**Examen de Microbiologie et toxicologie in vitro**

*(Corrigé type)*

**Questions : (14 pts)**

1. Donnez quelques microorganismes pathogènes associés aux intoxications alimentaires et les symptômes qu’ils provoquent. 2 pts

*Clostridium botulinum* : Agent du botulisme.

*E.coli* O157 : H7: a été à l'origine de nombreux épisodes de contamination entraînant souvent des séquelles graves et de nombreux décès. Le boeuf haché insuffisamment cuit est l'aliment le plus souvent en cause.

*Clostridium perfringens :* Agent d’intoxications alimentaires, la gangrène gazeuse.

*Staphylococcus aureus* : intoxication sévère, gastro-entérite

1. Citez, dans un tableau, les différences entre une endotoxine et une exotoxine microbienne. 2 pts



1. Quelles sont les méthodes de détection des microorganismes pathogènes dans les aliments ? 2 pts

La détection des microorganismes pathogènes dans les aliments se fait par des analyses phénotypiques qui reposent sur la mise en évidence des caractères morphologiques des microorganismes (forme, coloration de Gram, taille, mode de regroupement, mobilité etc…), ainsi sur des testes biochimiques et métaboliques utilisants différents milieux et substrats de croissances afin d'obtenir une réponse biochimique observable et mesurable du micro-organisme, et en dernier, les méthodes moléculaires comme l’analyses des acides nucléiques ADN et ARN ou de profils protéiques d'un micro-organisme avec les données documentées d'organismes connus .

1. Définissez qu’est ce qu’un Challenge test et donnez son principe général. 2 pts

Les industriels de l’agroalimentaire doivent valider la durée de vie de leurs produits. Pour cela, ils disposent de différents moyens dont les tests de vieillissement et les tests de croissance ou challenge-tests.

C’est l’étude de l’évolution dans un aliment de populations de microorganismes inoculés de manière volontaire. L’avantage du challenge-test est de pouvoir tirer des conclusions sur des faits établis car le produit a été inoculé volontairement de manière contrôlée avec des microorganismes préalablement sélectionnés, contrairement à une contamination naturelle.

Ce test permet la détermination ou la validation d’une durée de vie microbiologique (DVM).

1. La toxicologie *in vitro* est une analyse de toxicité d’une substance et de sa capacité de produire des effets nocifs à un organisme vivant : Donnez un exemple d’une méthode d’étude de la toxicité *in vitro* et développer le principe de cette méthode. 3pts

1**. Test de l’Irritation oculaire**

**a) Etude de l’irritation oculaire in-vitro d’un élément d’essai liquide par application sur cornée humaine reconstituée (Modèle HCE de Skinethic)**

*PRINCIPE DE L’ÉTUDE :*

L’objectif de l’étude est d’évaluer la capacité d’une molécule à induire des effets d’irritation oculaire, par un essai de cytotoxicité, sur des épithéliums de cornée humaine reconstituée.

Après application de l’élément d’essai pendant 30 minutes, les inserts sont lavés et incubés pendant 30 minutes à 37°C.

La viabilité cellulaire des modèles de cornée humaine reconstituée est évaluée par la mesure de l’activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes. Cette enzyme converti le colorant vital MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium] en un sel de formazan bleu mesuré par spectrophotométrie après son extraction des tissus.

2. **Tolérance in-vitro sur fibroblastes en culture**

L’évaluation de la tolérance cutanée vis-à-vis des produits chimiques peut se faire sur des tissus fibroblastiques.

Les fibroblastes sont des cellules présentes dans le tissu de soutien de différents organes. Ils ont été obtenus à partir de biopsies stériles.

• Protocole d’obtention des fibroblastes : Pour obtenir des fibroblastes, des prélèvements d’organes sont découpés en petits morceaux (explants) puis déposés dans un flacon de culture contenant 1mL de milieu nutritif stérile, ensuite mis dans une étuve à 37°C avec 5 % de CO2 sous forme gazeuse. Une dizaine de jours plus tard, les fibroblastes commencent à pousser autour de l’explant. Lorsqu’il y a suffisamment de cellules, l’explant est retiré puis congelé avec un cryoprotecteur (DMSO) dans un container d’azote liquide à - 196°C. Quand les cellules arrivent à confluence dans le flacon, il faut les décoller avec une enzyme, la trypsine, et les répartir dans un flacon plus grand. Cette manoeuvre est faite plusieurs fois afin d’amplifier les cellules. Celles-ci sont ensuite congelées, par tube de 10 millions de cellules, de la même manière que les explants. Lorsqu’on les décongèle, elles se remettent à se diviser comme auparavant.

**3. Corrosivité *in vitro*** L'évaluation du potentiel corrosif, irritant et/ou sensibilisant des produits chimiques et préparations est réalisée au moyen de tests conventionnels chez l'animal et d'essais cliniques chez l'homme. Un programme pour le développement de tests *in vitro* a été initié par la communauté scientifique pour réduire l'expérimentation animale et les essais cliniques chez des volontaires. De nombreuses équipes travaillent à l'élaboration de tests *in vitro*, qui doivent être fiables et reproductibles d'un laboratoire à l'autre. Ces méthodes alternatives sont construites à partir de cultures de cellules cutanées, d'épidermes et/ou de peaux reconstituées, de peaux totales provenant d'actes chirurgicaux.

1. Expliquez comment les études de toxicologie in vitro contribuent-elles à la réduction des essais sur les animaux. 3 pts

Les recherches de toxicologie *in vitro* ont contribué à réduire les essais sur les animaux en fournissant des méthodes d’évaluation des la toxicité des substances chimiques sur des cultures cellulaires, essentiellement sur deux types de cellules : les lignées de cellules transformées, qu’il s’agisse de cellules tumorales ou résultant de manipulations génétiques et les cellules provenant de prélèvements réalisés chez des patients.

**Question de synthèse : (6 pts)**

Développer dans un paragraphe (de 6 à 10 lignes) **comment gérer les risques microbiologiques dans un établissement d’industrie agroalimentaire.**

La gestion des risques microbiologiques dans un établissement d’industrie agroalimentaire doit être constamment appliquée pour garantir la sécurité sanitaire du produit fini, cela peut être appliquée en premier temps, par l’identification des dangers microbiologique dans la chaine de fabrication par évaluation des probabilité et de gravité de risque ( identification des points critiques), et en deuxième temps, par mise en place des bonnes pratiques d’hygiène (5M : le nettoyage et désinfection des équipements, contrôle des paramètres environnementaux, personnel …etc), par ailleurs, la surveillance microbiologique doit être assurée par des analyses régulières pour détecter les microorganismes pathogènes et d’altération. Le respect des textes législatifs et réglementaires (loi 09-03 du 25 février 2009 relative à la protection des consommateurs et les normes internationales ISO 22000 et ISO 9001) qui incluent des mesures et des exigences pour la sécurité sanitaire est très important pour garantir l’application des bonnes pratiques de productions et la salubrité des produits alimentaires.