union de cette communauté scientifique dont les thématiques sont aujourd'hui en plein essor chez nos collègues anglo-saxons

Perspectives scientifiques

Les perturbations de l'environnement ont des conséquences indéniables sur la santé, tout simplement parce qu'elles modifient les paramètres des écosystèmes où évoluent les pathogènes et leurs hôtes. En effet, tout comme les organismes libres, les pathogènes perçoivent et répondent aux modifications environnementales de manière intrinsèque ou extrinsèque, c'est-à-dire au travers de leurs hôtes. Le développement d'une écophysologie évolutive des pathogènes devient essentiel pour notre compréhension des processus dynamiques de la virulence et de la résistance dans les populations hôtes, confrontées aux changements d'ordres climatique ou anthropique.

Cette thématique est nouvelle, et il est nécessaire de définir trois grands chapitres scientifiques qui permettront de l'aborder et de la structurer sous différents angles complémentaires. Cette approche doit être totalement transversale afin de prendre en compte l'ensemble des paramètres qui lient Hôte-(Vecteur-Réservoir)-Pathogène (ou Parasite) évoluant dans leurs Ecosystèmes.

- Ouvrons tout d'abord le premier chapitre ! Il se situe à plusieurs niveaux d'échelles spatio-temporelles (du global au local et inversement) de l'écologie des interactions entre hôtes/pathogènes. Cet axe « Modélisation des Données Epidémiologiques » a pour but d'analyser et de modéliser les cinétiques et les dynamiques spatiales (distribution, abondance, modalités de propagation, agrégation,...) et temporelles (évolution des traits biologiques, dynamique des populations,...) des communautés d'agents infectieux et parasites de plusieurs groupes d'hôtes (par exemple, homme et vecteurs de maladies humaines, mais également maladies animales et végétales...), et d'en dégager l'impact sélectif sur les populations hôtes. Les recherches portent sur la compréhension des systèmes géographiques, physiques et démographiques responsables des dynamiques évolutives des agents étiologiques provoquant des maladies dans les populations humaines, animales et végétales. Elles doivent déboucher par la prise en compte de modèles conjoints statistiques (analyses de données) et mathématiques pour proposer une évaluation des risques en fonction de l'écosystème concerné. La principale question posée est ici : « Quels paramètres conditionnent les émergences de maladies ? ». L'approche est résolument interdisciplinaire puisqu'elle se place dans les sciences de l'environnement, mariage entre sciences de la vie et sciences de l'univers. Les sciences humaines et sociales doivent également être prises en compte dans le cadre de la connaissance des déplacements et des coutumes des populations humaines, par exemple, mais aussi de la mise en place à terme de systèmes d'alerte précoce que de telles recherches permettent d'envisager.

- Le deuxième axe est indissociable du premier dans la compréhension des processus responsables de l'organisation et du fonctionnement de la biologie et de la génétique des populations hôtes/pathogènes dans les écosystèmes. Ainsi, l'axe « Organisation et Fonctionnement des Populations Hôtes/Pathogènes » a pour but d'analyser les mécanismes qui, dans les populations, régissent l'évolution de ces systèmes en interaction. Le but principal est ici de comprendre l'origine et le maintien des diversités biologiques, l'adaptation et la spécialisation qui en découlent, les relations entre génotypes et expressions phénotypiques. Les recherches consistent en l'analyse des paramètres impliqués (sexe et modalités de reproduction, dérive et sélection, dispersion et colonisation...) dans la structuration et le fonctionnement des populations de pathogènes et d'hôtes, et dans les dynamiques adaptatives (polymorphisme de compatibilité, spécialisation dans l'habitat, évolution de la résistance et de la virulence, coévolution...) qui en résultent. Répondre à la question : « Qui transmet quoi, où et quand ? » correspond exactement à l'obtention des informations nécessaires à la compréhension de l'épidémiologie des agents en fonction des caractéristiques populationnelles hôtes présentes dans l'environnement. Cet axe permet naturellement d'informer et de compléter celui qui concerne la modélisation des données épidémiologiques.

- Le troisième axe se focalise sur l'intimité biologique de l'interaction hôte/pathogènes, et a pour but de découvrir les facteurs biologiques et moléculaires responsables de l'emprise de l'agent infectieux sur son hôte. Il est totalement complémentaire des deux premiers puisqu'il a pour objectif de répondre à la question : «Pourquoi et comment un organisme devient-il pathogène ?» car on ne naît pas «pathogène» mais on le devient par circonstances. L'axe «Pathogénicité, mode d'emploi» se situe dans un contexte résolument génétique et moléculaire pour interpréter l'évolution de la pathogénicité chez les agents responsables des maladies.

Priorités thématiques envisageables

Le choix de modèles d'études est ici crucial ; il doit permettre de développer une approche globale et intégrée des processus impliqués dans le fonctionnement et l'évolution des foyers infectieux en santé publique, vétérinaire et végétale. Par ailleurs, il est aussi primordial d'identifier et de définir les infrastructures (observatoires notamment ; nationaux, D.O.M.-T.O.M., tropicaux) dans lesquelles devront se développer les futures thématiques.

Le choléra et la dengue en santé publique, le SRAS et la grippe en santé vétérinaire et certains virus de plantes comme les espèces de chênes ou de riz, pour ne citer qu'eux, pourraient constituer des modèles pilotes, où l'ensemble des axes définis ci-dessus pourraient être rapidement pris en considération au travers de programmes les identifiant et les définissant explicitement.

Les thématiques prioritaires envisageables peuvent être déclinées comme suit :

- Etude de quelques groupes d'organismes pro- ou eucaryotes distribués naturellement dans des réservoirs animaux ou des variétés sauvages de plantes et suivi de leur transfert vers des populations humaines, animales ou des variétés de plantes cultivées. Des couplages obligatoires sont essentiels entre : (a) analyses moléculaires sur les structures de ces pathogènes entre hôtes d'origine et dérivés, (b) études de génétique et dynamique de populations, et (3) modélisation épidémiologique (analyse de données et modélisation mathématique).

Sylvaine Cordier, épidémiologiste, INSERM, U 625, Groupe d'étude de la reproduction chez l'homme et les mammifères, université de Rennes 1

- Etude des liens fonctionnels entre diversité biologique (par groupes taxinomiques hôtes) et risque infectieux. Existe-t-il une relation entre le maintien d'une diversité forte dans les écosystèmes et le transfert d'agent pro- ou eucaryotes vers des populations cibles qu'elles soient animales, humaines ou végétales ?

- Approche comparative et macroécologique sur les grands patrons statistiques entre diversité en agents étiologiques (totaux, par groupes taxinomiques) et diversité biologique (totale, par groupes taxinomiques), et inférences sur les processus écologiques et évolutifs qui en sont la cause.

- Etude de cas particuliers de séries chronologiques de maladies infectieuses ou parasitaires (humaines, animales ou végétales), où l'on dispose de séries rétrospectives de données, en relation avec la variabilité environnementale et les forçages climatiques ; recherche sur les implications potentielles d'une prise en compte de ces comportements dynamiques complexes pour les politiques de santé (publique, vétérinaire et des plantes), et la santé des populations du XXIème siècle.

Pour être intégratives et complémentaires, les recherches devront s'effectuer, à chaque niveau d'analyse, entre départements scientifiques : Sciences de l'Univers, Sciences de la vie et Sciences de l'Homme et de la Société. Les recherches en zones tropicales (D.O.M.-T.O.M., pays partenaires du Sud) seront particulièrement appréciées si elles s'inscrivent dans le cadre d'études au long terme.

Perspectives de couplage(s) avec d'autres disciplines, approches, données

Par définition l'épidémiologie au sens écologique de son acception est un domaine de recherche au carrefour de plusieurs disciplines. Les problèmes posés par l'émergence de nouvelles maladies, la ré-apparition d'anciennes que l'on croyait vaincues, la résistance aux drogues, ou encore la récurrence dans les cycles épidémiques de certaines maladies interpellent la société sur les causes et les mécanismes exactes qui en sont responsables. Pourquoi les maladies que l'on croyait maîtrisées ou contrôlées ré-apparaissent ? Pourquoi évoque-t-on toujours l'idée d'éradication de maladies lorsque ce concept ne tient pas compte de la complexité des interactions en jeu ? Comment expliquer la résistance aux drogues aujourd'hui ? Est-ce uniquement l'interaction

entre l'agent pathogène et le système immunitaire hôte qui est responsable de cycles périodiques pour de nombreuses maladies infectieuses et parasitaires ? Quelle est la part de l'environnement au sens large sur l'apparition de tels cycles ? Quels groupes taxinomiques d'hôtes sont à l'origine des principales maladies rencontrées chez l'homme et chez l'animal ? Existe-il des espèces particulières de plantes, sources d'infection et de dissémination pour des variétés cultivées ? Quel est le rôle fonctionnel des organismes étiologiques dans les écosystèmes ? La vision de l'organisme pathogène n'est-elle pas une vision orientée lorsque de nombreuses études de biologie évolutive montrent que les caractéristiques liées à la pathogénicité-virulence d'un agent sont des réponses adaptatives à survivre dans un nouvel environnement ? Dans ces systèmes dynamiques complexes et interactifs, quelle place et quel rôle donner aux campagnes de traitement (vaccination, drogues médicamenteuses...) dans le cadre d'un développement durable ? Pour quelles stratégies durables opter face aux résistances (antibiotiques, insecticides,...) ? Quelle est la place, finalement de, leur organisation structurale des maladies infectieuses et parasitaires dans l'organisation du vivant, de l'homme et de ses sociétés présentes et futures ?

L'ensemble de ces questions - il serait vain ici d'en dresser une liste exhaustive - exige que différentes disciplines puissent échanger leurs compétences pour développer une recherche compétitive et complémentaire. Nous devons ici faire abstraction de tout conflit d'intérêt, car chacun trouvera sa place au sein d'une contribution scientifique globale visant à mieux comprendre, et donc à mieux gérer les problèmes liés à la santé.

Développement des recherches au niveau international

Ainsi qu'indiqué en introduction à ce document, les pays anglo-saxons ont cette tradition d'une recherche holistique en matière de santé. Citons, par exemple, au Royaume-Uni, les travaux des Universités d'Oxford, de Cambridge ou de Warwick, et de l'Imperial College sur les maladies infectieuses ou parasitaires humaines, des centres de recherches des stations de Rothamsted et de Silwood Park en épidémiologie végétale, et des Universités de Stirling et d'Edimbourg sur les maladies infectieuses et parasitaires animales. Pour information, la plupart des enseignants-chercheurs y travaillant sont issus des Department of Biological Sciences, et ont tous à l'origine une formation en biologie animale ou végétale, suivie très souvent d'une formation complémentaire en statistiques, en mathématique, ou en génétique des populations. De même, aux Etats-Unis d'Amérique des Department of Ecology & Evolutionary Biology à Princeton (NJ), à Athens (GE), à Pennstate (PA), à Emory (GE), à Irvine (CA), ou encore aux Harvard & John Hopkins Schools of Hygiene and Health ont une très importante activités de recherche en écologie de la santé. Les Pays-Bas, notamment, mais aussi l'Italie ou l'Allemagne, se sont dotés assez récemment de laboratoires très performants ; citons, pour exemple, l'Université d'Utrechts (NL).

Un grand nombre d'enseignants-chercheurs travaillant en écologie de la santé ont été formés au cours de leur post-doctorat dans l'un ou l'autre de ces centres de recherche ou de ces Universités. Beaucoup aussi participent à des réseaux internationaux, formels ou plus informels, de recherche sur le thème. Comme exemple, nous pouvons donner ici le groupe de travail « Ecology of Infectious Diseases » de la National Science Foundation américaine, ou encore l'ancien programme « Biocomplexity » de cette même institution. Une littérature anglo-saxonne très abondante existe à ce sujet, notamment dans la parution d'ouvrages scientifiques spécialisés.

Des perspectives de recherche internationale, sous l'égide notamment des 4 grands programmes IGBP, IHDP, WCRP et DIVERSITAS, sont aujourd'hui initiées (notamment le programme Earth Science System Partnership) dans lesquelles la France est timidement présente. La Harvard School of Hygiene and Health (Directeur : Pr. E. Chivian) a une politique particulièrement offensive dans ce domaine puisque plusieurs programmes financés par la NSF s'intéressent aux liens entre climat et maladies ou, encore, entre diversité biologique et santé.

Notons pour conclure que les principaux journaux dans lesquels ces travaux sont publiés sont des publications spécialisées en écologie (Ecology, American Naturalist, Ecology Letters, Oikos, Glocal Ecology,..) ou en dynamique de populations (Journal of Animal Ecology,...), voire même plus généralistes (Science, Nature, PloS,...), mais l'on voit aujourd'hui cette communauté scientifique s'ouvrir à des journaux plus spécialisés (Journal of Infectious Diseases, Emerging Infectious Diseases, Microbes & Infection, Trends in Microbiology, Trends in Parasitology,...)

* *Ecologie de la Santé : le terme santé s'applique aussi bien aux plantes, qu'aux animaux et à l'homme*

Ecologie des agents pathogènes modification de l'environnement et risques infectieux

Benoit Cournoyer, UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne,
Université Claude Bernard – Lyon 1
Philippe Glaser, Laboratoire de Génomique des Microorganismes Pathogènes,
Institut Pasteur

Contexte

Cette note a pour objet d'attirer l'attention vers des domaines de recherche « en émergence » ou peu présents en France et pouvant contribuer à apporter de nouveaux éléments dans la gestion du risque infectieux. Lors de la Conférence Internationale sur la Biodiversité et les discussions tenues lors de la session « diversité microbienne et société » (UNESCO, Janvier 2005), il a été conclu que devant le problème récurrent des infections opportunistes et l'émergence (ou la ré-émergence) de micro-organismes pathogènes, il était urgent d'investir de façon plus soutenue le domaine de l'écologie des micro-organismes pathogènes (incluant les opportunistes). Ces recherches doivent poursuivre l'analyse du milieu hospitalier mais il est devenu essentiel de mieux connaître les environnements urbains, périurbains, et agricoles où se multiplient et « évoluent » ces micro-organismes. Notre société est confrontée, et le sera d'autant plus avec le vieillissement et l'augmentation de la population humaine mondiale, aux infections opportunistes et aux agents infectieux émergents. Il devient donc prioritaire d'identifier les pratiques et de comprendre les événements, éléments et propriétés microbiennes favorisant la multiplication, la survie, et l'émergence d'agents infectieux dans ces environnements. Il devient important d'étudier les raisons du succès écologique de ces micro-organismes et d'apprendre à gérer leurs populations. Lors de la conférence Internationale sur la Biodiversité, il a également été conclu que les sciences « -omics » (génomique, transcriptomique, protéomique, métabolomique) pourraient contribuer à la résolution de ces problèmes d'écologie microbienne. L'analyse des complémentarités métaboliques et des réseaux biologiques pourrait permettre de mieux comprendre les propriétés microbiennes et états cellulaires favorisant une colonisation de l'Homme par les agents pathogènes.

PNSE et écologie des agents pathogènes

Dans le texte du PNSE (2004-2008), il est clairement énoncé que « ... la recherche scientifique a un rôle majeur à jouer pour mesurer, diagnostiquer les phénomènes et comprendre leur dynamique d'évolution » (P. 34). Il est également indiqué qu'il devient prioritaire « ... de mobiliser et de développer le potentiel de recherche fondamentale » (P. 34) dans les domaines du PNSE. Des actions ont donc été définies et leur lecture permet d'observer une volonté de promouvoir des recherches dans le domaine de l'écologie des micro-organismes pathogènes.

Ci-dessous, quelques actions prioritaires citant des problèmes liés à l'écologie des pathogènes et aux conséquences de modifications environnementales (certaines pratiques) sur le risque infectieux :

- **Assurer une protection de la totalité des captages d'eau potable (P. 62)** : « ... 21% des unités de distribution d'eau de consommation présentaient des non conformités en ce qui concerne les bactéries... ». Les raisons de cette non-conformité ne sont pas indiquées ; sont-elles la conséquence des pratiques agricoles ou de la gestion des eaux usées ? Il y a en fait peu de données dans la littérature scientifique sur cette problématique. Le PNSE sera un outil utile pour stimuler une activité de recherche « en microbiologie des eaux » qui aborderaient ces questions d'écologie microbienne. Par exemple, des modifications significatives des pratiques agricoles sont annoncées ; il serait donc souhaitable d'inclure un volet sur le suivi des modifications de la « diversité microbienne » incluant les agents pathogènes, dans les ressources en eau de ces zones, en fonction des nouveaux paramètres physico-chimiques des eaux. Ces informations pourraient conduire à l'identification des composantes chimiques favorables à certains germes pathogènes ou affectant l'équilibre microbiologique de la flore normale. Elles permettraient aussi d'identifier les propriétés microbiennes et les éléments génétiques impliquées dans leur assimilation ou leur détoxification, et étudier leur distribution. Ces travaux pourraient permettre d'identifier de nouveaux déterminismes génétiques ou mutations à l'origine de nouvelles activités et de l'émergence de nouvelles lignées épidémiques chez certains pathogènes.

La protection des puits de captage et la modification des pratiques agricoles sont bien entendu essentielles mais ne seront pas suffisantes pour résoudre les problèmes de contamination microbiologique. Plusieurs bactéries pathogènes montrent une grande adaptabilité aux milieux

hydriques, et il est essentiel de documenter l'ensemble des sources possibles des germes pathogènes dans les zones de captage. De plus, les puits de captage ne sont qu'une facette du rôle de l'eau dans la diffusion des germes pathogènes. Les eaux potables des réseaux de distribution et les eaux usées sont émettrices d'une grande diversité de micro-organismes dont les *P. aeruginosa* et d'autres bactéries pathogènes opportunistes. Nous soufrons, cependant, d'un déficit important d'informations sur la virulence et la spécificité de ces lignées de bactéries pathogènes dans ces réseaux d'eaux. Ces lignées sont-elles liées à certaines infections communautaires ou épidémies nosocomiales ? Montrent-elles, sur modèle animal, une virulence équivalente aux lignées cliniques ? Ont-elles subi des réarrangements génétiques profonds liés à une adaptation aux contraintes environnementales ? Des recherches sur « l'écologie des bactéries pathogènes » pourrait permettre d'aborder et de documenter ce problème de la protection de la qualité microbiologique des eaux. Les résultats de ces recherches seront une aide à la prise de décision par les différents groupes de travail, ministères, collectivités, agences de l'eau concernés par l'amélioration de la qualité microbiologique de l'eau.

- **Mieux connaître les déterminants de la qualité de l'air intérieur (P. 65) et « Réduire l'incidence de la légionellose » (P. 82)**: « déterminer la contribution de l'air ...aux impacts sanitaires à court et long termes » est un objectif majeur de l'action 1.4. L'air, tout comme l'eau, est le vecteur d'une grande diversité de micro-organismes dont des agents pathogènes notoires comme les légionelles. Il y a, cependant, peu d'études sur les modifications de la diversité microbienne de l'air en fonction des périodes de l'année ou des zones échantillonnées (qualité microbiologique de l'air à proximité des hôpitaux, des industries, etc). Les micro-organismes de l'air sont généralement véhiculés par des supports de taille variable : poussières (10 à 100 µm), gouttelettes et micro-gouttelettes émises par les voies respiratoires humaines ou par aérosolisation (10 à 1 000 µm) et noyaux de condensation (droplet nuclei) issus de l'évaporation des gouttelettes (2 à 5 µm). Les plus petites particules, de l'ordre du micron, persistent dans l'atmosphère de manière prolongée car leur vitesse théorique de chute est lente (environ 1 mètre en 8 heures) ; elles peuvent être maintenues en suspension et diffuser à distance de leur point d'émission; elles peuvent pénétrer profondément dans l'appareil respiratoire et atteindre les alvéoles pulmonaires. La propagation des pathogènes par l'air est un problème majeur et nécessiterait d'être beaucoup plus abondamment documentée. Ce point est abordé dans l'action clé « **Réduire l'incidence de la légionellose** » (P. 82) où il y est clairement indiqué des besoins de connaissance en écologie des pathogènes dont l'identification des facteurs favorisant le développement des légionelles dans les écosystèmes naturels et permettant leur transport aérien (rôle des tours aéroréfrigérantes humides). Cette action nous semble exemplaire et devrait permettre de regrouper microbiologistes de la santé, de l'environnement, chimistes, hygiénistes, cliniciens et autres scientifiques pouvant contribuer à la réduction de l'incidence de la légionellose. De la même manière, une action thématique sur l'écologie des micro-organismes pathogènes et l'effet de certaines pratiques sur la diffusion de ces agents devrait être réalisée en regroupant les expertises en microbiologie de l'air, l'eau, des animaux – élevages intensifs, les plantes, etc. Cette action permettrait d'aborder d'autres cas de contaminations humaines associées à une diffusion par l'air de pathogènes.

- **Renforcer les connaissances fondamentales des déterminants environnementaux et sociétaux de la santé des populations (humaines) et le développement de nouvelles méthodes en sciences environnementales (P. 73)** – Deux objectifs importants de cette action clé sont de « renforcer les connaissances scientifiques du rôle de l'environnement dans l'apparition des pathologies ... », et de « développer les connaissances descriptives des expositions, de leurs sources et sur les méthodes pour les réduire (pathologies) ». Deux axes scientifiques ont été définis : (1) connaissance des déterminants environnementaux et sociétaux de la santé humaine, et (2) nouvelles méthodes expérimentales et de modélisation (toxicologie et épidémiologie) pour la détection et mesure des contaminants. L'axe 1 intègre pleinement les besoins de recherche sur les maladies infectieuses. Il fait état d'une nécessité de coupler les données de santé avec les facteurs environnementaux en incluant la qualité des milieux et les modes de production agricoles/industriels. Il s'appuiera sur les travaux engagés dans le cadre de l'ATC – Environnement et Santé qui a été pilotée par l'INSERM. L'axe 2 concerne l'évolution des substances toxiques, « spéciation et complexification », dans l'environnement. Le compartiment microbien est une composante majeure de la biotransformation des polluants dans l'environnement. Il est connu que de nombreux pathogènes opportunistes peuvent participer à cette transformation des toxiques. Il est indiqué à plusieurs reprises dans la littérature scientifique que les environnements pollués pourraient être favorables à la multiplication de certains pathogènes (Khan et al. Mycopathologia. 1997;137(3):159-63 ; Wongsu et al. Curr Microbiol. 2004 Dec;49(6):415-22 ; Filali et al. Curr Microbiol. 2000 Sep;41(3):151-6 ; Ghosh et al. Biochem Biophys Res Commun. 2000 May 27;272(1):6-11 ; etc). Il y a, cependant, trop peu d'études sur cette relation polluant-pathogènes pour conclure clairement sur la réalité de cette relation.

Les recherches sur l'écologie des micro-organismes pathogènes sont essentielles et permettront de

proposer des actions concrètes pour limiter les risques de contamination des populations humaines et réduire la diffusion des agents infectieux vers le milieu hospitalier et les populations les plus fragiles comme les personnes immuno-déprimées et les personnes âgées. Il apparaît important d'augmenter les recherches sur les réservoirs/sources d'agents infectieux (pour les populations humaines) retrouvés sur le territoire français. Dans la section suivante, nous présentons des thématiques de recherche en émergence pouvant aider nos politiques et agences de veille sanitaire à évaluer l'effet de certaines pratiques sur la diffusion et l'évolution d'agents pathogènes. Ces recherches illustrent la nécessité d'augmenter nos efforts dans le domaine de l'écologie des micro-organismes pathogènes et des sciences « -omics ». Elles plaident en faveur d'une action thématique concertée dédiée à l'écologie des micro-organismes pathogènes dont les agents opportunistes.

Thématiques de recherche « en émergence »

Ecologie des pathogènes opportunistes : principales questions, perspectives scientifiques et priorités

Le bilan des études sur les agents responsables d'infections opportunistes chez des individus fragilisés, immunodéprimés (cancer, SIDA, transplantés, etc.), ayant subi une antibiothérapie sévère, des soins invasifs (prothèse, intubation, sonde, cathéter), ou des traumatismes particuliers montre une méconnaissance importante des activités microbiennes favorisant la multiplication de ces bactéries hors du patient. Il y a, bien entendu, quelques démonstrations, dans la littérature scientifique internationale, d'infections de patients fragilisés par des souches de ces germes opportunistes retrouvées dans l'environnement hospitalier dont les siphons des éviers (e. g. Döring et al. 1996. *Pediatric Pulmonol.* 21 : 90-100), les baignoires (e. g. De Vos et al. 1997. *Burns* 23 : 379-386), ou par des souches dites environnementales (des sols, eaux, etc ; e. g. Hajjartabar. *Water Sci Technol.* 2004;50(1):63-7) et montrant des empreintes génétiques très voisines de souches cliniques. Par contre, ces études font peu état des conditions de croissance de ces bactéries dans leur environnement d'origine, qu'il soit environnemental ou hospitalier, et des effets de certaines pratiques (biocides, polluants, modes d'épuration des eaux, élevage intensif, agriculture intensive, etc) sur leur multiplication et leur évolution. Les isolats environnementaux sont majoritairement obtenus de façon aléatoire, et décrits succinctement. Il y a peu, voire aucune, information sur les effectifs, la localisation, la structure génétique des populations de ces pathogènes dans l'environnement et leur effet sur le fonctionnement écologique des niches pouvant les abriter. Il y a peu d'informations sur leur virulence. Ce manque d'informations rend difficile toutes appréciations du risque associé à la présence de ces pathogènes dans l'environnement. Néanmoins, l'obtention d'un échantillonnage représentatif collecté sur une base rigoureuse soulève rapidement des difficultés liées au nombre d'isolats nécessaire. Il est évident que des méthodes spécifiques doivent être établies pour analyser ce très grand nombre d'échantillons. Le vieillissement de la population française et l'augmentation de la population humaine mondiale risquent, cependant, de favoriser l'augmentation des infections opportunistes. Il devient donc prioritaire d'identifier les pratiques et de comprendre les événements, éléments et propriétés microbiennes favorisant la multiplication et la survie de ces agents infectieux dans l'environnement, leur évolution et la sélection de variants génétiques. Il devient important d'étudier les raisons de leur succès écologique et d'apprendre à gérer leurs populations.

Priorités de recherche

- Identification et caractérisation d'**environnements** (aquatiques et terrestres, selon un gradient d'anthropisation) **favorables** au maintien et à la **dissémination** de populations de bactéries pathogènes opportunistes.
- **Caractérisation des lignées et de la structure génétique des populations** de ces micro-organismes pathogènes opportunistes au sein des environnements identifiés et étude de leur proximité avec les lignées retrouvées dans les infections communautaires et nosocomiales.
- **Etude de l'histoire évolutive** des propriétés qui ont fait de ces bactéries des agents efficaces pour la **colonisation des environnements** identifiés.
- **Estimation** de la dangerosité des isolats « naturels » et étude de leurs propriétés de **virulence** et de leur spectre d'hôte
- **Etude de la génétique évolutive de l'adaptation** de ces bactéries aux changements de niche et **contraintes environnementales** e. g. pratiques agricoles, eaux usées, eaux pluviales, air, différents facteurs biotiques et abiotiques, etc

Exemple de recherches

- Cas des *Burkholderia* du complexe *cepacia* : *pathogènes opportunistes émergents* (Figure 1)

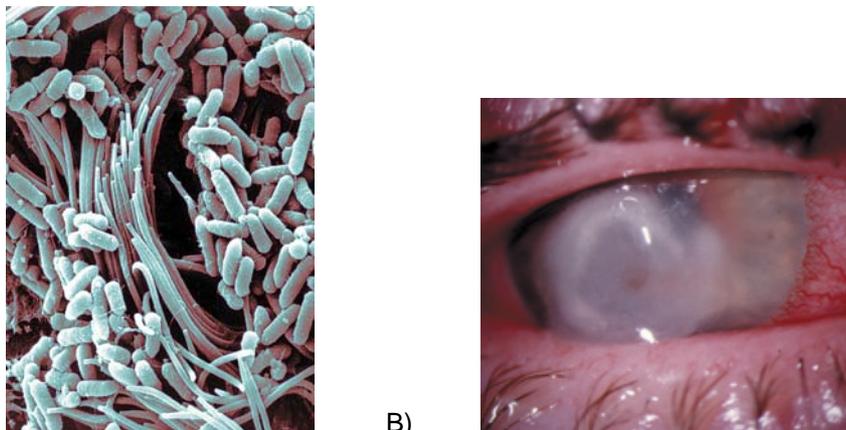


A) B) Figure 1. Photographies en microscopie électronique de deux *Burkholderia* du complexe *cepacia*. (A) les pili câbles permettant une adhésion aux cellules épithéliales humaines (www.cdc.gov/ncidod/eid/vol4no2/holmes.htm), et (B) visualisation de la forme ovale de ces bactéries (www.hs.ph.biu.ac.il/library/microblgy.shtml)

Ce complexe bactérien englobe une dizaine d'espèces retrouvées dans les infections pulmonaires d'individus atteints de mucoviscidose. Elles peuvent également être rencontrées dans le cadre d'infections nosocomiales, et sont présentes dans les sols, la rhizosphère de grandes cultures et les eaux usées. Initialement, ces bactéries étaient peu associées au milieu clinique, et ceci jusqu'à la fin des années 1990. Ce groupe bactérien était plutôt considéré comme regroupant des pathogènes de l'oignon, et des bactéries rhizosphériques. Début 1990, des études de l'UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne sur les bactéries à effet PGPR – ayant un effet positif sur la croissance et les rendements du riz, avaient permis la caractérisation d'une espèce de *Burkholderia*, *B. vietnamiensis*, qui depuis a été classée dans le complexe *cepacia* et a été retrouvée à de nombreuses occasions chez des patients atteints de mucoviscidoses. Dernièrement, la présence de souches d'une autre espèce de ce complexe dans l'environnement, l'espèce *Burkholderia cenocepacia*, a également été démontrée. Cette espèce a été retrouvée dans la rhizosphère du maïs, du lupin, et d'autres plantes (Balandreau et al., 2001). *B. cenocepacia* est l'espèce aujourd'hui associée au syndrome *cepacia*, une pneumonie nécrotique foudroyante pouvant toucher les mucoviscidosiques mais également des patients sous respirateur artificiel. Ces travaux montrent qu'il est essentiel de rechercher ces bactéries dans les rhizosphères et tissus des grandes cultures céréalières françaises, de démontrer si ces environnements peuvent constituer un réservoir pour les souches isolées de cas cliniques et de chercher à caractériser les variétés de ces plantes les moins susceptibles de favoriser la multiplication de ces bactéries. Il est également devenu indispensable d'étudier la virulence des souches environnementales de ce complexe bactérien pour permettre de clairement définir les risques sanitaires associés.

. Cas des *Pseudomonas aeruginosa*

Les *Pseudomonas aeruginosa* sont fréquemment rencontrées dans le contexte des infections nosocomiales. Ces bactéries colonisent largement notre environnement et sont responsables de pathologies graves (Fig. 2): septicémies, pneumopathies, infections cutanées ou urinaires, endocardites (etc ...) chez des individus sains, immunodéprimés ou présentant un terrain débilité (e. g. personnes atteintes de mucoviscidose). Malgré les précautions prises pour limiter leur transmission notamment en milieu hospitalier, les pathologies liées à ces bactéries opportunistes continuent leur progression.



A) B) Figure 14 (A) *Pseudomonas aeruginosa* cultivés en présence de cellules épithéliales humaines de la voie respiratoire (www.nature.com/.../v406/n6799/fig_tab/406947a0_F1.html), et (B) kératite provoquée par *Pseudomonas aeruginosa* (www.optometrists.asn.au/ceo/ceo.html).

Les bactéries de l'espèce *P. aeruginosa* peuvent se multiplier en milieu fortement pollué par des métaux (e. g. Cervantes-Vega and Chavez. 1987. Antonie Van Leeuwenhoek 53:253-9) ou hydrocarbures (Foght et al. 1996. Microbiol. 142 :2333-2340), en milieu oligo-trophique (e.g. Ramalho et al. 2002. J Microbiol Methods. 49:69-74), dans les compostes (Kaneshiro et al. 1999. Curr

Microbiol. 38:250-5), etc. Elles peuvent contourner les barrières immunitaires de plusieurs hôtes comme chiens, visons, bovins, moutons, etc. (e. g. Seol et al. 2002. J. Vet. Med. 49 :188-192, Daly et al. 1999. Appl. Environ. Microbiol. 65 : 2723-2729). De façon surprenante, elles peuvent induire la réponse immunitaire systémique (ISR) chez les végétaux, et représenter un intérêt non négligeable dans le domaine du bio-contrôle des fusarioses et autres pathologies végétales (De Meyer et al. 1999. MPMI 12 :450-8 ; Anjaiah et al. 2003. Can. J. Microbiol. 49 :85-91). Leur grande versatilité est liée à des capacités métaboliques exceptionnelles, et la sélection d'une grande diversité de réseaux de régulation permettant de sentir les fluctuations environnementales et d'induire la synthèse de protéines essentielles à une adaptation rapide.

L'un des articles de référence concernant les souches de *P. aeruginosa* de l'environnement est celui sur la caractérisation d'une lignée clonale, appelée C, qui a été retrouvée en Allemagne dans les collections de souches cliniques et environnementales (Römling et al. 1997. J. Mol. Biol. 271: 386-404). Ces travaux ont démontré par analyse de diversité (profils d'électrophorèse en champs pulsé) et tests de clonalité que des souches des deux milieux pouvaient être représentatives d'un même clone. Par contre, aucune information n'a permis d'apprécier l'importance des populations environnementales décrites; aucune stratégie d'échantillonnage des sites environnementaux n'ayant été établie. Les souches ont été obtenues de façon aléatoire, d'où plusieurs incertitudes sur la nature réelle des isolats environnementaux. Sont-ils le fait de populations microbiennes actives, bien établies dans l'environnement ou correspondent-ils à un échantillon d'isolats, en dormance ou dépérissement, qui auraient été rejetés dans l'environnement par des individus porteurs sains ou malades ? Les données sur le clone C ne sont appuyées par aucune étude de virulence de ces souches. Cependant, elles ont permis de soulever un problème important, celui de la stabilité des génotypes de *P. aeruginosa*. Des travaux sur la structure génétique des populations du clone C (Kiewitz et Tümmler. 2000. J. Bacteriol. 182: 3125-3135) et d'autres travaux, plus récents, (dont Pirnay et al. 2002. Env. Microbiol. 4 :898-911) ont démontré que cette structure était fortement marquée par des réarrangements et transferts génétiques. La fréquence de ces événements demeure inconnue mais semble élevée. Les génotypes du clone C, analysés par MLST (multi locus sequence typing - associé aux analyses de déséquilibre de liaisons classiques), montrent une structure en réseau avec des regroupements de souches liés à la présence de signatures moléculaires récentes. Des lignées semblent donc différenciables mais des échanges génétiques peuvent se produire au sein de cette espèce d'où la conclusion d'une structure génétique avec recombinaisons fréquentes mais émergence de clones épidémiques (par exemple, le clone responsable de keratites (Lomholt et al. 2001. Infect. Immun. 69 :6284-6295)). Ceci laisse présager, dans l'hypothèse de l'existence de populations environnementales stables, des échanges génétiques possibles entre populations cliniques et environnementales. Cette possibilité conduit à évoquer le risque pour la santé publique d'un rôle des réservoirs dans le recrutement de nouveaux gènes pouvant par la suite jouer un rôle dans la virulence ou la résistance aux traitements cliniques des populations microbiennes cliniques les plus adaptées à l'Homme.

Il ressort, de ces travaux et d'autres articles scientifiques sur le sujet, beaucoup d'interrogations sur le niveau de risque de transmission à l'Homme des *P. aeruginosa* d'origine environnementale ou se développant dans l'environnement en raison de certaines pratiques humaines e. g. champignonnière, élevage hélicicole, réseaux d'épuration des eaux usées, etc. Aucune étude suffisamment exhaustive ne permet d'apporter des éléments satisfaisants pour répondre à ces interrogations. Ces populations sont-elles virulentes et dans un état physiologique permettant une colonisation efficace d'individus sains ou immunodéprimés ? Les niveaux populationnels sont-ils suffisants pour permettre cette colonisation ? Ces bactéries peuvent-elles acquérir de nouvelles résistances aux antibiotiques ou des facteurs de virulence ?

- *Exemple de pratique favorisant la diffusion de Pseudomonas aeruginosa : le lagunage naturel des eaux usées*

Les eaux usées d'origine domestique, agricole et industrielle sont une préoccupation importante pour nos sociétés. Elles représentent un risque élevé de pollution chimique de nos environnements et une source d'agents pathogènes de l'Homme. Le « lagunage naturel » est l'un des modes d'épuration des eaux usées privilégié par les petites collectivités en raison de son faible coût.

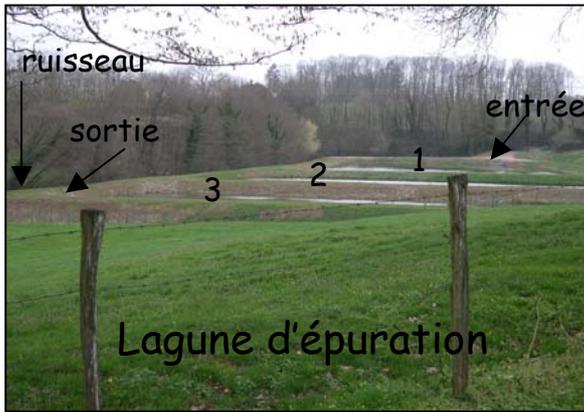


Figure 3. Lagune d'épuration. (1) la première lagune (6 m²/EH - équivalent-habitant), lagune d'entrée des eaux usées, est le siège prépondérant de la diminution de la charge polluante carbonée. En sortie de ce bassin, la concentration en algues microscopiques peut être importante; (2) la deuxième lagune (2,5 m²/EH) permet un abattement de l'azote, du phosphore et une réduction de la concentration en algues ; (3) la troisième lagune (2,5 m²/EH) continue l'abattement obtenu dans la deuxième lagune. Elle permet aussi de conserver une bonne qualité de traitement lors d'un incident (dysfonctionnement) ou d'une opération d'entretien (curage) survenant sur le premier bassin. Les eaux épurées (sortie) sont déversées dans un cours d'eau naturel (ruisseau).

Les lagunes d'épuration ont été identifiées, lors de recherches prospectives conduites en Rhône-Alpes, comme étant susceptibles de favoriser la multiplication et la diffusion de *P. aeruginosa* (collaboration UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne et laboratoire départemental des Eaux de l'Ain). Les souches de *P. aeruginosa* isolées de ces lagunes ont montré une très grande diversité génétique, et certaines lignées clonales identifiées ont été retrouvées dans des infections communautaires déclarées sur le secteur analysé. Ces travaux ont donc permis d'identifier un écosystème artificiel susceptible de diffuser cette bactérie mais également pouvant entretenir et favoriser des échanges génétiques entre un grand nombre de lignées génétiques, des génotypes, de *P. aeruginosa*. Des recherches sur l'organisation, la multiplication et l'évolution de ces génotypes pourraient aujourd'hui apporter des contributions importantes dans la compréhension de ces bactéries pathogènes. Comment ces bactéries se sont-elles adaptées à cet environnement ? Quelles propriétés ont favorisé cette colonisation ? Ces propriétés ont-elles une relation avec les facteurs de virulence identifiés chez ces bactéries ? Il est également devenu indispensable d'étudier l'évolution de la virulence et des résistances aux antibiotiques de ces génotypes en fonction des étapes de lagunage et ce jusque dans les cours d'eaux naturels récepteurs des eaux épurées. Ces recherches peuvent également permettre de faire évoluer ce type de pratique en identifiant des macrophytes ou bactéries pouvant réduire ou arrêter la multiplication des *P. aeruginosa*.

Ecologie des pathogènes – modification de l'environnement et risques infectieux : apport des sciences « -omics » et de la biologie des systèmes

Depuis dix ans et la publication de la première séquence complète du génome d'une bactérie: *Haemophilus influenzae* par TIGR, la biologie a connu une révolution avec l'accès à une information génétique exhaustive et à de nouveaux outils qui ont été rassemblés sous le terme de sciences "omics", en particulier la génomique, la protéomique, la transcriptomique et la métabolomique.

Plus de 200 génomes bactériens ont été séquencés et parmi eux un grand nombre de génomes de bactéries pathogènes pour l'homme dont certaines sont transmises par l'environnement. Les souches dont les génomes ont été séquencées sont le plus souvent d'origine clinique. Il est maintenant nécessaire de séquencer les génomes de souches de portage et de souches environnementales d'origine diverse, en choisissant en particulier les clones dominant s'ils existent. La comparaison de ces génomes associée à l'analyse génomique par puce à ADN d'un grand nombre d'isolats permettra d'identifier des biais dans la distribution de certains gènes ; biais pouvant être liés à une niche écologique particulière, des propriétés de virulence particulières ou une multi-résistance aux antibiotiques.

La flore normale de l'environnement joue un rôle considérable dans le contrôle de la survie et la multiplication de germes pathogènes. Elle peut aussi intervenir comme réservoir et vecteur de gènes codant pour des facteurs de virulence ou de résistance aux antibiotiques. La génomique et en

particulier la métagénomique¹ permettront d'avoir rapidement une meilleure connaissance de cette flore et de son évolution. Craig Venter (Rockville, USA) a ainsi lancé récemment un nouveau projet d'analyse microbiologique de l'air de Manhattan par le séquençage de son métagénome. La métagénomique associée à l'épidémiologie est aussi une approche prometteuse pour la découverte de nouvelles bactéries pathogènes. En effet pour de nombreuses pathologies, une origine infectieuse est suspectée, mais l'agent étiologique reste à découvrir. L'environnement pourrait être un réservoir pour ces germes.

Les bactéries pathogènes opportunistes rencontrent des environnements multiples et leurs "styles" de vie dans l'environnement et en interaction avec l'hôte sont totalement différents avec des profils d'expression génétique spécifiques. L'analyse du transcriptome et du protéome permet de comprendre cette adaptation. Des souches d'origine diverse se différencient aussi par des profils d'expression différents. Une seule mutation dans un gène régulateur peut mener à des bactéries qui pourraient sembler appartenir à deux espèces d'un point de vue phénotypique. Le phénomène de variation de phase, qui permet d'allumer ou d'éteindre par mutation, mais de manière réversible, un gène est essentiel à l'adaptation de certaines bactéries pathogènes opportunistes. La comparaison des profils d'expression génétique des souches environnementales et cliniques, n'a jamais été réalisée à grande échelle. Elle sera essentielle pour identifier les spécificités de chaque groupe de souches. La protéomique et la métaprotéomique peuvent jouer un rôle dans la découverte d'antigènes et éventuellement d'allergènes présents dans l'environnement qui pourraient être utilisés pour développer des capteurs ou pourraient avoir un impact sur la santé. L'étude de l'évolution du métagénome et du métaprotéome dans l'environnement à la suite de modification des procédures culturelles ou d'équipement, construction de routes, d'égouts ou de modification des écoulements d'eau est sans doute l'approche la plus puissante et automatisable d'investigation.

Finalement, la flore microbienne joue un rôle majeur dans les cycles des éléments chimiques et dans le métabolisme des polluants. Ces composés peuvent, en retour, avoir un impact sur l'équilibre de cette flore et sur la présence de germes pathogènes. Les flux métaboliques font le plus souvent intervenir des communautés microbiennes, par exemple le sous-produit du métabolisme d'une bactérie peut être toxique pour cette bactérie mais être un nutriment pour une autre espèce qui lui est associée. Les approches globales ont considérablement stimulé la recherche sur les communautés bactériennes et récemment des progrès importants ont été réalisés dans la compréhension de leur composition et de leur dynamique. Une analyse globale du métabolisme combinant une approche théorique de reconstruction métabolique sur les données génomiques et une approche expérimentale permettra de mieux comprendre le métabolisme d'un écosystème et ses variations. Ces connaissances pourront ensuite être mises à profit pour adapter ce métabolisme afin de limiter la contamination du milieu par des agents pathogènes

Ces approches globales par la nature et la quantité des connaissances générées permettent d'envisager de modéliser le mode de fonctionnement des microorganismes dans différents environnements ainsi que leur association. Cette biologie des systèmes constitue un champ nouveau d'investigation en biologie mais surtout en mathématique avec le besoin de nouveaux outils de modélisation et d'analyse. La modélisation de l'effet de perturbation sur l'état de la flore et de son métabolisme apportera une aide significative pour la mise en place des politiques de gestion des environnements.

Parallèlement à une meilleure compréhension de la flore de l'environnement, ces technologies permettent le développement de nouveaux outils d'analyse microbiologique. En particulier, elles permettent le développement de puces à ADN et de puces à protéine pour la détection et la caractérisation de la flore normale et pathogène. La combinaison de la génomique, de la transcriptomique et de la protéomique avec les nanotechnologies permettra le développement de nouveaux capteurs pour le suivi microbiologique précis des environnements qui nous entourent. Il sera nécessaire aussi de mettre en place des outils informatiques et des bases de données pour gérer ces informations. Ces nouveaux moyens de surveillance contribueront à améliorer la prévention contre les contaminations d'origine environnementale, la détection de microorganismes pathogènes émergents ou de clones hyper virulents ou multi-résistants aux antibiotiques et devra concourir à la détection rapide d'actes bioterroristes.

Potentiel de recherche en France

¹ La métagénomique consiste à l'analyse par séquençage de l'ADN de l'ensemble de la flore bactérienne d'un échantillon. Elle ne nécessite pas l'isolement d'une souche sur un milieu de culture et donne ainsi accès aux bactéries non cultivables. C'est une approche exploratoire extrêmement puissante pour découvrir de nouvelles fonctions et de nouvelles espèces microbiennes sans *a priori*.

Nous avons des activités de recherche reconnues internationalement en microbiologie environnementale et médicale. Cependant, il est nécessaire de favoriser les rapprochements entre ces deux secteurs de la microbiologie par des actions incitatives. Quelques groupes de recherche possèdent les compétences permettant de couvrir ces deux secteurs et de valider les études par de l'expérimentation animale. Les compétences dans les sciences « -omics » sont reconnues internationalement. Il y a cependant peu de recherches dévolues aux analyses de la biologie des systèmes. Le secteur de la métabolomique est en ébullition et la création de l'ISA (Institut des Sciences Analytiques - Lyon) devrait faciliter l'accès aux équipements lourds nécessaires à ce type d'approche.

Agences de veille sanitaire et centres nationaux de référence

Plusieurs agences, réseaux, centres de référence, et autres structures participent à une surveillance active des agents pathogènes, et contribuent à la documentation et l'élaboration d'enquêtes épidémiologiques dans le but de réduire les sources d'exposition et limiter les épidémies ou endémies. Entre autre, nous pouvons citer le rôle plus qu'essentiel de l'InVS, l'AFSSE, l'AFSSA, l'AFSSAPS, et nous présentons, ci-dessous, la liste des principaux Centre Nationaux de Référence avec leur adresse internet :

CNR des Arbovirus : <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/arboFHV-index.html>
CNR des Arbovirus et virus Influenzae dans la région Antilles-Guyane : <http://www.pasteur-cayenne.fr>
CNR des bactéries anaérobies et du botulisme : <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/anaer-index.html>
CNR des Bordetella - Coqueluche : <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/bordet-index.html>
CNR des Borrelia : <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/borrelia-index.html>
CNR Campylobacter et Helicobacter : <http://www.cnrch.u-bordeaux2.fr>
CNR du charbon : <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/charbon-index.html>
CNR des Corynebacterium diphtheriae : <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/coryndipt-index.html>
CNR des Escherichia coli et Shigella : <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/typenterob-index.html>
CNR des fièvres hémorragiques virales : <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/arboFHV-index.html>
CNR des hépatites virales B et C : <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/hepatV-index.html>
CNR des Legionella : <http://dm3.univ-lyon1.fr/legio/LEGIONELLES0.htm>
CNR des leptospiroses : <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/lepto-index.html>
CNR des Listeria : <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/listeria-index.html>
CNR des méningocoques : <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/meningo-index.html>
CNR des mycobactéries : <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/mycobact-index.html>
CNR mycologie - antifongiques : <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/mycoses-index.html>
CNR de la chimiorésistance du paludisme dans la région Antilles-Guyane : <http://www.pasteur-cayenne.fr/>
CNR de la peste et autres yersiniose : <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/yersinia-index.html>
CNR de la rage : <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/rage-index.html>
CNR de la résistance aux antibiotiques : <http://www.pasteur.fr/recherche/unites/aab/>
CNR des Salmonella : <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/salmcni-index.html>
CNR des staphylocoques : <http://dm3.univ-lyon1.fr/staph/txtstaph.htm>
CNR des vibrions : <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/vibrions-index.html>
CNR du virus Influenzae France Nord : <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/grippe-index.html>

Il nous semble également important de rappeler le rôle important des C.CLIN (Centres de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales), CTIN (Comité Technique National des Infections Nosocomiales), et CIN (Cellule " Infections Nosocomiales ") qui structurent les actions de lutte contre les infections nosocomiales conduites par les établissements ou organismes publics ou privés de prévention ou de soins.

Les zoonoses émergentes et ré-émergentes

Pascal Boireau
Directeur UMR BIPAR INRA AFSSA ENVA UPVM

Les zoonoses regroupent un ensemble de maladies qui sont transmises d'un animal vertébré (sauvage ou domestique) à l'homme. L'animal contaminé appelé « hôte » peut présenter une symptomatologie caractéristique (rage) ou frustrer en fonction de l'agent pathogène transmis (bactérie, virus, agent non conventionnel, parasite). L'hôte peut être seulement « véhicule de l'agent pathogène » sans clinique apparente. C'est le cas de nombreuses infections persistantes (trichinellose, cysticerose...) difficiles à diagnostiquer sur l'animal vivant en dehors d'investigations utilisant des méthodes de diagnostic de laboratoire (sérologie, amplification génique (PCR) sur prélèvement biologique). L'hôte peut présenter une maladie caractérisée à la suite de la contamination mais pour un certain nombre d'exemples la symptomatologie peut être très différente chez l'homme ou bien l'agent pathogène peut cibler des organes différents chez l'homme (exemple quand l'homme s'intercale dans un cycle parasitaire : *Alaria alata* qui va se retrouver dans les muscles, le cœur, le cerveau chez l'homme et dans le seul tube digestif chez le renard). La présente note sera divisée en quatre parties. Une première partie concernera un certain nombre de définitions avec quelques exemples récents d'émergences. Puis seront traitées les questions de recherche actuelles avec le mode de transmission des agents pathogènes, les mécanismes expliquant l'émergence des agents zoonotiques. Parmi ces facteurs d'émergence seront cités la démographie animale et humaine, les changements de comportement, le développement économique, la plasticité des génomes des agents pathogènes et l'agro terrorisme. Les autres paragraphes s'attacheront à décrire un aperçu de la dynamique à l'étranger de la recherche et à positionner le potentiel de recherche en France avec les interrogations majeures.

Le contexte

Définitions

Les maladies zoonotiques sont causées par des agents infectieux qui peuvent être transmis entre (ou être partagés par) les animaux et l'homme. L'OMS a défini ce concept en 1951 « the diseases and infections which are naturally transmitted between vertebrate animals and man ». Une définition des infections émergentes a été posée en 1992 : « new, reemerging or drug-resistant infections whose incidence in humans has increased within the past two decades or whose incidence threatens to increase in the near futur » (Emerging Infections, Microbial threats to health in the United States, Intitute of Medecine, 1992). Plus précisément pour les zoonoses on parlera d'émergences dans les cas suivant :

« Zoonotic diseased caused either by totally new or partially new agents, or by micro-organisms previously known, but now occuring in places or in species where the disease was previously unknown » (Mesli, OMS, 1992).

ZOONOSES and the RISK of DISEASE EMERGENCE

Taylor, L.H. and Woolhouse, M.E.J., U. of Edinburg, U.K.
Int. Conf. Emerg. Infect. Diseases, Atlanta, GA, USA, July 16-19, 2000

Infectious Organisms	Human Pathogens (N=1709)	Zoonoses (N=832)	Emerging Pathogens (N=156)
Viruses/Prions	507 (30%)	183 (22%)	64 (41%)
Bacteria/Rickettsia	541 (32%)	250 (30%)	48 (31%)
Fungi	309 (18%)	83 (10%)	16 (10%)
Helminths	286 (17%)	275 (33%)	9 (6%)
Protozoa	66 (3%)	41 (5%)	19 (12%)

Table 1 : Répartition des différentes classes d'agents pathogènes humains zoonotiques ou non.

Les principales classes d'agents pathogènes transmis sont regroupées Table 1. Les organismes infectieux sont divisés en :

- virus/prions (ou agents non conventionnels)
- Bactéries/*Rickettsia*
- Champignons, levures
- Helminthes
- Protozoaires

Il est à remarquer qu'une part importante d'agents pathogènes sont zoonotiques (832) et représente 50% de l'ensemble des agents pathogènes humains (1709) répertoriés. Parmi les agents pathogènes émergents 73% (114/156) sont zoonotiques (Taylor et al, 2000). De plus une majorité de ces agents zoonotiques émergents sont classés dans les groupes majeurs des agents susceptibles d'être utilisés comme arme de guerre (bioterrorisme).

Exemples d'émergence

Des exemples de virus, bactéries, parasites engendrant des zoonoses émergentes sont donnés Tables 2 à 4. Les émergences virales dominent en nombre mais les émergences bactériennes et parasitaires sont également très importantes par la somme de personnes contaminées (*E coli* O157:H7, *Cryptosporidium parvum*...). Pour les bactéries deux catégories d'agents peuvent être reconnus : ceux transmis par voie alimentaire (*Campylobacter*..) et ceux transmis par des ectoparasites (*Rickettsies*...). Pour les virus émergents, en dehors du virus des fièvres hémorragiques, il est à noter le nombre important de virus à ARN comme ceux du genre paramyxovirus (3) ou le récent coronavirus apparu en Asie (SRAS).

Emerging Zoonoses

• Some Major Bacterial Etiologic Agents of New Zoonoses Identified Since 1977

- 1977 *Campylobacter* spp.
- 1982 *E. coli* O157:H7
- 1982 *Borrelia burgdorferi* (Lyme disease)
- 1983 *Helicobacter pylori* and other spp.
- 1986 *Ehrlichia chaffeensis* (HME)
- 1992 *Bartonella henselae* (Cat scratch Disease)
- 1994 *Rickettsia felis* (Murine typhus like)
- 1994 *E. Equi/A. phagocytophilum* (HGE)

B Chomel, Davis University, USA, 2003

Table 2 : Zoonoses bactériennes émergentes.

Emerging Zoonoses

• Some Major Viral Etiologic Agents of New Zoonoses Identified Since 1990

- 1991 Guanarito virus (Venezuelan hemor. fever)
- 1993 Sin nombre virus (Hantavirus Pulm.Syndr.)
- 1994 Sabia virus (Brazilian hemorrhagic fever)
- 1994 Hendra virus (Equine morbillivirus, Australia)
- 1996 Australian bat Lyssavirus (Rhabdovirus)
- 1997 Menangle virus (paramyxovirus, Australia)
- 1997 Influenza virus H5N1 (Hong Kong)
- 1998 Nipah virus (Paramyxovirus, Malaysia)
- 1999 Influenza virus H9N2 (Hong Kong)
- 2003 ? SARS, Coronavirus (China, Hong Kong)

B Chomel, Davis University, USA, 2003

Table 3 : Zoonoses virales émergentes.

Emerging/Re emerging Zoonoses

• Some important parasitic diseases transmitted by food.

- 1976 *Trichinella spiralis*
- 1976 *Cryptosporidium parvum*
- >1980 *Toxoplasma gondii* (Western countries)
- >1990 *Echinococcus multilocularis* (Foxes)
- *Giardia duodenalis* (?)



Table 4 : Zoonoses parasitaires émergentes. (P Boireau, 2004). *G. duodenalis* est un contaminant hydrique majeur dans beaucoup de pays émergents. La « turista » n'a pas toujours une origine virale mais est parasitaire dans beaucoup de cas. La notion de zoonose pour *G. duodenalis* n'est pas formellement confirmée.

Les principales questions scientifiques

La recherche entreprise sur les agents de zoonose et les émergences vise à connaître comme pour tous les autres agents pathogènes les mécanismes impliqués dans la virulence, la réponse des hôtes à l'agent infectieux, le développement d'outils pour l'identification et le développement de vaccins. Cependant des questions plus spécifiques qui sont décrites ci-dessous existent pour les agents zoonotiques et les émergences.

Les modes de transmission

Les modes de contamination/transmission sont synthétisés dans le tableau 5. En fonction de la localisation géographique, de l'évolution du climat, de la gestion de l'environnement ou de la maîtrise de l'hygiène, l'une de ces voies de transmission peut être privilégiée.

Production infectieuse	Mode de transmission
Fèces, urine, salive, sang	Contamination de surface
aérosol	Contamination aérienne
Lait, viande	Consommation de l'aliment contaminé
Contact direct	Morsure (directe ou via un arthropode piqueur)

Table 5 : Analyse des différents mode de transmission d'un agent pathogène zoonotique.

Contact Direct

L'agent de la teigne ou le virus rabique peuvent être transmis directement par contact avec l'animal porteur (Figure 1). Ce contact peut nécessiter une rupture de l'intégrité de la peau (morsure nécessaire pour le virus de la rage canine). Cependant un certain nombre d'agents zoonotiques peuvent pénétrer directement l'épiderme (*Brucella*, agent de la fièvre de Malte). Pour le virus rabique il est à remarquer l'existence de plusieurs modes de transmission : contact direct ou aérosol via les sécrétions souillées des chauve-souris (concentration particulière dans des grottes et dans certaines régions). En matière de rage la présence d'hôtes particulièrement sensibles peut expliquer des diffusions rapides dans des zones jusqu'alors indemne. Ainsi entre 1977 et 1999 le raton laveur a été l'hôte principal de la diffusion du virus rabique sur la côte Est des USA (F.Murphy, UCD, USA). En revanche en Papousie Nouvelle Guinée c'est la chauve –souris frugivore *Pteropus alecto* qui est à l'origine de la transmission de virus apparentés à la rage.

Questions de Recherche (QR) : 1) La voie de pénétration transcutanée est une voie de recherche particulièrement importante puisque le contournement de la barrière naturelle protégeant l'hôte (l'homme) est réalisé. La compréhension des mécanismes sous tendant cette réussite pour l'agent pathogène permet de mettre en place des méthodes de lutte plus adaptées (exemple avec Leishmanies, *Capillaria*, bactéries traversant l'épiderme (*Bartonella*, *Brucella*..)).

2) La voie aérienne est privilégiées pour un certain nombre de viroses. La compréhension des modes de propagation fait intervenir deux approches différentes :

- Une approche spatiale avec une modélisation nécessaire si une prédiction du risque doit être faite (en particulier lors d'une demande du gestionnaire du risque). Plusieurs exemples ont été décrits et sont en cours d'investigation dans de nombreux pays et concernent essentiellement les agents viraux (virus de la Fièvre aphteuse, propagation d'agents pathogènes vectorisés comme le virus du West Nile aux USA ou dans le Sud de la France, dissémination des Babésioses, bactéries vectorisées).

- La diffusion spatiale nécessite une résistance à la dessiccation de l'agent pathogène ou une protection contre cette dessiccation. La caractérisation de cette résistance est nécessaire pour comprendre une émergence ou une dissémination nouvelle.

Transmission par l'aliment

Les agents pathogènes transmis par l'aliment sont particulièrement importants par le nombre de personnes potentiellement contaminées à partir d'une même source (anadémie).

	USA (2000) (nombre cas ou %)	France (2001) (nombre cas ou %)
Epidémies répertoriées	1414	559
Etiologie confirmées	31,5%	49%
Nombre de cas	26 021	6 742
Agent causal bactérien	6 506 (223 foyers)	64% Salmonella
Agent causal viral	7 208 (176 foyers)	679 hospitalisations (3 morts)

Table 6 : Agents de zoonoses émergentes transmises par les aliments

QR : Des méthodes rapides de détection ou mieux des méthodes globales et rapides de détection des agents pathogènes dans la matrice alimentaire sont des outils accessibles avec le développement des puces ADN/ARN à visé diagnostique. La modélisation de la diffusion est également bien développée à travers divers réseaux européens.

Les QR s'attachent également à la quantification des agents pathogènes dans la matrice alimentaire. Les conséquences des modifications de la matrice alimentaire sur la survie ou le développement des agents pathogènes sont des questions également récurrentes. De même les recherches d'inhibiteurs enzymatiques ou microbiens (par des probiotiques) sont toujours en développement.

Pourquoi certaines zoonoses émergent-elles ?

Plusieurs points sont à prendre en compte et découlent d'investigation de recherche et développement. La plupart des points développés font l'objet de QR et développement.

Concepts épidémiologiques

Des nouveaux hôtes peuvent survenir entre l'homme et le réservoir principal ou au contraire un hôte accidentel peut servir de relais. L'existence d'hôte amplificateur, surnuméraire ou non, pourrait expliquer l'émergence du SRAS. Enfin le laboratoire de haute sécurité peut accidentellement servir de lien entre le réservoir et l'homme (le lien étant voulu avec le bioterrorisme). La maîtrise du risque est essentiel à ce niveau.

Facteurs expliquant l'émergence de Maladies infectieuses

- Les changements de comportement

Ils sont particulièrement importants pour expliquer l'émergence des zoonoses transmises par l'aliment. Le type d'aliment, la nature de la cuisson ou de la préparation culinaire, les nouveaux aliments, les préférences ethniques et économiques sont autant de facteurs influençant significativement l'émergence de zoonoses. La globalisation des moyens peut servir d'amplificateur détonant, c'est le cas par exemple de la cryptosporidiose aux USA et en France. Les QR nécessiteront une approche pluridisciplinaire pour identifier les sources des épidémies et mettre en place des mesures pour la gestion de ce risque.

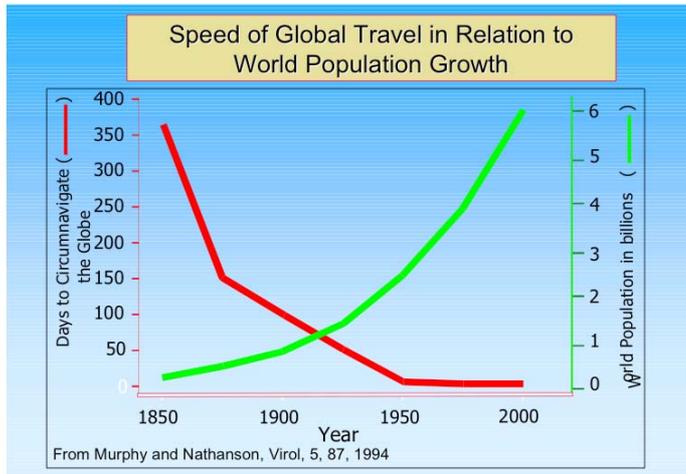


Figure 1 : Evolution de la population mondiale en lien avec l'évolution des temps de déplacement autour du monde.

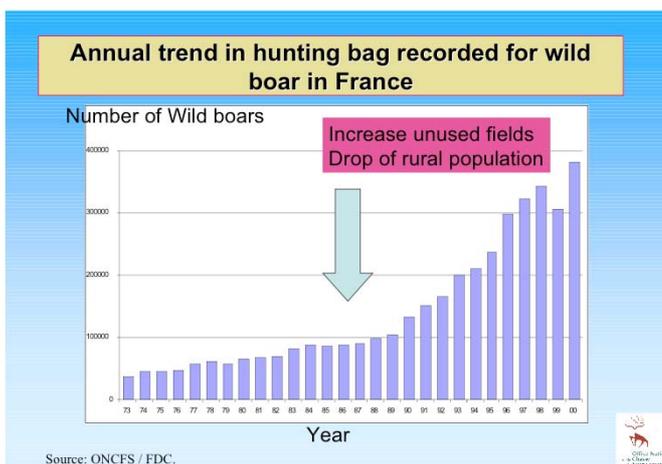


Figure 2 : Evolution de la population de sanglier en France au cours des 20 dernières années. L'évolution de la population de cervidés est comparable.

- *Démographie animale et humaine.* C'est un constat qui doit aller de pair avec celui de la vitesse de déplacement des hommes et des biens (Figure 1). Le véritable impact de ces deux paramètres est incomplètement connu. Des illustrations ont été apportées lors de l'épidémie du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) qui aurait pu devenir une pandémie. L'intensification de la production agricole joint à la déforestation en Malaisie semble avoir favorisé l'émergence du virus Nipah en 1998. Les conséquences des déséquilibres dans les populations animales n'est cependant pas particulièrement bien connu même si les conséquences sur la dissémination du virus rabique, de l'échinococcose (population de renard), de la tuberculose (population de chevreuil), de paramyxovirus (diverses populations animales) ont été décrits et ont été corrélées avec des extensions anormales d'animaux réservoir comme c'est le cas actuellement de certaines populations d'animaux sauvages (Figure 2).

- *Impact des progrès technologiques et industriels.* Le risque généré par une vaccination nouvelle fondée sur des souches atténuées d'un agent pathogène est un exemple. La vaccination de volailles à l'aide de souche de coronavirus atténuées (souche de la bronchite infectieuses) a permis la genèse dans des élevages de virus recombinant sauvage/vaccinaux. Aucun changement de tropisme n'a été observé dans cet exemple mais ceci a été démontré pour un autre coronavirus porcin.

- *Développement économique et utilisation du territoire.* L'analyse des « spolygotypes » (séquences marqueur stables de l'ADN génomique de mycobactérie correspondant à un isolat) de *Mycobacterium bovis* en France montre bien l'évolution spatiale voir la contamination de régions géographiques vierge par des transports d'animaux ou le développement d'un nouveau réservoir pouvant être représenté par des animaux sauvages sensibles. Ainsi des souches de *M bovis* isolées au Cameroun retrace le commerce de bovins des siècles passés (N Haddad et al, 2001).

- *Commerce international et globalisation des échanges.* Différents facteurs associés à l'émergence de zoonoses transmises par l'aliment sont ainsi concernés par la globalisation. Les systèmes d'approvisionnement de l'eau sont particulièrement sensibles notamment aux rejets d'animaux. Les concentrations d'élevages sous l'impact de l'internationalisation du marché de la viande contraignent à des rassemblements importants de troupeau dont la gestion des déchets est un facteur de risque devant être maîtrisé.

L'évolution des structures de production, leur gestion conditionnent dans un sens positif ou négatif ce qui sera une source de contaminant pour l'homme dans le futur. Ainsi l'arrêt de l'utilisation du DDT en ex URSS a entraîné une émergence de maladies humaines transmises par des arthropodes piqueurs.

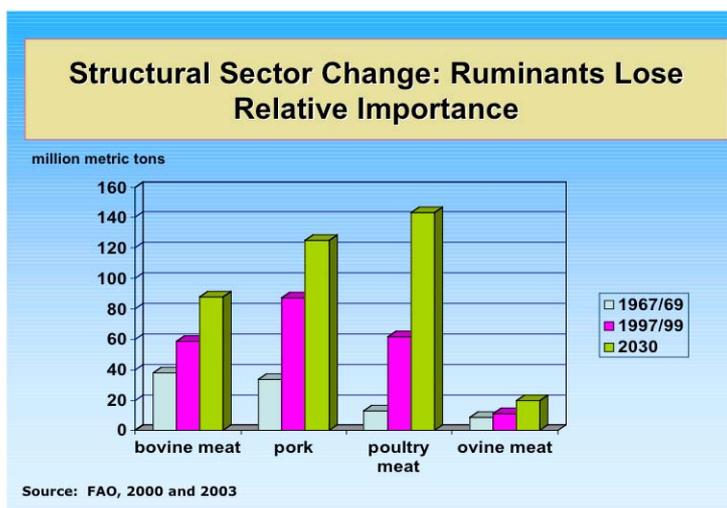


Figure 3 : Evolution de la consommation de viande projetée vers 2030. Une plus forte production de viande de volaille est attendue.

L'augmentation de la production de viande de poulet au niveau mondial (Figure 3) souligne l'impact des agents pathogènes véhiculés par cet animal, les agents de la grippe étant en premier lieu à considérer. Il est à noter la décroissance relative de viande de ruminant projetée au cours des 30 prochaines années.

- *Adaptation des agents pathogènes, mutations, réversion*

Ce domaine de la microbiologie fondamentale fournit régulièrement de nouvelles données expliquant l'émergence des agents pathogènes. Seront cités sans détailler :

- Les changements de tropisme imposés par l'homme : vaccins à virus atténués avec changement d'hôte (franchissement de la barrière d'espèce). Il est à remarquer que le changement d'hôte n'est pas toujours associé à une variation du pouvoir pathogène.
- Une mutation dans un récepteur de l'agent pathogène expliquant un changement de tropisme (bien documenté dans la famille des coronavirus avec plusieurs exemples), de virulence (cas de l'influenza H5).
- Effondrement des mesures de contrôle en Santé Publique (conflits.)
- Agro terrorisme.

Ces deux derniers éléments convergent vers un même effet déstabilisant et destructeur expliquant des émergences souvent décrites mais pas toujours analysées (ex : émergence de parasitoses dans le cœur de l'Europe).

Pourquoi maintenant parle-t-on plus de zoonoses et de zoonose émergente ?

En dehors de l'impact majeur de ces agents pathogènes transmis par les animaux à l'homme par leur nombre, les outils de détection sont actuellement plus fins et plus spécifiques avec des possibilités de marquer des sources de contamination (ex : agents parasitaires et marqueurs microsatellites permettant de montrer les transports de réservoir d'une aire géographique vers une autre ou de dater des contaminations de territoire).

De plus les épidémies sont mieux répertoriées et décrites. Des plans de surveillance pour les Hantavirus, les virus de la grippe, les leptospiroses (dans certaines régions), sont mis en place. Les arthropodes vecteurs d'agent pathogène font l'objet d'attention plus particulière (réseaux européens « EDEN », Tick born diseases, transversalité INRA EpiEmerge).

Comment identifier les agents de zoonoses ? Quelles méthodes diagnostiques et prophylactiques ?

L'émergence doit être identifiée par rapport à un état existant. Elle peut être caractérisée à différents niveaux :

- chez l'homme (trop tard)
- chez l'animal (West Nile, Trichinellose porcine...)
- chez le réservoir sauvage avant la contamination de l'animal « relais » (tuberculose du chevreuil). C'est le niveau optimum de dépistage.

- Recherche des causes

Ce champ est par essence multidisciplinaire. C'est peut-être à ce niveau qu'il existe une certaine « carence » en France compte tenu de la pluralité des intervenants (agences, centres de référence, instituts de recherche, gestionnaire du risque...). Il existe une nécessité d'établir des liens entre diverses disciplines : zoologie, entomologie, climatologie, microbiologie, biologie moléculaire...et de construire des interfaces réactives entre les acteurs locaux, nationaux et supra-nationaux impliqués en santé publique et santé vétérinaire (exemple en France de l'interface Laboratoires de référence vétérinaire et Centre nationaux de référence pour les pathologies humaines ; réseau européen pour le diagnostic des virus exotiques (www.enivd.de)).

- Collaboration inter agences/instituts nécessaire

Elle vise à évaluer le risque et à proposer des outils pour la gestion de ce risque. La recherche est souvent éloignée de cette gestion du risque en France.

- Education/transfert technologique

Certains réseaux de recherche impliquent une diffusion et une formation dans leur plan de dissémination. La formation à l'épidémiologie en France est certainement à (re)penser.

- Information/communication

Il y a une nécessité de bien informer et d'informer vite sans déformation d'où l'implication de scientifiques dans les médias à ce niveau.



Il est aussi important d'analyser avec rigueur l'impact des médias. Un bilan a été fait lors de l'épidémie du SRAS (Figure 4). Ce bilan réalisé en Italie montre l'importance de cette résonance médiatique pour la mise en place de mesures contraignantes sérieuses et des décisions coûteuses.

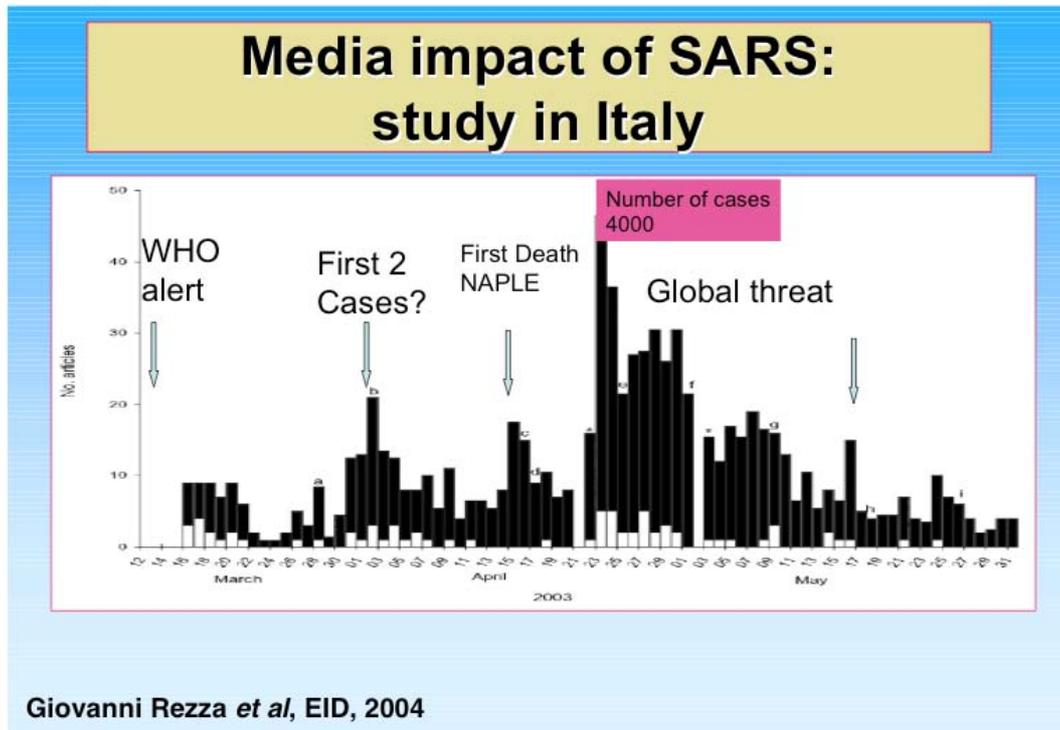


Figure 4: Nombre d'articles où le mot SRAS a été utilisé dans les 5 principaux quotidiens italiens entre mars et mai 2003 (barres noires en fonction du temps en jour). Les barres blanches indiquent les articles publiés en première page. Un astérisque indique une absence de publication d'un quotidien. L'OMS a déclaré l'alerte le 12 mars et les mesures pour les voyageurs ont été prises le 15. Les principaux événements sont décrits ci-dessous:

- a mort de Carlo Urbani
- b deux premiers cas putatifs en Italie
- c conférence de presse de la "task force"
- d cas suspect à Naples
- e l'OMS informe sur le risque de pandémie
- f doublement du nombre de cas probable en Italie
- g Troubles dans les mesures de sécurité mise en place dans les aéroports européens
- h amélioration des mesures de quarantaine en Chine
- Irôle putatif du carnivore civette

Aperçu de la dynamique scientifique à l'étranger

Dans le monde

L'impact de la recherche chinoise en santé animale devient important même s'il reste très inférieur au potentiel américain. Le génome du virus SRAS a été décortiqué en quelques jours par des équipes chinoises ayant des moyens particulièrement importants. Le coût du séquençage en Chine est globalement 4 à 5 fois moins cher ce qui n'est pas le cas de la plupart des pays émergents comme le Mexique ou au contraire cet indicateur est plus élevé. Un Institut à Pékin (National Engineering Research Center of Bioinformatics System co-founded by the Chinese Academy of Sciences and Beijing Huada Genomics Research Institute) a une capacité de séquençage journalière de 100 000 séquences jour. La mise en place de plan qualité, de procédures comptables entraînent un certain ralentissement mais les capacités de développement demeurent très supérieures à tous les autres pays. Bon nombre de parasites sont en cours de séquençage en Chine (*Schistosoma*...) cependant par rapport aux 30 nématodes animaux et végétaux séquencés dans un consortium américain la recherche chinoise est, dans ce domaine pris comme exemple, moins structurée.

En Europe

Le 6^e plan de recherche et développement a induit une certaine « révolution » dans les concepts organisationnels de la recherche. En fait les nouveaux outils émanent d'une adaptation des outils développés par l'ESF (Fondation Européenne pour la Science) depuis plus de 10 ans. Un des outils les plus surprenants est le Réseau d'excellence (REX) qui vise à créer des instituts virtuels résultants de l'association d'institutions. Plusieurs réseaux soutenus par des institutions françaises ont été développés :

- Eden soutenu par le CIRAD vise à traiter les agents pathogènes exotiques transmis aux animaux.
- EadGen (INRA) : Ce **Réseau d'Excellence** (13 partenaires) vise à améliorer la qualité et la sécurité des produits d'origine animale. L'intégration des activités permet à tous les partenaires d'avoir un accès facile et durable aux meilleures installations, ressources biologiques, plate-formes technologiques, logiciels, outils d'analyse et connaissances. Ce réseau doit créer un laboratoire virtuel durable dans le domaine de la génomique des interactions hôte-agent pathogène. Il coordonne et oriente la recherche européenne dans le domaine de la génomique et des maladies animales et utilisant la génomique comme outil pour améliorer la santé animale, la qualité et la sécurité des aliments.
- MedVetNet (AFSSA) regroupe des agences européennes pour le contrôle des zoonoses. L'institut virtuel a plus une action développement et diagnostic que recherche mais son évaluation tous les 18 mois permet de rééquilibrer ce point.

Notons l'existence d'autres réseaux très structurants comme l' »Integrated Consortium on Ticks and Tick-born diseases « (ICTTD3) qui porte sur un domaine majeur de maladies émergentes potentielles en Europe (lié au changement de climat).

Cependant ces réseaux fournissent des apports financiers très limités aux chercheurs (4-5000€ annuel) et permettent essentiellement d'organiser des symposiums, groupe de travail, institut virtuel, à charge pour le chercheur d'aller avec le support de ce réseau obtenir d'autres crédits de fonctionnement.

Potentiel de recherche en France

Les acteurs en France en matière de zoonoses se répartissent en deux grandes structures :

- EPST/EPIC : la dominante Recherche est assurée par l'INRA (département Santé Animale et également dans une moindre mesure département Microbiologie). L'implantation de l'INRA dans les ENV permet un lien fort avec l'enseignement vétérinaire. L'institut Pasteur est historiquement impliqué dans l'étude des zoonoses avec des laboratoires de référence Rage, charbon..., une recherche fondamentale sur les virus des fièvres hémorragiques, les gripes, différentes protozooses parasitaires (leishmanie, *Toxoplasma*...). L'INSERM avec une infrastructure lourde de niveau 4 à Lyon assure une recherche sur les agents pathogènes de classe 4 en partenariat avec l'Institut Pasteur. Le CIRAD (EPIC) dispose d'un département également à vocation santé animale dans le domaine des maladies tropicales. Le CNRS dispose de quelques unités/équipes ayant une vocation à travailler sur les agents pathogènes zoonotiques (*Toxoplasma*).
- EPA/agences : l'AFSSA avec ses laboratoires destinés à l'appui technique et la recherche finalisée gère l'essentiel des Laboratoires Nationaux de Référence (LR) en Santé Animale. L'institut de veille sanitaire avec les Centres Nationaux de référence assure des missions parallèles à celles de l'AFSSA pour les agents pathogènes humains dont certains sont zoonotiques.

Les perspectives scientifiques et les priorités

- **Persistance dans l'émergence** : assurer une pérennité de compétences dans les différents champs thématiques d'étude des agents pathogènes animaux zoonotiques, des parasites aux agents non conventionnels.

Depuis 25 ans chaque année de nouvelles maladies animales émergent ou ré-émergent. La fréquence n'est pas forcément plus importante que par le passé compte tenu de la précision des outils développés. La santé animale n'est cependant pas maîtrisée pour autant comme cela était présenté il y a seulement 10 ans en France, période où il était préférable d'investir en sécurité sanitaire des aliments au détriment de l'amont (la production). Il y a une nécessité de maintenir une recherche de haut niveau en France en Santé Animale compte tenu de la rémanence des agents pathogènes, de par leur diversité et compte tenu des facteurs multiples favorisant évoqués.

Note : des auteurs affirment l'existence d'émergence accrue, cependant il n'est pas évident que le nombre d'émergences soit plus fort que par le passé. Les fortes concentrations de la production

animale peuvent néanmoins servir d'amplificateur. Cependant ces amplificateurs ne sont pas forcément plus « efficaces » pour l'agent pathogène que de multiples petits élevages disséminés dans une large province. Par ailleurs l'agent de la grippe espagnole a été particulièrement meurtrier (40 millions de victimes) avant le développement très rapide de l'aviation.

- Nécessité d'un référentiel pour les émergences en santé animale

La France demeure le premier producteur d'animaux de rente et bénéficie d'une population d'animaux sauvages également importante. La maîtrise des maladies animales à caractère zoonotique est une préoccupation majeure. Pour déceler des émergences un référentiel dans le temps et l'espace pour différentes espèces animales est nécessaire. Celui-ci n'existe pas actuellement. Comment étudier la circulation d'un agent pathogène chez une espèce animale de rente il y a 20 ans ? comment connaître l'impact d'un réservoir sauvage dans telle ou telle région ? L'installation d'un conservatoire d'ADN, de liquides biologiques/tissus provenant de différentes espèces animales dans le temps et l'espace devrait être mis en place. Une construction inter-instituts via le BRG (Bureau de Ressource Génétique) par exemple, est suggérée pour permettre une exploitation par des équipes de différentes origines de ce conservatoire qui doit être actif et réel. Quelques conservatoires de cette nature existent de part le monde comme le conservatoire des tissus de la faune sauvage en Corée du Sud.

- Associer Référence et Recherche

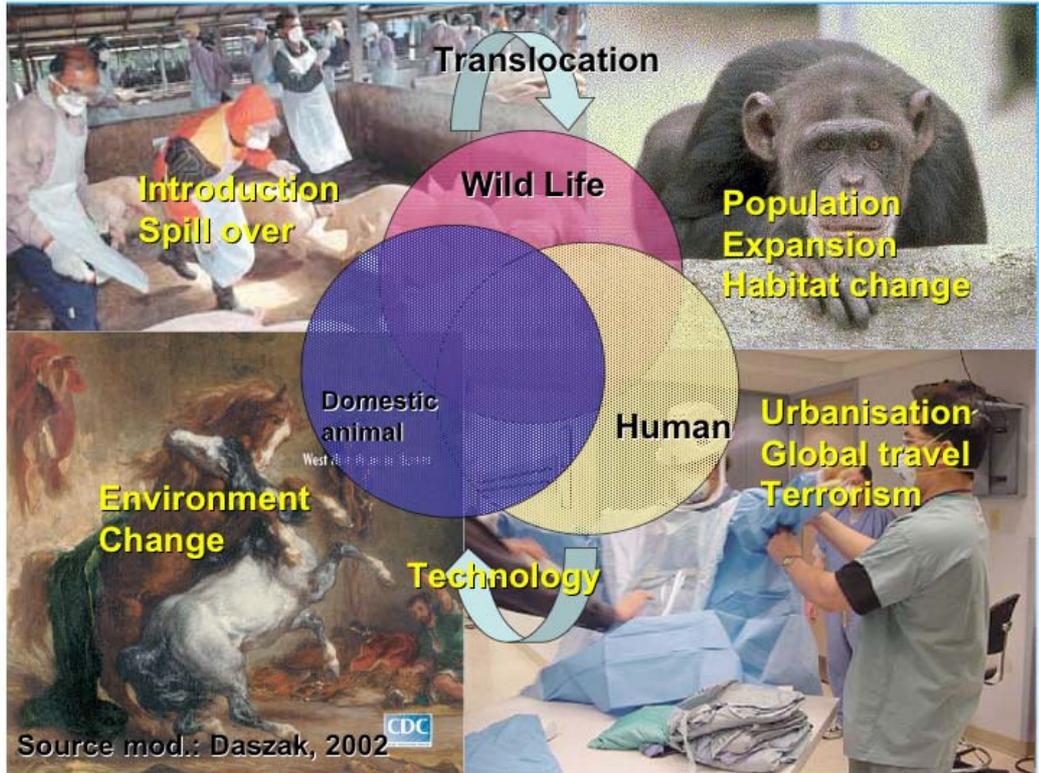
Les laboratoires européens de référence des maladies animales du groupe A de l'Office International des Epizooties (OIE) sont essentiellement anglais (LR Fièvre aphteuse, LR peste petits Ruminants), espagnol (Peste porcine africaine), allemand (LR des zoonoses européens). Une carence majeure existe en France à ce niveau qui devrait être contre balancée compte tenu des enjeux sanitaires présentés par l'élevage, les animaux sauvages et les animaux de compagnie. L'éloignement « Référence » et « Recherche et Développement » explique cet état de fait en partie l'un ne se nourrissant pas de l'autre et réciproquement (accès plus difficile aux données par exemple). Le modèle a souvent été privilégié au détriment d'agents pathogènes majeurs de fait. De même des applications pratiques de la biologie intégrative ou à haut débit doivent bénéficier plus rapidement aux besoins pratiques d'appui scientifique et technique, de développement diagnostique par exemple.

Conclusion

La circulation des agents zoonotiques est permanente et se résume dans le schéma ci-contre où tout déséquilibre dans l'un des quatre grands blocs de circulation des agents pathogènes entraîne une émergence :

- dérégulation de la population animale
- changement d'échelle (transport ..)
- modifications environnementales majeures, modification de l'agent pathogène
- non maîtrise d'un danger.

L'ensemble de ces points entraîne un questionnement de recherche nécessaire à la maîtrise des risques en aval des filières au niveau du consommateur/utilisateur. Par ailleurs si les maladies humaines sont bien connues, de nouvelles maladies animales sont découvertes chaque année et sont donc potentiellement sources de nouvelles maladies chez l'homme.



Remerciements : Pr Bruno Chomel, Davis University, USA, Pr Henri Jean Boulouis, Microbiologiste ENVA, Pr René Chermette Parasitologue, ENVA , Pr Nadia Haddad, Microbiologiste, ENVA, scientifiques cités.

Biotoxines : mycotoxines, toxines d'origine végétale et animale

Mycotoxines

Dr. Pierre Galtier (UR66 Pharmacologie-Toxicologie INRA Toulouse)
Directeur du Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie UR66 INRA

Toxines de bactéries, de plantes, d'animaux

Dr. Daniel Gilet, Chef de Groupe
Département d'Ingénierie et d'Etudes des Protéines
Direction des Sciences du Vivant, CEA-Saclay

Toxines de microalgues

Pr. Simone Puiseux-Dao, Professeur Emérite
au Muséum National d'Histoire Naturelle
Toxicologie cellulaire et environnementale *USM 505*

Introduction

Il existe dans la nature des millions de toxines auxquelles l'Homme est plus ou moins exposé. Ces toxines proviennent d'organismes très variés: bactéries, algues microscopiques, champignons, plantes, animaux. Leurs natures chimiques sont également très diversifiées: molécules organiques, peptides, protéines de petite ou de grande taille, etc. Leurs modes d'action sont très différents, de nombreux processus physiologiques peuvent être touchés. Les intoxications peuvent être aiguës ou chroniques selon l'organisme producteur et provoquer des dégâts immédiatement visibles ou au contraire à long terme. En conséquence, la recherche sur les toxines est séparée en disciplines bien distinctes. Cette note de synthèse sur les biotoxines a donc été divisée en quatre parties correspondant à des domaines de recherche propres: les mycotoxines ou toxines de moisissures, les toxines de bactéries et de plantes, les toxines animales et les toxines de microalgues.

LES MYCOTOXINES

Le contexte scientifique et sanitaire

Origine des mycotoxines

Les mycotoxines sont des produits du métabolisme secondaire de moisissures pouvant se développer sur la plante au champ ou en cours de stockage et doués de potentialités toxiques à l'égard de l'homme et des animaux. Plus de 300 métabolites secondaires ont été identifiés mais seuls une trentaine possèdent de réelles propriétés toxiques préoccupantes. Ces toxines se retrouvent à l'état de contaminants naturels de nombreuses denrées d'origine végétale : notamment les céréales mais aussi les fruits, noix, amandes, grains, fourrages ainsi que les aliments composés et manufacturés destinés à l'alimentation humaine et animale.

Les mycotoxines sont secrétées par des moisissures appartenant notamment aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. Deux groupes de champignons toxinogènes peuvent être distingués. Le premier type est constitué de champignons envahissant leur substrat et produisant la mycotoxine sur plantes sénescentes ou stressées : il est alors question de toxines de champs. L'autre groupe regroupe ceux qui produisent les toxines après récolte, on les qualifie de toxines de stockage. On distingue parmi les groupes de mycotoxines considérées comme importantes du point de vue agro-alimentaire et sanitaire les aflatoxines, l'ochratoxine A, la patuline, les fumonisines, la zéaralénone, les trichothécènes et notamment le déoxynivalénol et la toxine T-2. Il convient de remarquer que dans un groupe structural de toxines, la toxicité peut varier très largement d'une toxine à une autre et que le danger ne vient pas toujours de la toxine elle-même, mais peut aussi venir de ses métabolites.

Historiquement, la mycotoxicose la plus anciennement connue en France, est l'ergotisme. En fait, des moisissures toxinogènes peuvent se développer sous tous les climats, sur tous les supports solides ou liquides dès l'instant qu'il y a des éléments nutritifs, de l'humidité, d'où la grande variété de substrats alimentaires concernés. Les aliments contaminés par les mycotoxines peuvent être classés en deux groupes : les aliments et produits d'origine végétale et ceux d'origine animale. Parmi les

produits et aliments d'origine végétale, les céréales présentent le plus grand facteur de risque compte tenu de leur consommation importante quel que soit le régime alimentaire et de la fréquence de leur contamination. Les autres produits d'origine végétale sont les fruits et légumes secs, les épices, le café, le cacao et les jus de fruits et leurs produits de fermentation. Parmi les produits et aliments d'origine animale, le lait, les viandes, les abats et tout ce qui en dérive, doivent retenir l'attention en priorité.

Toxicité des mycotoxines et risque sanitaires

La toxicité de ces contaminants naturels peut être directe ou indirecte vis à vis des organismes consommant des denrées alimentaires contaminées. Certaines mycotoxines ont une toxicité aiguë très marquée (exposition unique à une forte dose), mais il est exceptionnel en Europe d'être exposé à des doses toxiques en une seule ingestion d'aliments contaminés. Dans tous les cas, les effets chroniques (exposition répétée à de faibles voire très faibles doses) sont les plus redoutés en raison des habitudes alimentaires et du pouvoir de rémanence de ces toxines souvent résistantes aux températures et aux procédés technologiques mis en œuvre dans l'industrie alimentaire.

La toxicité est variable, certaines mycotoxines sont reconnues ou suspectées d'être cancérogènes (aflatoxines, ochratoxine A, fumonisines). Certaines toxines exercent un pouvoir hépatotoxique (aflatoxines), d'autres se révèlent œstrogéniques (zéaralénone), immunotoxiques ou hématotoxiques (patuline, trichothécènes, fumonisines), dermonécrosantes (trichothécènes), néphrotoxiques (ochratoxine A) ou neurotoxiques (toxines trémorgènes). En outre, plusieurs mycotoxines peuvent être présentes dans le même produit ou la même ration alimentaire.

Pour les consommateurs humains, un autre type de risque indirect est la présence possible de résidus dans les productions issues d'animaux de rente exposés à une alimentation contaminée. Ces résidus correspondent à la toxine elle-même ou à des métabolites bioformés et conservant les propriétés toxiques du dérivé parental. Les espèces d'élevage peuvent donc constituer un vecteur de ces toxines ou de leurs métabolites dans des productions telles que la viande, le lait ou les œufs. C'est le cas notamment de l'aflatoxine B1, dont le métabolite l'aflatoxine M1 est retrouvé dans le lait des mammifères lorsque ceux-ci ont ingéré des aliments contaminés par l'aflatoxine B1. Leur capacité à se lier aux protéines plasmatiques et leur lipophilie en font des toxiques capables de s'accumuler dans l'organisme en cas d'expositions répétées et rapprochées.

Issues d'une contamination généralement reconnue comme d'origine végétale, les mycotoxines constituent un problème très actuel de qualité et de sécurité des aliments. Si la mise en place de réglementations est déjà intervenue à propos des aflatoxines, de l'ochratoxine A et de la patuline, elle est en voie d'élaboration pour le déoxynivalénol, les fumonisines et la zéaralénone.

L'évaluation du risque mycotoxique demeure délicate. En effet, ce risque est d'essence naturelle, l'homme n'en maîtrisant pas la survenue (conditions climatiques notamment), il est pernicieux car la contamination fongique est difficilement contrôlable et enfin il peut être multiple en raison de la capacité d'une même moisissure à produire différentes mycotoxines. En effet, plusieurs toxines d'une même famille structurale ou présentant des structures différentes peuvent se retrouver dans le même produit alimentaire. Cette situation naturelle pose cependant des problèmes car les recherches menées sur les synergies possibles demeurent difficiles.

Objets de recherche et questions scientifiques

Devant ce constat, il convient de mettre en place des moyens de connaissance relatifs à l'appréciation des expositions de l'homme et des animaux d'élevage mais aussi à la détermination des dangers potentiels afin d'argumenter encore la définition des risques encourus et de pouvoir les gérer ensuite.

- La première dynamique doit concerner la connaissance de l'état des contaminations naturelles des aliments par les mycotoxines ou leurs dérivés toxiques. A ce propos, un manque réel d'informations ouvertes à tous par voie de publications, caractérise depuis toujours cette problématique. Cela est d'autant plus dommageable que les mycotoxines sont des toxiques d'origine naturelle dont la dissémination est sporadique et souvent liée à la climatologie. Même si cette activité relève plus des plans de surveillance que de programmes scientifiques, elle n'en constitue pas moins la base de réflexion pour mesurer les expositions de l'homme et des animaux d'élevage à ces toxines. Dans ce domaine, un autre objet de recherche est la mise à disposition de méthodes d'échantillonnage et de dosages, particulièrement dans les matrices hétérogènes comme les grains de céréales.

- La toxinogénèse des moisissures constitue une préoccupation scientifique très actuelle en raison des approches génomiques et métaboliques actuellement entreprises sur les voies de biosynthèse des toxines. En effet, il est devenu possible de connaître par clonage et séquençage, les gènes codant pour des protéines enzymatiques ou de transport essentielles dans la production des mycotoxines. Cette approche conduit à des perspectives en termes de détection génétique des souches réellement toxiques mais aussi de sélection future d'antifongiques spécifiques venant interférer sélectivement avec des étapes clés de ces biosynthèses.

- La qualification des dangers mycotoxiques est une quête permanente en matière de sécurité sanitaire des aliments. A propos des mycotoxines, la mise en évidence des dangers cancérigènes, perturbateurs endocriniens ou immunotoxiques devrait être optimisée dans le futur par l'application des nouvelles approches de toxicologie moléculaire alors qu'elle apparaît comme une priorité en raison de la démonstration épidémiologique de l'importance des pathologies d'origine cancéreuse, endocrinienne et infectieuse dans nos populations. Le souci des toxicologues porte également sur une meilleure prise en compte du risque mycotoxique en élevage car l'état sanitaire des cheptels est plus que jamais surveillé alors que de nouvelles conditions d'élevage (élevage extensif, usage de litière pour les porcs,...) apparaissent et peuvent conduire à des problèmes mycosiques ou mycotoxiques non avérées jusqu'ici.

- Les produits animaux étant proposés à la consommation humaine, une question scientifique d'importance est la connaissance du devenir des toxines dans ces produits (viandes, graisses, abats, lait, œufs). En effet, la sophistication des méthodes analytiques permet désormais de rechercher des traces de dérivés toxiques dans les matrices biologiques. Aussi, la demande actuelle porte sur une recherche de résidus dans les tissus consommables d'animaux soumis à des expositions expérimentales dont le niveau correspondre aux contaminations alimentaires relevées. La réactualisation des données est essentielle dans ce domaine. En complément, un manque d'informations subsiste dans le domaine du transfert éventuel des mycotoxines tout au long de la chaîne alimentaire et en particulier de leur résistance au cours des processus technologiques d'élaboration de l'aliment final (fermentation, cuisson, stockage,...).

- La meilleure connaissance de l'exposition de l'homme aux mycotoxines est essentielle pour apprécier le risque encouru. L'un des objets de recherche majeur doit être la détermination des populations à risques (enfants, personnes âgées, végétariens, immunodéprimés, consommateurs d'alimentation biologique,...) afin que des mesures puissent être prises pour protéger ces sujets des dangers supposés. Dans ce sens, l'approche épidémiologique doit être basée sur une démarche réfléchie capable de corréliser la consommation alimentaire et la réponse de bioindicateurs avérés d'exposition ou d'effet. Bien que peu étudié en Europe, un nouveau risque mycotoxique a été identifié, il s'agit de l'exposition environnementale à ces toxines ou leurs résidus. Si la présence de traces dans les déchets animaux (lisiers, litières,...) devrait être anecdotique, le risque sanitaire de toxines contenues dans les spores fongiques semble une menace réelle particulièrement pour des travailleurs exposés dans leur environnement professionnel (compostage, agriculture) ou domestique (logements anciens). De fait, outre le risque mycosique, il est maintenant bien connu que certaines toxines peuvent être véhiculées par les spores et pourraient exercer leur toxicité après une exposition par voie aérienne.

- Enfin, nous distinguerons le cas des situations nouvelles liées soit à une meilleure connaissance de ce type de contaminants soit à la prise en compte des évolutions. Ces dernières années nous ont convaincu de la présence de métabolites secondaires fongiques insoupçonnés et dont les caractères délétères devront être étudiés par des approches toxicologiques raisonnées. Il en va ainsi des toxines des *Alternaria* ou de moisissures pathogènes pour l'homme et les animaux comme *Aspergillus fumigatus*. Par ailleurs, des substrats alimentaires réputés sanitaires sûrs comme les jus de fruits se sont avérés porteurs de contaminations possibles par l'ochratoxine A ou la patuline. Enfin, l'évolution climatologique vers un réchauffement planétaire doit être prise en compte comme en atteste la plus grande prévalence de toxines aspergillaires dans les céréales enregistrée en Italie, à la suite des fortes chaleurs de l'été 2003.

Dynamique scientifique à l'étranger

Actuellement, l'essentiel des recherches relatives à la toxigenèse fongique et à la qualification toxicologique des dangers sont conduites en Amérique du Nord et en Afrique du Sud (terre de tradition en mycotoxicologie). En fait, les forces scientifiques européennes sont essentiellement mobilisées sur l'amélioration des moyens de détection analytique et de prévention vis à vis des risques mycotoxiques.

Les contrats européens accordés au titre du 5^{ème} PCRD ont d'ailleurs porté sur la prévention en matière d'ochratoxine A dans les céréales, de fusariotoxines dans la chaîne alimentaire de l'homme et des animaux et sur la détection en temps réel des moisissures productrices de ces deux types de mycotoxines. D'autres actions européennes ont concerné l'appréciation du risque lié à la présence d'ochratoxine A dans le raisin et ses produits ou encore ont servi de forum (action COST) en mycotoxicologie. En revanche, le 6^{ème} PCRD n'a pour l'instant, accordé aucune place aux recherches relatives aux mycotoxines.

Dans le domaine toxicologique, la France, l'Allemagne et la Suède apparaissent comme les seuls pays capables de proposer des unités de recherche de compétence en qualification des dangers pour l'homme ou l'animal d'élevage.

Potentiel de recherche en France

Disciplines

Les disciplines scientifiques participant à la dynamique de recherche en mycotoxicologie sont nombreuses et variées. Elles réunissent l'agronomie, la mycologie, la pathologie végétale, la technologie de l'alimentation, la chimie analytique, la zootechnie, la toxicologie, l'épidémiologie et les sciences de la consommation. Le potentiel français est de ce fait dispersé, toutefois l'acuité du problème posé par la présence indésirable des mycotoxines dans l'alimentation humaine et animale et ses conséquences au plan réglementaire, a conduit les laboratoires et instituts compétents à se regrouper ces dernières années dans des actions de recherche transversales et d'envergure, initiées par la puissance publique.

Organismes et laboratoires

Depuis quelques années, l'INRA a su développer en son sein une dynamique fédérative sur les mycotoxines en lançant de 2001 à 2004, une action incitative et transversale réunissant une dizaine d'unités sur des actions de recherche concernant la mycotoxinogénèse par les moisissures, notamment des *Fusarium* ou des *Byssoschlamys*. La détermination des niveaux de contamination et du transfert animal des mycotoxines constituait le deuxième axe de recherche alors que le troisième axe concernait la qualification des dangers et des risques mycotoxicologiques pour l'homme et l'animal.

D'autres instituts à vocation davantage appliquée, ont également investi des équipes et des moyens dans ce type de recherche, en particulier Arvalis, l'IRTAC et le CEA. En outre, de nombreuses équipes universitaires sont venues apporter leur compétence spécifique dans ces dynamiques fédératives.

La liste ci-dessous identifie en regard des disciplines correspondantes, les principaux partenaires dont l'implication et les moyens humains et financiers sont très variés :

- agronomie et pathologie végétale : INRA Rennes, Versailles et Grignon, Arvalis, semenciers et industriels phytosanitaires (IRTAC),
- mycologie : INRA Bordeaux, Versailles et Toulouse, ENSA Toulouse, Institut Pasteur, Université de Grenoble.
- technologie de l'alimentation : INRA Montpellier, IFBM, industriels agro-alimentaires,
- chimie analytique : AFSSA, nombreux laboratoires spécialisés,
- zootechnie et toxicologie : INRA Toulouse, Alfort et Clermont-Ferrand, ENV Lyon et Toulouse, CEA, Universités de Brest, Bordeaux et de Paris-Sud,
- épidémiologie et sciences de la consommation : INRA Paris-INAPG, AFSSA,
- contamination aérienne : INRA Alfort et Toulouse, ADEME, CSTB Champ sur Marne.

Priorités scientifiques

- Les priorités scientifiques doivent se définir en considérant d'une part l'état effectif des connaissances relatives aux mycotoxines et d'autre part le degré d'acuité des problèmes sanitaires suspectés ou réellement posés.

- Les fusariotoxines constituent actuellement le sujet principal d'intérêt des recherches entreprises en raison de leur découverte récente (fumonisines), de la mise à disposition récente de moyens fiables de détection (trichothécènes) et surtout de leur occurrence avérée dans les productions végétales. A ce titre, de nombreuses lacunes existent dans leur connaissance, notamment en matière de toxinogénèse et d'applications en termes de traitements phytosanitaires sélectifs. Il en va de même pour la qualification exacte de leur danger en situation de faible contamination ou de contamination multiple (trichothécènes, fumonisines et/ou zéaralénone). De plus, l'appréciation de leur présence à l'état de résidu dans les produits animaux devra être engagée sur des modèles exposés à des contaminations alimentaires représentatives de la réalité.

- Le même problème du danger non déterminé par association de toxines co-occurentes peut se retrouver avec les toxines produites par des *Aspergillus* ou des *Penicillium*, notamment l'ochratoxine A, la patuline ou la citrinine. D'une façon générale, la communauté en charge d'apprécier les risques sanitaires est très intéressée par des recherches concernant le problème de la contamination multiple entre mycotoxines, voire entre mycotoxines et d'autres contaminants alimentaires (pesticides, métaux lourds, hydrocarbures polycycliques,...). Il existe également une forte demande sur la qualification réelle du danger des faibles expositions appliquées sur le moyen voire le long terme, à l'aide de modèles pertinents et adaptés.

Dans le domaine de la toxicologie, certaines hypothèses devront être confirmées ou écartées, notamment le caractère perturbateur endocrinien de diverses mycotoxines (zéaralénone, patuline), la toxicité éventuelle des toxines d'*Alternaria* et leur communauté d'effet avec les fusariotoxines, le danger effectif des toxines présentes dans l'environnement aérien dans le cas de situations professionnelles ou domestiques particulières.

Enfin, la mise en évidence de bioindicateurs d'effet ou d'exposition devenue possible par l'appoint récent des méthodes à haut débit (transcriptomique, protéomique, métabolomique) devrait apporter des arguments nouveaux dans l'appréciation épidémiologique des risques encourus par les consommateurs mais aussi de certaines populations à risque.

Perspectives de programmes et de projets

A l'énoncé de ces priorités de recherche, des programmes nouveaux devraient être lancés, notamment dans la dynamique de l'action RARE actuellement en cours (Maîtrise du risque de contamination par les fusariotoxines des aliments à base de céréales).

Ces actions devraient notamment porter sur :

- l'influence des changements climatiques et des pratiques sur l'occurrence des mycotoxines dans les productions végétales,
- la connaissance de la toxinogénèse des souches fongiques d'intérêt non seulement à l'égard des céréales mais aussi des fruits et légumes et leur application en termes de recherche de traitements phytosanitaires sélectifs,
- l'étude des dangers constitués par les faibles expositions à des toxines seules ou en association, à la fois chez l'homme et l'animal d'élevage,
- la connaissance des résidus de mycotoxines dans les produits végétaux et animaux proposés à l'alimentation humaine.

Références

Le Bars, J., Galtier, P. *Symposium International MYCOTOX 98 « Mycotoxines dans la Chaîne alimentaire, aspects toxicologiques et technologiques »*. *Revue de Médecine Vétérinaire* 1998, 149, volume 6, pages 469-715.

Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France. 1999. *Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque*, éditions TEC & DOC.

LES TOXINES BACTERIENNES

Contexte scientifique

Les toxines bactériennes sont des protéines permettant aux bactéries pathogènes, soit de pénétrer les tissus de l'organisme infecté, soit de le tuer, soit de baisser ses défenses immunitaires. Il existe schématiquement trois grands types de toxines: les toxines perforant les membranes cellulaires, les toxines agissant à l'intérieur des cellules ou des neurones, les toxines perturbant la fonction immunitaire. Les premières sont surtout responsables de dégâts tissulaires locaux et locaux régionaux au niveau du site de l'infection: pus, abcès, gangrènes. Les toxines agissant à l'intérieur des cellules sont de loin les plus dangereuses. Elles sont impliquées dans de nombreuses pathologies mortelles ou sévères: diphtérie, tétanos, cholera, botulisme, charbon, coqueluche, ulcère gastro-duodéal, diarrhées nosocomiales etc. Les vaccins existants contre certaines de ces maladies sont réalisés à partir de toxines détoxifiées par traitement chimique. Les toxines perturbant le système immunitaire provoquent des chocs toxiques potentiellement mortels. Enfin, certaines toxines protéiques de plantes (RIP, ribosome inactivating protein) peuvent être traitées avec les toxines bactériennes car leur structure et leur mode d'action sont comparables.

Contexte politique

Par le passé, un nombre significatif de pays et de grandes puissances ont travaillé à la militarisation des toxines de bactéries et de plantes les plus dangereuses (toxine botulique, ricine) ou de leurs organismes producteurs (bacille du charbon, peste, etc.). Si ce risque semble aujourd'hui limité après l'adoption de conventions internationales, le terrorisme international et certaines sectes apocalyptiques constituent une nouvelle menace prise extrêmement au sérieux par les autorités compétentes. De nombreux pays, dont la France, ont commencé à mettre en place des incitations à la recherche de moyens de détection, de parades et de traitements contre ces dangers.

Contexte économique, social et sanitaire

La diphtérie, le tétanos et la coqueluche sont contrôlés par la vaccination contre les toxines correspondantes. En France, ce contrôle est bon, encore que des résurgences de coqueluche sont apparues, liées au refus de vacciner de certains praticiens. Dans certains pays, notamment de l'ex-block soviétique, de nombreux cas de diphtérie sont à signaler en raison d'une mauvaise couverture vaccinale.

Les maladies infectieuses sont en principe contrôlables par les antibiotiques. En réalité, de nombreuses infections sont difficiles à traiter, en particulier en milieu hospitalier en raison du développement de multiples résistances aux antibiotiques. Le développement de médicaments ou de traitements spécifiques contre les toxines bactériennes pourrait constituer un traitement adjuvant dans ce contexte.

Sur le plan sanitaire, la nourriture industrielle ou collective, bien que très contrôlée, peut présenter un risque. Le développement de bactéries même en faible quantité peut conduire à une accumulation de toxines responsables d'intoxications alimentaires: botulisme, entérotoxémies, etc. Dans l'environnement urbain, le risque posé par la légionellose est à prendre en considération. Cette pathologie difficile à traiter implique en effet des toxines produites par la bactérie.

Principales questions scientifiques ou objets de recherche dans le domaine

Quatre grandes questions scientifiques sont identifiables. Il faut noter qu'elles sont toutes interconnectées. Les objectifs à atteindre sont:

- La compréhension des mécanismes d'action des toxines bactériennes dans leur détail et l'identification des toxines encore inconnues. On connaît aujourd'hui le principe général du mécanisme d'action de plusieurs toxines, dont les plus dangereuses. Mais les détails des événements moléculaires impliqués dans l'intoxication restent inconnus, de nombreuses zones d'ombre demeurent, de nombreuses toxines restent à caractériser. En particulier, il faut identifier les récepteurs permettant aux toxines de se fixer aux cellules, comprendre comment ces toxines perforent les

membranes cellulaires ou les traversent, comment les toxines agissant à l'intérieur des cellules modifient leur cible moléculaire.

- .La détection des toxines bactériennes (dans le contexte de la médecine, de la sécurité des aliments, de la défense contre le bioterrorisme, de la surveillance de l'environnement). Il n'existe pas de tests simples et sensibles adaptés à une surveillance de terrain, de réseaux d'eau, de systèmes d'aération ou de climatisation ou de patients potentiellement intoxiqués. Un effort considérable doit être réalisé dans ce domaine que l'on peut considérer comme urgent.

- .Le développement de traitements contre les toxines bactériennes (anticorps pour la sérothérapie, molécules inhibitrices). Il existe des anticorps pour la sérothérapie contre plusieurs toxines (tétaniques, botuliques) mais ils doivent être administré de manière très précoce après une intoxication. C'est pourquoi il est nécessaire de développer des molécules thérapeutiques inhibitrices de l'activité des toxines, qui seraient efficaces sur des toxines ayant déjà pénétré les tissus ou les cellules.

- .L'ingénierie des toxines pour exploiter leurs propriétés et développer de nouveaux médicaments ou de nouveaux outils pour la biologie. Plusieurs toxines ont un fort potentiel thérapeutique, soit sous leur forme naturelle, soit sous une forme modifiée par ingénierie moléculaire. Les applications sont multiples et concernent le traitement des dystonies musculaires (toxine botulique), des tumeurs (toxine diphtérique, ricine, exotoxine A de pseudomonas), la vaccination anticancéreuse ou l'injection de protéines thérapeutiques dans les cellules (toxines diphtérique, de Shiga, ricine, adényl cyclase de Bordetella, etc.) ou dans les neurones (toxines botulique et tétanique).

Dynamique scientifique à l'étranger (revues, associations scientifiques, grands programmes nationaux ou internationaux..)

La recherche sur les toxines bactériennes est actuellement dominée par les questions de bioterrorisme. Les grandes revues scientifiques internationales publient volontiers des articles sur le sujet. Les travaux publiés sont scientifiquement pertinents, mais ne correspondent que rarement à des recherches réellement applicables à la détection et aux traitements. Ces dernières sont souvent publiées dans des revues mineures car la mise au point et l'application de savoir-faire existants sont moins prestigieuses scientifiquement. Les Etats-Unis ont réorienté des crédits très importants sur la biodéfense (plusieurs milliards de dollars) avec pour inconvénient le développement de recherches "tous azimuts" sur la question, parfois mal ciblées en termes de priorités. Les financements européens par le biais des programmes-cadres couvrent les aspects de sécurité alimentaire. En revanche, les aspects de biodéfense ne le seront que dans le futur. La France a lancé en 2003 les appels à propositions ACI microbiologie 2003 et Biotox traitant entre autre les aspects de toxines et biodéfense. Ces financements sont cependant très insuffisants et ne permettent pas un travail dans la durée. L'ingénierie moléculaire appliquée à la thérapie du cancer peut éventuellement bénéficier de financements par les associations caritatives. Il faut souligner un effort de longue date de la DGA qui finance plusieurs projets dans des laboratoires académiques.

Le potentiel de recherche en France et les manques (disciplines, laboratoires, organismes concernés...)

Le potentiel de recherche en France est excellent, notamment sur les toxines à action intracellulaire. L'Institut Pasteur traite tout naturellement de nombreuses toxines. Des laboratoires au CNRS et au CEA participent aussi à cet effort. En particulier le CEA est très bien positionné sur les techniques de détection, aussi bien par des méthodes classiques (ELISA) que par des méthodes innovantes en cours de développement (biopuces etc.).

Le Muséum national d'Histoire naturelle propose un parcours de Master 2 dédié aux toxines animales, bactériennes, de microalgues, de plantes, à leurs biotechnologies, aux toxiques industriels et nucléaires et à leurs interactions avec les organismes dans les écosystèmes. Cette formation participe à la formation de jeunes chercheurs dans le domaine des toxines.

Les perspectives scientifiques et les priorités envisageables

Il est essentiel de soutenir la recherche sur la biodéfense contre les toxines bactériennes. Ces recherches doivent porter en priorité sur des réalisations concrètes notamment en détection, sans négliger les projets à plus long terme sur la mise au point de traitements, la compréhension des mécanismes d'action des toxines et en dehors de la biodéfense, l'ingénierie des toxines à des fins thérapeutiques. La recherche sur les toxines constitue ainsi typiquement une recherche duale.

Les collaborations sont à envisager notamment dans le domaine des nanotechnologies, de la chimie, de la physique, des automatismes. Les problèmes de biodéfense sont malheureusement considérés par les autorités comme relevant de l'échelon national, mais l'effort nécessaire doit aussi être réalisé à l'échelle européenne par le biais de collaborations compte tenu de l'ampleur des besoins financiers. La constitution de réseaux européens est à encourager. Le financement de ces recherches doit se faire par le biais d'appels d'offres, les projets doivent être évalués par des comités scientifiques et les montants financiers doivent être à la mesure des objectifs à atteindre.

Références

Popoff M. R. and Alouf J. The comprehensive sourcebook of bacterial toxins (2nd edition). Academic Press, Elsevier, Oxford

Dossier Bioterrorisme : quels risques ? Quelles ripostes ? (A. Ménez, Ed) Biofutur n° 248, Octobre 2004

Dossier Bioterrorisme : de l'analyse aux solutions. (A. Ménez, Ed) Biofutur n° 250, Décembre 2004

LES TOXINES ANIMALES

Contexte scientifique

Il existe de très nombreuses espèces animales productrices de toxines. Ces espèces sont retrouvées aussi bien parmi des invertébrés que des vertébrés: anémones de mer, insectes, araignées, scorpions, mollusques, centipèdes, batraciens, serpents...Les venins de ces animaux renferment souvent un grand nombre de toxines différentes. Au total, le règne animal produit des millions de toxines différentes. Ces toxines sont en général de petites protéines très stables. Leur rôle est en général d'immobiliser ou de neutraliser des proies. Les fonctions biologiques touchées sont en priorité le système nerveux, le système cardiovasculaire et la coagulation sanguine. Les venins (de serpent notamment) peuvent contenir des enzymes digestives qui ne sont pas à proprement parler des toxines mais qui provoquent des dégâts tissulaires considérables. Les cibles moléculaires visées sont extrêmement variées. Ainsi, les toxines animales forment un réservoir de molécules pharmacologiques quasiment inépuisable. Elles constituent des outils essentiels pour permettre au biologiste de disséquer de nombreux processus physiologiques et d'identifier les molécules biologiques impliquées telles que les récepteurs du système nerveux (douleur, contraction musculaire, etc.). Elles représentent une source potentielle considérable de médicaments, certaines toxines étant déjà utilisées en clinique (traitement de la douleur par exemple).

Contexte politique et économique

Les toxines animales ne constituent pas directement un risque d'utilisation criminelle. Cependant, leur incorporation à des agents pathogènes, bactéries ou virus, est à considérer. Sur un plan économique, il faut considérer leur potentiel thérapeutique dans des pathologies variées comme le traitement des maladies neuro-dégénératives, des troubles neurologiques, cardiovasculaires ou de la coagulation, de la douleur, des maladies parasitaires, etc.

Contexte sanitaire et social

En France, l'impact des toxines animales sur la santé est relativement faible. La mortalité liée à la faune française toxique est réduite. Il existe des sérothérapies contre les morsures de vipères. Une mortalité faible est liée aux allergies aux venins d'abeille et de guêpe, et donc pas directement aux toxines. En revanche, les populations de pays désertiques et tropicaux sont frappés par de très nombreux accidents (notamment scorpions et serpents). On estime la mortalité liée aux morsures de serpent à 100.000 par an. Les rescapés présentent des séquelles graves. Les pays émergents développent des sérums antivenimeux contre les espèces les plus représentées, mais les traitements sont souvent administrés mal ou trop tard. Le marché est considéré comme non solvable par l'industrie occidentale et de nombreux pays sont totalement démunis. Les touristes des pays occidentaux dont la France sont exposés.

Principales questions scientifiques ou objets de recherche dans le domaine

Un savoir considérable a déjà été accumulé dans le domaine, mais on est très loin de connaître l'intégralité des toxines animales et de leurs fonctions. Il est donc nécessaire de poursuivre les travaux de fractionnement de venins, d'identification des toxines, de résolution de leurs structures et de leurs fonctions. Ceci doit maintenant être réalisé à l'aide de techniques modernes de protéomique, de transcriptomique et de génomique de manière à découpler le processus de découverte de toxines ayant de nouvelles activités biologiques et pharmacologiques. Dans ce contexte, la compréhension de la fonction venimeuse constitue un nouvel enjeu d'importance. La détermination de la séquence du génome d'animaux venimeux est nécessaire. Un projet international impliquant la France (CEA) au premier plan est en gestation pour séquencer le premier génome d'un animal venimeux.

Dynamique scientifique à l'étranger (revues, associations scientifiques, grands programmes nationaux ou internationaux)

Les toxines animales sont un sujet de recherche important dans le monde. Ces recherches portent sur l'identification des toxines et de leur mode d'action, leur utilisation pour disséquer des processus biologiques essentiels (notamment neurologiques), leur utilisation en pharmacologie. Il faut ajouter des activités de recherche sur les moyens de défense et de protection contre les envenimations: sérothérapies classiques et ingénierie d'anticorps.

Le potentiel de recherche en France et les manques (disciplines, laboratoires, organismes concernés...)

Il faut déplorer une réduction importante du nombre de laboratoires français sur le sujet dans les années récentes. Il subsiste cependant quelques laboratoires de premier plan dans le domaine au CEA et au CNRS.

Les perspectives scientifiques et les priorités envisageables

Il est essentiel de promouvoir une approche multidisciplinaire d'équipes travaillant en synergie dans les domaines suivants: isolement et purification à partir de venins, identification, résolution de structures, synthèse et ingénierie, caractérisation fonctionnelle *in vitro* et *in vivo*, études pharmacologiques, génomique. Il faut renforcer la recherche sur la génomique des animaux venimeux. Un projet international impliquant la France au premier plan est en train de se mettre en place à l'instigation du Pr. André Ménez au CEA. Les interactions avec les pays du sud sont à promouvoir sous la forme de collaborations et d'échanges scientifiques de chercheurs. Tout en cherchant à protéger les populations, il faut préserver la biodiversité des animaux venimeux car elle constitue un réservoir de molécules actives et de médicaments potentiels inestimable. La valorisation de ces substances doit se faire en partenariat avec les pays d'origine.

Références

Ménez A. *Perspectives in Molecular Toxinology*. 2002. John Wiley & Sons.

Le Gall F., Favreau P., Richard G. *Cônes et Toxines*. 1999. *Pour La Science* n° 261, 56-62.

Meier J., White J. *Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*. 1995. CRC Press

LES TOXINES DE MICROALGUES : PHYCOTOXINES ET CYANOTOXINES

Le contexte :

Les microalgues *sensu lato*, microorganismes aquatiques photosynthétiques, peuvent produire des toxines susceptibles de perturber les écosystèmes et d'atteindre la santé de l'Homme et des animaux d'élevage.

Les phycotoxines des milieux marins et saumâtres ont pour producteurs des microalgues appartenant principalement aux dinoflagellés mais aussi aux diatomées. Les intoxications humaines, sont liées à l'ingestion de produits de la mer contaminés, le plus souvent coquillages et poissons tropicaux. Les plus dangereuses à court terme car parfois mortelles correspondent à des neurotoxines (intoxications

paralysantes/saxitoxines, amnésiantes/acide domoïque et dérivés, ciguatera/ciguatoxines). Pour les toxines diarrhéiques, un risque cancérigène sur le long terme est à l'étude.

Certaines phycotoxines, jusqu'à présent majoritairement observées hors des côtes européennes ont une incidence sur le développement et la physiologie, en particulier comportementale, d'animaux marins ou d'eau saumâtre situés plus ou moins haut dans les chaînes trophiques. Il peut en résulter des hécatombes spectaculaires de poissons par exemple ; la productivité des océans et zones côtières peut être plus ou moins fortement perturbée.

Les cyanotoxines sont synthétisées par des cyanobactéries. Les plus connues contaminent les eaux douces induisant des intoxications de troupeaux et de la population humaine. L'Homme peut être atteint directement *via* l'eau de boisson ou des hémodialyses mais aussi lors d'activités de loisirs aquatiques. Les toxines les plus fréquentes, les microcystines sont hépatotoxiques et présentent un potentiel cancérigène mal défini. Des neurotoxines, saxitoxines et anatoxines, sont également synthétisées par diverses espèces. Dans ce cas des intoxications rapides pouvant entraîner la mort ont été décrites pour divers animaux comme des chiens.

Une des caractéristiques de ces microorganismes est leur capacité à proliférer pouvant engendrer de fortes biomasses aussi bien en algues qu'en toxines. Les proliférations de dinoflagellés marins semblent favorisées par des perturbations des écosystèmes côtiers comme les récifs coralliens lors de tempêtes. Il est vraisemblable que des événements tels que le tsunami de décembre 2004 puissent aboutir à des développements d'espèces toxiques dont certaines inconnues jusqu'à présent. Pour les cyanobactéries de même on relie souvent leurs proliférations à des conditions d'eutrophisation. Cependant dans les deux cas ces hypothèses nécessitent d'être mieux étayées. Comme pour les phycotoxines, les cyanobactéries productrices de toxines sont loin d'être toutes identifiées et l'apparition d'intoxications nouvelles est un problème récurrent.

Il faut remarquer que les neurotoxines les plus dangereuses sont susceptibles d'être utilisées comme armes chimiques. Les saxitoxines que l'on sait obtenir en quantité industrielle, cependant limitée, sont sous surveillance. On peut souligner que contaminer des plans d'eau par des cyanobactéries est tout à fait envisageable, spécialement dans des pays ayant de faibles ressources en eau potable et dont la microflore est mal connue en général.

La prévention

La protection de la santé humaine et des animaux d'élevage constitue un problème sanitaire et économique important.

Cependant actuellement les données écologiques qui permettraient d'empêcher les proliférations des espèces algales toxiques sont très limitées et laissent entrevoir une complexité qu'il est encore difficilement envisageable de maîtriser.

Pour les phycotoxines, pour lesquelles il existe une réglementation au niveau communautaire, des dispositifs de prévention sont mis en place depuis une vingtaine d'années. Ils s'appuient sur une surveillance des espèces phytoplanctoniques potentiellement toxiques dans l'eau et, le cas échéant, sur la toxicité accumulée dans les coquillages à l'aide de méthode de référence, bioessais sur animaux et HPLC/UV. Des résultats défavorables entraînent la fermeture des zones de production conchylicoles concernées.

Pour les milieux dulçaquicoles pour lesquels aucun dispositif réglementaire n'est encore mis en place, une surveillance des proliférations est réalisée *in situ* ce qui à partir d'une certaine densité d'une (au minimum) espèce toxique dans les prélèvements conduit à la recherche de toxines par des tests sur souris ou *in vitro* comme l'inhibition de la protéine phosphatase PP2A.

Si un potentiel toxique est détecté, les tests positifs incitent à impliquer un type de toxine(s) qui doit être déterminé par voie chimique. Mais sans attendre une identification chimique précise plus ou moins longue, généralement avec les tests la possibilité d'un risque toxique peut être quantifiée ou tout au moins évaluée et conduire, à partir d'un certain niveau indiqué par les réglementations internationales, à la fermeture de sites de loisirs aquatiques par exemple ou bien d'installations de traitement d'eau potable.

Comme on le voit, simplement la surveillance de sites nécessite une collaboration pluridisciplinaire d'écologistes et systématiciens, de chimistes ainsi que de toxicologues.

Des progrès sont envisageables dans tous les domaines mais doivent reposer sur des recherches fondamentales par des équipes multidisciplinaires et des collaborations en réseaux de laboratoires complémentaires. Tous doivent pouvoir faire progresser les connaissances pour les efflorescences toxiques connues mais aussi être capables de répondre à de nouveaux risques d'intoxications.

La recherche

Au niveau international la prise en compte des microalgues et cyanobactéries toxiques ainsi que des risques associés a conduit à un développement spectaculaire des recherches et à des réunions internationales périodiques tous les deux ou trois ans suivant les manifestations. La XIth International Conference on Harmful Algal Blooms sous la responsabilité de l'International Society for the Study of Harmful Algae vient de se tenir à Cape Town (Afrique du Sud) en novembre 2004. La Sixth International Conference on Toxic Cyanobacteria s'est déroulée à Bergen (Norvège) en juin 2004 juste avant le 16th Symposium of the International Association for Cyanophyte Research (Luxembourg, 30 août-3 septembre 2004), sans oublier les réunions de l'American Society for Limnology and Oceanography (une à deux par an) qui se tiennent en Europe une fois tous les deux ans en gros. La prochaine doit avoir lieu à Santiago de Compostelle (Espagne) en juin 2005.

En France les recherches ont été très peu soutenues. Cependant l'IFREMER et l'AFSSA ont induit des travaux en vue de réaliser des expertises pertinentes pour le MAAPR, ministère responsable de la salubrité des produits de la mer d'origine française et d'importation. Sont impliqués, l'unité TOP du laboratoire AFSSA de Maisons-Alfort, nommé Laboratoire National de Référence et une Unité du laboratoire IFREMER de Nantes. L'AFSSA apporte aussi une contribution par l'Unité Toxicologie alimentaire de Fougères qui est impliquée dans l'analyse des risques génotoxiques des phyco- et cyanotoxines.

A La Réunion l'ARVAM (Association pour la Recherche et la Valorisation des Algues Marines) a de même une implication forte dans la surveillance des microalgues toxiques et des produits de la mer dans l'Océan Indien.

Cependant l'expertise ne peut progresser qu'en s'appuyant sur une recherche fondamentale pluridisciplinaire comprenant

- des écologistes et algologues : *détermination des espèces présentes dans les efflorescences toxiques ; étude in situ des conditions environnementales favorisant leur prolifération ; cultures de clones toxiques et non toxiques pour déterminer les gènes impliqués mais aussi pour préciser les facteurs externes agissant sur la croissance algale et la production toxinique ; sélection d'outils moléculaires en vue de la reconnaissance in situ de clones toxiques ; obtention de biomasse pour la chimie et la toxicologie ;*
- des chimistes : *extraction de toxines ; mise au point de techniques de purification ; identification des toxines par des techniques de spectroscopie (MS principalement) ;*
- des toxicologues : *mises au point de modèles expérimentaux pour l'analyse de la toxicité in vitro mais aussi sur animal de façon à répondre aux exigences éthiques ; détermination de modes d'action de toxines ; précision et évaluation de risques encourus ; sélection de tests pour les laboratoires de contrôle.*

Les premières incitations financières à budget très limité ont été gérées par l'IFREMER à partir de 1989 (Programme National Efflorescences algales marines). Depuis deux sous-ensembles se sont structurés sous la forme de GIS. Le GIS parisien CABAMIRA « Contaminants des Aliments d'origine animale et de l'eau de Boisson. Analyse des Mécanismes Impliqués et des Risques Associés » rassemble depuis 1998 le Muséum National d'Histoire Naturelle MNHN (Equipe Systématique et Ecotoxicologie des microalgues de l'USM 505), l'Ecole Supérieure de Physique et Chimie Industrielle, ESPCI (Environnement et Chimie analytique), l'AFSSA (Toxines Microbiennes). Le deuxième GIS national est plus récent (2003) et concerne les équipes consacrant leurs travaux aux cyanobactéries toxiques GRISCYA-cyanobactéries (responsables : C. Bernard, MNHN ; J.F. Humbert, INRA ; N. Tandeau de Marsac, Institut Pasteur). Les recherches des laboratoires de ces deux GIS donnent lieu à des publications dans des revues de bon niveau, à des participations actives aux congrès cités plus haut et à de nombreuses coopérations internationales.

Parallèlement le DEA Interactions toxiques dans les Ecosystèmes et Biotechnologies liées aux Toxines piloté par le MNHN et qui est devenu le Parcours Toxines et Ecosystèmes du master du MNHN a permis de former des jeunes chercheurs dont les compétences sont appréciées internationalement.

Cependant aucune reconnaissance officielle des équipes de recherche fondamentale spécialisées dans le domaine n'a été établie au niveau national et tous les financements ont été obtenus dans le cadre de programmes, nationaux tels qu'EFFLOCYA, PNETOX, ENVIRONNEMENT-SANTE 2000 et 2002, AQS 2001, européen comme IFOP, ou bien tel que FAIR (French Australian Industrial Research). La DGA en raison des risques liés aux toxines a accordé à la fois des financements et des bourses de thèse. De même une participation de l'équipe de l'USM 505 à l'unité FLAG de l'IRD permet de réaliser des travaux en Afrique de l'ouest tandis que des coopérations fortes avec divers laboratoires du Maghreb ont été développées par une équipe de l'Université Paris Sud. Diverses

prestations de service sont menées par exemple pour les DDASS et DRASS ou VEOLIA, Electricité de France.

De ce fait les énergies se dissipent dans la mise sur pied et la gestion de dossiers de financement alors qu'aucun poste de chercheur ou enseignant-chercheur n'a été créé ce qui limite considérablement la structuration de la recherche, en particulier en dispersant le potentiel de jeunes bien formés qui souvent travaillent dans des laboratoires américains, canadiens ou européens hors France, alors que les travaux français sont internationalement reconnus dans le domaine et considérés comme constituant un fort potentiel..

Références

Botana L.M. 2000 Seafood and freshwater toxins. M Dekker, New York

Chorus I., Bartram J. 1999 Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. E&FN Spon, London and New York

Fremy J-M., Lassus P. 2001 Toxines d'algues dans l'alimentation. Ifremer, Paris

Hallegraeff G.M., Anderson D.M., Cembella A.D. 2003 Manual on harmful marine microalgae. UNESCO Publishing, Paris