



Toxic risk assessment of specific chemical substances and contaminants (Food additifs and Mycotoxins)

Lama Soubra

► To cite this version:

Lama Soubra. Toxic risk assessment of specific chemical substances and contaminants (Food additifs and Mycotoxins). Chemical Sciences. AgroParisTech, 2008. English. NNT : 2008AGPT0014 . pastel-00004382

HAL Id: pastel-00004382

<https://pastel.hal.science/pastel-00004382>

Submitted on 1 Dec 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° / / / / / / / / / / / / /

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur

de

**l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement
(Agro Paris Tech)**

Spécialité :

*présentée et soutenue publiquement
par*

Lama SOUBRA

le 22 février 2008

ÉVALUATIONS SCIENTIFIQUES DES RISQUES TOXIQUES LIÉS A CERTAINES SUBSTANCES CHIMIQUES (ADDITIFS ALIMENTAIRES) ET CONTAMINANTS (MYCOTOXINES)

SOUS-TITRE

Directeur de thèse : Philippe VERGER

Codirecteur(s) de thèse : Dolla SARKIS

Travail réalisé : INRA, UR Unité Met@risk, F-75231 Paris

Devant le jury :

M. Daniel TOMÉ, Professeur, AgroParisTech	Examineur
M. Gérard PASCAL, Directeur de recherche, INRA.....	Rapporteur
M. Mostafa OUDELHAKIM, Chercheur, AFSSA	Rapporteur
Mme. Valérie CAMEL, Maître de conférence, AgroParisTech	Examineur
M. Jean-Louis JOUVE, Professeur, Ecole Vétérinaire de Nantes	Examineur

Dédicace

A mon père Toufic,

A ma mère Nouha,

A ma sœur Lina,

A mon frère Hassan,

A mon mari Youssef,

Aux personnes qui dans les pires moments, je trouve à mes côtés. Je vous aime tous.

A ma fille Leen et à mon fils Riad,

Remerciements

Au Docteur Philippe Verger,

Directeur de l'unité met@risk, INRA,

Un merci ne suffit pas au docteur Philippe, qui sans lui, sans sa patience et son expérience et ces encouragements, ce travail n'aura pas été réalisé.

Au Docteur Dolla Sarkis,

Doyen de la faculté de pharmacie à l'USJ,

Merci à votre support continu durant toute la durée de mon étude.

Au Docteur Max Feindberg,

Directeur de l'unité de chimie analytique, INRA-INAP-G,

Merci d'avoir accepté d'ouvrir les portes de cet établissement afin de m'accueillir et de me former, malgré tes nombreuses obligations.

Au Docteur Christo Hilan,

Directeur de L'IRAL,

Je vous suis reconnaissante de vous être intéressé à mon travail et de m'avoir accordé votre support pour pouvoir le réaliser.

A madame Nadine Flavigny, à Jessica Tressou, à Emilie Counil, à Amelie Crepet, à toute l'équipe de l'unité met@risk, et toute personne qui m'a aidé à réaliser cette recherche: **Grand merci.**

Résumé

Suite à un nombre croissant de crise le risque alimentaire paraît être soudainement rentré dans la catégorie des préoccupations majeures pour l'Homme et par la suite les gouvernements et les instances internationales améliorent les systèmes de sécurité alimentaire pour réduire, prévenir ou éviter l'augmentation des maladies d'origine alimentaire. Au Liban l'industrie agroalimentaire et l'agriculture intensive connaissent un développement rapide, que les systèmes assurant la sécurité alimentaire y sont déficients voire absents, et que les conditions climatiques, les comportements de stockage et les habitudes alimentaires locales sont favorables à la présence de certains types de dangers présentant des risques sanitaires. L'objectif de cette recherche a consisté à établir le niveau de sécurité alimentaire en relation avec certains contaminants microbiologiques et certaines substances chimiques (additifs alimentaires (benzoates, sulfites, BHA et BHT) et mycotoxines (ochratoxine A, aflatoxines BG et déoxynivalénol)) qui sont susceptibles d'être présents dans une sélection d'aliments disponibles sur le marché Libanais d'une part, et d'autre part d'évaluer les risques liés aux additifs alimentaires et aux mycotoxines pour des sous groupes de la population libanaise considérés d'être à risque: les enfants et les adolescents, afin d'établir une hiérarchie de l'importance des risques que ceux ci représentent pour les sous groupes de la population étudiés.

Les aliments disponibles sur le marché libanais et qui sont susceptibles de contenir les dangers étudiés ont été identifiés et analysés. 596 échantillons alimentaires ont subis des analyses microbiologiques. Ceux-ci appartenaient à 6 catégories produits par des industries agroalimentaires libanaises: les sodas, les jus de fruits, les produits laitiers, les chips, les biscuits et les conserves. 2200 échantillons alimentaires ont subis des analyses chimiques pour déterminer soit leur contenu en additifs alimentaires (421 échantillons) soit leur niveau de contamination par les mycotoxines (1779 échantillons). La représentativité des échantillons était assurée par le fait qu'ils étaient prélevés d'une façon aléatoire, pendant deux saisons différentes, à partir des principaux lieux d'approvisionnement et de façon à couvrir les principales marques disponibles sur le marché libanais. Les analyses ont été réalisées par des méthodes validées adoptées dans les laboratoires de l'Institut de Recherche Agronomique Libanais (IRAL) et de l'Université Saint Joseph, sur les aliments tels que consommés.

L'évaluation des risques toxiques liés aux substances étudiées a été réalisée en suivant les étapes du processus d'évaluation scientifique des risques c.à.d évaluation et caractérisation du danger, évaluation de l'exposition et caractérisation du risque. L'évaluation de l'exposition a été réalisée en croisant les données de consommation alimentaire obtenues par le biais d'une enquête de consommation alimentaire exécutée dans le cadre de cette recherche avec les données de contamination obtenues par les analyses chimiques. La caractérisation du risque a été obtenue en estimant le pourcentage de contribution des expositions alimentaires aux Valeurs Toxicologiques de Référence (VTR) et en calculant le pourcentage d'individus ayant des expositions dépassant les VTR établies pour chacune des substances étudiées.

Les résultats des analyses microbiologiques ont montré qu'uniquement 9% des aliments analysés contenaient des microorganismes indicateurs des conditions hygiéniques déficientes à des taux non conformes aux normes microbiologiques en vigueur.

Les résultats des analyses chimiques ont montré que les additifs alimentaires étudiés sont présents dans une large variété d'aliments y compris des aliments non autorisés selon les normes nationales dans 70% des cas pour les benzoates, 15% des cas pour les sulfites, 13% des cas pour le BHA, dans 3.5% des cas pour le BHT, et à des taux dépassant les taux autorisés

dans les normes NN dans 70% des cas pour les benzoates, 62% des cas pour les sulfites, 37% des cas pour le BHA alors que les mycotoxines sont présents, d'une façon générale à des taux conformes aux normes nationales, internationales et européennes en vigueur.

Les résultats de l'évaluation des risques toxiques ont montré que, parmi les dangers étudiés, seuls les aflatoxines sont susceptibles de représenter un risque alimentaire préoccupant. En fait, le niveau moyen, le p75 et le p95 de la distribution de l'exposition des consommateurs ont été trouvés d'être inférieurs aux Valeurs Toxicologiques de Référence (VTR) fixés pour les benzoates, les sulfites, le BHA, le BHT, l'OTA et le DON, alors qu'ils ont été trouvés d'être supérieurs à la VTR fixée pour les aflatoxines avec des valeurs allant de 182-769% la VTR pour les enfants et 144- 650% la VTR pour les adolescents, et un pourcentage d'individus dépassant la VTR de 58% pour les enfants et de 52% pour les adolescents.

De plus, les résultats ont montré qu'il était nécessaire de porter une attention particulière à l'exposition de certains groupe de populations tels que les enfants et les forts consommateurs pour lesquels le risque d'être exposés à un niveau supérieur aux valeurs toxicologiques de références vis-à-vis des additifs alimentaires et des mycotoxines étudiés n'est pas nul. Les principaux contributeurs aux expositions des benzoates, des sulfites, du BHA, du BHT et des trois mycotoxines ont été trouvés d'être respectivement les sodas et les jus de fruits, les fruits secs, les biscuits, les chewing gum et les produits céréaliers.

**Toxic risk assessment of specific chemical substances and
contaminants (Food additives and Mycotoxins)**

Abstract

Following an increasing number of crisis, food hazards entered in the category of major concerns for humans and thereafter governments and international bodies improved the food safety systems in order to reduce or prevent food borne illness. In Lebanon the food industry and intensive agriculture recognized a rapid development that systems ensuring food safety are deficient or absent, and that climate and storage conditions in addition to local food habits are favorable to the presence of certain types of hazards that present health risks. The objective of this research is to assess the level of food safety in relation with certain microbial contaminants and chemicals (food additives (benzoates, sulphites, BHA and BHT) and mycotoxins (ochratoxin A, aflatoxinsBG and deoxynivalenol)) in a selection of foods that are available in the Lebanese market on one hand, and on the other hand to assess the risks related to the selected food additives and mycotoxins for two subgroups of the Lebanese population considered to be at risk: children and teenagers, in order to establish a hierarchy of the importance of the risk that these substances represent to the health of these subgroups.

Available foodstuffs in the Lebanese market that are susceptible to contain these hazards were identified and analyzed. 596 food samples were analyzed microbiologically. These belonged to 6 food categories: soft drinks, fruit juices, dairy products, potato chips, biscuits and canned foods that are produced by the Lebanese food industry. 2200 food samples were analyzed chemically to determine either their content in food additives (421 samples), or the degree of their contamination by the mycotoxins (1779 samples). The representativeness of the samples was ensured by the fact that those were withdrawn randomly, during two different seasons, from the major food markets in a way to cover the main brands available in the Lebanese market. The analyses were performed in the laboratories of Saint Joseph University and of the National Agricultural Research Institute (IRAL) according to validated methods and on foods as consumed.

The risk assessment was carried out according to the steps of the scientific process of risk assessment i.e. hazard identification and characterization, exposure assessment and risk characterization. Dietary exposures to food additives and mycotoxins was obtained by combining the food consumption data obtained from an individual food survey specially developed and carried out during this research, with the contamination data obtained by chemical analysis. The risk was characterized by comparing the estimated dietary intakes with the toxicological reference values (TRV) established for these substances by the international bodies and also by calculating the percentage of individuals that have dietary intakes exceeding these TRV.

The results of microbial analysis showed that only 9% of the analyzed food did not comply with current microbial food standards.

The results of chemical analysis showed that the food additives are present in a wide range of foods including unauthorized foods according to the national standards in 70% of cases for benzoates, 15% of cases for sulphites, 13% of cases for the BHA and 3.5% of cases for the BHT, and at levels exceeding the authorized levels in 70% of cases for benzoates, 62% of cases for sulphites and 37% of cases for BHA. Moreover they showed that the studied mycotoxins are present at levels conform to the national, international and European standards.

The results of the risk assessment showed that, among the studied hazards, only aflatoxins BG constituted a risk for the studied subgroups. In fact the mean, the p75 and the p95 of the distribution of exposure were below the Toxicological Reference Value (TRV) fixed for benzoates, sulphites, BHA, BHT, OTA and DON, and above the TRV fixed for aflatoxins with values ranging from 182-769% the TRV for children and 144- 650% of the TRV for the

teenagers group, and a percentage of individuals exceeding this TRV of 58% for children and of 52% for teenagers.

Results also showed that it was necessary to bring special attention to the exposure of some group of the population such as children and high consumers for whom the risk of being exposed to a level higher than the toxicological reference values for food additives and mycotoxins exist. The main contributors to the exposures of benzoates, sulphites, BHA, BHT and the three mycotoxins were found to be, respectively, sodas and fruit juices, dried fruits, biscuits, chewing gum and cereal products.

Mots clés

Évaluation des risques toxiques, enfants et adolescents, exposition alimentaire, détermination analytique, mycotoxines, benzoates, sulfites, butylhydroxyanisole (BHA) et butylhydroxytoluène (BHT).

Key words

Risk assessment, children and teenagers, dietary exposure, analytical determination, mycotoxins, benzoates, sulfites, butylhydroxyanisol (BHA) and butylhydroxytoluen (BHT).

Table de matières

<i>Dédicace</i>	2
Remerciements	3
Résumé	4
Abstract	7
Mots clés	9
Key words	10
Table de matières	11
Liste des tableaux	13
Liste des figures	15
<i>Introduction générale</i>	19
1- Le risque alimentaire : définition et caractéristiques	20
2- L'analyse du risque alimentaire	21
2.1- L'évaluation du risque ou appréciation du risque	22
2.2- La gestion du risque	22
2.3- La communication relative au risque	23
3- L'évaluation du risque alimentaire	23
3.1- L'identification du danger	24
3.2- Caractérisation du danger	33
3.3- Evaluation de L'exposition	39
3.4- La caractérisation du risque	47
4- Les additifs alimentaires et Les mycotoxines en tant que risques alimentaires.....	48
4.1- Les additifs alimentaires	48
4.2- Les mycotoxines	50
5- Problématique et méthodologie de la recherche	53
<i>Matériels et méthodes</i>	56
1- première étape: étude microbiologique.....	57
1.1- Etablissement de la liste d'aliments à échantillonner	57
1.2- Analyses microbiologiques	57
2- Deuxième étape: enquête de consommation alimentaire	67
2.1- Sujets	67
2.2- Questionnaires	68
2.3- Traitement des questionnaires	69
3- Troisième étape: Evaluation préliminaire des expositions alimentaires à certains additifs alimentaires (benzoates, sulfites, BHA et BHT): Estimation de la consommation théorique maximale d'additifs alimentaires	71
4- quatrième étape: données analytiques pour les additifs alimentaires et les mycotoxines.....	72
4.1- les additifs alimentaires	72
4.2- les mycotoxines	81
5 - cinquième étape: évaluation scientifique des risques	83
5.1- Identification et caractérisation du danger	83
5.2- Evaluation de l'exposition	83
5.3- Caractérisation du risque	84
<i>Résultats</i>	85
1- Etude microbiologique.....	86
2- Etude de consommation alimentaire	91

2.1- Description des sujets	91
2.2- Description des données de consommation	91
3- Evaluation préliminaire de l'exposition.....	94
3.1- Estimation de la consommation théorique maximale des benzoates	94
3.2- Estimation de la consommation théorique maximale des sulfites	97
3.3- Estimation de la consommation théorique maximale du BHA	99
3.4- Estimation de la consommation théorique maximale du BHT	101
4- Données analytiques	103
4.1- Les additifs alimentaires	103
4.2- les mycotoxines	112
5. Evaluation scientifique des risques	117
5.1- Présentation des résultats	117
5.2- les additifs alimentaires	118
5.3- Les mycotoxines	141
<i>Discussion, Conclusion et Recommandations générales</i>	161
1- Evaluation des risques microbiologiques.....	162
2- Evaluation préliminaire des expositions aux additifs alimentaires.....	163
3- données analytiques pour les additifs alimentaires et les mycotoxines	165
3.1- Les additifs alimentaires	165
3.2- Les mycotoxines	168
4- Evaluation des risques liés à certains additifs alimentaires et à certaines mycotoxines	169
4.1- Considération méthodologique	169
4.2- Interprétation des résultats	170
5- Conclusion et recommandations générales	175
Références bibliographiques	177
Annexes	198

Liste des tableaux

Tableau 1. Les principaux tests de génotoxicité.....	26
Tableau 2. Les principaux tests toxicologiques réalisés en expérimentation animale pour l'identification des dangers.....	29
Tableau 3. Tests à entreprendre en fonction du niveau de préoccupation de la substance à étudier.....	31
Tableau 4. Facteurs impliqués dans la détermination de l'étendu des essais toxicologiques nécessaires pour l'évaluation d'une substance chimique.....	32
Tableau 5. Quelques forces et faiblesses de l'épidémiologie.....	33
Tableau 6. Problèmes de l'extrapolation de fortes aux faibles doses.....	34
Tableau 7. Méthodes d'évaluation de l'exposition.	40
Tableau 8. Quelques avantages et inconvénients des approches déterministes et probabilistes.	47
Tableau 9. . Moisissures et mycotoxines d'importance mondiale	51
Tableau 10. Exemple de représentativité de l'échantillonnage.....	73
Tableau 11. Descriptions des aliments échantillonnés.	87
Tableau 12. Analyses microbiologiques effectuées pour les différents types d'aliments échantillonnés.....	88
Tableau 13. Normes des analyses microbiologiques effectuées pour les différents types d'aliments échantillonnés.....	89
Tableau 14. Résultats des analyses microbiologiques des différents types d'aliments analysés.....	90
Tableau 15. Description de l'échantillon des sujets participant dans l'enquête de consommation alimentaire.....	91
Tableau 16. Description des données de consommation alimentaire pour les sujets Libanais âgés entre 9-14 ans.....	92
Tableau 17. Description des données de consommation alimentaire pour les sujets Libanais âgés entre 15-18 ans.....	93
Tableau 18. Rapport entre la Consommation Théorique Maximale (CTM) et la Dose Journalière Admissible (DJA), basée sur la consommation alimentaire et les taux maximaux d'utilisation autorisés (TMA) pour le groupe d'enfants et d'adolescents confondus.....	95
Tableau 19. Pourcentage de contributions des différentes catégories alimentaires à la Consommation Théorique Maximale moyenne (1) et au 95 ^{ème} percentile (2) des benzoates basées sur la consommation alimentaire et les taux maximaux d'utilisation autorisés par le DGSFA et NN.....	96
Tableau 20. Pourcentage de contributions des différentes catégories alimentaires à la Consommation Théorique Maximale moyenne (1) et au 95 ^{ème} percentile (2) des sulfites basées sur la consommation alimentaire et les taux maximaux d'utilisation autorisés par le DGSFA et NN.....	98
Tableau 21. pourcentage de contributions des différentes catégories alimentaires à la Consommation Théorique Maximale moyenne (1) et au 95 ^{ème} percentile (2) du BHA basées sur la consommation alimentaire et les taux maximaux d'utilisation autorisés par le DGSFA et NN.....	100
Tableau 22. Pourcentage de contributions des différentes catégories alimentaires à la Consommation Théorique Maximale moyenne (1) et au 95 ^{ème} percentile (2) du BHT basées sur	

la consommation alimentaire et les taux maximaux d'utilisation autorisés par le DGSFA et NN.....	102
Tableau 23. Limites de détection des additifs alimentaires recherchés.....	103
Tableau 24. Nombre d'analyse, taux maximaux d'utilisation autorisés, concentration analytique moyenne et le pourcentage du rendement d'extraction des benzoates.....	105
Tableau 25. Nombre d'analyse, taux maximaux d'utilisation autorisés, concentration analytique moyenne et le pourcentage du rendement d'extraction des sulfites.....	106
Tableau 26. Nombre d'analyse, taux maximaux d'utilisation autorisés, concentration analytique moyenne et pourcentage du rendement d'extraction du BHA.....	109
Tableau 27. Nombre d'analyse, taux maximaux d'utilisation autorisés, concentration analytique moyenne et taux de recouvrement du BHT.....	111
Tableau 28. Limites de détection des mycotoxines alimentaires recherchés.....	112
Tableau 29. Description des données de contamination de l'OTA.....	113
Tableau 30. Description des données de contamination des aflatoxines BG.....	115
Tableau 31. Description des données de contamination du déoxynivalénol (DON).....	116
Tableau 32. Les expositions alimentaires des enfants âgés 9-14 ans aux benzoates, aux sulfites, au BHA et au BHT calculées à partir des données de consommation et des taux analytiques.....	136
Tableau 33. Les expositions alimentaires des adolescents âgés 15-18 ans aux benzoates, aux sulfites, au BHA et au BHT calculées à partir des données de consommation et des taux analytiques.....	137
Tableau 34. Les principaux contributeurs et le pourcentage de contribution aux expositions alimentaires aux benzoates, sulfites, BHA et BHT pour les 5 % des enfants consommateurs aux forts quantiles d'expositions.	138
Tableau 35. Les principaux contributeurs et le pourcentage de contribution aux expositions alimentaires aux benzoates, sulfites, BHA et BHT pour les 5 % des adolescents consommateurs aux forts quantiles d'expositions.	139
Tableau 36. Caractérisation du risque aux additifs alimentaires des groupes de population étudiés.....	140
Tableau 37. Denrées et régions concernées par la contamination à l'ochratoxine A en fonction de l'espèce microbienne.....	142
Tableau 38. Estimation de l'exposition à l'ochratoxin A (OTA) des enfants.....	146
Tableau 39. Estimation de l'exposition à l'ochratoxin A (OTA) des adolescents.	148
Tableau 40. Estimation de l'exposition alimentaire aux aflatoxines BG des enfants.....	154
Tableau 41. Estimation de l'exposition alimentaire aux aflatoxines BG des adolescents.....	155
Tableau 42. Estimation de l'exposition alimentaire au déoxynivalénol (DON) des enfants...	159
Tableau 43. Estimation de l'exposition alimentaire au déoxynivalénol (DON) des adolescents.....	159
Tableau 44. Caractérisation du risque aux mycotoxins des groupes de population étudiés...	160
Tableau 45. Synthèse de données analytiques pour les benzoates, BHA, BHT.....	167

Liste des figures

Figure 1. Processus d'analyse du risque.....	22
Figure 2. Processus de gestion de risque.	23
Figure 3. Processus d'évaluation du risque.	24
Figure 4. Niveau de préoccupation développée pour une substance.....	31
Figure 5. La caractérisation du danger.....	35
Figure 6. Dérivation de la VTR pour les effets à seuil.....	37
Figure 7. Extrapolation linéaire des effets génotoxiques.....	39
Figure 8. Processus d'évaluation de l'exposition.....	42
Figure 9. Représentation schématique de l'arbre de décision applicable à la recherche.....	55
Figure 10. Métabolisme de l'acide benzoïque.....	119
Figure 11. Structure du BHA.....	125
Figure 12. Structure du BHT.....	130
Figure 13. Structure de l'OTA.....	141
Figure 14. Structure de l'aflatoxine B ₁	150
Figure 15. Structure du déoxynivalénol.....	156

Liste des annexes

Annexe 1. Questionnaires de l'étude de consommation

Annexe 2. Quelques photos des portions développées pour l'étude de consommation

Annexe 3. Degré de dilution effectué pour les différents types d'aliments en fonction de l'analyse microbiologique réalisée.

Annexe 4. Résultats détaillés de l'étude microbiologique de quelques aliments analysés.

Annexe 5. Résultats détaillés par saison de la détermination analytique des additifs étudiés dans les aliments sélectionnés.

Annexe 6. Pourcentage d'importation des différentes céréales à partir de différents pays.

Annexe 7. Courbes d'étalonnage obtenues pour les différents additifs analysés.

Annexe 8. Résumé des études de toxicité aigue et chronique pour les quatre additifs alimentaires.

Liste des abréviations

ADN: Acide Di Nucléique.
ALARA: As Low As reasonably Achievable.
ARN: Acide Ribo Nucléique.
BMD: Bench Mark Dose.
BMR: Bench Mark Response.
BPL: Bonnes pratiques de laboratoire.
BHA: Butylhydroxyanisol.
BHT: Butylhydroxytoluène.
CCFAC: Codex Committee for Food Additifs and Contaminants.
COX: CycloOxygénase.
CTM: Concentration Théorique Maximale.
DE: Dose de référence.
DJA: Dose Journalière Admissible.
DJT: Dose Journalière Tolérable.
DJTP: Dose Journalière Tolérable provisoire.
DGSFA: Draft General Standard for Food Additifs.
DL50: Dose Létale 50.
DON: Déoxynivalénol.
DS: Déviation Standard.
DSEO: Dose Sans Effet Observable.
DTM: Dose Tolérable Maximale.
DUE: Directive de l'Union Européenne.
FM: Facteur Modifiant.
FS: Facteur de sécurité.
g, µg, ng: Gramme, microgramme, nanogramme.
γGT: gamma glutamyl transférase.
HPLC: High Performance Liquid Chromatography.
IFN-γ : Interferon gamma.
IL: Interleukine.
IPCS/Gems/Food: International program of chemical safety/Global Environment Monitoring System/Food Contamination and Assessment Program.
IG: Immunoglobuline.
IL: Interleukine.
IRAL: Institut de Recherche Agronomique Libanais.
JECFA: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additifs and Contaminants.
LMR: Limite Maximale Résiduelle.
LOD: Limit of Detection.
LOQ: Limit of Quantification.
MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase.
ml: millilitre
MNU: Methylnitrosourea.
NK: Natural Killer.
N: Normal.
NN: Norme Nationale.
OECD: Organisation for economic Co-operation and development.

OTA: Ochratoxine A.
PDM: Partition du Marché.
PPM: Partie Pour Million.
QA: Quality Assurance.
QC: Quality Control.
QSP: quantité suffisante pour.
p.c.: poids corporel
SCF: Scientific Committee for Food Additifs.
TD50: tumorigenic dose rate 50.
TDS: Total Diet Studies.
TMA: Taux d'utilisation Maximaux Autorisés.
VTR: Valeur Toxicologique de Référence.

Introduction générale

La salubrité des aliments est une préoccupation de plus en plus importante en santé publique. En réaction à un nombre croissant de crises et pour répondre aux inquiétudes des consommateurs les gouvernements redoublent d'effort pour améliorer la sécurité des aliments et par la suite prévenir ou réduire les maladies d'origine alimentaire.

Les maladies d'origine alimentaire sont en général définies comme étant des affections provoquées par des agents, pouvant être de nature biologique ou infectieuse (bactéries) ou bien de nature chimique ou toxique, capables de contaminer l'organisme par le biais des aliments ingérés. Les indicateurs de surveillance et les investigations épidémiologiques suggèrent que les maladies d'origine alimentaire sont très fréquentes (dans les pays industrialisés, la proportion de personnes souffrant chaque année de maladies d'origine alimentaire pourrait atteindre 30%) (AFSSA/INRA, 2001) mais très sous-estimées par les systèmes actuels de recueil de données. Si des données existent d'ores et déjà (mortalité, morbidité...) sur les principales maladies d'origine alimentaire imputables aux microorganismes (bactéries), en revanche les informations disponibles en ce qui concerne les maladies d'origine alimentaires liés à des toxiques chimiques sont très fragmentaires. En fait, il est très difficile de corréler l'apparition d'une maladie à la présence d'un toxique particulier dans l'alimentation vu que les effets des toxiques alimentaires sont observés après une longue période d'exposition (effets chroniques), les maladies développées sont le plus souvent multifactorielles, et les expositions aux différents toxiques ne sont généralement pas connues. Compte tenu ces difficultés il convient, dans ces cas, de procéder à un recueil des données sur l'exposition aux dangers chimiques et non pas à un recueil de données des maladies liés à ces toxiques.

C'est dans le cadre de la mission de veille à la maîtrise des risques alimentaires, qu'ils soient d'origine microbiologique ou liés à la présence de substances chimiques de l'environnement dans l'alimentation, que des systèmes d'analyse de risque ont été implémentés dans de nombreux pays (pays de la communauté européenne, Japon, Etats-Unis, Canada et autres...). Ces systèmes ont pour objectif principal de permettre aux citoyens de vivre dans une société où, d'une part les risques alimentaires qui les préoccupent sont perçus, reconnus et effectivement réduit à un niveau socialement accepté, et d'autre part les risques qu'ils ne perçoivent pas font l'objet d'une vigilance efficace permettant de les détecter et d'alerter les citoyens tôt.

1- Le risque alimentaire : définition et caractéristiques

Suite à un nombre croissant de crises (vache folle, dioxines, listérioses...) le risque alimentaire paraît être soudainement entré dans la catégorie de risques majeurs pour l'homme.

En fait les aliments, qui sont à la fois source de vie en tant que pourvoyeur des nutriments indispensables au développement et à la subsistance de l'individu et source de déséquilibres éventuellement graves lorsqu'ils ne sont pas utilisés avec discernement par celui-ci, sont redoutés et stigmatisés en tant que vecteurs de deux types de dangers pouvant compromettre leur sécurité :

- Les dangers biologiques : incluant les bactéries, champignons, virus, parasites et les agents non conventionnels tels que les prions.

- Les dangers chimiques : incluant les contaminants chimiques de l'environnement et les résidus de substances intentionnellement utilisées en production végétale (pesticides et fongicides, métaux lourds), les résidus de substances intentionnellement utilisées en production animale (résidus d'antibiotiques et des médicaments vétérinaires), les substances utilisées en technologie alimentaire (additifs alimentaires) et des substances naturelles toxiques bio synthétisées par les plantes (alcaloïde et substances anti-nutritionnelles) et les moisissures (mycotoxines).

La contamination des aliments par ces dangers peut avoir lieu aux différents stades de leur production, de leur transformation et de leur conservation.

Le risque alimentaire qui est défini comme étant la probabilité de survenue d'un événement de santé dans une population sur une période de temps donnée, est donc la résultante d'une interaction entre un agent complexe et variable (danger présent dans l'aliment) et l'homme. Il est multiforme associé à des agents chimiques et biologiques intentionnellement ou accidentellement présents dans les aliments. Il peut être immédiat dans le cas de toxi-infections alimentaires et des allergies, ou différé dans le temps dans le cas des cancers et dégénérescence de certains organes et fonctions physiologiques. De plus, la grande variabilité individuelle liée aux facteurs génétiques, physiologiques et environnementaux, a pour conséquence des réactions très diverses aux toxiques et aux agents biologiques agresseurs. Des catégories de population tels que les enfants, les personnes âgées, les femmes enceintes, les immunodéprimés et les personnes ayant des conditions génétiques et physiologiques particulières seront selon les cas placées en situation favorable ou défavorable par rapport aux risques associés à un type d'alimentation.

Finalement, le risque alimentaire présente une triple spécificité : nous y sommes tous exposés car nous mangeons tous; les preuves expérimentales sont indirectes et ne concernent qu'un petit nombre de dangers; ce risque n'est que difficilement quantifiable, du fait même que nous exigeons qu'il soit nul.

2- L'analyse du risque alimentaire

C'est dans le cadre d'un changement de paradigme des risques forts vers les risques faibles et des fortes aux faibles doses d'exposition touchant un grand nombre de personnes que le processus d'analyse du risque alimentaire a vu le jour.

L'analyse de risque est une démarche de prévision, mitigation et communication principalement des risques faibles, le plus souvent en situation d'incertitude. Elle procède à un recensement qualitative et/ou quantitative des problèmes potentiellement liés à un type d'exposition dans une optique de «screening» destiné à ne prendre en considération que les expositions pour lesquelles une intervention serait susceptible de faire diminuer le risque de maladie dans la population considérée, ou d'éviter l'augmentation du risque dans le cas de substances introduites volontairement (tels que les additifs alimentaires, les pesticides,...).

L'analyse de risque est généralement réalisée selon un processus comportant trois composantes que nous allons présenter brièvement avant de revenir sur le détail de l'évaluation du risque (Fig.1).

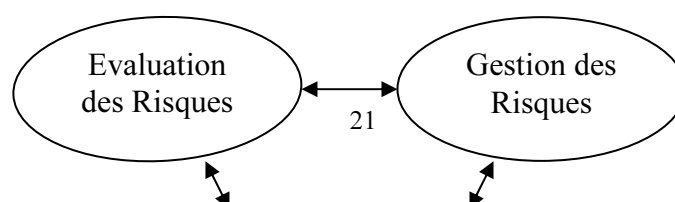




Figure 1. Processus d'analyse du risque.

2.1- L'évaluation du risque ou appréciation du risque

C'est une démarche scientifique destinée à identifier un danger chimique ou biologique et à en estimer la probabilité de survenue ainsi que l'importance de ses effets toxiques connus ou potentiels pouvant résulter de l'exposition de l'homme à des aliments porteurs de ce danger.

2.2- La gestion du risque

La gestion du risque est le processus, distinct de l'évaluation du risque, d'identification, de sélection et de mise en œuvre de mesures permettant de réduire le risque (Fig.2). Elle consiste à mettre en balance les différentes politiques possibles en consultation avec toutes les parties intéressées, en tenant compte de l'évaluation du risque et d'autres facteurs ayant une importance pour la protection de la santé des consommateurs et la promotion des pratiques commerciales loyales. Ultimement, la gestion du risque consiste à choisir les moyens de contrôle et de prévention appropriés.

Les mesures de gestion de risque alimentaire relèvent en premier lieu de l'application de mesures à grande échelle : fixation de normes sanitaires et mise en place des systèmes de surveillance de leur mise en application. Ces mesures ne pouvant être prises qu'au niveau global et ne comportant pas de contrainte individuelle (ni vaccination, ni changement de comportement tel que le port de ceinture de sécurité...), sont comparables à la fluoration des eaux de boissons et aux mesures réglementaires de fortification de certains produits alimentaires. La responsabilité de leur mise en œuvre incombe à l'état (établissement de recommandations et de lois, surveillance de leur mise en application, sanction dans le cas contraire).

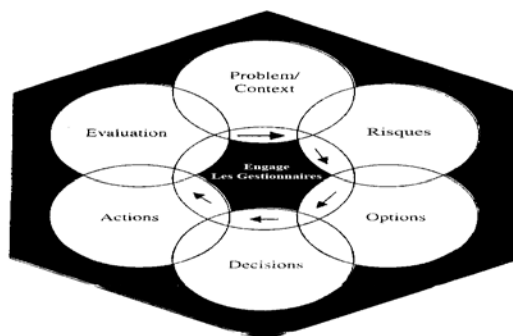


Figure 2. Processus de gestion de risque.

2.3- La communication relative au risque

C'est l'échange interactif tout au long du processus d'analyse du risque, d'informations et d'opinions concernant le risque, les facteurs liés aux risques et leurs perceptions, entre les responsables de leur évaluation, les responsables de leur gestion et les autres parties intéressées, tels que les milieux professionnels et le public, notamment l'explication des résultats de l'évaluation des risques et des fondements des décisions prises en matière de gestion du risque.

3- L'évaluation du risque alimentaire

Les bases internationales d'une méthode scientifique d'évaluation des risques chimiques et biologiques associés à l'alimentation ont été discutées et établies lors d'une consultation *ad hoc* d'experts mixtes FAO/OMS réunis à Genève en 1995 pour traiter de l'application de l'analyse de risque aux aliments. Cette initiative du Codex Alimentarius résultait d'une part des préoccupations croissantes des opinions publiques en matière de sécurité alimentaire, et d'autre part des dispositions prévues par l'accord SPS (accord sur l'application des mesures sanitaires et phytosanitaires) de l'acte final de l'organisation mondiale de commerce (OMC), spécifiant que les normes, les lignes directrices et les recommandations du Codex Alimentarius, reflètent un consensus international en ce qui concerne les exigences minimales pour la protection de la santé humaine en regard des risques alimentaires.

L'évaluation des risques constitue avant tout une méthode permettant d'organiser systématiquement l'information scientifique et technique, y compris les incertitudes qui l'entourent, pour répondre à des questions précises sur les risques sanitaires. Elle nécessite l'évaluation des informations pertinentes et le choix des modèles à utiliser pour en tirer des conclusions. Cette procédure est donc sujette à des incertitudes liées aux données et au choix du modèle approprié. Elle est utile pour réaliser une analyse bénéfice/risque liée à l'utilisation de certaines substances chimiques (additifs alimentaires, pesticides), pour établir les niveaux ciblés du risque suite à la mise en évidence des problèmes liés à des contaminations particulières (contaminants et polluants de l'eau), pour établir les priorités d'action pour les programmes de contrôle et de prévention et, finalement, pour estimer les risques résiduels et l'étendu de la réduction du risque après que des actions spécifiques pour réduire le risque ont été prises.

L'évaluation des risques est un processus qui se déroule en quatre étapes (Fig.3) qui seront présentées en détail dans ce qui suit.

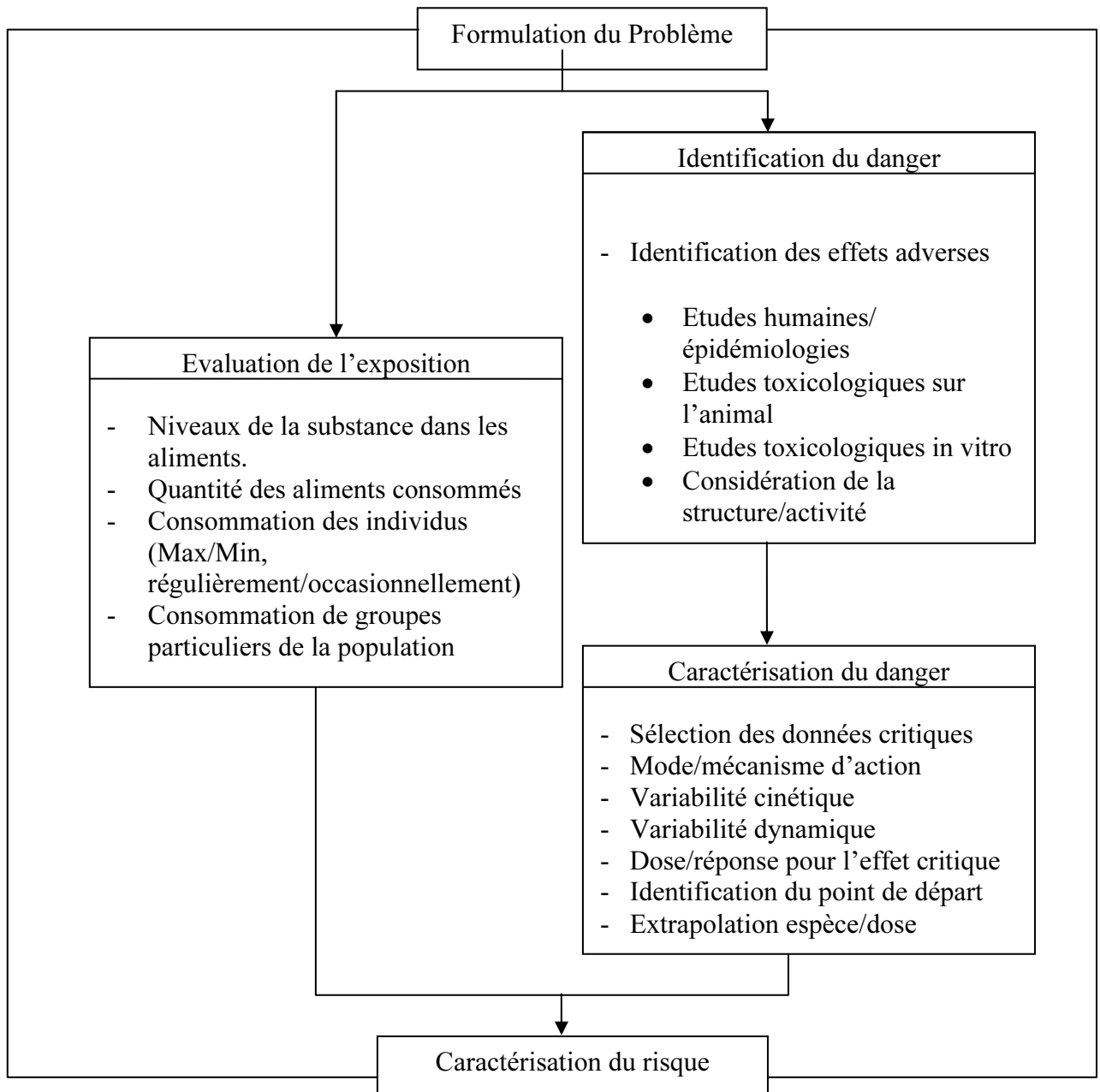


Figure 3. Processus d'évaluation du risque.

3.1- L'identification du danger

C'est la 1^{ère} étape de l'évaluation du risque. Elle consiste à identifier les effets adverses que peut causer sur la santé humaine un danger chimique, biologique ou physique présent dans un aliment ou un groupe d'aliments. Cette identification est faite sans tenir compte de la dose nécessaire pour produire ces effets adverses ni des mécanismes spécifiques impliqués dans la production de ses effets. Elle s'appuie d'une part sur les données épidémiologiques ou cliniques lorsqu'elles existent, et d'autre part sur des études conduites in vitro (modèles mécanistiques) ou in vivo (chez l'animal- Tab.2) (Casse et al., 1998).

3.1.1- Méthodes d'évaluation de la toxicité des substances chimiques : méthodes d'identification du danger

Pour identifier un danger il faut effectuer une analyse suffisamment approfondie et documentée des données scientifiques pertinentes provenant de bases de données appropriées, de la littérature ayant déjà fait l'objet d'une évaluation par les experts et, si elles sont accessibles, d'autres sources d'études non publiées (industrie). Par ordre d'importance croissante, les études se classent ainsi: les études quantitatives des relations entre la structure et l'activité, les essais *in vitro*, les études toxicologiques chez l'animal, et enfin les études épidémiologiques, tel est l'ordre dans lequel ces différentes études sont décrites dans ce qui suit.

a- Méthode basée sur la relation structure/activité

La structure chimique, la solubilité, la stabilité, la sensibilité au pH, l'électrophilicité, la volatilité et la réactivité chimique d'une substance peuvent être des indicateurs de sa toxicité. Les relations entre la structure et l'activité peuvent être donc utiles pour accroître la force de la preuve lors de l'étape d'identification des dangers. Lorsqu'on étudie une classe de composés (par exemple les hydrocarbures polycycliques aromatiques, les polychlorobiphényles ou les dioxines), et que l'on dispose de données toxicologiques adéquates sur un ou plusieurs membres de la classe, il peut être utile d'utiliser la notion d'équivalence toxique pour prédire les dangers associés à l'exposition aux autres substances de la même classe. Cette méthode est surtout utile pour l'évaluation de la toxicité potentielle des mélanges complexes.

b- Méthodes «in vitro»: tests de génotoxicité

L'objectif principal de ces tests est de fournir un avertissement précoce du potentiel génotoxique, qui lui-même peut être un indicateur du potentiel cancérogène, mutagène ou tératogène, de la substance étudiée. Cette information est très utile dans deux cas : lors du développement de nouveaux additifs, permettant ainsi d'éviter l'exécution des études de toxicité chronique pour des substances qui ne seront pas approuvées, et aussi pour l'évaluation des risques potentiels des toxiques naturels.

Ils existent plusieurs types de tests dont les plus importants sont présentés dans le tableau 1 (Euinsenbrand, 2002). Les observations réalisées au cours de ces tests se subdivisent en mutations génétiques, clastogénicité (modification de la structure ou du nombre des chromosomes) et les altérations de l'ADN (comme par exemple les altérations de la synthèse de l'ADN) (Kluwe, 1995).

A noter que certains de ces tests sont réalisés *in vivo*. Ceux ci sont considérés plus pertinents pour l'évaluation du risque car ils sont capables de démontrer le potentiel génotoxique d'une substance en présence des processus métaboliques, toxico cinétiques, et de cytoprotection (Renwick, 1999).

Tableau 1. Les principaux tests de génotoxicité.

Niveau du test	Exemple
In vitro- bactéries	Salmonella Thyphimurium- mutation inverse
	Escherichia Coli- mutation inverse
In vitro- levures	Saccharomyces cerevisiae- mutation du gène
	Saccharomyces cerevisiae-recombinaison mitotique
In vitro- mammalien	Cellules mammaliennes- mutation du gène
	Cellules mammaliennes- échange de chromatide sœur
	Cellules mammaliennes- test cytogénétique
	Cellules mammaliennes- synthèse non programmée de l'ADN
In vivo- mammalien	Test de micronucléus
	Test de la moelle osseuse- analyse chromosomique
	Test de létalité dominante chez les rongeurs
	Synthèse non programmée de l'ADN in vivo
	Essai de translocation héritable chez les souris

c- Méthodes «in vivo»: études de la toxicologie conventionnelle réalisées en expérimentation animale

La plupart des données toxicologiques utilisées pour l'évaluation des risques proviennent d'études menées chez l'animal; ces études étant effectuées selon des protocoles d'essais normalisés et largement acceptés. Il existe de nombreux protocoles à cet effet (OECD par exemple), mais aucun guide n'a été publié en ce qui concerne le choix et l'utilisation d'un protocole donné pour l'évaluation des risques présentés par les denrées alimentaires. Quel que soit le protocole utilisé, toutes les études doivent respecter les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) et les procédures normalisées d'assurance et de contrôle de la qualité (QA/QC).

Des spécifications concernant les caractéristiques minimales que doivent présenter les données destinées à l'évaluation des risques présentés par les aliments sont généralement disponibles et utilisées. Il s'agit notamment des spécifications concernant le nombre d'espèces ou de souches, l'utilisation d'animaux des deux sexes, le choix des doses, la voie d'exposition et la taille des échantillons. En général, la source de données (études publiées, études non publiées....) ne pose pas de gros problèmes dans la mesure où les études sont transparentes et où l'on peut prouver qu'elles ont été menées dans le respect des BPL et des procédures QA/QC (WHO, 1987).

Généralement les essais réalisés en expérimentation animale pour l'identification de danger comprennent: l'étude de la toxicité orale aiguë, l'étude de la toxicité à court terme, l'étude de la toxicité subchronique, l'étude de la toxicité à long terme ou chronique et de cancérogenèse, l'étude de la toxicité de la reproduction, l'étude de l'immunotoxicité (Tab.2).

Ces études permettent de mettre en évidence le potentiel toxique d'une substance chimique qui se traduit par la survenue à court ou à long terme, d'effets adverses soit de nature fonctionnelle (réactions d'intolérance, perte de poids, changement de comportement...), soit de nature morphologique (hypertrophie, atrophie, effets hormonaux, nephrocalcinose...), soit de nature néoplasique (induction et promotion d'une tumeur) ou soit des effets adverses sur la fonction de reproduction et/ou sur le développement (réduction de la fertilité, stérilité, embryotoxicité, teratogénicité.....) (Mc Connell, 1995, WHO, 1987).

i) Sélection du matériel à utiliser en expérimentation animale: caractérisation chimique de la substance

L'évaluation toxicologique adéquate des substances chimiques nécessite leur caractérisation chimique afin de prouver que le matériel utilisé en expérimentation animale est représentatif de celui qui est ingéré par les consommateurs. Cette caractérisation consiste à établir l'identité chimique du produit (matière première utilisée et processus de sa fabrication) et à identifier les impuretés qui s'y trouvent suite au transfert à partir de la matière première utilisée, les sous produits résultant du processus de fabrication ainsi que les produits de réaction qui peuvent survenir lors des processus de traitement et de stockage.

ii) Sélection des niveaux de dosage

Généralement trois niveaux de dosage sont utilisés au cours de chaque essai. Ces niveaux comprennent (ISBN, 1997):

- Une Dose maximale: c'est la dose maximale qui peut être administrée en expérimentation animale pour reproduire les effets toxiques d'un danger chimique sans entraîner des modifications significatives au niveau des processus biochimiques et physiologiques normaux. Pour les études chroniques, cette dose est la dose qui est capable de produire une réduction de croissance ou une perte de poids de 10% et est appelée Dose Tolérable Maximale (DTM). En aucun cas cette dose ne doit dépasser la concentration de 1% dans l'aliment ou 1000mg/Kg/jour (Swenberg, 1995).
- Des doses intermédiaires: qui vont permettre de définir la relation dose réponse (ou effet) de l'effet adverse identifié.
- Une Dose minimale: c'est la dose qui, administrée en expérimentation animale, n'entraîne pas des changements ou des perturbations significatifs aux niveaux des organes cibles identifiés par l'usage des doses élevées, entre les animaux traités et les animaux témoins. Cette dose est appelée Dose Sans Effet Observable (DSEO).

iii) Sélection de l'espèce animale à tester

La sélection de l'espèce animale pour les études toxicologiques a été pour longtemps un sujet de débat. L'espèce idéale doit avoir une courte durée de vie, des taux de reproduction élevés et une large taille de la portée afin d'optimiser la sensibilité de détection des effets adverses. De plus elle doit avoir un métabolisme et une sensibilité comparable à ceux de l'espèce humaine. Malheureusement de telles espèces n'existent pas, et par la suite les études de toxicité sont effectuées sur l'espèce la plus appropriée pour l'effet sous investigation. D'une façon générale, les rongeurs sont considérés comme étant des bons modèles expérimentaux malgré qu'ils

présentent des différences avec l'espèce humaine de point de vue biochimique et physiologique, et sont alors utilisés dans la majorité des études chroniques pour des raisons de praticabilité (Mc connell, 1995). En fait la compréhension croissante des mécanismes toxiques a permis de reconnaître parmi les effets adverses observés chez les rongeurs ceux qui sont pertinents à l'espèce humaine. Par ailleurs l'expérience croissante avec ces espèces a permis de mieux reconnaître parmi les changements mineurs qui sont détectés en expérimentation ceux qui ont une signification clinique. Des données émanant des essais conduits chez des espèces autres que les rongeurs sont indispensables pour optimiser l'identification du danger. Le choix de cette seconde espèce va dépendre de l'objectif des investigations. Bien qu'il n'existe pas de directives indiquant le genre d'espèce à utiliser dans les différents essais de toxicité, la pratique courante utilise (Renwick, 1999):

- Les rats et les chiens pour les études de toxicité à court terme et subchronique.
- Les rats et les souris pour les études de toxicité chronique et de cancérogenèse.
- Les rats et les lapins pour les études de toxicité de la reproduction et du développement.

iv) Description des essais toxicologiques

1. Etudes de la toxicité orale aigue, à court terme, subchronique et chronique et études de la toxicité sur la fonction de reproduction, le système immunitaire et le système nerveux.

La description des essais toxicologiques réalisés en expérimentation animale est présentée dans le tableau 2. Ces essais diffèrent essentiellement par leur objectif, la durée de leur exécution, le niveau de dosage qui y est impliqué ainsi que le nombre d'espèces animales utilisées.

Tableau 2. Les principaux tests toxicologiques réalisés en expérimentation animale pour l'identification des dangers.

Tests	Description
Toxicité orale aiguë	Administration d'une seule dose afin de définir l'étendu de la toxicité de la substance en l'absence d'autres données et de déterminer la dose létale 50.
Toxicité à court terme	Administration de doses journalières répétées pour une durée de 14 -28 jours afin de fournir des indicateurs utiles sur le potentiel toxique.
Toxicité subchronique	Administration de doses journalières répétées pour une durée de 90 jours afin de fournir de l'information sur les sites majeurs de toxicité ainsi que sur les effets toxiques. Utilisée surtout pour la conception des études de toxicité chronique.
Toxicité à long terme et cancérogenèse	Administration de doses journalières répétées pour une durée d'une année (cas des non rongeurs) ou de deux ans (cas des rongeurs). Les données dérivées de ces études sont souvent la base de l'évaluation de risque des produits chimiques.
Toxicité de la reproduction	Administration de doses journalières répétées avant, pendant et après la gestation afin de déterminer les effets sur la fonction de reproduction, de gestation et sur le développement du fœtus et du nouveau né et d'éventuels effets héréditaires.
Immunotoxicité	Investigation sur la structure et le fonctionnement des tissus et des cellules responsables de l'activité et de l'intégrité du système immunitaire, intégrée dans les tests de toxicité à court terme et subchronique.
Neurotoxicité	Investigation sur la structure et le fonctionnement du système nerveux, intégrée dans les tests de toxicité à court terme et subchronique.

2. Etude de la toxico cinétique et du métabolisme

Comme la toxicité chimique résulte de l'interaction d'une substance ou l'un de ses métabolites avec les constituants de l'organisme, les études de toxico cinétique ou de métabolisme semblent être indispensables pour compléter l'évaluation de la toxicité des substances chimiques.

En fait la toxico cinétique est le terme utilisé pour décrire le mouvement du produit chimique ou l'un de ses métabolites dans l'organisme c.à.d son absorption, sa distribution, son métabolisme et son élimination.

Le métabolisme constitue une étape majeure de la toxico cinétique. Il s'agit des réactions de biotransformations, catalysées par des enzymes intra ou extra cellulaires ou les enzymes de la microflore intestinal, aboutissant soit :

- A la conversion de la substance en un constituant de l'organisme,
- A la détoxification du produit ingéré par la formation de métabolites inactifs et leur élimination de l'organisme par voie urinaire ou biliaire,
- A l'activation du produit ingéré par la formation de métabolites réactionnels réagissant avec les protéines tissulaires, l'ADN, l'ARN,.....

Les études de toxico cinétique fournissent donc de l'information, chez les différentes espèces animales, sur l'étendu de l'absorption de la substance à partir du tractus digestif (biodisponibilité), l'étendu de la distribution avec un accent particulier sur les organes/ tissus qui montrent une accumulation après administration répétée (identification des organes/tissus cibles de toxicité) et sur les principaux voies d'élimination : métabolisme et/ ou excrétion urinaire ou biliaire dans les conditions déterminant la DSEO. Cette information est utile pour avoir un aperçu du devenir éventuel de la substance chez l'homme.

Généralement ces études ont deux rôles bien distincts dans l'évaluation toxicologique des substances chimiques (Renwick, 1994; Renwick 1993(a)):

- lors de la conception des études animales, elles permettent d'identifier l'espèce appropriée pour ces études, et le niveau approprié d'essais à exécuter
- lors de l'extrapolation des données de la toxicologie expérimentale à l'homme, elles permettent d'élucider le mécanisme de toxicité de la substance, facilitant ainsi l'établissement de la dose sans effet observable (DSEO); de plus une comparaison des données de toxico cinétique entre l'animal et l'homme aide à fournir de l'information sur la pertinence à l'homme des effets toxiques observés chez l'animal.

v) Sélection du niveau approprié des essais «in vivo» pour l'identification du danger: approche par niveau de préoccupation

D'énormes ressources humaines et financières sont nécessaires pour entreprendre tous les tests qui sont décrits ci-dessus pour chacune des substances à étudier. Par ailleurs, il existe une préoccupation générale de garder à son strict minimum le nombre d'essais qu'une substance chimique doit subir pour permettre une évaluation rationnelle du risque. En fait puisque l'évaluation du risque prend en considération deux aspects : la toxicité de la molécule et l'exposition potentielle ou réelle de l'homme à cette molécule (Henschler et al., 1996) une approche prenant en compte ces deux aspects a été alors développée. Cette approche consiste à fixer un nombre limité de tests à entreprendre pour évaluer la toxicité de la substance en fonction de son niveau de préoccupation (Tab.3). Ce niveau est déterminé d'une part par le

potentiel toxique de cette substance, et d'autre part par l'exposition humaine (réelle ou potentielle) à cette substance (FDA redbook I, 1982): la substance est initialement attribuée à l'une des trois catégories suivantes, ceci en fonction de sa structure chimique et du potentiel toxique de ses analogues (Klassen et Watkins, 2003): catégorie A (faible potentiel toxique), catégorie B (potentiel toxique intermédiaire) ou catégorie C (fort potentiel toxique); l'exposition anticipée est ensuite prise en considération et introduite pour développer le niveau de préoccupation pour la substance étudiée (Fig.4) (Renwick, 1999).

Tableau 3. Tests à entreprendre en fonction du niveau de préoccupation de la substance à étudier.

Test Toxicologique	Niveau Impliqué		
	I	II	III
Génotoxicité	*	*	*
Toxicité à court terme (rongeur)	*		
Toxicité subchronique (rongeur)		*	*
Toxicité subchronique (non rongeur)	*		
Toxicité chronique/cancérogenèse (rongeur 1)			*
Cancérogenèse (rongeur 2)			*
Toxicité de la reproduction		*	*
Neurotoxicité	+	+	+
Immuno-toxicité	+	+	+
Métabolisme et toxico cinétique		*	*

+ signifie à inclure dans les tests toxicologiques

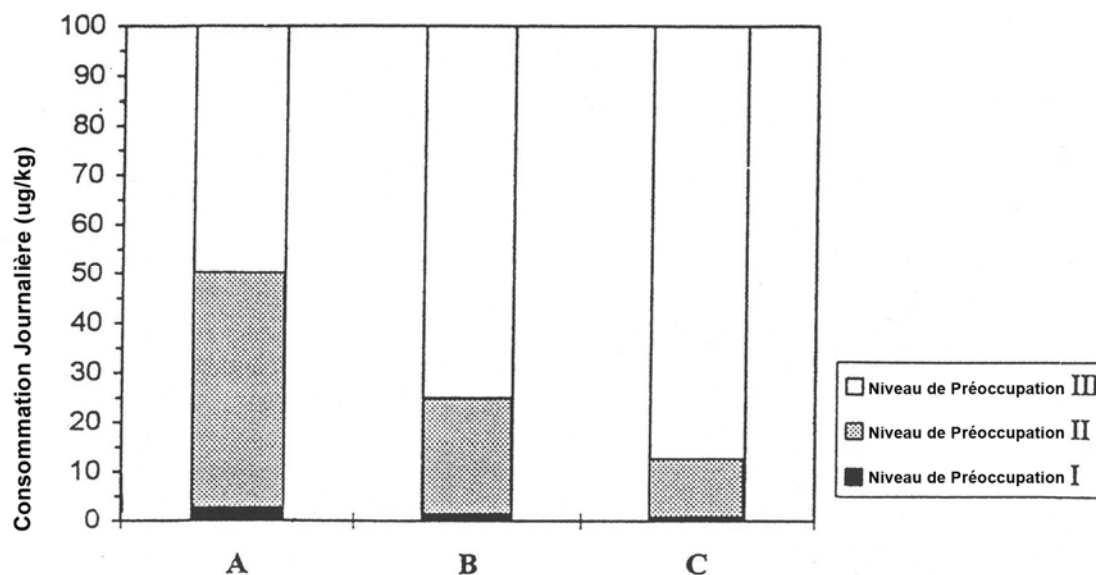


Figure 4. Niveau de préoccupation développée pour une substance.

En plus de l'exposition à la substance et de son potentiel toxique, d'autres facteurs peuvent contribuer à la détermination du niveau de préoccupation de la substance et par la suite à l'étendu d'essais nécessaire pour évaluer sa toxicité (Tab.4) (Henschler et al., 1996, Maga et Anthony, 1995). Cependant ces facteurs ne jouent qu'un rôle complémentaire.

Tableau 4. Facteurs impliqués dans la détermination de l'étendu des essais toxicologiques nécessaires pour l'évaluation d'une substance chimique

Facteurs principaux Toxicité potentielle	Information contributrice
	Structure chimique
	Relation structure/activité
Exposition potentielle	Concentrations alimentaires
	Autres sources environnementales
Facteurs complémentaires	
Occurrence naturelle dans les aliments	Comparaison entre une exposition antérieure et une exposition supplémentaire
Occurrence en tant que constituant normal de l'organisme	Comparaison entre la charge corporelle préexistante avec une charge corporelle supplémentaire suite à une exposition alimentaire
Usage dans les aliments traditionnels	Comparaison d'une exposition antérieure à une exposition supplémentaire
Connaissance des effets sur l'homme	Représente une base de données importante pour l'évaluation du risque

d- Observations réalisés sur l'homme: études épidémiologiques et cliniques

Les observations réalisées sur l'homme ne sont pas incluses dans la base de données obligatoires pour l'identification du danger (WHO, 1987; SCF, 1980). D'une façon générale ces observations permettent de compléter la base de données obtenue en expérimentation animale. Cependant, pour la plupart des substances chimiques, il est rare que l'on dispose de ces observations. Généralement ces observations sont obtenues soit à partir des études épidémiologiques soit à partir des études cliniques. Toutefois, ces deux types d'études présentent des différences importantes dans leur objectif, leur conception, et leur exécution.

Les études épidémiologiques dont les données sont exploitées pour l'évaluation des risques doivent être menées selon des protocoles normalisés reconnus. Elles sont utilisées pour identifier les dangers chez l'homme. Elles permettent de confirmer la pertinence à l'homme des effets adverses observés en expérimentation animale. Elles permettent également l'identification des effets adverses spécifiques à l'espèce humaine. Le principal avantage de ces études est qu'elles ne nécessitent pas une extrapolation des données obtenues en expérimentation animale, mais utilisent des observations aux niveaux d'expositions humaines et des effets adverses qui ont une signifiante clinique. Cependant ces études sont essentiellement critiquées pour leur manque de sensibilité, leur faible puissance statistique pour la détection des effets ayant une faible incidence aux niveaux d'expositions humaines,

pour l'absence de contrôle sur le niveau et la durée de l'exposition, pour le coût élevé de leur exécution, et enfin pour le peu d'information qu'elles fournissent (Tab.5) ((Klassen et Watkins, 2003, Tomenson et al., 1993).

Par contre les études cliniques n'ont pas pour objectif d'identifier le danger mais d'évaluer d'une part la tolérabilité, aux niveaux potentiels de l'exposition humaine (ou à des niveaux légèrement supérieurs), d'une substance chimique qui est intentionnellement ajoutés aux aliments (additifs et pesticides) après que celle-ci ait été extensivement étudiée en expérimentation animale; d'autre part, d'étudier le devenir de la substance (cas des contaminant naturels surtout) dans l'organisme humain c.à.d son métabolisme et sa toxicocinétique (Wilks et Woollen, 1994). L'avantage de ces études est qu'elles possèdent un niveau bien contrôlé de l'exposition humaine au danger chimique (Maga et Anthony, 1995).

Tableau 5. Quelques forces et faiblesses de l'épidémiologie.

Avantages	Limitations
Le risque observé dans une population extrapolé à une autre peut varier d'un facteur 2 à 3 (facteur 100 entre l'animal et l'homme)	Le temps nécessaire à la production des résultats valides est long
Les effets observés correspondent à la plage de variation réelle des expositions en population humaines	Le coût de la réalisation d'études à grande échelle est élevé
Des voies d'exposition multiples et complexes sont intégrées simultanément	La tendance à la surinterprétation d'un résultat positif ou négatif par des «non initiés» est réelle
Les facteurs endogènes de variabilité (génétiques, hormonaux et autres) sont pris en compte	Le risque d'erreur pour les risques faibles est élevé

3.2- Caractérisation du danger

C'est l'étape qui suit l'identification du danger, elle permet d'évaluer qualitativement et quantitativement la nature des effets adverses sur la santé humaine associés aux dangers identifiés via la caractérisation de la relation dose-effet (ou réponse).

La caractérisation du danger correspond généralement à:

- l'établissement de la relation dose effet pour les effets adverses ou critiques (un effet critique est défini comme étant l'effet physiologique survenant à la plus faible dose (Klassen et Watkins, 2003).
- l'évaluation de la dose externe (administrée) contre la dose interne (absorbée).
- l'identification des espèces et des souches les plus sensibles.
- l'identification des différences potentielles qualitatives et quantitatives entre les différentes espèces.
- la caractérisation du mode d'action et les mécanismes de toxicité des effets adverses et des effets critiques.
- finalement l'extrapolation d'espèce et de dose.

Pour ce faire la caractérisation du danger va s'appuyer essentiellement sur la toxicologie expérimentale. Celle-ci permet de déterminer si le toxique a un effet seuil ou sans seuil et de

l'estimer en mettant en œuvre un ensemble de tests toxicologiques validés, utilisant des doses très élevées de la substance testée afin de solliciter des réponses expérimentalement appréciables. Pour pouvoir être comparées aux niveaux auxquels l'homme est exposé, les données recueillies chez l'animal doivent être alors extrapolées à des doses beaucoup plus faibles que celles qui sont utilisées pour les études. Cette extrapolation comporte alors des incertitudes tant qualitatives que quantitatives (Tab.6) ce qui laisse poser la principale question sur la signification des effets indésirables détectés chez l'animal à ces doses élevées pour les populations humaines exposées à des doses beaucoup plus faibles. En fait, le danger peut changer de nature avec la dose ou même disparaître complètement. Le modèle choisi pour étudier la relation dose-réponse peut être incorrect si la nature de la réponse chez l'animal et chez l'homme est qualitativement la même. L'estimation de la dose équivalente chez l'animal et chez l'homme est un problème de pharmacocinétique comparative. A cela s'ajoute le fait que le métabolisme d'une substance chimique peut être différent aux fortes doses et aux faibles doses. Par exemple, les doses élevées submergent souvent les voies normales de détoxification et de métabolisme et entraînent des effets indésirables qui ne se produiraient pas à des doses plus faibles. De fortes doses peuvent induire un taux plus élevé de production enzymatique, des modifications physiologiques et des modifications pathologiques liées à la dose (Renwick, 1999). Le toxicologue prend en compte l'incidence potentielle de ce type de modifications liées à la dose lors de l'extrapolation des effets indésirables aux faibles doses.

Tableau 6. Problèmes de l'extrapolation de fortes aux faibles doses.

Effets nutritionnels	Palatabilité des aliments Digestion des nutriments Absorption des nutriments
Effets biochimiques	Inhibition des enzymes Déplétion des cofacteurs Induction enzymatique
Effets physiologiques	Effets hormonales Mal fonctionnement des organes Mal fonctionnement des cellules
Toxico cinétique non linéaire	
Absorption	Dissolution - élimination de la substance non dissoute par les fèces Saturation des systèmes de transport actif Effet du 1 ^{er} passage hépatique
Distribution	Fixation aux protéines plasmatiques Fixation aux protéines tissulaires
Métabolisme	Saturation par le substrat Déplétion des cofacteurs Inhibition par le produit final Utilisation d'une voie métabolique alternative pour produire un nouveau métabolite non formé aux faibles doses.
Excrétion	Saturation de l'excrétion tubulaire rénale
Ejection cardiaque	Réduction de la vitesse de distribution tissulaire et de la clairance.

L'approche adoptée pour réaliser l'extrapolation d'espèce et de dose pour la dérivation des Valeurs Toxicologiques de Référence (VTR tels que DJA, DJT, LS...) de l'exposition humaine sûre va dépendre de la nature de l'effet toxique du danger (Fig.5). En effet les effets toxiques des dangers sont de trois types : 1) les effets non cancérogènes, non génotoxiques, 2) les effets cancérogènes, non génotoxiques et 3) les effets cancérogènes génotoxiques.

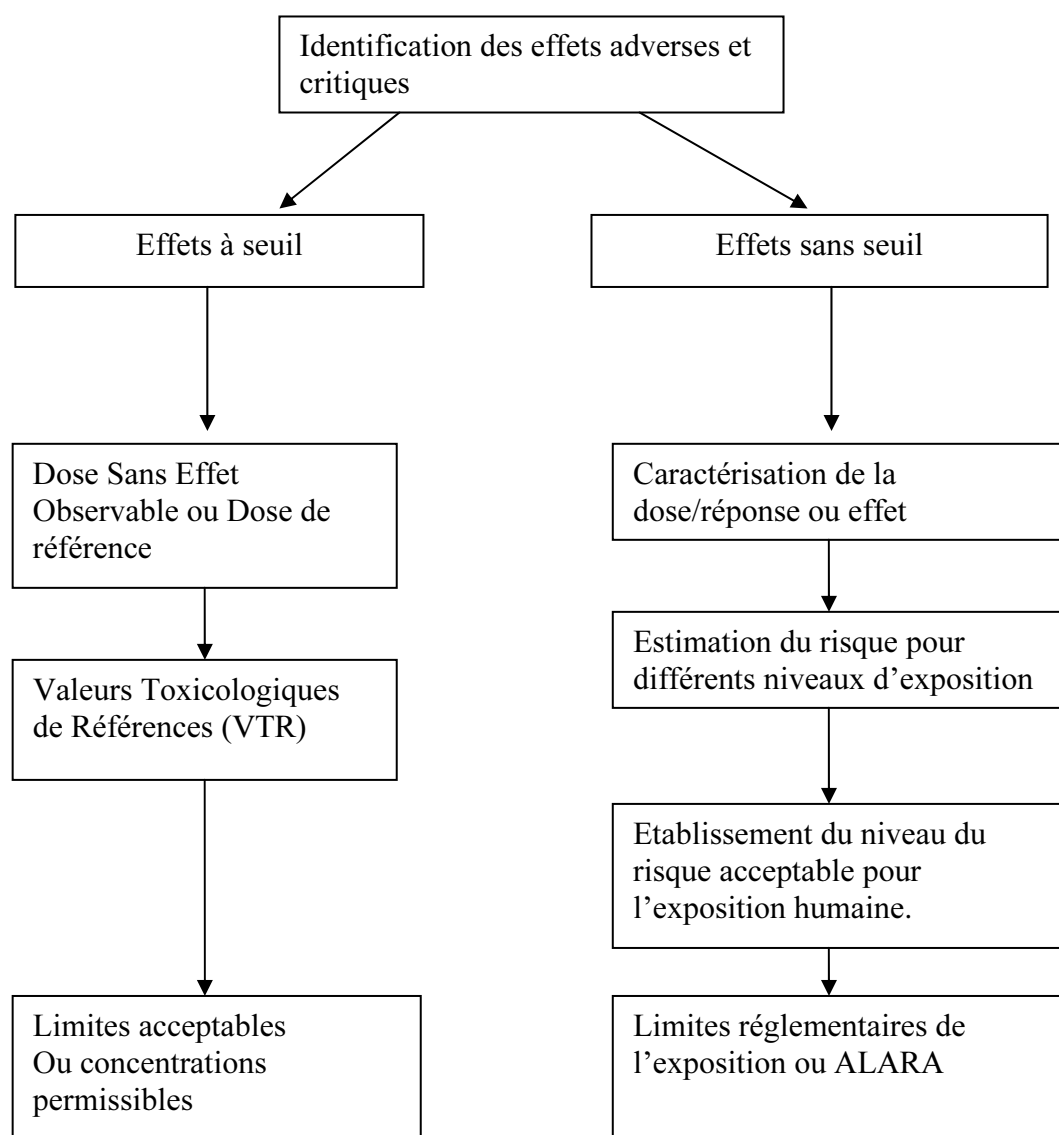


Figure 5. La caractérisation du danger; ALARA: As low as reasonably achievable.

Pour le premier type d'effets, il est reconnu qu'il existe un seuil d'exposition au dessous duquel aucun effet adverse n'est observé ou reproduit (Renwick, 1991). Ce seuil n'est que la dose sans effet observable (DSEO) et est exprimé en mg/Kg de poids corporel /jour. Ce seuil va constituer le point de départ de l'extrapolation d'espèce et de dose pour la dérivation de la VTR. D'une façon générale, cette valeur est dérivée par application d'un facteur de sécurité à la dose sans effet observable (DSEO) la plus élevée qui est obtenue par comparaison entre les données tirées de l'ensemble des essais (Kroes et al., 1991). L'application de ce facteur a pour objectif d'introduire une marge de sécurité qui prend en compte les incertitudes inhérentes à l'extrapolation des données obtenues en expérimentation animale à l'homme d'une part et d'autre part la grande variabilité de l'espèce humaine. La marge de sécurité ainsi introduite doit être suffisamment large afin d'éviter tout risque pour les différents groupes de consommateurs et /ou pour les individus ayant une exposition à court terme dépassant la VTR à condition que l'exposition sur des périodes plus longues ne la dépassent pas (Rulis, 1987; Lu, 1988).

Le choix de ce facteur est du domaine de la gestion du risque. Il détermine qualitativement l'importance du risque résiduel incompressible socialement ou individuellement acceptable. Lorsqu'on dispose des résultats d'études chroniques chez l'animal, le facteur de sécurité traditionnellement appliqué est de 100 (10×10): celui-ci assume que l'être humain est 10 fois plus sensible que l'espèce animale la plus sensible et que la différence de sensibilité entre les individus de la population humaine est de l'ordre de 10 (Fig.6). Cependant un facteur de sécurité inférieur à 100 (données dérivées des études humaines, substances métabolisées en un constituant normal de l'organisme....) ou supérieur à 100 (données dérivées des études subchroniques, nombres d'animaux insuffisants, VTR provisoire...) peut être appliqué (Pieters et al., 1998; Renwick, 1995; Gaylor et Gold, 1995; Renwick, 1993 (b); Renwick, 1991; Rulis, 1987). De plus des facteurs de modification (FM) peuvent être utilisés pour ajuster les facteurs de sécurité utilisés, en fonction des données de toxico cinétique (Klassen et Watkins, 2003; Renwick, 1998).

$$VTR = DSEO / (FS \times FM)$$

La DSEO qui est sélectionnée pour la dérivation de la VTR est généralement obtenue à partir des études de toxicité à long terme (lorsqu'elles existent) réalisées en expérimentation animale. La DSEO est donc une valeur expérimentale. Sa détermination dépend essentiellement de la bonne sélection des doses utilisées dans ces études et du modèle expérimentale (Klassen et Watkins, 2003; Maga et Anthony, 1995).

Lorsque différentes études de toxicité sont menées sur la même substance la DSEO utilisée pour la dérivation de la VTR est soit celle qui est attribuée à l'espèce animale la plus sensible (c.à.d ayant la DSEO la plus faible) à condition que ses différentes études soit comparables de point de vue qualité et durée ou soit celle qui est attribuée à l'espèce animale présentant le plus de similitude à l'homme de point de vue toxico cinétique et métabolisme (Walton, 2001).

Cependant l'approche basée sur la DSEO a été critiquée pour de nombreuses raisons: 1) la DSEO doit être l'une des doses expérimentalement testées, 2) une fois que cette dose est identifiée, le reste de la courbe de dose-effet est ignoré, 3) les expérimentations qui testent peu d'animaux résultent en des DSEO plus élevées et par la suite des VTR plus élevées et 4) l'approche basée sur la DSEO n'identifie pas les réponses actuelles à la DSEO et varient avec le modèle expérimentale, aboutissant ainsi à l'établissement des limites réglementaires à des niveaux variant du risque. En réponse à ces limitations, une méthode basée sur une dose

efficace plus faible ou dose de référence (DE) a été proposée. Dans cette approche, la dose réponse est modélisée, et la limite inférieure de l'intervalle confiance pour une dose ayant un niveau de réponse spécifique (réponse de référence ou bench mark response (BMR)) est calculée. La BMR est spécifié d'habitude à 1%, 5%, ou 10%. La DEx (avec x étant le pourcentage de la BMR) est utilisée comme alternative à la DSEO pour la dérivation de la VTR. Les valeurs des facteurs de sécurité appliquées pouvant être les mêmes ou différents (généralement inférieurs) de ceux qui sont utilisés par l'approche basée sur la DSEO (Dourson et al., 1999; Auton, 1994).

$$VTR = DE_x / (FS * FM)$$

Cette approche présente de nombreux avantages: 1) elle est capable de prendre en considération la totalité de la courbe dose-effet, 2) elle permet l'inclusion d'une mesure de la variabilité, 3) elle permet l'utilisation des réponses obtenues expérimentalement, et 4) elle permet l'utilisation d'un niveau de réponse constant pour la dérivation des VTR (Barnes et al., 1995).

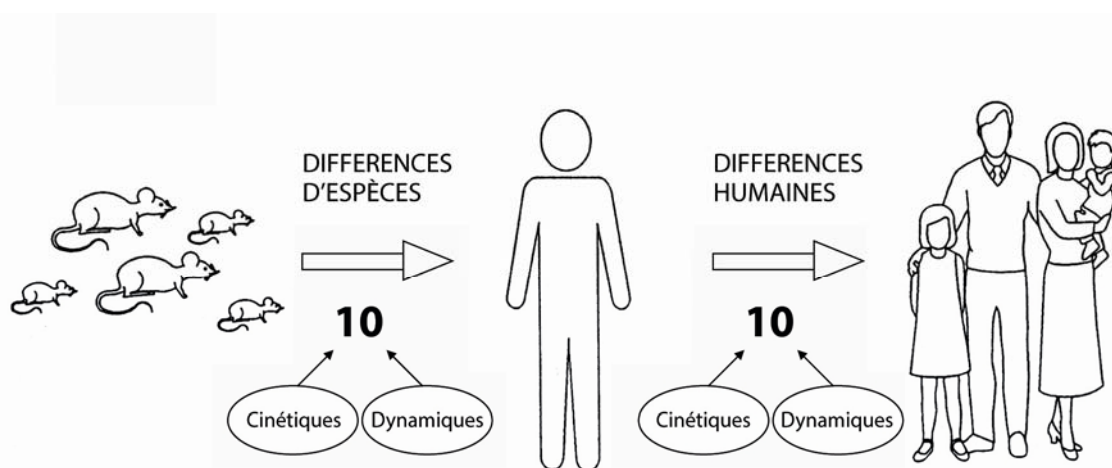


Figure 6. Dérivation de la VTR pour les effets à seuil.

Pour le 2nd type d'effet, l'extrapolation d'espèce et de dose peut être réalisée par l'usage d'un facteur de sécurité standard, l'usage d'un facteur de sécurité supplémentaire ou l'extrapolation linéaire du risque aux faibles doses (Rubbery, 1990). Cette dernière approche est difficilement justifiable puisque les mécanismes non génotoxiques dérivent de l'altération des processus physiologiques et métaboliques (sécrétion excessive des hormones trophiques qui contrôlent d'autres organes, effet de l'erythrosine sur la TSH, activation des récepteurs cytosoliques régulateurs de la transcription de l'ADN (prolifération des peroxisomes avec le di ethylhexylphtalate) , prolifération cellulaire chronique et hyperplasie (effet de la saccharin sur la vessie des rats) qui, le plus souvent, exerce un effet seuil (Renwick, 2003, Slob, 1998, Purchase et Auton, 1995). De plus, l'usage des études de cancérogenèse chroniques ayant une durée de 2 ans pour la dérivation de la DSEO semble être discutable. En fait les études ayant une durée de 6 à 12 mois sont plus sensibles et permettent une meilleure détection de la toxicité des organes cibles suite à l'élimination des modifications physiologiques liées au vieillissement (Rubbery, 1990).

Finalement, pour les cancérogènes génotoxiques, on considère généralement que la méthode consistant à appliquer un facteur de sécurité à la DSEO ne convient pas pour établir une VTR. On considère en effet qu'il existe un risque à toutes les doses, même la plus faible. Deux solutions sont alors possibles:

- 1) interdire l'utilisation commerciale de la substance en question, ou
- 2) établir un niveau de risque suffisamment faible pour qu'il puisse être considéré comme négligeable, insignifiant ou socialement acceptable.

L'application de cette deuxième solution est à l'origine de l'évaluation quantitative des risques pour les cancérogènes.

Différents modèles d'extrapolation ont été utilisés à cette fin. Les modèles actuellement utilisés pour l'établissement des VTR sont basés sur une extrapolation linéaire du risque aux faibles doses en utilisant la relation dose effet obtenue en expérimentation animale afin d'estimer le risque aux différents niveaux d'exposition humaine (Count et Goodman, 1995).

Cette approche nécessite, en général, une extrapolation sur 3 ordres de puissance: en effet pour qu'un danger soit détecté en expérimentation animale, il doit avoir une incidence de plus que 1 pour 100 alors qu'un risque acceptable pour l'espèce humaine ne doit pas dépasser une incidence de 1 pour 100,000 ou 1 pour 1,000,000. La variabilité entre les espèces (de point de vue pharmacocinétique) est incorporée dans l'extrapolation par l'introduction de la modélisation pharmacocinétique basée sur la physiologie (PBPR). De plus la variabilité interindividuelle au sein de l'espèce étudiée est tenue en compte par l'usage du cadran supérieur du 95th percentile de l'intervalle de confiance (Fig.7) de l'extrapolation linéaire (Renwick, 1999; Slob, 1998).

Cependant ces modèles prennent en compte la mesure expérimentale des doses et de l'incidence des tumeurs, pratiquement à l'exclusion de toute autre information biologique. Aucun de ces modèles n'a été validé au-delà du stade expérimental. Aucune correction n'est faite pour la toxicité à haute dose, l'intensification de la prolifération cellulaire ou la réparation de l'ADN, de sorte que l'on considère que les modèles linéaires actuels surestiment quelque peu le risque. C'est ce que l'on exprime en déclarant que les risques déterminés par ces modèles constituent une "limite supérieure plausible" ou qu'ils ont été calculés dans l'hypothèse la plus défavorable. Beaucoup d'organismes de réglementation reconnaissent que cette méthode ne prédit pas les risques réels ou probables pour l'homme. Certains pays ont tenté de réduire la surestimation des risques inhérente à l'extrapolation linéaire en utilisant des modèles non linéaires.

La difficulté essentielle de cette approche est qu'une décision non scientifique doit être prise lors de la détermination d'un niveau de risque acceptable et par suite lors de la détermination de la VTR pour une substance déterminée (Counts et Goodman, 1995).

Une alternative à cette approche est de considérer qu'il n'y a pas de dose «virtuellement salubre» et par suite d'appliquer le principe ALARA (As Low As Reasonably Achievable) c.à.d. que la concentration du contaminant en cause dans les aliments soit réduite au niveau le plus bas raisonnablement réalisable. Ce niveau, qui peut être considéré comme irréductible, est par définition la concentration d'une substance qui ne peut être éliminée sans entraîner le rejet pur et simple d'un aliment ou sans compromettre gravement la disponibilité d'une source importante de nourriture (Dybing, 2002).

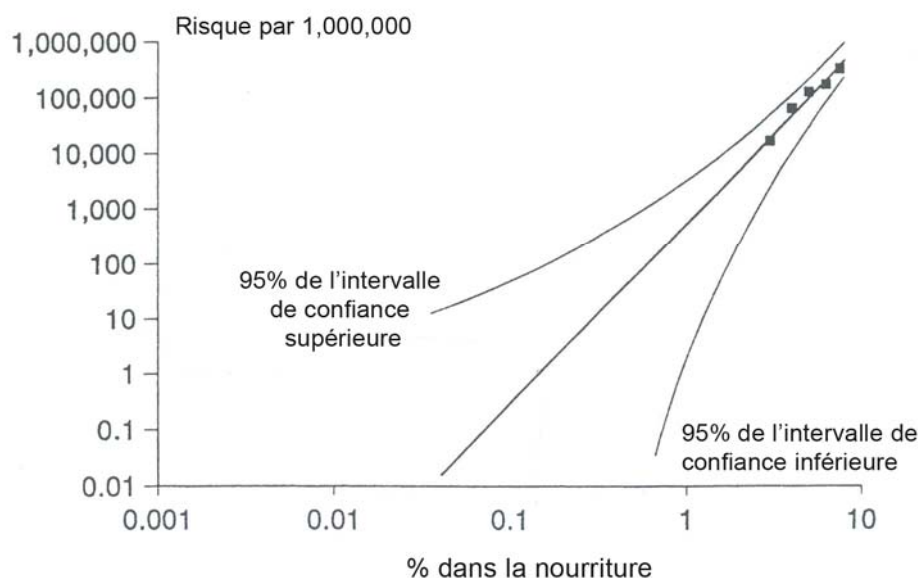


Figure 7. Extrapolation linéaire des effets génotoxiques.

La VTR dérivée par l'une de ces trois approches, est définie comme étant la quantité d'une substance, exprimée sur la base du poids corporel, qu'un individu peut ingérer durant toute sa vie sans encourir de risque appréciable pour sa santé. Cette VTR est exprimée sur une base hebdomadaire ou journalière tolérable lorsqu'il s'agit d'un contaminant, on parle alors de DHT ou DJT (Dose Hebdomadaire Tolérable ou Dose journalière Tolérable) ou sur une base journalière admissible pour les substances qui sont intentionnellement ajoutées dans les aliments tels que les additifs alimentaires, les résidus de pesticides et les résidus de médicaments vétérinaires, on parle alors de DJA (Dose Journalière Admissible) (Dourson et al., 1996).

3.3- Evaluation de L'exposition

L'évaluation de l'exposition est définie comme étant l'évaluation qualitative et/ou quantitative de l'ingestion d'agents biologiques, chimiques et physiques par le biais d'aliments, ainsi que par suite de l'exposition à d'autres sources, le cas échéant.

Elle constitue une étape majeure de l'évaluation du risque. Elle permet d'identifier les groupes de la population qui sont le plus à risque en terme d'exposition et les substances les plus préoccupantes en terme de santé publique. Elle peut être aussi utilisée pour déterminer des relations entre des effets indésirables observés chez l'homme et l'exposition à une substance particulière. Elles sont également utiles à la prise de décisions en matière de réglementation des produits chimiques et de sécurité des produits alimentaires.

Il existe plusieurs méthodes (Tab.7) permettant l'évaluation de l'exposition. Celles-ci reposent généralement sur deux approches (Kroes et al., 2002):

- celle fixant a priori, à partir des limites maximales résiduelles (LMR) ou taux d'utilisation maximaux autorisés (TMA) pour chacune des denrées alimentaires susceptibles de renfermer la substance considérée, et en prenant les consommations maximales des différents groupes de population. Cette évaluation par excès est généralement très conservatrice puisqu'elle postule une consommation quotidienne de la substance durant toute la vie de l'individu, aux doses les plus élevées permises. Il convient de remarquer que les LMR ou les TMA s'appliquent aux denrées non transformées, et ne tiennent pas compte des phénomènes de dilution, ou au contraire de concentration, pouvant résulter des processus technologiques appliqués aux aliments.
- celle prenant en compte séparément la contamination réelle des aliments et la consommation de ces aliments, qui intègre l'incidence des processus technologiques appliqués aux aliments, voire la variabilité des comportements alimentaires.

L'évaluation de l'exposition peut être aussi basée sur l'évaluation de la dose interne ou de biomarqueurs. Dans cette démarche l'exposition alimentaire est reconstruite à partir des résultats d'analyses biochimiques effectués sur les prélèvements biologiques humains. Cependant l'usage de cette méthode demeure encore marginal.

Tableau 7. Méthodes d'évaluation de l'exposition.

Méthode	Application	Description
Estimation "per capita"	Composés synthétiques	Estimation basée sur la production annuelle totale du composé chimique en question divisé par le nombre total de la population exposée
Budget	Additifs Approuvés	L'estimation assume que tous les aliments autorisés contiennent le composé à son niveau d'utilisation maximal approuvé, utilisé surtout comme une méthode de dépistage "pire cas".
Estimation de l'usage	Additifs Approuvés	Estimation basée sur les taux d'utilisation maximaux autorisés dans les différentes matières premières et sur la consommation de celles-ci par la population.

Tableau 7 (suite). Méthodes d'évaluation de l'exposition.

Etude de l'alimentation totale	Additifs Approuvés et contaminants	Estimation basée sur l'identification des aliments représentatives du comportement alimentaire de la population étudiée, ainsi que sur la détermination des quantités consommés de ces aliments, et finalement sur la détermination par analyse de la contamination de ces aliments tels que consommés.
Etude de l'alimentation dupliquée	Contaminants	Estimation basée sur le prélèvement directe d'aliments tels que consommés et sur la détermination de leur contamination par analyse directe.
Modèle alimentaire	Additifs approuvés et contaminants	Estimation basée sur une simulation d'un modèle alimentaire pour un groupe déterminé de la population, et sur la détermination par analyse de la contamination de ces aliments.
Bio marqueurs	Contaminants	Estimation basée sur le dosage directe des bio-marqueurs (molécules dérivées de la biodégradation des contaminants) dans les liquides biologiques des volontaires.

On voit donc que, la plupart des méthodes utilisées pour l'évaluation de l'exposition à un produit chimique nécessitent (Fig.8):

- Une information sur la concentration du produit chimique présent dans les différents aliments.
- Une information sur la consommation de ces aliments par les différentes tranches d'âges ou groupes de la population.
- Et finalement le choix d'un modèle de croisement entre les données de contamination et celles de consommation alimentaire (à l'exception de la méthode de l'alimentation dupliquée).

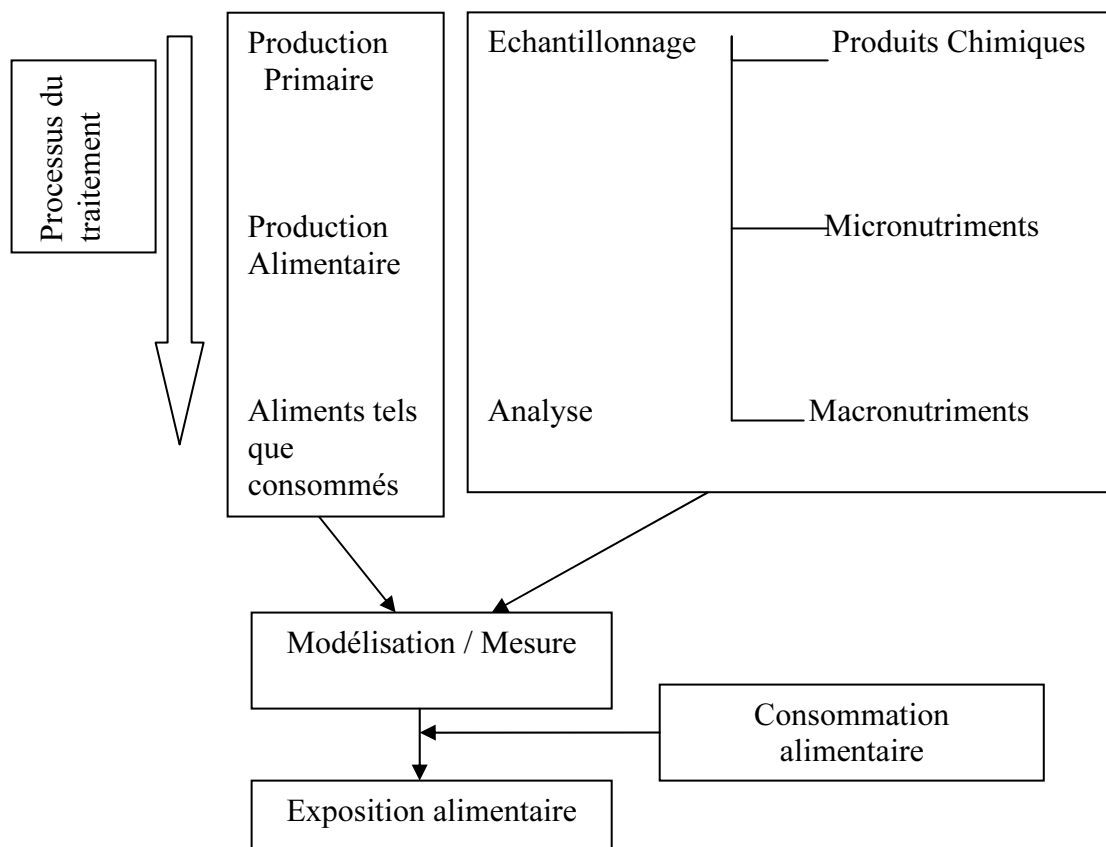


Figure 8. Processus d'évaluation de l'exposition.

3.3.1- Données de contamination

Pour évaluer l'exposition à un danger chimique une estimation de sa concentration dans les aliments est nécessaire. Cette estimation repose sur deux approches:

- celle assumant la présence des substances étudiées dans les aliments à leur LMR ou TMA tels qu'ils sont indiqués dans les différentes directives.
- celle reposant sur une détermination analytique de la contamination réelle des aliments consommés. Dans ce cas la sélection des échantillons et des méthodes d'analyses est critique pour l'obtention d'une information précise et comparable à un niveau international.

a- L'échantillonnage

Pour obtenir des résultats fiables l'échantillonnage doit être: 1) représentatif, 2) complet : c.à.d. permettre de refléter autant que possible la distribution probable des niveaux de contamination du produit chimique dans les différents échantillons prélevés; en effet plus les échantillons sont hétérogènes de point de vue concentration en produit chimique, plus le nombre d'échantillons à prélever doit être élevé et 3) être porté si possible sur le produit tel que consommé et non pas sur la matière première afin de permettre une élimination des effets de perte ou de concentration dues aux différents processus de traitement (Thompson et Bryers, 1994).

Il existe deux types de plan d'échantillonnage :

- plan d'échantillonnage aléatoire : qui consiste à prélever d'une façon aléatoire un certain nombre d'échantillons pour analyse ultérieure. Le nombre d'échantillons à prélever est stratifié en fonction des figures de production, de consommation ou finalement de partition du marché (marques).
- plan d'échantillonnage ciblé : qui consiste à prélever des échantillons connus ou suspects de contenir des concentrations «plus élevées que les limites permises» en un produit chimique dans un but de contrôle.

D'une façon générale, c'est le plan d'échantillonnage aléatoire qui est utilisé lorsque l'objectif est une évaluation de l'exposition car l'échantillonnage ciblé a tendance à exagérer d'une façon significative les niveaux actuels ou réels de contamination par les produits chimiques et par la suite l'exposition humaine à ceux-ci (Renwick, 1999).

b- Choix de la Méthode Analytique

Une fois qu'un échantillon représentatif est obtenu, le choix de la méthode analytique à adopter joue un rôle critique pour l'obtention des résultats valides et comparables (Kroes et al., 2002). En effet, il existe différentes méthodes analytiques qui peuvent être utilisées pour la détection et le dosage d'un produit chimique déterminé. Le choix de la méthode va dépendre essentiellement de l'objectif du dosage: ainsi pour un dépistage qualitative ou pour la quantification des produits chimiques présents à des concentrations élevées, des méthodes analytiques peu sensibles peuvent être utilisées ; alors que pour la quantification des produits chimiques présents à des faibles concentrations l'usage des méthodes analytiques très sensibles est indispensable. Cependant quelque soit la méthode adoptée, elle doit être validée et sa limite de détection (LOD) ainsi que sa limite de quantification (LOQ) doivent être déterminées et spécifiées. De plus la façon de traiter les résultats qui sont au dessous des limites de quantification ou de détection doit être clairement précisée.

3.3.2- Données de consommation alimentaire

Les données de consommation alimentaire sont indispensables pour pouvoir évaluer l'exposition à un danger. L'estimation de la consommation alimentaire est basée sur deux types d'approches (Beaton, 1994):

- approche indirecte: il s'agit de l'estimation de la consommation alimentaire individuelle à partir des données existantes de consommations collectives: FAO bilan alimentaires et enquêtes sur les achats alimentaires des ménages.
- approche directe: Il s'agit de l'estimation de la consommation alimentaire individuelle à partir des données à recueillir pour les individus d'une façon prospective (record de 1 jour → 14 jour) ou d'une façon rétrospective (FFQ- questionnaire alimentaire de fréquence, historique alimentaire, rappel de 24hr) par l'intermédiaire d'enquête de consommation alimentaire.

L'information obtenue par les bilans alimentaires porte sur la quantité d'aliment disponible par individu de la population indépendamment de son âge et de son genre. Il s'agit d'une estimation grossière de la consommation individuelle moyenne (surestimation) car elle ne permet pas de distinguer entre consommateur et non consommateur ni d'identifier les sous groupes de la population qui sont à risque (WHO, 1999) d'une part, et d'autre part elle ne tient pas compte des phénomènes de dilutions ou de concentrations liés aux processus de traitement. Cette estimation est souvent multipliée par un facteur de 10 pour tenir compte de la fraction potentielle des consommateurs et des gros consommateurs. Les bilans alimentaires sont surtout utilisés pour évaluer la variation des tendances alimentaires au cours du temps. Ils sont également utilisés dans l'évaluation de l'exposition aux résidus de pesticides et aux contaminants naturels qui sont essentiellement évalués dans les aliments bruts. Finalement ils sont utilisés comme une première étape pour évaluer l'exposition aux substances chimiques et ils peuvent être utiles pour les comparaisons entre les pays.

L'information obtenue à partir des enquêtes au niveau des ménages porte sur les achats alimentaires de ceux-ci. Ces enquêtes ne fournissent pas de l'information sur la façon avec laquelle les aliments ont été préparés, ni sur la consommation réelle de ses membres, ni finalement sur la consommation alimentaire en dehors des ménages.

Contrairement aux deux méthodes précédentes, l'information obtenue par les enquêtes de consommation alimentaire porte directement sur les consommations alimentaires moyennes et leur distribution pour un groupe d'individus bien définis (Nelson et Bingham, 1997). Elle comporte d'une façon générale une description plus en moins détaillée:

- de la consommation de l'eau
- du type d'aliment consommé (cru, cuit, transformé, mode de préparation...)
- de la quantité consommée (portion)
- de la fréquence de consommation
- du profil du consommateur (ex: âge, genre, indice de masse corporelle (IMC), culture, état de santé...).

Et/ou des informations supplémentaires :

- saison/jour de la semaine
- région/culture
- revenus/facteurs socioéconomiques

Cependant il est important de noter qu'il n'existe pas une méthode idéale pour estimer la consommation alimentaire; le choix de la méthode à adopter va généralement dépendre de plusieurs facteurs entre autres (Biro et al., 2002):

- l'objectif de l'étude (nutrition ou toxicologie)
- la cible (individu ou population)
- les caractéristiques de la population (âge, sexe, éducation, motivation, niveau de compréhension)
- les moyens disponibles
- le temps disponible
- le risque de sur ou sous estimation.

D'une façon générale, la méthode la plus précise et donc la plus fiable pour l'estimation de la consommation alimentaire est celle qui est basée sur un enregistrement de sept jours (Kroes et al., 2002). Cependant la méthode la plus simple et la moins sophistiquée pour caractériser la consommation moyenne d'un groupe est celle qui est basée sur un rappel sur 24 heure ou sur un record de 24 heure à condition que l'échantillon soit représentatif de la population à étudier d'une part et que tout les jours de la semaine soient également représentés d'autre part (Eck et al., 1994). Par contre si une distribution de la consommation individuelle est requise au sein d'un groupe, deux jours consécutives (ou non) sont alors exigés afin de permettre une estimation de la variabilité inter journalière de consommation alimentaire pour un individu donnée (Cariquiry et al., 1994, Hoffman et al., 1994).

De plus, les méthodes historiques et de fréquence (FFQ), sont généralement utilisés pour construire les modèles du comportement alimentaire, sur une période de temps relativement longue (Goldy et al., 2004, Hesecker et Kubler, 1994).

Finalement, il est important de signaler qu'une association de deux ou plusieurs méthodes permet d'améliorer nettement la qualité des données recueillies ceci par le fait que les points faibles d'une méthode seront contrebalancés par les points forts de l'autre, comme par exemple l'association d'un record alimentaire de trois jours à un questionnaire de fréquence. De plus cette association est pratique et facilite l'interprétation des données (Farris et al., 1994, Metka et Sevenhuysen, 1994).

3.3.3- Méthode d'intégration des données de consommation alimentaire et des données de contamination; modélisation de l'exposition à un danger chimique

A l'exception des études basées sur la méthode de l'alimentation dupliquée, les données de consommation et les données de contamination se rapportant au même individu n'existent pas. Pour cela, l'évaluation de l'exposition à un danger dans l'alimentation va nécessiter un certain degré de modélisation afin de tenter de créer une représentation réelle de l'exposition.

La modélisation consiste à croiser les données de consommation avec les données de contamination selon le principe général suivant (Thompson et Bryers, 1994):

$$\text{Exposition} = \text{consommation} \times \text{contamination (ou résidus)}.$$

En croisant les données de contamination et les données de consommation plusieurs niveaux d'agrégation des aliments sont possibles. Le niveau agrégé c'est lorsque tous les produits alimentaires de la même nomenclature sont considérés comme un seul aliment ayant une valeur de contamination bien définie. Il a été démontré que le niveau agrégé entraîne une surestimation de l'exposition aux toxiques en comparaison avec le niveau désagrégé (WHO, 1997). En fait ceci peut être expliqué par le fait que, pour le niveau agrégé, les valeurs de contamination sont dépendantes de l'homogénéité des données. En fait, si à l'intérieure d'une classe, plusieurs aliments ont des valeurs de contamination élevées, la valeur de contamination moyenne sera plus élevée que si la valeur de contamination réelle est attribuée à chacun des aliments.

Ce croisement peut être réalisé selon trois approches: 1) une approche déterministe, 2) une simple distribution ou 3) une approche probabiliste

a- Approche déterministe

Cette approche consiste à multiplier une valeur fixe de la consommation par une valeur fixe de la contamination (limite moyenne ou maximale du résidu), puis à sommer l'exposition de toutes les sources alimentaires (Kroes et al., 2002).

Un exemple d'application de cette approche est la détermination de la consommation journalière théorique maximale pour les additifs alimentaires. Cette approche est le plus souvent utilisée comme une première étape pour évaluer l'exposition basée sur les enquêtes de consommation alimentaire car elle a l'avantage d'être simple et peu coûteuse.

Cependant elle ne permet pas de refléter la distribution de l'exposition au sein de la population, ni de souligner les facteurs influençant les résultats puisqu'elle suppose que tous les individus consomment la même quantité d'un aliment spécifique qui a un niveau de contamination fixe (Tab.8).

L'approche déterministe est généralement considérée appropriée pour des objectifs de «dépistage». Si elle démontre que l'apport alimentaire d'une substance chimique est beaucoup plus faible que sa VTR en général, même lorsque l'usage des niveaux de consommation et/ou de contamination maximaux a été assumé, elle peut être suffisante pour décider qu'une évaluation supplémentaire de l'exposition à cette substance est non nécessaire.

b- Simple distribution

Cette approche consiste à utiliser la totalité de la courbe de consommation qui est alors croisée à une valeur fixe de la contamination (ou résidus).

Cette approche a l'avantage d'être plus informative que l'approche déterministe puisqu'elle tient en compte la variabilité de la consommation alimentaire entre les individus de la population étudiée.

Cependant elle présente l'inconvénient d'être conservative puisqu'elle suppose qu'un aliment spécifique est toujours contaminé par le même danger et que celui-ci est toujours présent à la même teneur.

Cette approche est utilisée surtout pour estimer la limite supérieure de l'exposition à un danger déterminé (Kroes et al., 2002).

c- Approche probabiliste

Cette approche utilise la totalité de la courbe de consommation ainsi que la totalité de la courbe de contamination. Les données sont croisées entre elles par l'usage de logiciels contenant des formules mathématiques prédéfinies (Slob et Pieters, 1998).

Cette approche a l'avantage de simuler la distribution de l'exposition au sein d'une population donnée (totalité de la courbe de consommation). De plus elle permet la détermination de la probabilité pour qu'un fort consommateur soit exposé au delà de la VTR ainsi que la détermination du pourcentage des consommateurs fortement exposés. Elle permet également de quantifier l'incertitude associée à l'estimation de l'exposition (Tab.8).

Cependant elle nécessite la présence d'un nombre suffisant de données représentatives et l'utilisation des plans d'échantillonnage aléatoires ainsi que d'un modèle mathématique adapté à la question afin d'éviter une approche très homogène pour des problèmes différents (Tab.8). A rajouter à ceux ci la faible acceptabilité de cette approche par le consommateur: en effet les études sociologiques montrent que le consommateur n'accepte pas un risque probable même si sa probabilité est faible, d'où la difficulté dans la communication du risque avec le gestionnaire.

Tableau 8. Quelques avantages et inconvénients des approches déterministes et probabilistes.

Avantages	Inconvénients
<u>Approche déterministe</u> *simple *peu coûteuse *fournit une hiérarchisation des risques	*surestimation de l'exposition réelle par l'usage des niveaux de consommation ou de contamination maximale * peu informative * non associé à une mesure de l'intervalle de confiance et des incertitudes inhérente à l'exposition.
<u>Approche probabiliste</u> *informative *permet une mesure quantitative de l'incertitude *permet une évaluation quantitative du conservatisme de l'approche déterministe *facilite l'analyse du rapport bénéfice/risque	*compliqué *assurance qualité des calculs est difficile à conduire * son usage n'est pas trop recommandé

3.4- La caractérisation du risque

C'est l'étape finale de l'évaluation du risque qui va intégrer l'information des étapes précédentes en un conseil approprié pour les gestionnaires du risque. Elle est définie comme étant l'estimation qualitative et ou quantitative, compte tenue des incertitudes inhérentes à l'évaluation, de la probabilité de survenue ainsi que de la gravité des effets adverses connus ou potentiels sur la santé dans une population donnée (moyens et forts consommateurs) en se basant sur l'identification et la caractérisation du danger et l'évaluation de l'exposition.

La probabilité de survenue des effets adverses sur la santé est généralement difficile à estimer puisqu'elle va dépendre de la nature de l'effet, de l'importance ainsi que de la durée de l'exposition dépassant les valeurs toxicologiques de référence. En fait, il convient de noter qu'une exposition dépassant les valeurs toxicologiques de référence n'est pas nécessairement associée à la survenue d'effets adverses significatifs puisque ces valeurs sont basées sur l'exposition chronique et incorporent une large marge de sécurité. Cependant, elle a pour effet d'éroder la marge de sécurité par le rapport de la valeur guide à l'exposition estimée (ILSI, 1998; Renwick et Walker, 1993).

D'une façon générale, pour les substances chimiques présentant un seuil, la probabilité d'effets adverses sur la santé est par définition, négligeable si l'exposition est inférieure à la DJA/DJT/DHT. En ce qui concerne les substances chimiques pour lesquelles il n'est possible de fixer un seuil (cancérogènes génotoxiques), le risque pour la population est le produit du potentiel toxique par l'exposition. Ainsi toute augmentation du risque suite à une augmentation de l'exposition est interprétée par l'usage du même modèle mathématique utilisé dans l'extrapolation (Renwick, 2003).

Finalement il ne faut pas oublier qu'ils existent plusieurs incertitudes inhérentes à l'identification et la caractérisation du danger ainsi qu'à l'évaluation de l'exposition qui peuvent influencer la caractérisation du risque. Par conséquent la caractérisation du danger va errer sur le terrain de précaution et non plus de prévention jusqu'à ce que les données scientifiques relatives aux sujets traités soient améliorées. La caractérisation du risque représente donc une méthode nécessitant d'être mise à jour au vue de nouvelles données émergentes.

4- Les additifs alimentaires et Les mycotoxines en tant que risques alimentaires

Une alimentation saine et de qualité est essentielle pour le développement de l'être humain. En effet, il ne suffit pas d'avoir une quantité suffisante de denrées alimentaires, encor faut-il qu'elles soient variées, qu'elles contiennent les éléments nutritifs nécessaires, qu'elles ne soient pas présentées de façon à tromper l'acheteur sur leur identité et leur qualité, et qu'elles ne représentent pas de danger pour la santé des consommateurs, c.à.d. qu'elles soient libres de tout dangers microbiologiques et/ou chimiques ou qu'elles soient susceptibles de contenir ces dangers à des taux ne posant pas un problème sanitaire. Cependant c'est au XX^{ème} siècle, parallèlement à la modification de mode de vie et au développement de l'industrie agroalimentaire et des méthodes de l'agriculture intensive que les additifs alimentaires et les mycotoxines ont constitués un sujet de plus en plus préoccupant en terme de risques alimentaires.

4.1- Les additifs alimentaires

4.1.1- Généralités

Les additifs alimentaires constituent un large groupe de substances de structures chimiques et de rôles fonctionnels très diversifiés, qui sont ajoutés délibérément aux aliments pour assurer leur qualité. L'expression additif alimentaire s'entend de toute substance qui n'est pas normalement consommée en tant que denrée alimentaire en soi et n'est pas normalement utilisée comme ingrédient caractéristique d'une denrée alimentaire, qu'elle ait ou non une valeur nutritive et dont l'addition intentionnelle à la denrée alimentaire, dans un but technologique ou organoleptique, à une quelconque étape de la fabrication, de la transformation, de la préparation et du traitement, du conditionnement, de l'emballage, du transport ou du stockage de la denrée, entraîne ou peut entraîner son incorporation ou celle de ses dérivés dans la denrée. Les additifs alimentaires sont classifiés en fonction de leur rôle fonctionnel en une dizaine de classe incluant par exemple les conservateurs, les antioxydants, les édulcorants artificiels, les antimoussants etc.....

Les additifs alimentaires sont utilisés dans les aliments de façon délibérée dans un cadre réglementaire permettant de maîtriser les risques sanitaires de leur utilisation. En fait leur usage est régi par deux facteurs: l'innocuité et le besoin technologique.

- L'innocuité: tous les additifs alimentaires sont soumis aux tests et évaluation toxicologiques appropriés, cette évaluation tenant en compte de tout effet cumulatif, synergique ou de renforcement de leur emploi. Seuls sont alors confirmés les additifs alimentaires qui ne présentent aucun danger pour la santé du consommateur aux doses d'emploi proposées. De plus tous les additifs alimentaires sont tenus sous observation permanente et réévalués, compte tenu des variations des conditions d'emploi et des nouvelles données scientifiques et doivent être toujours conforme à une spécification d'identité et de pureté approuvée.
- Le besoin technologique: L'emploi des additifs alimentaires est justifié uniquement lorsque:

→ L'additif alimentaire permet de conserver la qualité nutritive des aliments,

→ L'additif alimentaire permet de fournir les ingrédients nécessaires à des produits alimentaires fabriqués à l'intention de groupes de consommateurs ayant des besoins nutritifs particuliers,

→ L'additif alimentaire permet d'accroître la conservation ou la stabilité d'un aliment ou améliorer ses propriétés organoleptiques, à condition de ne pas altérer la nature, la substance ou la qualité de l'aliment de façon susceptible d tromper le consommateur

→ L'additif alimentaire permet d'aider à la fabrication, à la transformation, au traitement, à l'emballage, au transport et au stockage des aliments, à condition que l'additif ne soit pas utilisé aux fins de déguiser les effets de l'emploi de matières premières défectueuses ou de méthodes ou techniques indésirables (y compris antihygiéniques) au cours de n'importe laquelle de ces activités.

Par ailleurs, l'approbation de l'incorporation d'un additif alimentaire est limitée autant que possible à des aliments spécifiques, à des fins spécifiques et dans des conditions spécifiques. De plus elle concerne la dose minimale strictement nécessaire pour atteindre l'effet désiré et tient en compte autant que possible de toute dose journalière admissible établie pour cet additif et de l'apport quotidien probable de cet additif dans tous les produits alimentaires.

4.1.2- Evaluation des risques liés aux additifs alimentaires

Les synthèses récentes des évaluations des risques liés aux additifs alimentaires, publiées dans WHO Technical report series et WHO food additifs series (International programme on chemical safety), à partir du recensement des données à un niveau national dans plusieurs pays incluant des pays Européens Américains et Asiatiques a permis de tirer les conclusions suivantes sur les additifs alimentaires en tant que risques alimentaires:

1. le « screening » des additifs alimentaires par la méthode de budget réalisé par le comité du Codex sur les additifs alimentaires et les contaminants (CCFAC) a permis d'identifier un certain nombre d'additifs alimentaires pouvant constituer des risques alimentaires potentiels et par la suite nécessitent une évaluation plus détaillée de l'exposition. L'inclusion des estimations nationales de la proportion d'aliments qui pourraient contenir les additifs identifiés dans les calculs réalisés par la méthode de budget a résulté en la même conclusion.
2. les résultats des évaluations nationales de l'exposition étaient variables pour un même additif en fonction de la nature du comportement alimentaire des groupes de populations étudiés et des taux d'additifs alimentaires utilisés dans ces évaluations.

3. des dépassements des Doses Journalières Admissibles (DJA) établies par les comités internationaux ont été observés lorsque les additifs alimentaires ont été assumés (ou trouvés) d'être présents à des taux élevés (comme ceux du DGSFA).
4. le potentiel de dépassement des DJA établies pour les additifs alimentaires existe pour un certain groupe de consommateurs tel que les forts consommateurs. Cependant les données disponibles étaient insuffisantes pour estimer la nature (enfants, adultes.....) et le nombre de ces consommateurs ni l'intensité et la durée des expositions dépassant les DJA.
5. les aliments qui sont les contributeurs majeurs des expositions aux additifs alimentaires sont trouvés d'être variables entre les populations.

Finalement, afin de mieux cerner le risque associé aux additifs alimentaires le CCFAC a recommandé aux différents pays de réaliser des études d'exposition à ceux-ci propres aux différents sous groupes de leur population (Codex Alimentarius Commission, 1997).

Pour une revue détaillée voir WHO (IPCS) food additive series 42, 1999 et WHO Technical report series 891, 2000.

4.2- Les mycotoxines

4.2.1- Généralités

Les mycotoxines font partis des contaminants naturels de l'alimentation, par opposition aux molécules apportées intentionnellement ou accidentellement par l'homme tel que les additifs alimentaire et les résidus de produits phytosanitaires.

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires sécrétés par des moisissures toxicogéniques appartenant essentiellement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* qui contaminent les denrées alimentaires aux champs ou durant leur stockage. La même toxine peut être élaborée par diverses espèces fongiques mais pas obligatoirement par toutes les souches appartenant à une même espèce. De même, dans certains cas, une même espèce de champignon peut produire plusieurs mycotoxines. De plus, la présence de moisissures toxicogéniques n'implique pas automatiquement la présence de la mycotoxine associée. Réciproquement, l'absence d'une contamination évidente par les moisissures ne garantit pas l'absence de contamination par les mycotoxines qui leur sont associées.

Les principales familles présentant une importance agro-économique et des effets délétères sur la santé humaine prouvés ou suspectés sont: les aflatoxines, les ochratoxines, les fumonisines, certains tricothécènes, la zéaralénone et la patuline (Pitt et al., 2000).

Ces contaminants ubiquitaires de l'alimentation humaine et animale peuvent être produits avant la récolte et /ou pendant le stockage des denrées alimentaires (Tab.9) et se retrouvent principalement dans les céréales, le café en grain, les haricots, les légumineuses, les fruits secs, mais aussi dans le café, la bière, le vin, les jus de fruits et les produits animaux (lait, œufs, viande) par transfert par l'intermédiaire de l'alimentation animale contaminée (Pitt et al., 2000). La FAO estime ainsi à 25% la proportion des denrées alimentaires mondiales contaminées annuellement par les mycotoxines (FAO, 1999).

Les mycotoxines sont généralement thermostables et résistants aux agents chimiques. Elles tendent à survivre le stockage et les processus de traitement même lorsqu'elles ont été

exposées à des températures élevées telles que celles qui sont atteintes pendant la production du pain ou des céréales de petit déjeuner. De plus les procédés alimentaires usuels ne font en général au mieux que détruire ou éliminer partiellement la plupart des mycotoxines présentes dans les aliments. L'exposition se fera donc essentiellement par ingestion d'aliments contaminés.

Les mycotoxines causent des effets adverses divers car leur structure chimique est trop différente les unes des autres. Ces effets adverses incluent des effets sur le foie, les reins, le système immunitaire et des effets cancérogènes (Park, 1995).

Ces différentes mycotoxines sont classés quant à leurs risques de cancérogénicité pour l'homme conformément aux procédures adoptées et aux pratiques en vigueur au CIRC (Centre International de Recherche sur la Cancer):

- **Groupe 1:** L'agent (le mélange) est cancérogène pour l'homme. Le mode d'exposition à cet agent entraîne des expositions qui sont cancérogènes pour l'homme.
- **Groupe 2** (deux groupes) :
 - **Groupe 2A** : L'agent (le mélange) est probablement cancérogène pour l'homme. Le mode d'exposition à cet agent entraîne des expositions qui sont probablement cancérogènes pour l'homme.
 - **Groupe 2B** : L'agent (le mélange) est peut-être cancérogène pour l'homme. Le mode d'exposition à cet agent entraîne des expositions qui sont peut-être cancérogènes pour l'homme.
- **Groupe 3** : L'agent (le mélange ou le mode d'exposition) est inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'homme.
- **Groupe 4** : L'agent (le mélange ou le mode d'exposition) n'est probablement pas cancérogène pour l'homme.

Tableau 9. Moisissures et mycotoxines d'importance mondiale.

Flores	Espèce de moisissures	Mycotoxines sécrétées	Principaux aliments contaminés
Du champ	Fusarium Sporotrichoides	Toxines T-2	Maïs, orge
	Fusarium Graminearum	Déoxynivalénol (ou nivalénol)	Blé, riz, seigle, avoine
		Zéaralénone	Blé, riz, seigle, maïs et avoine
	Fusarium Moniliforme	Fumonisin B ₁	Blé, riz, seigle, maïs et avoine
Du stockage	Aspergillus Parasiticus	Aflatoxines B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁ , M ₂	Maïs, blé, légumineuses et lait et produits laitiers
	Aspergillus Flavus	Aflatoxines B ₁ , B ₂	Arachides
	Aspergillus Ochraceus	Ochratoxine A	Maïs, orge et blé
	Penicillium Verrucosum	Ochratoxine A	Riz, orge et blé

4.2.2- Evaluation des risques liés aux mycotoxines

Des synthèses récentes des données de contamination et des évaluations des expositions relatives à certaines mycotoxines (ochratoxine A, aflatoxines et déoxynivalénol (DON)) obtenues par recensement international effectué par le comité mixte d'experts FAO/OMS (JECFA) et de l'EFSA ont permis de tirer les conclusions suivantes sur les mycotoxines en tant que risques alimentaires:

i) à propos de la contamination par les mycotoxines: Les mycotoxines ont été détectées dans pratiquement tous les types de céréales -dont le maïs, le blé, le seigle, l'orge et l'avoine et ont été retrouvées dans des produits à base de céréales comme la farine, le pain, les céréales de petit déjeuner... et dans de nombreuses autres denrées tels que les haricots, les grains de café, les produits cacaotés, les fruits secs et les épices et herbes.....On ne dispose actuellement pas de données pour tous les pays qui sont potentiellement concernés au vu de leurs conditions climatiques et/ou des pratiques agricoles particulières. En effet, d'après le recensement international effectué par le comité mixte d'experts FAO/OMS (JECFA), la majorité des données de contamination actuellement disponibles proviennent de l'Europe, tandis que l'Amérique du sud, l'Amérique du nord, l'Afrique et l'Asie sont très sous représentées et que la région du moyen orient est pratiquement absente. En outre, la comparaison internationale des données de contamination est rendue difficile par l'absence fréquente des procédures standardisées d'échantillonnage et d'analyse chimique, d'où une hétérogénéité des méthodes et des limites de détection obtenue. De plus, on constate que le type, la fréquence et les niveaux de contamination varient en fonction des denrées, des pays et de l'année considérés et que la contamination des aliments par ces mycotoxines est relativement ubiquitaire et courante. Ainsi, la consommation d'aliments contaminés serait responsable d'une exposition chronique aux différentes mycotoxines à des doses variables dans de nombreuses régions du monde.

ii) à propos de l'évaluation de l'exposition aux mycotoxines: Les expositions aux mycotoxines ont été estimées pour les cinq types de régime alimentaire du GEMS/food. Il a été alors conclu que certains types de régime alimentaire (type moyen orient par exemple) sont en faveur d'une exposition plus élevée aux mycotoxines. De plus ces estimations étaient significativement variables en fonction des taux de contamination utilisés ce qui a permis de souligner l'importance de l'impact des limites réglementaires nationales sur l'exposition totale aux mycotoxines. Les céréales étaient trouvées d'être les contributeurs majeurs aux expositions des mycotoxines. Le potentiel de dépassement des VTR établies par les comités internationaux est présent pour plusieurs catégories de consommateurs tels que les forts consommateurs et les enfants qui peuvent avoir des préférences particulières pour certaines spécialités produites localement résultant ainsi en des niveaux d'exposition exceptionnellement élevés.

Finalement dans sa dernière évaluation le JECFA préconisait, afin de cerner le risque associé aux mycotoxines, de réaliser des études d'exposition dans d'autres régions que l'Europe dont la majorité des données de contamination émane.

Pour une revue détaillée voir WHO (IPCS) food additif series 40, 1998, WHO (IPCS) food additif series 47, 2001, the EFSA journal 365, 20006.

5- Problématique et méthodologie de la recherche

Ce rapide aperçu des connaissances relatives à l'importance des systèmes d'évaluation de risque en tant qu'outil d'orientation des actions précises de prévention ou de réduction des risques alimentaires d'une part et aux additifs alimentaires et aux mycotoxines en tant que risques alimentaires d'autre part nous permet de dégager trois catégories de questions soulevant d'importants points de recherche:

A propos de l'évaluation des risques

Quelle est l'importance du rôle des systèmes d'analyse des risques dans la prévention des risques alimentaires? En d'autres termes quel pourrait être la pertinence de l'absence des systèmes de contrôle alimentaire, des normes et des systèmes d'analyse des risques sur le niveau de la sécurité alimentaire? Quelle pourrait être la pertinence des normes de sécurité alimentaire non établie selon une base de l'évaluation scientifique du risque sur la prévention des risques alimentaires?

A propos des additifs alimentaires en tant que risques alimentaires

Les additifs alimentaires constituent-ils un risque alimentaire pour les enfants et les adolescents dans un pays où les systèmes de sécurité alimentaire sont déficients (ou absents)? C'est-à-dire quel pourrait être le niveau de l'exposition actuelle aux additifs alimentaires des enfants et des adolescents dans un tel cas?

A propos des mycotoxines en tant que risques alimentaires

Quels sont la fréquence et le niveau de présence des mycotoxines dans les aliments disponibles dans une région où les conditions climatiques et le comportement de stockage des denrées alimentaires sont favorables à la sécrétion des mycotoxines tel que la région du moyen orient ? Et quels sont les niveaux d'exposition aux mycotoxines des enfants et des adolescents d'une population qui a un régime alimentaire riche en céréales ? En d'autres termes les mycotoxines constituent-ils un risque alimentaire pour les enfants et les adolescents d'une région type moyen orient?

L'examen de ces questions nous a amenés à ancrer nos recherches sur l'évaluation scientifique des risques microbiologiques et des risques chimiques associés aux additifs alimentaires et aux mycotoxines chez des sous groupes (enfants et adolescents) d'une population de la région du moyen orient: le Liban, où l'essor du secteur agro-alimentaire et le développement de l'agriculture intense couplés à une déficience, pour ne pas dire absence, dans les systèmes de sécurité alimentaire (systèmes de contrôle des denrées alimentaires, les normes, les systèmes d'évaluation des risques), aux conditions climatiques, aux comportements de stockage et aux habitudes alimentaires locales sont en faveur de la présence de ce type de risques alimentaires.

Nous avons sélectionné pour ce faire, les dangers alimentaires qui vont faire l'objet de notre recherche.

Nous avons ensuite développé différentes approches méthodologiques afin d'apporter des éléments de réponse qualitatifs et quantitatifs faisant à ce jour défaut. Nous avons mis au point conjointement un arbre de décision afin d'organiser les étapes de la recherche à mettre en œuvre (figure 9). Nous avons alors construit une démarche de recherche se déroulant en cinq étapes complémentaires que nous allons présenter brièvement dans ce qui suit.

La première étape: dans cette étape nous décrivons et commentons les méthodes d'analyses microbiologiques mises en œuvre pour une sélection d'aliments confectionnés au Liban ainsi que l'incidence de la contamination microbiologique de ces denrées. Notre objectif principal était d'obtenir des données qualitatives et quantitatives permettant de porter réponse sur le niveau de la sécurité microbiologique de certain type d'aliments confectionnés au Liban.

La seconde étape: dans cette étape nous décrivons les méthodes utilisées pour mener l'enquête de consommation alimentaire réalisée dans le cadre de cette recherche. L'objectif de ce volet est d'obtenir des données de consommations alimentaires qui soient représentatifs des sous groupes de la population étudiés et qui seront utilisables dans les évaluations des expositions aux additifs alimentaires et aux mycotoxines réalisées dans les étapes ultérieures.

La troisième étape: dans cette étape nous réalisons une évaluation préliminaire de l'exposition aux additifs alimentaires sélectionnés dans le cadre de cette thèse afin de mettre en évidence si ces additifs constituent des risques alimentaires préoccupants pour les sous groupes étudiés de la population libanaise (c.à.d les expositions à ces additifs dépassent les DJA établies pour ces mêmes additifs). Le principal objectif de cette étape est d'identifier les additifs nécessitant des données analytiques pour permettre une analyse plus raffinée de l'exposition à ceux-ci d'une part, et d'autre part, les différents types d'aliments qui sont des contributeurs potentiels aux expositions à ces additifs alimentaires afin d'orienter le plan d'échantillonnage qui est réalisé à l'étape suivante vers les aliments sur lesquels doivent être portés la recherche et le dosage de ces additifs.

La quatrième étape: dans cette étape nous décrivons les méthodes qui sont mises en œuvre pour l'obtention des données analytiques pour les additifs alimentaires qui ont été retenus et pour les mycotoxines d'une sélection de denrées alimentaires. L'objectif principal de ce volet est l'obtention des données qualitatives et quantitatives permettant de porter réponse sur le niveau de la sécurité chimique des aliments qui sont disponibles sur le marché libanais et qui seront utilisables à l'étape suivante.

La cinquième étape: dans cette étape nous effectuons une pose méthodologique et nous entamons un travail de modélisation de l'exposition aux additifs alimentaires et aux mycotoxines sélectionnés en vue de déterminer parmi ces substances celles qui posent un risque sur la santé des sous groupes de la population étudiés et d'estimer le niveau de ce risque d'une part et d'autre part d'identifier parmi les sous groupes étudiés ceux qui sont le plus à risque et parmi les aliments analysés ceux qui sont les principaux contributeurs aux expositions à ces substances. L'objectif principal de ce volet est d'analyser la situation des sous groupes de population étudiés vis-à-vis de ces risques alimentaires afin d'apporter des éléments de réponse sur la pertinence des normes (ou de l'absence de normes) non établies sur une base des résultats des évaluations des risques sur les niveaux des expositions aux additifs alimentaires et aux mycotoxines et par la suite sur la prévention (ou la réduction) des risques alimentaires associés à ces substances.

objectif: évaluer le niveau de sécurité alimentaire dans un pays où les systèmes d'analyse de risque n'existent pas, en particulier identifier des dangers alimentaires potentiels et estimer le risque que chacun d'entre eux est susceptible de représenter réellement pour les consommateurs.

Sécurité alimentaire

méthode: constitution d'un fichier de données relatif à la présence de ces dangers, évaluations des risques liés à ceux-ci

Dangers microbiologiques

Dangers chimiques

Objectif: identifier les dangers microbiologiques qui sont susceptibles d'être présents dans un certain type d'aliments qui est consommé par les sous groupes de la population étudiés.

Données de contamination microbiologique

Etude microbiologique

Objectif: caractériser la consommation des groupes de la population étudiés, confirmer ou réfuter le besoin d'une évaluation des risques liés aux substances sélectionnées
Méthode: choix des sous groupes de la population libanaise, élaboration des questionnaires à utiliser dans l'enquête, mise en œuvre d'une enquête de consommation alimentaire

Objectif: constituer un fichier de données sur la nature et des degrés de contamination microbiologique de certaines denrées alimentaires
méthode: sélection des denrées alimentaires; réalisation d'un plan d'échantillonnage représentatif; réalisation de l'analyse microbiologique de ceux-ci.

Evaluation quantitative des risques

Données de consommation alimentaire

Données de contamination

Evaluation de l'exposition

Approche traditionnelle

Approche de l'alimentation totale

Objectif: sélectionner les dangers qui constituent des risques potentiels et orienter les plans d'échantillonnage
Méthode: Estimation du niveau de risque en se basant sur les taux maximaux d'utilisation autorisés dans les différents aliments et sur la consommation de ceux-ci par la population.

Objectif: identifier des dangers chimiques qui sont susceptibles d'être présents dans un certain type d'aliments, déterminer la fréquence d'occurrence de ces dangers, et apprécier le niveau des risques que ces dangers sont susceptibles de représenter pour les consommateurs.

Objectif: constituer un fichier de données sur la présence des dangers chimiques dans différents aliments
Méthode: recensement des données à partir des normes, réalisation des analyses chimiques, recensement des données analytiques auprès de laboratoires

Objectif: sélectionner les dangers qui constituent des risques actuels et orienter les priorités d'action
Méthode: Estimation du niveau de risque en se basant sur les taux analytiques dans les différents aliments et sur la consommation de ceux-ci, caractérisation du risque, identification des groupes à risque et des principaux contributeurs de l'exposition à ces dangers.

Figure 9. Représentation schématique de l'arbre de décision applicable à la démarche de la recherche.

Matériels et méthodes

1- première étape: étude microbiologique

1.1- Etablissement de la liste d'aliments à échantillonner

L'objectif premier de cette étape a consisté à établir une liste d'aliments à échantillonner qui soit représentative des aliments produits par les industries agroalimentaires libanaises et à déterminer les différents types d'analyse microbiologique qu'ils doivent subir afin de pouvoir juger de leur qualité microbiologique. Le choix des aliments de la liste a été basé sur une étude du marché indiquant les principaux types d'aliments confectionnés par ces industries ainsi que les principales marques disponibles sur le marché libanais. L'établissement du protocole de l'étude microbiologique pour chacun des différents types des aliments sélectionnés a été basé sur une analyse des directives nationales et européennes traitant de la sécurité microbiologique des aliments.

Six types d'aliments confectionnés au Liban par les industries agroalimentaires ont été identifiés: les sodas, les jus de fruits, les produits laitiers, les conserves, les biscuits et les chips. Une liste principale des aliments pour le plan d'échantillonnage a été alors élaborée à partir de ces différents types d'aliments. Deux vagues d'achats des aliments de la liste ont été programmées pour prendre en compte autant que possible les variations de la contamination des denrées alimentaires. La première vague couvre les saisons automne/hiver 2003 et la seconde les saisons printemps/été 2003. L'achat des aliments a été effectué d'une façon aléatoire à partir des principaux lieux d'approvisionnement. La représentativité de l'échantillonnage a été réalisée en prenant en compte les modes d'achats et d'approvisionnement des consommateurs issus des analyses de la chambre du commerce et de l'industrie libanaise. Les informations obtenues portent sur les principaux lieux d'approvisionnement et /ou sur les principales marques qui couvrent entre 50-100% du marché (budget des ménages, 1999).

1.2- Analyses microbiologiques

Les laboratoires de microbiologie de la faculté de pharmacie de l'Université Saint Joseph (USJ) ont été retenus comme lieu de préparation et d'analyse des aliments échantillonnés. Les aliments échantillonnés ont été transportés le plus rapidement possible dans les conditions spécifiées par les directives nationales et européennes et stockés tels quels (conserves) ou après congélation ou réfrigération (produits frais surtout les produits laitiers) dans ces laboratoires jusqu'à leur analyse (ISO 7218, 1996). Des échantillons pour analyse ont été préparés à partir de 5 échantillons d'aliments de la même nature et de la même marque ayant chacun un poids de 100g. Ces 100 g pouvant être fournis par une ou plusieurs pièces du produit de la même marque. La préparation de ces échantillons a été effectuée d'une façon extemporanée, et a consisté tout d'abord à nettoyer les emballages à l'aide d'un détergent, en utilisant une brosse (cas des conserves et semi conserves), et en faisant attention tout particulièrement des sertis et des joints de fermeture. L'emballage a été ensuite séché à l'aide d'un papier adsorbant à usage unique, avant de procéder à sa désinfection.

La désinfection a été réalisée en passant à l'aide d'un coton hydrophile, une solution d'hypochlorite de sodium à 100mg/ml de chlore libre (Merck, Allemagne). Cette solution a été laissée pour action pendant 10 à 15 min, puis l'opération est recommencée mais cette fois avec du coton imprégné d'éthanol (Merck, Allemagne). Finalement, après séchage complet de l'emballage les échantillons ont été ouverts. Après ouverture les échantillons ont été tout d'abord inspectés visuellement pour la détection des signes physiques d'altération. Les échantillons ont été ensuite mélangés aseptiquement à l'aide d'un mélangeur mécanique préalablement stérilisé pour donner des échantillons homogénéisés à partir duquel la prise d'essai pour analyse a été prélevée.

1.2.1- Première étape: préparation de l'inoculum (Afnor, NF 08-010, 1996).

L'échantillon composite a été dans une première étape homogénéisé et dilué pour obtenir la prise d'essai destinée à être inoculée dans les différents milieux de culture. En fait tout dénombrement des bactéries va, en raison de la grande variabilité de leur nombre, nécessiter des dilutions du produit. En effet un produit peut contenir de très nombreuses bactéries, la culture de 1 ml de ce produit, placé dans un milieu de culture d'une boîte de Petrie, ne permettra pas de compter les colonies bactériennes que l'on devrait attendre, seule une nappe rassemblant toute les colonies sera visible. Il est donc nécessaire de diluer. La dilution des produits liquides ne pose pas de problème technique, ceci n'est pas vrai pour les produits solides d'où la nécessité de préparer une suspension mère à partir de laquelle les dilutions seront ensuite préparées.

Toutes les manipulations d'homogénéisation, de préparation des solutions mères et des dilutions décimales ont été réalisées d'une façon aseptique pour éviter toute contamination, et seuls les matériaux stériles à usage unique en matière plastique et conditionné stérilement et/ou stérilisables (pipettes, tubes à essai et autres) ont été utilisés lors de ces manipulations.

a- Homogénéisation et préparation des suspensions mères : cas des produits solides

→ Définition: La suspension mère est définie comme étant une suspension, solution ou émulsion obtenue après qu'une quantité pesée (10, 25 ou 50 g) du produit à analyser ait été mélangé, si nécessaire en utilisant un homogénéisateur, avec une quantité neuf fois égale de diluant, puis en laissant se déposer les particules grossières, s'il y en a.

→ Technique de préparation: Une prise d'essai de 10 g, obtenue à partir des parties superficielles et profondes du produit solide, est pesée aseptiquement dans le récipient où s'est fait le broyage. Cette prise d'essai est ensuite broyée en présence d'un liquide stérile (diluant) pour l'homogénéiser et la mettre en suspension. La suspension ainsi préparée est appelée suspension mère et constitue une première dilution. Le matériel utilisé pour réaliser le broyage a été stérilisé avant chaque préparation.

b- Préparation des dilutions décimales: cas des produits liquides et des suspensions mères

→ Définition: Les dilutions décimales sont des solutions ou suspensions obtenues en mélangeant un volume déterminé du produit liquide homogénéisé ou de la suspension mère avec un volume neuf fois égal de diluant, et en répétant cette opération sur chaque dilution ainsi préparée, jusqu'à obtention d'une gamme de dilutions décimales appropriée pour l'inoculation des milieux de culture.

→ Technique de préparation: Après agitation pendant 10 secondes environ du récipient contenant le liquide à diluer, par des mouvements tournants, 1 ml du liquide est prélevé à l'aide d'une pipette stérile ouverte stérilement en n'introduisant pas la pipette de plus de 1 à 2 cm dans le liquide et en aspirant et en refoulant une fois avant le prélèvement proprement dit. Le liquide prélevé est alors introduit dans un tube contenant 9 ml du diluant approprié, sans faire rentrer la pipette dans le diluant. Cette pipette n'a pas été réutilisée pour la préparation de la dilution suivante car elle est très contaminée et peut entraîner de graves risques d'erreur par excès. Le tube est ensuite agité doucement par des mouvements circulaires. Ces étapes sont répétées jusqu'à la dernière dilution voulue.

c- Préparation des diluants

Ils existent de nombreux liquides de dilutions: eau distillée stérile, eau physiologique (eau 1lg, NaCL 9g), tryptone-sel, eau peptonée tamponnée (eau 1lg, molécules organiques azotés 1g, NaCL 8,5g) et Ringer au $\frac{1}{4}$ ou phosphate dipotassique à 2%.....dont le choix dépend de la nature du produit à analyser. Dans notre analyse l'eau peptonnée tamponnée (Scharlau Chemie SA, division of microbiology, Espagne) a été choisie pour la réalisation des dilutions (Afnor, NF 08-010, 1996). La préparation des diluants a consisté en une dissolution des composants dans de l'eau distillée, sous l'action de la chaleur si nécessaire. Le pH a été ajusté de façon qu'après stérilisation soit de 7,0 à 25°C. Les diluants ainsi préparés sont répartis dans des fioles de capacité appropriée (pour les suspensions mères) ou dans des tubes à essai (pour les dilutions décimales) en quantités telles qu'après stérilisation, chaque tube contienne 9,0 ml. Les fioles et les tubes ont été bouchés, puis stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 min puis finalement refroidis à 25°C.

1.2.2- Deuxième étape: analyses microbiologiques

Les analyses microbiologiques ont été portées sur les dilutions ainsi préparées. Celles-ci ont été conduites aseptiquement, de façon à éviter toute contamination. De plus, elles ont été commencées immédiatement après la préparation des dilutions. En fait le temps qui s'est écoulé entre la fin de la préparation de la suspension mère et le moment où les dilutions étaient en contact avec le milieu de culture n'a pas dépassé 15 minutes dans tout les cas. Finalement, pour chacun des différents types d'aliments une analyse microbiologique spécifique a été envisagée.

Deux groupes de microorganismes ont été recherchés:

- les germes potentiellement pathogènes pour le consommateur: Les bactéries pathogènes (ou généralement pathogènes) recherchées à l'heure actuelle, sont essentiellement les salmonelles, les anaérobies sulfito- réducteurs à 46°C (pour *Clostridium Perfringens* A), les *Staphylococcus Aureus* et les brucelles (pour le lait et les produits laitiers). La recherche (plutôt le dénombrement) des *Staphylococcus Aureus* n'est réalisée que parce qu'on ne connaît pas de moyen simple et économique de mettre en évidence la présence de leur entérotoxine.

- les germes tests d'hygiène générale:

- Les germes capables d'altérer la qualité marchande de l'aliment: la recherche des bactéries pathogènes sont insuffisantes car elles ne renseignent pas sur l'éventuelle altération possible des aliments par d'autres bactéries présentes. Les difficultés techniques de la recherche des salmonella pourraient masquer, donc un résultat faussement négatif, le danger de l'aliment. Aussi un certain nombre de tests indicateurs de l'hygiène générale de l'aliment ont été inventés. Il s'agit habituellement du dénombrement de l'ensemble des micro-organismes aérobies cultivant à une

température donnée (appelée souvent flore totale). Ce dénombrement est appelé improprement flore totale car on ne peut pas dénombrer à la fois les aérobies stricts et les anaérobies stricts. Il peut également s'agir d'un dénombrement adapté aux caractères physico-chimiques du produit pour surveiller l'évolution de la flore conditionnant sa stabilité (levures, moisissures dans les produits acides) et /ou d'un dénombrement sélectif (bactéries anaérobies dans les conserves).

- les témoins de contamination fécale: l'analyse de la flore fécale permet de refléter premièrement la présence possible de bactéries pathogènes telles que les salmonelles, et deuxièmement que les aliments ne sont ni préparés ni conservés dans des conditions normales d'hygiène. Un bon germe de contamination fécale doit être spécifique du contenu intestinal, sensible (donc présents en grand nombre dans les matières fécales), résistant une fois sorti du milieu intestinal mais pas plus que les pathogènes qu'il accompagne, facile à mettre en évidence. Idéalement il ne devrait pas être capable de se multiplier dans le milieu extérieur: on a vu que cela n'est pas respecté dans les aliments. Aucune bactérie ne possède l'ensemble de ces propriétés. Toutefois deux catégories de bactéries sont utilisées dans ses tests: Les coliformes, les coliformes thermo tolérants et E.coli. Ces bactéries sont commensales de l'intestin et survivent en saprophytes à l'extérieur plus ou moins longtemps: E.Coli notamment ne survit que peu de temps à l'extérieur et sa présence traduit donc une contamination fécale récente. Il en est probablement de même pour les coliformes thermo tolérants.

a- Dénombrement de la flore totale (Afnor, NF 08-051, 1991)

*** But:** dénombrer la flore totale, c'est tenter de compter tout les microorganismes (bactéries, levures et moisissures se développant en aérobiose) présents, afin d'apprécier la pollution microbienne du produit et de prévoir son altération probable. Ce dénombrement se fait en général à 30°C.

***Principe:** cette méthode consiste à compter après étuvage à 30°C, en aérobiose, pendant 72h, le nombre de colonies obtenues dans un milieu de culture défini, coulé dans deux boîtes de pétri et ensemencé avec un volume connu (1ml en général) de l'échantillon pour essai (ou des dilutions) si le produit à examiner est liquide, ou avec un volume connu de la suspension mère (ou des dilutions) dans le cas de produits solide.

***Milieu de culture:** le milieu utilisé pour la culture et le dénombrement de la flore totale est la gélose pour dénombrement ou PCA (Scharlau Chemie SA, division of microbiology, Espagne) ayant la composition suivante: tryptone (5g); extrait de levure déshydraté (2.5g); glucose anhydre (1g); agar agar (12 à 18g); eau (1000ml). La préparation du milieu de culture a été réalisée par dissolution, sous l'action de la chaleur, du milieu complet déshydraté dans de l'eau. Le milieu dissout a été ensuite réparti dans des fioles dont la capacité ne dépassait pas 500 ml, à raison d'environ la moitié du volume dans la fiole, puis stérilisé à l'autoclave réglée à 121°C pendant 15 minutes. Si le milieu a été utilisé extemporanément, il a été refroidi au bain marie réglé à 45°C avant emploi. Dans le cas contraire, il a été fondu complètement puis refroidi au bain marie réglé à 45°C.

***Mode opératoire:** 1ml de l'échantillon s'il est liquide, ou 1 ml de la suspension mère dans les cas d'autres produits a été transféré dans deux boîtes de Pétri stériles. Cette étape a été refaite mais avec des dilutions décimales obtenues à partir de la suspension mère ou du produit lui-même. Dans chaque boîte de Pétri 15 ml de la gélose pour dénombrement à 45°C ont été coulés. L'inoculum a été soigneusement mélangé au milieu de culture qui a été laissé pour se solidifier en posant les boîtes de Pétri sur une surface horizontale. Après solidification complète, et uniquement dans le cas où l'on a suspecté que le produit à examiner contient des microorganismes dont les colonies envahissent la surface des milieux (cas des conserves par exemple), 4ml d'une gélose blanche ont été coulés à la surface du milieu ensemencé. Après solidification de la nouvelle couche, les boîtes ainsi préparées sont retournées et incubées à l'étuve réglée à 30°C pendant 72 heures. Une boîte de pétri contenant le milieu de culture non ensemencé est incubée à la même température et pendant la même durée pour contrôler sa stérilité. Après la période d'incubation spécifiée, les colonies pour chaque boîte contenant au plus 300 colonies ont été comptées et le nombre de microorganismes par ml ou par g de produits a été calculé.

***calcul:** le nombre de microorganismes présents dans l'échantillon est égal à:

$$N = \frac{C}{V(n_1 + 0.1 n_2)d}$$

Où C = somme des colonies sur toutes les boîtes comptées

d = dilution à partir de laquelle les premiers dénombrement ont été obtenus (ex: 10⁻²)

n₁ = nombre de boîte dans la première dilution comptée

n₂ = nombre de boîte dans la seconde dilution comptée

V = volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte

b- Dénombrement de Clostridium Perfringens et des Clostridium sulfito- réducteurs par comptage des colonies à 37 °C et 46 °C (Afnor NF 08-056, NF 08-061, 1994)

*** But:** ce test a pour but de rechercher et dénombrer Clostridium perfringens de type A, responsable d'intoxications alimentaires et les Clostridium sulfito-réducteurs (ou leurs spores), bactéries commensales de l'intestin ou saprophytes du sol, comme témoin de contamination fécale, éventuellement ancienne vu la résistance des spores à l'extérieur. Clostridium Perfringens fait partie des Clostridium sulfito-réducteurs. D'autre part, les Clostridium (ainsi que les Bacillus) thermophiles sont recherchés dans les conserves où ils peuvent facilement proliférer puisque leurs spores sont les seuls êtres vivants qui survivent après le chauffage qui assure de plus la fragilisation des enveloppes sporales nécessaire à la germination.

***Principe:** cette méthode consiste à compter après étuvage à 37°C ou 46°C, en anaérobiose, pendant 48-72h, le nombre de colonies obtenues dans un milieu de culture défini, coulé dans deux boîtes de pétri et ensemencé avec un volume connu (1ml en général) de l'échantillon pour essai (ou des dilutions) si le produit à examiner est liquide, ou avec un volume connu de la suspension mère (ou des dilutions) dans le cas de produits solides.

*** Milieu de culture:** plusieurs milieux de culture peuvent être utilisés pour réaliser la recherche et le dénombrement de *Clostridium Perfringens* et des *Clostridium* sulfito-réducteurs. Dans cette étude le milieu Tryptone Sulfite (TS) régénéré avec de la D-cyclosérine a été utilisé (Scharlau Chemie SA, division of microbiology, Espagne). Ce milieu est composé de: tryptone (20 g); citrate de fer III ammoniacal (1 g); Fer III (présence); $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (1g); cyclosérine (0.4g); agar agar (5g); eau (1000ml). La préparation du milieu de culture a été réalisée par dissolution, sous l'action de la chaleur, du milieu complet déshydraté dans de l'eau. Le milieu dissout a été ensuite réparti dans des fioles dont la capacité ne dépassait pas 500 ml ou dans des tubes, à raison d'environ la moitié du volume dans la fiole ou 20 ml par tube, puis stérilisé à l'autoclave réglée à 121°C pendant 15 minutes. Si le milieu a été utilisé extemporanément, il a été refroidi au bain marie réglé à 45°C avant emploi. Dans le cas contraire, il a été fondu complètement puis refroidi au bain marie réglé à 45°C. La D-cyclosérine a été dissoute dans de l'eau distillée, puis stérilisée par filtration. Le milieu complet est préparé en rajoutant 0,2 ml de solution stérilisée de D-cyclosérine au milieu désaéré (20ml).

***Mode opératoire:** 1ml de l'échantillon s'il est liquide, ou 1 ml de la suspension mère dans les cas d'autres produits a été transféré dans 3 tubes stériles. Cette étape a été refaite mais avec des dilutions décimales obtenues à partir de la suspension mère ou du produit lui-même. Dans chaque tube 20 ml de la gélose pour dénombrement à 45°C ont été coulés. L'inoculum a été soigneusement mélangé au milieu de culture sans faire des bulles puis il a été laissé se solidifier sous l'eau froide. Après solidification complète, les tubes sont incubés, en anaérobiose à l'étuve réglée à 46°C pour *Clostridium Perfringens* et à 37°C pour les *clostridium* sulfito-réducteurs, pendant 24 à 48 heures. Une boîte de pétri contenant le milieu de culture non ensemencé est incubée à la même température et pendant la même durée pour contrôler sa stérilité. Après la période d'incubation spécifiée, les colonies caractéristiques c.à.d les grosses colonies noires ont été comptées et le nombre de microorganismes par ml ou par g de produits a été calculé. A noter que dans le cas de dénombrement des spores de *C. sulfito-réducteurs* l'inoculum a été traité pendant 10 minutes à 80°C, et ceci pour éliminer toutes les formes végétatives.

***calcul:** le nombre des tubes positifs obtenus est noté pour chaque dilution, les trois dilutions donnant le nombre le plus représentatif sont sélectionnées. Le nombre choisi, a été déterminé, en se rapportant à une table nombre le plus probable (NPP). Celui-ci permet d'obtenir le nombre de microorganismes par ml ou par g en multipliant ce coefficient par l'inverse du taux de dilution correspondant à la dilution retenue la moins élevée.

$$Cs = N \frac{F}{V} Vs$$

Cs = la concentration la plus probable en microorganismes dans la quantité de référence Vs

N = indice NPP lu dans la table pour la dilution de base V

F = facteur de dilution correspondant à la dilution de l'échantillon considéré comme dilution de base (généralement F=10, 100....)

Vs = quantité de référence choisie pour exprimer la concentration en microorganismes

***identification:** l'identification du *C. perfringens* a été réalisée selon la démarche suivante: deux milieux sont ensemencés:

- milieu Nitrate Mobilité, gélose molle aux nitrates de lecture classique (Scharlau Chemie SA, division of microbiology, Espagne).
- milieu lactosé au rouge de phénol à la gélatine (Scharlau Chemie SA, division of microbiology, Espagne), où l'hydrolyse de la gélatine se fera par liquéfaction. Le refroidissement du milieu permettra de distinguer une liquéfaction à la chaleur d'une liquéfaction enzymatique.

C. perfringens est considéré comme confirmé avec les caractères d'immobilités, de réduction des nitrates en nitrites, de fermentation du lactose, et de la possession d'une gélatinase (en 48 heures).

c- Dénombrement de la flore fongique (Afnor, NF 08-059, 1987)

***But:** dénombrer la flore fongique c'est compter les champignons qui comprennent les levures et les moisissures afin de prévoir une possible altération du produit. Généralement ces champignons sont capables de se développer en milieu acide et au froid. Leur croissance est moins rapide que celle des bactéries.

***Principe:** cette méthode consiste à compter après étuvage à 25°C, en aérobiose, pendant 3-4-5 jours, le nombre de colonies obtenues dans un milieu de culture sélectif défini, coulé dans deux boîtes de pétri et ensemencé avec un volume connu (1ml en général) de l'échantillon pour essai (ou des dilutions) si le produit à examiner est liquide, ou avec un volume connu de la suspension mère (ou des dilutions) dans le cas de produits solides.

***Milieux de culture:** le milieu utilisé doit inhiber toutes les bactéries ceci en contenant des antibiotiques tels qu'une oxytétracycline ou du chloramphénicol. Généralement la composition du milieu yeast malt agar (Scharlau Chemie SA, division of microbiology, Espagne) utilisé est la suivante: extrait de levure (5 g); dextrose (20 g); chloramphénicol (0.1 g); agar-agar (12 à 15 g); eau distillée (1000ml); pH final 6.6. La préparation du milieu de culture a été réalisée par dissolution, en portant à ébullition, du milieu complet déshydraté dans de l'eau. Le milieu dissout a été ensuite réparti dans des fioles dont la capacité ne dépassait pas 500 ml, à raison d'environ la moitié du volume dans la fiole, puis stérilisé à l'autoclave réglée à 121°C pendant 15 minutes. Si le milieu a été utilisé extemporanément, il a été refroidi au bain marie réglé à 45°C avant emploi. Dans le cas contraire, il a été fondu complètement puis refroidi au bain marie réglé à 45°C. A noter que l'eau utilisée était une eau distillée ou déséionisée, exempte de toutes substances susceptibles d'inhiber la croissance des levures et des moisissures.

***Mode opératoire:** 1ml de l'échantillon s'il est liquide, ou 1 ml de la suspension mère dans le cas d'autres produits a été transféré dans deux boîtes de Pétri stériles. Cette étape a été refaite mais avec des dilutions décimales obtenues à partir de la suspension mère ou du produit lui-même. Dans chaque boîte de Pétri 15 ml de la gélose pour dénombrement à l'extrait de levure, au dextrose et au chloramphénicol refroidie à 45°C ont été coulés. L'inoculum a été soigneusement mélangé au milieu de culture qu'il a été laissé pour se solidifier en posant les boîtes de Pétri sur une surface fraîche et horizontale. Après solidification complète, 5ml d'une gélose blanche ont été coulés à la surface du milieu ensemencé. Après solidification de la nouvelle couche, les boîtes ainsi préparées ont été retournées et incubées à l'étuve réglée à 25°C pendant 3-4-5 jours. Une boîte de pétri contenant le milieu de culture non ensemencé est incubée à la même température et pendant la même durée pour contrôler sa stérilité. Après la période d'incubation spécifiée, les colonies pour chaque boîte contenant au plus 300 colonies ont été comptées et le nombre de microorganismes par ml ou par g de produits a été calculé.

***calcul:** le nombre de microorganismes présents dans l'échantillon est égal à:

$$N = \frac{C}{V (n_1 + 0.1 n_2) d}$$

Où C = somme des colonies sur toutes les boîtes comptées

d = dilution à partir de laquelle les premiers dénombrement ont été obtenus (ex: 10^{-2})

n_1 = nombre de boîte dans la première dilution comptée

n_2 = nombre de boîte dans seconde dilution comptée

V = volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte

d- Dénombrement d'Escherichia Coli et des coliformes totaux (Afnor, NF 08-050, 1999)

***But:** les techniques de colimétrie ont pour objectif le dénombrement et éventuellement l'identification des coliformes d'une manière générale, des coliformes thermo tolérants (ou coliformes fécaux) ou d'E.Coli en particulier. A l'heure actuelle, on tend à accorder une plus grande valeur aux coliformes thermo tolérants (ou coliformes fécaux fermentant le lactose (avec gaz) à la température de 44°C) qu'aux coliformes (entérobactéries fermentant le lactose (avec gaz) à 30°C) ou à E.Coli (coliforme fécal ou coliforme produisant de l'indole à 44°C).

***Principe:** cette méthode consiste à compter après étuvage à 30°C (pour le dénombrement des coliformes totaux) ou à 44°C (pour le dénombrement des coliformes thermo tolérants), en aérobiose, pendant 24h, le nombre de colonies obtenues dans un milieu de culture défini, coulé dans deux boîtes de pétri etensemencé avec un volume connu (1ml en général) de l'échantillon pour essai (ou des dilutions) si le produit à examiner est liquide, ou avec un volume connu de la suspension mère (ou des dilutions) dans le cas de produits solides.

***Milieu de culture:** le dénombrement des coliformes peut se faire, selon les produits, par des techniques en milieux liquides (bouillon lactose bilié au vert brillant +cloche BLBVB) ou solides (Gélose désoxycholate 0,1% ou gélose VRBL). Dans cette étude le dénombrement des coliformes est réalisé sur gélose désoxycholate 0,1% (Scharlau Chemie SA, division of microbiology, Espagne). Ce milieu est composé de: peptone pepsique de viande (7 g); extrait de levure (3g); sels biliaires (1,5g); lactose (10g); chlorure de sodium (5 g); rouge neutre (0,03g); cristal violet (0,002g); agar agar (12 à 18g); eau (1000ml). La préparation du milieu de culture a été réalisée par dissolution, en portant à ébullition, du milieu complet déshydraté dans de l'eau. Le milieu dissout a été ensuite réparti dans des fioles dont la capacité ne dépassait pas 500 ml, à raison d'environ la moitié du volume dans la fiole et a été utilisé extemporanément, sans stérilisation préalable à l'autoclave, le délai s'écoulant entre sa préparation et son utilisation ne dépassant pas 4 heures au maximum.

***Mode opératoire:** 1ml de l'échantillon s'il est liquide, ou 1 ml de la suspension mère dans les cas d'autres produits a été transféré dans deux boîtes de Pétri stériles. Cette étape a été refaite mais avec des dilutions décimales obtenues à partir de la suspension mère ou du produit lui-même. Dans chaque boîte de Pétri 15 ml de la gélose pour dénombrement au désoxycholate refroidie à 45°C ont été coulés. L'inoculum a été soigneusement mélangé au milieu de culture qui a été laissé pour se solidifier en posant les boîtes de Pétri sur une surface fraîche et horizontale. Après solidification complète, 5ml d'une gélose blanche ont été coulés à la surface du milieuensemencé. Après solidification de la nouvelle couche, les boîtes ainsi préparées sont retournées et incubées à l'étuve réglée à 30°C ou à 44°C pendant 24 heures. Après la période d'incubation spécifiée, les colonies caractéristiques (colonies violacées d'un diamètre supérieur ou égal à 0,5mm et parfois entourées d'une zone rougeâtre due à la précipitation de la bile) ont été comptées et le nombre de microorganismes par ml ou par g de

produits a été calculé. A noter qu'une boîte témoin avec environ 15 ml du milieu pour contrôler sa stérilité a été préparée et incubée à la même température pendant la même durée.

***calcul:** le nombre de microorganismes présents dans l'échantillon est égal à:

$$N = \frac{C}{V(n_1 + 0.1 n_2)d}$$

Où C = somme des colonies sur toutes les boîtes comptées

d = dilution à partir de laquelle les premiers dénombrement ont été obtenus (ex: 10^{-2})

n_1 = nombre de boîte dans la première dilution comptée

n_2 = nombre de boîte dans seconde dilution comptée

V = volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte

***identification:** l'identification des bactéries coliformes a été réalisé par l'usage des micro méthodes utilisant les galeries Api 20 E (Scharlau Chemie SA, division of microbiology, Espagne).

e- Dénombrement de Staphylococcus Aureus (Afnor, NF 08-057, 1994)

***But:** la recherche et le dénombrement des Staphylococcus Aureus, les seuls à produire éventuellement une entérotoxine protéique cause d'intoxications alimentaires, permet donc de savoir si l'aliment présente des risques pour le consommateur.

***Principe:** Cette méthode consiste à compter après étuvage à 37°C, en aérobiose, pendant 24h à 48h, le nombre de colonies obtenues dans un milieu de culture défini, coulé dans deux boîtes de pétri et ensemencé avec un volume connu (1ml en général) de l'échantillon pour essai (ou des dilutions) si le produit à examiner est liquide, ou avec un volume connu de la suspension mère (ou des dilutions) dans le cas de produits solides.

***Milieu de culture:** le dénombrement des Staphylococcus Aureus est réalisé sur gélose de Baird Parker solide (Scharlau Chemie SA, division of microbiology, Espagne). Ce milieu est composé de: peptone pepsique (10g); extrait de levure (1g); extrait de viande (5g); tellurite de potassium (0,1g); pyruvate de sodium (10g); glycolle (12g); LiCl (5g); K_2TeO_3 (0.1g); émulsion de jaune d'œuf (50ml); agar agar (20g); eau (1000ml). La préparation du milieu de culture a été réalisée par dissolution, en portant à ébullition, du milieu complet déshydraté dans de l'eau. Le tellurite de potassium et l'émulsion de jaune d'œuf sont apportés au moment de l'emploi sous forme de 1 ml de jaune d'œuf au tellurite (institut pasteur, France) pour 20 ml de ce milieu. Le milieu ainsi préparé a été ensuite réparti dans des fioles dont la capacité ne dépassait pas 500 ml, à raison d'environ la moitié du volume puis stérilisé à l'autoclave.

***Mode opératoire:** un enrichissement et une revivification ont été réalisés, lorsque nécessaire, par introduction de 1ml de l'échantillon s'il est liquide, ou 1 ml de la suspension mère dans les cas d'autres produits dans 9 ml de l'eau peptonnée et incubation à 30°C pendant 1 heure. 1ml de l'échantillon ainsi préparé a été transféré dans deux boîtes de Pétri stériles. Ces étapes ont été refaites mais avec des dilutions décimales obtenues à partir de la suspension mère ou du produit lui-même. Dans chaque boîte de Pétri 15 ml de la gélose Baird Parker refroidie à 45°C ont été coulés. L'inoculum a été soigneusement mélangé au milieu de culture qui a été laissé pour se solidifier en posant les boîtes de Pétri sur une surface fraîche et horizontale. Après solidification, les boîtes ainsi préparées sont retournées et incubées à l'étuve réglée à 37°C pendant 24 ou 48 heures. Une boîte de pétri contenant le milieu de culture non ensemencé a été préparée et incubée à la même température pendant la même

durée de temps pour contrôler sa stérilité. Après la période d'incubation spécifiée, les colonies caractéristiques (colonies noires, convexes, brillantes d'un diamètre compris entre 0,5mm et 2mm, avec un liseré blanc opaque, entouré d'une auréole claire) ont été comptées et le nombre de microorganismes par ml ou par g de produits a été calculé.

***calcul:** le nombre de microorganismes présents dans l'échantillon est égal à:

$$N = \frac{C}{V(n_1 + 0.1 n_2)d}$$

Où C = somme des colonies sur toutes les boîtes comptées

d = dilution à partir de laquelle les premiers dénombrement ont été obtenus (ex: 10^{-2})

n_1 = nombre de boîte dans la première dilution comptée

n_2 = nombre de boîte dans seconde dilution comptée

V = volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte

***identification:** les *Staphylococcus Aureus* ont été identifiés par le AVIPATH-STAH Test (Scharlau Chemie SA, division of microbiology, Espagne). Le principe de ce test consiste à mettre en évidence la coagulase et la protéine A des *Staphylococcus Aureus* par agglutination au latex sur lequel sont fixés du fibrinogène humain et de l'immunoglobuline G. Pour ce faire, 2 à 4 colonies suspectes ont été prélevées à l'aide d'une anse stérile et émulsionnées dans la solution saline sur la lame du test. Après agitation du réactif latex, une goutte de ce dernier est déposée sur la lame, puis mélangée pendant 1 minute. Le résultat est considéré d'être positif si une agglutination de la suspension préparée, a été notée après examen à l'œil nu sous une forte lumière.

f- Recherche de brucella (OIE, 2000)

***But:** les brucellas sont des coccobacilles gram négatif, aérobies stricts, de culture délicate, provoquant des avortements chez les ovins, caprins et bovins. Ces bactéries sont transmissibles à l'homme (fièvre de Malte ou brucellose) et la maladie, lorsqu'elle se déclare, peut devenir chronique après une phase aiguë et n'est pas facile à guérir.

La contamination de l'homme peut être directe à partir de l'animal (éleveurs, vétérinaires..) ou indirecte par la consommation des produits laitiers contaminés. La recherche de *Brucella* dans les produits laitiers permet d'éviter l'atteinte des consommateurs.

***Principe:** il s'agit de la recherche des anti-corps anti-brucella dans le produit laitier examiné. En effet, l'animal excrète dans le lait des anticorps que l'on peut mettre en évidence. La réaction met en jeu un test de l'anneau entre un antigène coloré (suspension de *Brucella* tuée et colorée) et des anticorps présents dans le produit laitier examiné.

***Mode opératoire:** 1ml de lait ou 1ml de la suspension mère (pour les produits laitiers) est mélangé avec une goutte d'antigène coloré dans un tube à hémolyse puis incubé à 37°C pendant une heure.

***Expression des résultats:** La réaction est dite positive s'il y a formation d'un anneau de crème colorée à la surface et le lait/suspension mère sous jacent est blanc. Cet anneau est dû à la remontée de la crème qui a entraîné les agglutinants colorés. Elle est négative si l'anneau est blanc et le lait/suspension mère sous jacent est coloré.

2- Deuxième étape: enquête de consommation alimentaire

Pour pouvoir réaliser des évaluations des expositions aux substances sélectionnées, il a été indispensable d'utiliser des données de consommation alimentaire. L'objectif de cette étape a consisté donc à établir à partir d'enquête de consommation alimentaire, de préférence individuelle, des données de consommation alimentaire qui soient représentatives de la diète alimentaire des sous-groupes étudiés.

Deux sous-groupes d'intérêt de la population libanaise ont été enquêtés: les enfants appartenant à la tranche d'âge 9-14 ans et les adolescents appartenant à la tranche d'âge 15-18 ans. En effet, ces deux sous-groupes ont été sélectionnés car ils sont susceptibles de représenter des «groupes à risque» vis-à-vis des additifs alimentaires et des mycotoxines du fait qu'ils ont une consommation alimentaire par kilogramme de poids corporel supérieure à celle de l'adulte (Kroes et al., 2002; Leclercq et al., 2000 (b)) d'une part et d'autre part de la faible diversité de leur alimentation qui conduit à une consommation supérieure à celle de l'adulte de certains produits alimentaires (WHO, 1997 (a)).

La méthodologie de l'enquête de consommation alimentaire a été basée sur un questionnaire de rappel de 24 heures et un questionnaire de fréquence alimentaire. En fait l'association de ces deux types de questionnaires est particulièrement recommandée pour l'évaluation du risque lié à certains produits chimiques car elle permet d'améliorer la précision des données de consommation d'une part (donc réduire les incertitudes) et d'autre part de faciliter leur interprétation (WHO, 1997).

L'enquête de consommation alimentaire s'est déroulée dans des écoles situées dans la région de Beyrouth entre septembre 2002 et avril 2003. Le choix de la région de Beyrouth était motivé non seulement par des raisons de praticabilité mais également par des raisons techniques: importance de la taille de cette ville (57% de la population libanaise vit à Beyrouth (ministère de l'éducation, 1996), consommation des céréales et des produits céréaliers similaires aux autres grandes villes et aux régions périphériques (Baba, 1998), et présence d'une probabilité supérieure de consommation de produits issus des industries agro alimentaires à Beyrouth que dans les autres régions périphériques où une alimentation traditionnelle est toujours prépondérante.

2.1- Sujets

L'enquête a été réalisée auprès de 285 élèves ayant un âge compris entre 9 et 18 ans. L'échantillon a été constitué, au départ, de 150 enfants (9 à 14 ans) et de 135 adolescents (14 à 18 ans). Ils ont été choisis aléatoirement dans deux écoles publiques et dans deux écoles privées situées dans la région de Beyrouth. Les critères d'inclusion des sujets dans l'enquête étaient l'âge, le remplissage correct et complet de trois questionnaires alimentaires et l'absence de toute condition pouvant affecter leur consommation alimentaire habituelle de point de vue qualité et quantité (maladie, jeun, fête d'anniversaire,...).

Une représentativité nationale satisfaisante de l'échantillon était assurée par stratification (taille de la ville, région d'habitation...) et par l'application de la méthode de quotas (âge, sexe et taille du ménage). Afin d'éviter de biaiser les résultats, l'objectif de cette enquête n'a pas été révélé aux étudiants.

2.2- Questionnaires

Chacun des sujets sélectionnés était porté à remplir trois types de questionnaires (annexe 1) : un questionnaire alimentaire générale, un rappel de consommation alimentaire de 24 heures et un questionnaire de fréquence alimentaire.

Ces questionnaires ont été remplis par les élèves selon un protocole d'entretien standardisé en présence d'une assistance professionnelle. Lorsque les sujets n'arrivaient pas à rapporter l'information exacte (pour les enfants surtout) l'intervention des parents était alors nécessaire. D'une façon générale les parents ont été contactés par téléphone pour compléter l'information manquante. Les dates des entretiens étaient choisies de façon à ce que tous les jours de la semaine soient également représentés.

Des tasses en plastique, des cuillères de mesure, des assiettes, des aliments modèles et des récipients pour boissons ont été utilisés pour faciliter l'estimation de la taille des portions des aliments consommés par les élèves. De plus, un cahier de photos des portions alimentaires pour plus qu'une centaine d'aliments qui a été spécialement développé pour cette enquête, a été également utilisé. Des incitations de mémoire (comme par exemple les activités) ont été utilisés au cours de l'administration de ces questionnaires. Les élèves ont été encouragés pour inclure le plus de détail possible sur les aliments consommés tels que leur mode de préparation, leur marque commerciale....

A la fin, les questionnaires ont été vérifiés pour voir s'ils ont été remplis d'une façon exacte et complète.

2.2.1- Elaboration des portions alimentaires et du cahier des photos

Le laboratoire de nutrition de l'Université Saint Joseph a été retenu pour réaliser ce travail. Les aliments traditionnels et les aliments consommés après une préparation préalable (tel que cuisson par exemple) ont été cuisinés selon les recettes présentées dans le « food composition table for use in the middle east » (Pellet PL. et Shadarevian S., 1983). Ces aliments ont été ensuite répartis sur un nombre approprié de plats. On obtenait ainsi la portion moyenne pour chacun des aliments préparés. Le poids réel de la portion moyenne, exprimé en gramme, a été mesuré et enregistré. Des photos de cette portion ont été alors prises. De plus, le poids standard des aliments consommés tels que achetés a été rapporté et considéré de correspondre au poids de la portion moyenne. De plus des photos de ces aliments ont été prises pour les inclure dans le cahier de photos. La mesure des poids moyens des fruits et des légumes a été également effectuée et des photos de ceux-ci ont été prises. Finalement les poids et les photos des petites et des grandes portions ont été obtenus pour tous les aliments en assumant que la petite portion corresponde à la moitié de la moyenne portion et que la grande portion corresponde au double de celle-ci.

2.2.2- Questionnaire alimentaire général

Ce questionnaire avait pour objectif de rassembler, pour chaque participant, une information générale sur son statut sociale, son statut sanitaire (présence d'une maladie, d'un traitement médical...) et ses habitudes alimentaires (les préférences alimentaires, la consommation d'eau, la consommation de suppléments diététiques...). Une mesure et un enregistrement de la taille et du poids des participants étaient aussi inclus dans ce questionnaire.

Ce questionnaire a servi en tant qu'outil de présélection: les sujets qui suivaient une diète spéciale étaient exclus de l'enquête. De plus, puisque cette enquête est basée sur un rappel de consommation des dernières 24 heures, les participants qui avaient une consommation alimentaire non habituelle (jeun, fête d'anniversaire...) au cours du jour précédant l'administration des questionnaires étaient aussi exclus de l'enquête.

2.2.3- Questionnaire de rappel de la consommation alimentaire

Ce questionnaire était composé de questions ouvertes. Il avait comme objectif de rassembler pour chaque participant une information sur tout ce qu'il a consommé (aliments et boissons) durant les 24 heures précédant l'administration du questionnaire.

2.2.4- Questionnaire de fréquence alimentaire

Un questionnaire de fréquence a été spécialement développé pour cette enquête pour inclure une liste de 107 aliments y compris les aliments libanais traditionnels. Ces aliments ont été groupés en 13 catégories: céréales et pains, légumes secs, légumes, fruits et jus de fruits, viandes, poissons, lait et produits laitiers, matières grasses ajoutées, boissons à l'exclusion de l'eau, fruits secs, sucreries, snacks et plats composés. Le questionnaire ainsi conçu avait pour objectif de rassembler une information sur la quantité consommée et sur la fréquence de consommation des différents aliments de la liste durant une période de temps spécifique (dans ce cas durant l'année précédente). La quantité d'aliment consommé était rapportée sous forme de petite, moyenne ou large portion. Le poids des portions des aliments de la liste, exprimé en gramme, a été déterminé au préalable dans les laboratoires de nutrition de l'Université Saint Joseph tel que décrit ci-dessus.

Le format de réponse pour la fréquence de consommation allait de «jamais ou moins qu'une fois par mois» à «une ou plusieurs fois par jour». Finalement une version préliminaire de ce questionnaire a été testée sur une trentaine de personne pour vérifier sa clarté et la facilité de son administration.

2.3- Traitement des questionnaires

Le traitement des questionnaires de fréquence et ceux de rappel sur 24 heures a été réalisé par les programmes excel et access du « microsoft office 2003».

Les questionnaires de rappel de 24 heures obtenus ont été utilisés pour la dérivation des données de consommations alimentaires individuelles.

Le questionnaire de fréquence a été analysé pour identifier parmi les catégories d'aliments celles qui sont régulièrement consommées, et pour dériver le pourcentage de consommateurs réguliers pour chacune de ces catégories. Le pourcentage de consommateur régulier d'une catégorie alimentaire est définie comme étant le pourcentage de sujets consommant un aliment de cette catégorie au moins une fois par jour.

Afin d'obtenir des données détaillées de la consommation alimentaire, le poids de chaque aliment composé consommé était transformé en poids de ses composants simples en utilisant les descriptions soit du «répertoire général des aliments» soit du «food composition table for use in the middle east» (Pellet PL. et Shadarevian S., 1983).

2.3.1- Première étape: Consommation énergétique

Les questionnaires de rappels de 24 heures obtenus des 285 participants ont été, dans un premier temps, analysées pour estimer la quantité d'énergie consommée par participant. Cette information était utile pour exclure, des calculs ci – après, les sujets «sous-évaluants» et par la suite écarter le biais lié à la sous-estimation des consommations alimentaires par certains enquêtés.

- pour le groupe d'adolescents (n=135) les individus sous évaluant sont ceux qui ont un rapport entre l'énergie consommée et le métabolisme de base calculé inférieur à un certain seuil (Goldberg et al., 1991).
- pour le groupe d'enfants (n=150), on ne dispose d'aucune formule standard permettant d'isoler les individus sous-évaluant (INRA, 2004). Dans ce cas, cette information n'a pas été utilisée pour redresser l'échantillon des enfants mais elle a été utile pour identifier les sujets qui présentaient d'erreurs éventuelles dans le remplissage du questionnaire (apports énergétiques trop faible, information manquante).

2.3.2- Seconde étape: données de consommation alimentaire

Après l'élimination des sous-évaluants, les questionnaires de rappel de 24 heures ont été traités, dans un second temps, pour estimer la consommation des différents aliments et par la suite des différentes catégories alimentaires pour chacun des participants. Les consommations alimentaires de chaque catégorie à la moyenne, à la médiane, au 75^{ème} percentile, au 90^{ème} percentile et au 95^{ème} percentile de la distribution étaient alors dérivées pour les deux groupes de population étudiés. Le pourcentage des consommateurs était ensuite calculé pour chacune des catégories alimentaires. Dans ce cas un consommateur est défini comme étant un sujet qui a consommé l'aliment considéré durant les 24 heures précédents l'administration du questionnaire. Après l'élimination des non consommateurs, la consommation des différentes catégories alimentaires au 95^{ème} percentile de la distribution a été alors calculée pour le groupe de consommateurs.

3- Troisième étape: Evaluation préliminaire des expositions alimentaires à certains additifs alimentaires (benzoates, sulfites, BHA et BHT): Estimation de la consommation théorique maximale d'additifs alimentaires

Dans cette première étape d'évaluation des expositions aux additifs alimentaires sélectionnés, des consommations théoriques maximales (CTM) ont été calculées pour les additifs alimentaires. Ceci a été réalisé en sommant pour chaque participant, les apports de toutes les sources alimentaires issus du croisement des données de consommations alimentaires détaillées provenant de l'enquête de consommation avec successivement les taux maximaux d'utilisation autorisés (TMA -exprimés en mg par kg d'aliment frais) tels qu'ils sont indiqués dans deux différentes directives: le Draft General Standard for Food Additive (DGSFA) et les normes nationales (qui sont celles de la Directive de l'Union Européenne (DUE)). Le choix de ces deux limites maximales a été motivé par la possibilité d'encadrer la valeur de la CTM par un niveau bas correspondant à l'usage des limites nationales (Normes nationales (NN) qui sont celles de la DUE), et un niveau haut correspondant à l'usage des limites du DGSFA puisqu'il était impossible de prévoir les pratiques des industriels de point de vue usage des additifs alimentaires suite à l'absence des plans de contrôle et de surveillance nationaux. Dans les deux cas le système de catégorisation alimentaire du Codex Alimentarius a été utilisé pour attribuer les TMA aux différents aliments consommés. De plus toutes les graisses d'origine inconnu, présentes dans les aliments composés ont été assumées de contenir le BHA et le BHT à leurs TMA.

Deux consommations théoriques maximales (exprimées en mg) de chacun des additifs alimentaires étudiés ont été ainsi obtenues pour chaque participant: la première issue de l'usage des limites du DGSFA, la seconde issue de l'usage des limites du DEU. Ces valeurs ont été alors divisées par le poids réel de l'individu pour qu'elles soient exprimées en mg/kg de poids corporel (p.c.)/jour. Les élèves non consommateurs d'additifs alimentaires (qui avaient une exposition alimentaire totale égale à 0 mg/kg p.c./j) ont été ensuite identifiés et éliminés pour obtenir le groupe des consommateurs pour chacun des additifs alimentaires étudiés. La moyenne et le 95^{ème} percentile des consommations théoriques maximales ont été alors dérivés pour ce groupe. Les rapports de la CTM sur la DJA ont été calculés pour le niveau moyen et le 95^{ème} percentile de la distribution de l'exposition. Ce calcul a été indispensable pour identifier, parmi les additifs alimentaires étudiés, ceux qui nécessitent un raffinement des résultats de l'exposition alimentaire.

Finalement, les consommations théoriques maximales (au niveau moyen et au 95^{ème} percentile de la distribution) ont été analysées en fonction de leurs sources alimentaires. La ou les catégories d'aliments majoritairement contributrices à l'exposition de ces additifs suivant les recommandations méthodologiques de fixation de normes alimentaires du comité du Codex Alimentarius (CCFAC), ont été identifiés et rapportés.

4- quatrième étape: données analytiques pour les additifs alimentaires et les mycotoxines

4.1- les additifs alimentaires

4.1.1- Etablissement de la liste d'aliments à échantillonner

Le premier objectif de ce volet était d'établir la liste de produits «tels que consommés» à échantillonner qui soit représentative de la diète alimentaire des sujets enquêtés. Le choix des aliments de la liste est basé sur les résultats de l'enquête alimentaire (rappel de 24 heures) et prend en compte les aliments qui se sont avérés d'être des contributeurs potentiels des expositions aux additifs alimentaires au cours de l'étape précédente. Une liste préliminaire d'aliments a été alors établie. De cette liste, seuls sont retenus pour analyse, les aliments qui sont disponibles sur le marché libanais et qui par analyse des législations, études des ingrédients alimentaires et des labels, se sont avérés susceptibles de contenir les additifs alimentaires étudiés. On a ainsi obtenu la liste finale des aliments à échantillonner pour analyse.

4.1.2- Echantillonnage et préparation des aliments «tels que consommés»

La préparation des échantillons tels que consommés et leur analyse ont été réalisées dans les laboratoires de L'Institut de Recherche Agronomique Libanais (IRAL).

Deux vagues d'achats des aliments de la liste ont été programmées pour prendre en compte les variations des concentrations en additifs liés aux conditions climatiques et/ou pratiques des industriels. La première vague couvre les saisons printemps/été 2004 et la seconde couvre les saisons automne/hiver 2004/2005.

Tous les aliments achetés sont des aliments dits nationaux, car se sont des produits alimentaires transformés et commercialisés par un nombre restreint d'industriels. D'une façon générale ces aliments sont susceptibles de présenter des niveaux de contamination homogènes en regard des modes de production et/ou de transformation. Ces aliments ont été par conséquent, achetés dans une seule région. La région choisie était Beyrouth (capital du Liban).

La représentativité de l'échantillonnage a été réalisée en prenant en compte les modes d'achats et d'approvisionnement des consommateurs issus des statistiques de la chambre de commerce et de l'industrie libanaise. Les informations obtenues portent sur les principaux lieux d'approvisionnements (hypermarché, supermarché....) et les principales marques qui couvrent 75% du marché libanais.

L'approche qui a été adoptée pour la préparation des échantillons pour analyse est celle qui est utilisée dans les études de l'alimentation totale (TDS). Cette approche consiste à préparer un échantillon composite pour chacun des aliments de la liste à partir de cinq sous échantillons au maximum, pondérés en fonction de la marque achetée et du lieu d'approvisionnement majoritaire pratiqué par les consommateurs. Prenons l'exemple de l'échantillon des jus de fruits où quatre marques majoritaires se partagent le marché (X, Y, Z et V, % Partition du Marché (PDM)). Il s'agit des différents types de jus d'orange (Tab.10). Pour ce type de produit, les lieux majeurs d'approvisionnement sont les hypermarchés (50%) et les supermarchés (30%).

Tableau 10. Exemple de représentativité de l'échantillonnage.

Produit TDS ^a	Aliment	Produit commercial	% PDM ^b	Nombre d'unités achetées et mélangées dans l'échantillon final pondéré
Jus d'orange	A	Jus d'orange sans sucre ajouté marque X	40	2
Jus d'orange	B	Jus d'orange sans sucre ajouté marque Y	33	1,5
Jus d'orange	C	Jus d'orange à base de concentré marque Z	20	1
Jus d'orange	D	Jus d'orange à base de concentré marque W	7	0,5

^aTDS: Total Diet Study.

^b%PDM: pourcentage de partition de marché.

Les aliments ont été cuisinés «tels que consommés» selon les recettes de la cuisine traditionnelle libanaise quand nécessaire, mélangés, broyés et mixés de façon à obtenir au final, un seul échantillon composite homogène de l'aliment par saison. Dans tout les cas, les échantillons n'ayant pas été achetés à la même saison ont été traités d'une façon séparée.

L'utilisation de récipient intermédiaire, tout comme l'utilisation d'ustensiles de cuisine en aluminium, en céramique lors de préparation ou du transfert des aliments préparés «tels que consommés» ou tout autre matériel d'emballage a été proscrit. Le matériel en acier inoxydable considéré comme approprié a été utilisé lors de la préparation des aliments.

Conformément aux bonnes pratiques de laboratoires, le matériel utilisé pour la préparation et le broyage des échantillons composites a été correctement lavé entre chaque préparation afin d'éviter d'éventuelles contaminations croisées. Par ailleurs suivant les recommandations internationales OMS/GEMS food (WHO, 1988), les aliments ont été préparés quand cela était nécessaire par l'eau potable de la région de Beyrouth où les aliments ont été achetés.

L'ensemble de l'échantillonnage a porté le nombre d'échantillons composites à un total de 421 échantillons composites préparés pour l'étude et stockés à -20 °C dans des contenants appropriés de 100 ml jusqu'à leur analyse.

4.1.3- Analyse des échantillons

L'analyse pour la recherche et la quantification des benzoates, sulfites, BHA et BHT a porté sur l'ensemble des aliments de la liste principale. Ces analyses ont été réalisées par des méthodes validées, au département d'analyse des additifs de l'IRAL qui est le laboratoire agronomique national. Les échantillons alimentaires n'étaient pas ouverts que lorsqu'ils ont atteint la température ambiante et ils étaient analysés le jour de leur ouverture. Les échantillons ont été homogénéisés avant le prélèvement de la prise d'essai. Deux dosages (deux essais) ont été effectués par échantillon alimentaire. Une détermination des rendements d'extraction a été réalisée pour chaque méthode en fonction de différents types de matrices alimentaires. Des standards de concentrations différentes (étalons) qui ont été utilisés pour calibrer l'appareillage, ont été préparés le jour même du dosage.

- acide benzoïque/benzoates:

Le dosage des acide benzoïque/ benzoates a été réalisé par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (IRAL, 1998).

→**Principe:** cette méthode qui a été développée et validée par Hild et Gertz en 1985 (IRAL, 1998) consiste à doser l'acide benzoïque/ benzoates, présents dans les différents produits alimentaires solides ou liquides, par HPLC après leur extraction avec de la soude et purification avec une solution d'hexacyanoferrate et une solution d'acétate de zinc.

→**Mode opératoire:**

- aliments liquides: la prise d'essai (2 à 7g ; en moyenne 5g) de l'échantillon homogénéisé ou moulinée a été introduite dans une fiole jaugée (100ml). A cette prise d'essai, 25ml de soude (NaOH) 0.1N ont été ajoutés. Les produits liquides sont dégazés par ultrasons pendant 15 minutes et les produits semi solides et solides sont introduits au bain marie à 70°C pour 15 minutes. Le pH a été ensuite ajusté à 8 à l'aide d'une solution Normale d'acide sulfurique (H₂SO₄). Puis sous agitation vive, 2ml d'une solution d'hexacyanoferrate et 2ml d'une solution d'acétate de zinc ont été ajoutés successivement. Après être mise au repos pour 15 minutes, la solution a été volumée à 100ml avec de l'eau distillée puis filtrée successivement sur papier filtre puis sur filtre Santorius (0.45microns) avant leur injection.

→**Conditions chromatographiques:**

Colonne: RP-18, 5µm

Phase mobile: 10ml de méthanol (Fluka Chimica, Suisse) ajoutés à 90 volumes de tampon phosphate.

Détecteur: Ultraviolet à 227 nm

Boucle d'injection: 20µl

Débit de la phase: 0,7ml/min

Temps d'un cycle: 12 minutes

Temps de rétention des benzoates sous ces conditions: 7 minutes

Température de fonctionnement: température ambiante

Détection: 235 nm

→Réactifs:

Tampon phosphate: cette solution est préparée par dissolution de 25 gramme de (KH_2PO_4) (Merck NJ, états Unis) dans de l'eau distillée q.s.p 1 litre.

Solution d'hexacyanoferrate de potassium: cette solution est préparée par dissolution de 106 gramme de ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6, 3\text{H}_2\text{O}$) (Merck NJ, états Unis) dans de l'eau distillée q.s.p 1 litre.

Solution d'acétate de zinc: cette solution est préparée par dissolution de 219 grammes d'acétate de zinc bi hydraté ($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn}, 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck NJ, états Unis) et 32ml d'acide acétique (CH_3COOH) (Chromanorm- prolabo, France) dans de l'eau distillée q.s.p 1 litre.

NaOH: 0,1N (Acros, états Unis).

H_2SO_4 : 1N (BDH, Royaume Uni).

→**Equipement:** l'instrumentation HPLC a consisté en une Perkin Elmer binary LC pump 250 (Norwalk, USA), un autosamplieur modèle 738 de ICS (Instrumentation Consommable Service, France), un intégrateur Shimadzu CR8A chromatopac et un détecteur diode array modèle 235C de Perkin Elmer et une colonne RP18 5 μm Econisil (150*4.6mm). La mesure de l'aire et de la hauteur du pic a été réalisée par le système a1020 LC plus PE Nelson software analysis de ICS.

→Etalons:

Trois solutions étalons A, B et C ayant respectivement des concentrations de 5, 7,5 (solution standard) et 10 mg/l ont été utilisés pour calibrer l'appareil. Elles ont été préparées en diluant dans de l'eau distillée, une solution mère d'acide benzoïque à 200 mg/l obtenu par dissolution de 20 mg de l'acide benzoïque (BDH, Royaume Uni) dans 100 ml de l'eau distillée.

→Calculs:

Le calcul de la concentration de la solution en benzoates a été réalisé comme suit :

$$\text{Acide benzoïque/ benzoates, mg/l} = (R/R') \times (C_s/W_x) \times D$$

Où R et R'=hauteurs des pics des échantillons et des standards, respectivement;
 C_s =concentration du standard en g/ml; W_x =poids de l'échantillon dans 10 ml d'extrait final (en g/ml); et D=le facteur de dilution si la solution injectée est diluée.

Le calcul du contenu de l'aliment en additif a été réalisé comme suit:

$$\text{Contenu en acide benzoïque en mg/kg} = \frac{\text{concentration de la solution(g/l)} \times \text{volume final(en ml)}}{\text{Masse de la prise d'essai (g)}}$$

- les sulfites:

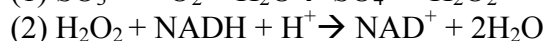
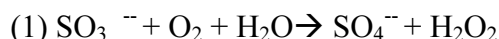
Le dosage des sulfites a été réalisé par une méthode colorimétrique.

→**Principe:** cette méthode qui a été développée et validée par Beutler en 1984 (Biopharm, 1998) consiste à doser les sulfites dans différents produits alimentaires selon le principe suivant:

En présence d'oxygène, le sulfite est oxydé par la sulfite oxydase (SO₂-OD) en sulfate (1).

Le peroxyde d'hydrogène formé dans la réaction est réduit à son tour par l'enzyme NADH-péroxydase (NADH-POD) en présence de nicotinamide- adénine-dinucléotide réduit (NADH) (2).

La quantité de NADH consommée dans la réaction 2 est proportionnelle à la quantité de sulfites totaux (libres ou chimiquement liés). Le NADH est déterminé par son absorbance à 340nm (Biopharm, 1998).



→**Mode opératoire:**

*Préparation de l'échantillon:

- Aliments liquides (jus de fruits): les jus de fruits troubles ont été centrifugés (environ 4000 tours/minute). 2ml du surnageant ont été prélevés puis amenés à un pH de 7,5 -8 avec une solution d'hydroxyde de sodium (2mol/l). Le volume de NaOH ajouté a été mesuré afin d'en tenir compte dans le calcul. Après addition de 0,1g de polyvinylpyrrolidone (PVPP) (pour les jus fortement colorés) les échantillons sont agités pendant une minute puis filtrés. La solution claire ainsi obtenue a été utilisée pour l'essai.

- Aliments semi solides et solides (confitures, aliments à base de pomme de terre...):

Les échantillons d'aliments semi solides ou solides ont été émincés à l'aide d'un mixer et homogénéisés. 5g de l'échantillon homogénéisé ont été pesés dans une fiole jaugée (50 ou 100ml). 40ml (ou 80ml) d'eau bi distillée y ont été alors introduits. Les fioles ont été bouchées et maintenues à 60 - 65°C pendant 5 minutes sous agitation. L'échantillon a été ensuite ramené à la température ambiante. Le volume a été alors ajusté à la marque avec de l'eau bi distillée. Finalement l'échantillon a été mélangé puis filtré et/ou centrifugé pour obtenir une solution claire utilisée pour l'essai.

***Préparation de l'essai:**

L'eau bi distillée a été uniquement utilisée pour la préparation des essais. L'essai et le témoin ont été préparés comme suit:

Introduire dans les cuves	Témoin	Essai
Mélange réactionnel	1,00ml	1,00ml
Solution échantillon	---	0,10ml -> 2ml
Eau bi distillée	2,00ml	1,90ml -> 0,00ml
Suspension de NADH-POD	0,01ml	0,01ml

Mélanger, lire les absorbances au bout de 5 minutes (A_1)

Déclencher la réaction en ajoutant :

Suspension de SO_2 -OD	0,05ml	0,05ml
---------------------------------	--------	--------

On mélange, puis on attend la fin de la réaction, environ 30 minutes. Les absorbances des solutions (A_2) sont lues. Si la réaction n'est pas terminée au bout de 30 minutes, on a continué à lire les absorbances toutes les 2 minutes, jusqu'à ce que l'absorbance soit constante sur 2 minutes.

Si les différences d'absorbance observées (ΔA) pour l'échantillon sont supérieures à 0,960, une dilution de l'échantillon a été alors nécessaire.

→ Conditions spectrophotométriques :

Longueur d'onde: 340nm

Cuve de verre: 1 cm d'épaisseur

Température: 20 à 25°C

Volume du test: 3,06ml

Solution d'essai: 3-30 μg de sulfite/cuve (en tant que SO_2 , avec 0,1ml-2ml de volume d'échantillon).

→ Réactifs :

Solution tampon de triéthanolamine à pH = 8 (R-biopharm, Allemagne).

Comprimés de NADH dosés à 0.4 mg (R-biopharm, Allemagne).

Suspension enzymatique de NADH-POD dosée à 3 U (R-biopharm, Allemagne).

Suspension enzymatique de SO_2 -OD dosée à 4 U (R-biopharm, Allemagne).

Mélange réactionnel: un comprimé de NADH est mélangé à un millilitre de la solution tampon de triéthanolamine.

Solution d'hydroxyde de sodium (2mol/l) (Acros, états Unis).

Polyvinylpyrrolidone (Merck NJ, états Unis).

→ Etalons:

Une solution standard a été préparée en mélangeant 45 mg de disulfite de sodium (contenant 67,4% de SO_2) (BDH, Royaume Uni) avec de l'eau bi distillée q.s.p 100ml (correspondant à 0,3g sulfite/l). Cette solution standard est préparée juste avant la mesure. Elle est utilisée pour contrôler la technique.

→Calculs:

Le calcul de la concentration de la solution en sulfites a été réalisé en utilisant la formule suivante:

$$C_{\text{Sulfites}} (\text{g/l}) = \frac{V \times PM}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A$$

Où;

V= volume final (ml)

v = volume de l'échantillon

PM = poids moléculaire de la substance à doser

d = épaisseur de la cuve (cm)

ϵ = coefficient d'absorption du NADH (6,3 (l. mmole⁻¹. cm⁻¹))

On obtient ainsi pour le sulfite (en tant que SO₂)

$$C_{\text{Sulfites}} (\text{g/l}) = \frac{3,06 \times 64,06}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A = 1,960 \times \frac{\Delta A}{\epsilon \times d \times v} \text{ g SO}_2 / \text{l échantillon}$$

Si l'échantillon a été dilué au cours de sa préparation, le résultat est multiplié par le facteur de dilution.

Le calcul du contenu de l'aliment en additif a été réalisé par application de la formule suivante:

$$\text{Contenu en sulfites en g/kg} = \frac{\text{concentration de la solution (g/l)} \times \text{volume final (en ml)}}{\text{Masse de la prise d'essai (g)}}$$

- Butylhydroxyanisol (BHA) et Butylhydroxytoluène (BHT):

Le dosage du BHA et du BHT a été réalisé simultanément par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (AOAC, 1992).

→**Principe:** cette méthode consiste à doser par HPLC le BHA et le BHT, présents dans les différents les aliments selon la méthode qui a été développée et validée par Page et Charbonneau en 1984 (Pilsbacher et Dekker, 1992, AOAC, 1992), après leur dissolution dans l'hexane et leur extraction par une solution d'acétonitrile.

→**Mode opératoire:** la prise d'essai (10g pour les aliments solides et 20g pour les huiles) de l'échantillon mouliné a été introduite dans un entonnoir de séparation (250ml). Cette prise d'essai a été homogénéisée avec 25ml d'hexane saturé et puis avec 75ml (50 ml pour les huiles) d'acétonitrile saturé. L'hexane et l'acétonitrile ont été ensuite décantés, filtrés et séparés; L'hexane a été extrait de nouveau avec 2 portions supplémentaires d'acétonitrile en répétant à chaque fois l'opération décrite précédemment. Les extraits combinés d'acétonitrile ont été concentrés à 3-4ml puis dilués jusqu'à 10ml avec de l'acétonitrile avant d'être analysés. Les antioxydants présents dans les gommages à mâcher ont été extraits premièrement par l'hexane saturé puis dans une solution de diméthyle sulfoxyde. L'extrait résultant est acidifié avec de l'acide chlorhydrique normal avant d'être analysé.

→Conditions chromatographiques :

Colonne: RP-18, 5 μ m

Phase mobile: A: eau/acide acétique (1,000:20 v/v)

B: acétonitrile/acide acétique (1,000:20 v/v)

Gradient : 5-10 minutes 10% B dans A à 85% B linéaire.
Détecteur: Ultraviolet à 280nm
Boucle d'injection: 20µl
Débit de la phase: 1 ml/min
Temps d'un cycle: 30 minutes
Temps de rétention du BHA sous ces conditions: 18 minutes
Temps de rétention du BHT sous ces conditions: 24 minutes
Température de fonctionnement: 40°C
Détection: 280 nm

→Réactifs :

Solution saturée d'hexane: cette solution a été préparée en mélangeant l'hexane (Fluka Chemica, Suisse) à l'acétonitrile (Riedel dehaen, Allemagne). Le mélange obtenu a été agité pour deux minutes puis décanté. La couche supérieure qui n'est que l'hexane saturée a été alors récupérée.

Solution saturée d'acétonitrile: cette solution a été préparée en mélangeant l'acétonitrile à l'hexane. Le mélange obtenu a été agité pour deux minutes puis décanté. La couche inférieure qui n'est que l'acétonitrile saturé a été alors récupérée.

Acide chlorhydrique: 1N (Merck, Allemagne).

Solution de diméthyle sulfoxyde (BDH, Royaume Uni).

Acide acétique (Chromanorm- prolabo, France).

→Équipement: l'instrumentation HPLC a consisté en une Perkin Elmer binary LC pump 250 (Norwalk, USA), un autosamplieur modèle 738 de ICS (Instrumentation Consumable Service, France), un intégrateur Shimadzu CR8A chromatopac et un détecteur diode array modèle 235C de Perkin Elmer et une colonne RP18 5 µm LiChrosorb (150*4.6mm) (Merck, Allemagne). La mesure de l'aire et de la hauteur du pic a été réalisée par le système a1020 LC plus PE Nelson software analysis de ICS.

→Étalons :

Trois solutions étalons A, B et C ayant respectivement des concentrations de 50 (solution standard), 75 et 100 mg/l de BHA et de BHT ont été utilisées pour calibrer l'appareil. Elles ont été préparées en diluant avec de l'eau distillée une solution mère de BHA et de BHT à 1000mg/l obtenue par dissolution de 100 mg de BHA (Sigma, USA) et de 100 mg de BHT (Sigma, USA) dans 100 ml de l'eau distillée.

→Calculs :

Le calcul de la concentration de la solution en BHA et BHT a été réalisé selon la formule suivante:

$$\text{BHA/BHT, mg/l} = (R/R') \times (C_s/W_x) \times D$$

Où R et R' = hauteurs des pics des échantillons et des standards, respectivement; C_s=concentration du standard en g/ml; W_x poids de l'échantillon en g/ml dans 10 ml d'extrait final; et D=le facteur de dilution si la solution injectée a été diluée.

Le calcul du contenu de l'aliment en additif a été réalisé par application de la formule suivante:

$$\text{Contenu en BHA/ BHT en mg/kg} = \frac{\text{concentration de la solution (g/l)} \times \text{volume final (en ml)}}{\text{Masse de la prise d'essai (g)}}$$

- détermination des rendements d'extraction:

Les rendements d'extraction absolu peut être obtenu par le rapport des signaux mesurés, d'une part après traitement de l'échantillon chargé avec une quantité connu de standard, et d'autre part après l'injection directe dans les systèmes analytiques d'une solution de référence contenant une concentration équivalente de la substance à examiner (Aubert et al., 2003).

Pour ce faire, des matrices alimentaires comparables à celle des échantillons à analyser ont été préparées au laboratoire. Elles ont été ensuite chargées avec des différents niveaux de quantités connues d'une solution standard, puis extraites et préparées d'une façon identique à celle des échantillons pour obtenir finalement la prise d'essai à injecter. Le pourcentage du rendement d'extraction est alors déterminé en comparant les rapports des signaux mesurés (Feinberg, 2000).

$$\% \text{ du rendement d'extraction} = \frac{\text{mesure de la solution standard dans la matrice} \times 100}{\text{mesure de la solution standard seule}}$$

Dans le cas où il a été impossible de préparer une matrice alimentaire similaire et/ou la préparation d'une matrice alimentaire exempte d'additifs alimentaires, les échantillons à analyser ont été chargés avec une quantité connue d'une solution standard puis extraits et préparés pour obtenir la prise d'essai à injecter. Dans ce cas le pourcentage de rendement d'extraction a été calculé comme suit (Allen, 1998):

$$\% \text{ du rendement d'extraction} = \frac{2 \times \text{Mesure}_{\text{échantillon} + \text{standard}} - \text{Mesure}_{\text{échantillon}}}{\text{Mesure}_{\text{standard}}} \times 100$$

4.1.4- traitement des données analytiques

Les taux d'additifs alimentaires obtenus par analyse ont été exprimés en mg /kg de poids d'aliment frais. Les niveaux moyens de concentration en additifs alimentaires de chaque type d'aliment analysé ont été alors calculés. Ceux-ci correspondent à la moyenne pondérée de l'échantillon alimentaire composite pour les deux essais et pour les deux saisons. Dans ce calcul, la méthodologie de traitement des données censurées proposée dans les recommandations IPCS/Gems/Food (IPCS, 1995) a été adoptée. Elle présente l'intérêt de prendre en compte l'effet de censure en fonction de la proportion des résultats quantifiés et ainsi d'encadrer les valeurs d'exposition par un niveau bas (limite inférieure, nd=0 et <LOQ=LOD), un niveau intermédiaire (limite moyenne), et un niveau haut (limite supérieure, nd=LOD et <LOQ=LOQ). Les valeurs non détectées (nd) ont été alors traitées comme étant égales à la moitié de la limite de détection et les valeurs inférieurs à la limite de quantification comme étant égales à la moitié de cette limite lorsque le nombre d'échantillons non détectés était inférieur à 60% des échantillons analysés. Par contre lorsque ce nombre était supérieur à 60%, les valeurs non détectées ont été traitées premièrement comme étant égales à zéro (ou limite de détection), et à la limite de détection (ou de quantification) dans un second temps pour obtenir un niveau bas et un niveau haut de l'exposition.

4.2- les mycotoxines

4.2.1- Elaboration de la liste d'aliments

L'objectif de cette étape consiste à établir à partir de l'enquête de consommation alimentaire une liste d'aliments «tels que consommés» qui sont représentatives de la diète alimentaire des populations enquêtés et qui sont susceptibles d'être contaminés par les mycotoxines. Une liste préliminaire d'aliments a été alors établie. De cette liste, seuls sont retenus les aliments dont les données de contaminations ont été disponibles. On a ainsi obtenu la liste finale des aliments dont les données de contamination sont disponibles et qui sont alors utilisables dans l'évaluation de l'exposition réalisée à la dernière étape.

4.2.2- Sources des données de contamination alimentaire

Plusieurs sources des données de contamination ont été utilisées afin d'avoir une vue réaliste en terme de variabilité de la contamination des denrées alimentaires par les mycotoxines étudiées. Ces sources ont inclus l'IRAL, le département de toxicologie de l'Université Saint Joseph (USJ) et le département des recherches agronomiques de l'Université Américaine (UA). Toutes les données de contamination ont été acquises à partir des analyses des denrées alimentaires exécutées durant l'an 2005 par ces laboratoires. Ces laboratoires ont utilisés des méthodes validées pour le dosage des mycotoxines. Les données analytiques relatives aux aflatoxines ont été obtenues exclusivement de l'IRAL. Le dosage des aflatoxines totaux était basé sur des techniques ELISA et réalisé par HPLC (d'après Aflaprep Rhône poulenc) ou par des kits de quantification Ridascreen (d'après r-Biopharm). Les données analytiques relatives à l'ochratoxine A ont été obtenues de l'IRAL et de l'USJ. Le dosage de l'ochratoxine A a été effectué soit par HPLC (USJ, d'après Majerus et coll.) soit par des kits de quantification Ridascreen (IRAL, d'après r-Biopharm). Finalement les données analytiques relatives au déoxynivalénol ont été obtenues de l'IRAL et de l'UA. Le dosage du déoxynivalénol a été effectué soit par des kits de quantification Ridascreen (IRAL, d'après r-Biopharm).

La représentativité des échantillons d'aliments qui ont été analysés pour les aflatoxines BG était assurée par le fait que l'IRAL est le laboratoire national chargé de l'inspection et du contrôle des taux d'aflatoxines totaux dans tous les aliments bruts ou transformés avant l'autorisation de leur mise sur le marché libanais. La représentativité des échantillons d'aliments qui ont été analysés pour l'ochratoxine A et le déoxynivalénol était assurée par le fait qu'ils ont été prélevés aléatoirement soit à partir des principaux lieux de stockage et/ou de distribution et/ou d'approvisionnement en prenant en compte les principales marques commerciales disponibles sur le marché libanais (pour les aliments bruts et transformés), soit à partir des principales boulangeries (de grande et de moyenne taille, pour les aliments consommés tels que achetés) situés dans toutes les régions libanaises.

4.2.3- traitement des données analytiques

En se basant sur les données analytiques obtenues par ces laboratoires, une valeur moyenne de la contamination, exprimée en microgramme par kilogramme d'aliment frais, a été calculée et attribuée pour chacun des aliments de la liste tels qu'ils ont été rapportés d'être consommés par l'enquête de la consommation alimentaire.

Cependant des données de contamination spécifiques pour certains aliments «tels que consommés» n'ont pas été disponibles. Il a été alors indispensable de pondérer, dans ces cas, les données de consommation alimentaires par un facteur de recette, lors de l'attribution pour ces aliments les valeurs de contamination des aliments bruts. Ce facteur de correction a été déterminé par le pourcentage d'ingrédient contaminé contenu dans l'aliment «tels que consommé» comme s'est spécifié dans la «Food composition tables for use in the middle east» (Pellet PL. et Shadarevian S., 1983).

Finalement les valeurs de contamination non détectées ont été traitées en suivant la même méthodologie que celle appliquée aux additifs alimentaires lors des calculs des niveaux moyens de contamination des aliments par les mycotoxines.

5 - cinquième étape: évaluation scientifique des risques

L'évaluation des risques s'est déroulée en suivant les étapes du processus de l'évaluation scientifiques des risques tels que décrites précédemment.

5.1- Identification et caractérisation du danger

Pour évaluer le danger, une synthèse de l'ensemble des données toxicologiques et épidémiologiques disponibles sur la substance respectivement chez l'animal et chez l'homme ont été présentées. Ces données ont principalement pour sources les rapports du JECFA et du SCF et des publications scientifiques. Les valeurs toxicologiques de références (DJA) proposés par les différents organismes internationaux (JECFA et SCF) ont été rapportées.

5.2- Evaluation de l'exposition

Pour évaluer l'exposition aux additifs alimentaires et aux mycotoxines, l'approche déterministe a été adoptée. Cette approche consiste à multiplier une valeur fixe de la consommation alimentaire par une valeur fixe de la contamination puis à sommer la consommation de toutes les sources alimentaires et finalement à diviser la consommation total par le poids corporel réel de l'individu.

Les estimations des apports alimentaires en additifs et en mycotoxines ont été obtenues, pour chaque sujet, par la multiplication des données alimentaires individuelles détaillées issues des rappels de 24 heures, par les données de concentrations moyennes en additifs ou des niveaux de contamination moyens en mycotoxines présents dans les aliments «tels que consommés» puis en sommant les apports de toutes les sources alimentaires. Ces apports, initialement exprimée en mg/jour, ont été divisés par le poids corporel réel mesuré pour chacun des participants pour qu'ils soient exprimés en mg/kg p.c./j facilitant ainsi les comparaisons avec les VTR. La moyenne de l'exposition alimentaire aux additifs alimentaires a été dérivé pour le groupe total des sujets participants. Les sujets non consommateurs (dont la somme des apports alimentaires était égale à 0 mg/kg p.c./j) ont été ensuite identifiés et éliminés des calculs ci-après. Le niveau moyen, le P75 et le P95 de la distribution de l'exposition aux additifs alimentaires et aux mycotoxines étudiés ont été estimés pour le groupe de consommateurs uniquement.

Finalement, les expositions alimentaires moyennes (aux mycotoxines) et au 95^{ème} percentile de l'exposition (additifs alimentaires) ont été analysées en fonction de leurs sources alimentaires. La contribution de chaque aliment à l'exposition moyenne totale et au 95^{ème} percentile de l'exposition a été calculée et exprimée en pourcentage de contribution. Le ou les vecteurs majoritairement contributeurs à cette exposition ont été identifiés en suivant les recommandations méthodologiques de fixation de normes alimentaires du comité du Codex Alimentarius (CCFAC).

5. 3- Caractérisation du risque

Cette étape finale de l'évaluation des risques a pour objectif de comparer le niveau moyen, le percentile 75 et le percentile 95 de la population exposée avec les Valeurs Toxicologiques de Références (DJA/DJTP et DHTP) établies par les comités scientifiques européens et internationaux (SCF, JECFA). Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage de contribution de la VTR pour chacun des additifs alimentaires et pour chacune des mycotoxines. Lorsque les expositions alimentaires ont été obtenues par application de deux scénarios, une moyenne des valeurs issues de ces deux scénarios a été calculée et comparée aux VTR. Ceci était nécessaire pour obtenir une caractérisation réaliste du risque. De plus, dans le cas où les VTR établies par les deux comités cités ci- dessous sont différentes pour un même toxique, la VTR ayant la valeur la plus faible a été retenue pour caractériser le risque afin d'adopter une approche conservative.

Le risque a été aussi quantifié en estimant empiriquement pour la population étudiée le pourcentage d'individus exposé en dessus de la VTR. Cette notion a été traduite dans le texte par une valeur exprimée également en pourcentage qui correspond tout simplement au nombre d'individus exposés à un danger identifié et dont l'exposition théorique ou calculée est au-dessus de la VTR établi vis à vis de ce danger.

Résultats

1- Etude microbiologique

Au total 596 aliments ont été échantillonnés pendant les deux saisons en vue d'être analysés microbiologiquement. Aucun des aliments échantillonnés n'avait une apparence anormale de son emballage externe, de sa texture, de son odeur ou de sa couleur. La distribution des ces aliments en fonction de leur type et de leur pourcentage de partition du marché est présentée dans le tableau 11. De plus le pourcentage d'échantillons qui sont libellés «sans additif» et dont l'étiquetage n'indique pas la présence des additifs étudiés est également présentée dans le tableau 11.

Les résultats montrent que pour les sodas et les jus de fruits la production locale couvre la totalité (100%) du besoin du marché. De plus, la majorité des produits laitiers (95%) et des chips (95%) qui sont consommés au Liban sont produits localement, ce qui n'est pas le cas des conserves et des biscuits dont une bonne partie (30% et 50% respectivement) provient d'une importation de l'extérieur. De plus 50% des jus de fruits, 50% des chips et 25% des conserves sont libellés «sans additif», alors que l'étude de l'étiquetage des autres échantillons a montré que 75% des produits laitiers étudiés sont supposés ne pas contenir les additifs alimentaires étudiés.

Les analyses effectuées pour chacun des différents types d'aliments sont présentées dans le tableau 12. Les normes bactériologiques des aliments analysés sont présentées dans le tableau 13.

Les résultats de la contamination moyenne entre les deux saisons obtenus par les différentes analyses microbiologiques effectuées sur les aliments échantillonnés sont regroupés et exprimés en pourcentage de conformité à la norme en vigueur et présentés dans le tableau 14. A noter que seules les boîtes contenant un nombre de colonies entre 30 et 300 sont retenues pour le calcul de la concentration en microorganismes et ceci uniquement lorsque le contrôle de stérilité du milieu de culture était positive (absence de bactéries qui ont poussé sur le milieu). Les résultats montrent que tous les échantillons contiennent les microorganismes recherchés en quantité conforme aux normes à l'exception de 56 produits laitiers provenant de deux usines (soit 35% des échantillons des produits laitiers ou 9% du total des échantillons). Ces produits laitiers sont contaminés par des coliformes totaux à des taux correspondant en moyenne à 150 microorganismes/ml (45/ml-420/ml). De plus tous les produits non-conformes sont supposés de ne pas contenir de conservateurs en se basant sur leur étiquetage. Finalement, en comparant les niveaux de contamination obtenus au cours de chaque saison, la variabilité de la contamination en microorganismes n'est pas significative entre les deux saisons pour les conserves, les chips et les biscuits. Cependant une différence significative de cette contamination est notée dans le cas des sodas, des jus de fruits et de certains produits laitiers ($p < 0.05$).

Tableau 11. Descriptions des aliments échantillonnés.

Type d'aliment	Nombre d'échantillons analysés/saison	% PDM	% d'échantillons libellés sans additifs (3)
Sodas	20	100%	0%
Jus de fruits	90	100%	50%
Conserves (1)	60	70%	25%
Produits laitiers (2)	80	95%	75%
Biscuits	16	50%	0%
Chips	32	95%	50%
Total	298	-	-

PDM: pourcentage de partition du marché

1: incluant les conserves de légumes, de légumineuses et des confitures

2: incluant laban, labneh, fromage blanc, fromage jaune, ayran et crème glacée.

3: portant la mention sans additif et/ou dont l'étiquetage n'indique pas la présence d'additifs alimentaires.

Tableau 12. Analyses microbiologiques effectuées pour les différents types d'aliments échantillonnés (d'après l'Afnor, 1999).

Analyse microbiologique	Sodas	Jus de fruits	Conserves(1)	Produits laitiers (2)	Biscuits	Chips
Dénombrement de la flore totale	*	*	*	* (4)	*	*
Dénombrement de Clostridium perfringens	-	-	*	-	-	-
Dénombrement des Clostridium Sulfitoréducteur	-	-	*	-	-	-
Dénombrement de la flore fongique	*	*	* (3)	*	-	-
Dénombrement des coliformes fécaux	-	-	-	*	*	*
Dénombrement des coliformes totaux	-	-	-	*	*	*
Dénombrement de Staphylococcus Aureus	-	-	*	*	*	*
Recherche de brucella	-	-	-	*	-	-

* : analyse effectuée

- : analyse non effectuée

1: incluant les conserves de légumes, de légumineuses et des confitures

2: incluant laban, labneh, fromage blanc, fromage jaune, ayran et crème glacée

3: effectué pour les confitures

4: à l'exception des produits fermentés

Tableau 13. Normes des analyses microbiologiques effectuées pour les différents types d'aliments échantillonnés (Libnor, d'après le journal officiel de la république française, 1980 et Afnor, 1999).

Analyse microbiologique	Sodas	Jus de fruits	Conserves(1)	Produits laitiers (2)	Biscuits	Chips
Dénombrement de la flore totale	100-1000/ml	100-1000/ml	1-2/g	100-1000/ml(4)	1-2/g	1-2/g
Dénombrement de Clostridium perfringens	-	-	Absence	-	-	-
Dénombrement des Clostridium Sulfitoréducteur	-	-	Absence	-	-	-
Dénombrement de la flore fongique	< 100/ml	<100/ml	<100/ml (3)	<100/ml	-	-
Dénombrement des coliformes fécaux	-	-	-	<1/g	Absence	Absence
Dénombrement des coliformes totaux	-	-	-	<10/ml	<25/ml	<25/ml
Dénombrement de Staphylococcus Aureus	-	-	Absence/1 g	10/1 g	Absence/1 g	Absence/1 g
Recherche de brucella	-	-	-	Absence	-	-

- : analyse non effectuée

1: incluant les conserves de légumes, de légumineuses et des confitures

2: incluant laban, labneh, fromage blanc, fromage jaune, ayran et crème glacée

3: effectué pour les confitures

4: à l'exception des produits fermentés

Tableau 14. Résultats des analyses microbiologiques des différents types d'aliments analysés.

Analyse microbiologique	Sodas	Jus de fruits	Conserves(1)	Produits laitiers (2)	Biscuits	Chips
	%C	%C	%C	%C	%C	%C
Dénombrement de la flore totale	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Dénombrement de Clostridium perfringens	-	-	100%	-	-	-
Dénombrement des Clostridium Sulfitoréducteur	-	-	100%	-	-	-
Dénombrement de la flore fongique	100%	100%	100% (3)	100%	-	-
Dénombrement des coliformes fécaux	-	-	-	100%	100%	100%
Dénombrement des coliformes totaux	-	-	-	65%	100%	100%
Dénombrement de Staphylococcus Aureus	-	-	100%	100%	100%	100%
Recherche de brucella	-	-	-	100%	-	-

* : analyse effectuée.

- : analyse non effectuée.

1: incluant les conserves de légumes, de légumineuses et des confitures.

2: incluant laban, labneh, fromage blanc, fromage jaune, ayran et crème glacée.

3: effectué pour les confitures.

%C: pourcentage de conformité aux normes.

2- Etude de consommation alimentaire

2.1- Description des sujets

Au total 55 (19% ou 35 adolescents et 20 enfants) de 285 sujets ont été éliminés soit à cause des erreurs dans le remplissage des questionnaires, soit à cause d'une sous évaluation évidente. L'échantillon final a consisté en 230 sujets (130 enfants et 100 adolescents). La majorité (89%) de ces sujets ont un indice de masse corporelle (IMC) normale c.à.d situé entre 19 et 24 kg/m²; uniquement 11% des sujets étaient en surpoids ou obèse (IMC ≥ 25 (kg/m²). La distribution de sujets en fonction de leur âge, leur genre ou le type d'école fréquentée est présenté dans le tableau 15.

Tableau 15. Description de l'échantillon des sujets participant dans l'enquête.

Catégories des sujets	Caractéristiques	Nombre de sujets et %
AGE	9-14 ans	130 (56%)
	15-18 ans	100 (44%)
GENRE	Garçon	110 (48%)
	Fille	120 (52%)
Type de l'école	Publique	117 (51%)
	Privée	113 (49%)
Poids corporel (kg)	9 -14 ans	37.5 ± 8.9
	15 -18 ans	53.1 ± 12.3
Indice de poids corporel (kg/m ²)	19-24	205 (89%)
	≥25	25 (11%)

2.2- Description des données de consommation

Les données de consommation alimentaire obtenues pour les deux sous groupes de la population enquêtés sont présentées dans les tableaux 16 et 17. Ces résultats montrent que les aliments de la catégorie «pains et céréales» ainsi que les boissons (sodas et jus de fruits) sont plus fortement consommés par les enfants âgés 9-14 ans (respectivement 305 g/jour et 440 g/jour) et par les adolescents âgés 15-18 ans (respectivement 335 g/jour et 495 g/jour) de la population étudiés que les aliments des autres catégories. De plus la consommation de ces deux types de produits paraît être régulière (100% de consommateurs réguliers pour les pains et céréales et plus que 50% pour les boissons ou les jus de fruits).

Tableau 16. Description des données de consommation alimentaire pour les sujets Libanais âgés entre 9-14 ans.

Catégorie alimentaire	% de consommateurs (1)	% de consommateurs réguliers (2)	Consommation moyenne g/jour	Consommation médiane g/jour	P75 de la consommation g/jour	P90 de la consommation g/jour	P95 de la consommation g/jour	P95 Consommateurs seuls g/jour
Pain et Céréales	100%	100%	305	300	350	490	570	570
Légumes secs	12%	3%	45	0	0	360	370	560
Légume	60%	2.10%	192	190	290	480	520	550
Fruits et jus de fruits	92%	68.3% (3)	265	267	420	480	680	680
Viande	100%	3.90%	131	150	200	270	300	320
Poisson	12%	0%	9	0	0	0	0	200
Lait et produits laitiers	100%	60%	162	115	285	330	440	440
Graisses ajoutées	20%	1.30%	13	12	24	25	30	34
Boissons (4)	90%	30%	235	240	380	480	588	595
Fruits secs	9%	10%	5.5	0	0	35	55	100
Sucreries	95%	90%	83	55	125	198	246	250
Snacks	100%	4.60%	79	0	200	220	220	220
Plats composés (5)	10%	0.50%	17	0	0	0	150	300

(1) Sujets ayant consommé l'aliment 24 heures avant l'administration du questionnaire.

(2) sujets consommant l'aliment considéré au moins une fois par jour.

(3) 57% pour les jus de fruit.

(4) A l'exclusion de l'eau, du jus de fruits et du lait.

(5) Lahm bi ajin et pizzas.

Tableau 17. Description des données de consommation alimentaire pour les sujets Libanais âgés entre 15-18 ans.

Catégorie alimentaire	% de consommateurs (1)	% de consommateurs réguliers (2)	Consommation moyenne g/jour	Consommation médiane g/jour	P75 de la consommation g/jour	P90 de la consommation g/jour	P95 de la consommation g/jour	P95 Consommateurs seuls g/jour
Pain et Céréales	100%	100%	335	297	420	550	660	660
Légumes secs	12%	1%	40	0	0	80	189	260
Légume	60%	3.10%	214	200	322	466	500	510
Fruits et jus de fruits	82%	58.3% (3)	275	240	420	480	620	650
Viande	100%	4.90%	151	200	200	290	350	350
Poisson	12%	0%	11	0	0	0	0	400
Lait et produits laitiers	100%	50%	158	105	270	330	480	480
Graisses ajoutées	20%	1.30%	15	19	30	55	65	65
Boissons (4)	100%	75%	265	240	380	480	640	644
Fruits secs	9%	12%	13.5	0	0	50	75	120
sucreries	95%	70%	77	57	127	200	235	250
Snacks	100%	2.60%	60	0	210	220	220	220
Plats composés (5)	10%	1.70%	45	0	0	150	300	600

(6) Sujets ayant consommé l'aliment 24 heures avant l'administration du questionnaire.

(7) sujets consommant l'aliment considéré au moins une fois par jour.

(8) 37% pour les jus de fruit.

(9) A l'exclusion de l'eau, du jus de fruits et du lait.

(10) Lahm bi ajin et pizzas.

3- Evaluation préliminaire de l'exposition

3.1- Estimation de la consommation théorique maximale des benzoates

Les résultats des rapports des CTM sur la DJA établie pour les benzoates par le JECFA/SCF sont rapportés dans le tableau 18. Ces résultats montrent que, pour les benzoates, les consommations théoriques maximales au niveau moyen et au 95^{ème} percentile de la distribution, dépassent significativement la DJA, lorsqu'elles sont basées sur les taux maximaux d'utilisation autorisés tels qu'ils sont indiqués par le DGSFA (500 et 900% de la DJA); alors qu'elles étaient inférieures à la DJA lorsque les taux maximaux d'utilisation autorisés indiqués par la NN ont été utilisés (30 et 60% de la DJA).

Les contributions (exprimée en pourcentage) des différentes catégories alimentaires aux CTM au niveau moyen (1) et au 95^{ème} percentile (2) de la distribution sont rapportées dans le tableau 19 pour les deux estimations. Les résultats montrent que les jus de fruits et les boissons sont les principaux contributeurs des CTM qu'elles soient calculées à partir des TMA de la NN ou à partir des TMA du DGSFA avec des contributions allant de 18% à 39% pour les jus de fruits et de 18% à 66% pour les boissons. De plus, la contribution de chacune des autres catégories aux CTM est $\leq$ à 12% dans tous les cas, à l'exception de la contribution de la catégorie «graisses ajoutées» qui est de 18% pour la CTM au 95^{ème} percentile lorsqu'elle est calculée sur la base des TMA du DGSFA.

Tableau 18. Rapport entre la Consommation Théorique Maximale (CTM) et la Dose Journalière Admissible (DJA), basée sur la consommation alimentaire et les taux maximaux d'utilisation autorisés (TMA) pour le groupe d'enfants et d'adolescents confondus.

Additifs alimentaires	DJA^a	CTM^b/DJA basée sur la consommation moyenne et les TMA^c du DGSFA^d	CTM^b/DJA basée sur la consommation moyenne et les TMA^c de la NN^e	CTM^b/DJA basée sur la consommation du 95^{ème} percentile et les TMA^c du DGSFA^d	CTM^b/DJA basée sur la consommation du 95^{ème} percentile et les TMA^c de la NN^e
Benzoates (E210,E211 E212,E213) (JECFA-SCF)	0-5 mg/kg bw	5	0.3	9	0.6
Sulphites (E220,E221, E222,E223,E224,E226 E227,E228) (JECFA-SCF)	0-0.7 mg/kg bw	7	1.3	18	4.8
BHA (butylated hydroxyanisol - E320) (JECFA-SCF)	0-0.5 mg/kg bw	17	0.5	37	1.5
BHT (butylated hydroxytoluene - E321)(a) (SCF)	0-0.05 mg/kg bw	f ₋	2	f ₋	4
BHT (butylated hydroxytoluene - E321) (JECFA)	0-0.3 mg/kg bw	1.6	f ₋	3.3	f ₋

a: DJA: dose journalière admissible.

b: CTM: Concentration Théorique Maximale .

c: TMA: Taux Maximaux d'utilisation Autorisés.

d: DGSFA: Draft General Standard for Food Additifs, Codex Alimentarius Commission (1997).

e: NN: Normes Nationales.

f: le tiret dénote que le rapport CMT/DJA n'a pas été calculé dans ce cas.

Tableau 19. Pourcentage de contributions des différentes catégories alimentaires à la Consommation Théorique Maximale moyenne (1) et au 95^{ème} percentile (2) des benzoates basées sur la consommation alimentaire et les taux maximaux d'utilisation autorisés par le DGSFA et NN.

Catégorie alimentaire	% de contribution la CTM (1) basée sur les TMA de la NN	% de contribution à la CTM (2) basée sur les TMA de la NN	% de contribution à la CTM (1) basée sur les TMA de la DGSFA	% de contribution à la CTM (2) basée sur les TMA de la DGSFA
Pain et Céréales	NC	NC	12%	<10%
Légumes secs	NC	NC	<10%	<10%
Légumes	NC	NC	NC	NC
Fruits et jus de fruits (3)	39%	34%	22%	18%
Viandes	NC	NC	NC	NC
Poissons	NC	NC	<10%	<10%
Lait et produits laitiers	NC	NC	<10%	<10%
Graisses ajoutées	NC	NC	<10%	28%
Boissons (4)	56%	66%	18%	18%
Fruits secs	NC	NC	<10%	<1%
Sucreries	3%	NC	<1%	NC
Snacks	NC	NC	<1%	NC
Plats composés (5)	NC	NC	<10%	<10%

CTM: Concentration Théorique Maximale.

TMA: Taux Maximaux d'utilisation Autorisés.

DGSFA: Draft General standard of Food Additifs, Codex Alimentarius Commission (1997).

DEU: Directives de l'Union Européenne (1995).

NC: catégorie non contributrice.

NN: Normes Nationales.

(3) toute la contribution provient du jus de fruits uniquement.

(4) A l'exclusion de l'eau, du jus de fruits et du lait.

(5) Lahm bi ajin et pizzas.

3.2- Estimation de la consommation théorique maximale des sulfites

Les résultats des rapports des CTM sur la DJA établie pour les sulfites par la JECFA/SCF sont rapportés dans le tableau 18. Ces résultats montrent que, dans le cas des sulfites, les consommations théoriques maximales au niveau moyen et au 95^{ème} percentile de la distribution, dépassent significativement la DJA, lorsqu'elles sont basées sur les taux maximaux d'utilisation autorisés indiqués par le DGSFA (respectivement 700 et 1800% de la DJA); mais également lorsqu'elles sont basées sur les taux maximaux d'utilisation autorisés indiqués par la NN (respectivement 130 et 480% de la DJA).

Les contributions (exprimée en pourcentage) des différentes catégories alimentaires aux CTM au niveau moyen (1) et au 95^{ème} percentile (2) de la distribution sont rapportées dans le tableau 20. Les résultats montrent que la catégorie «pains et céréales» est l'un des principaux contributeurs des CTM au niveau moyen et au 95^{ème} percentile de la distribution qu'elles soient calculées à partir des TMA de la NN ou à partir des TMA du DGSFA. Le pourcentage de contribution de cette catégorie va de 11% jusqu'à 63%. De plus, la catégorie «légumes secs» est un contributeur principal de la CTM au 95^{ème} percentile avec une contribution de 85% lorsqu'elle est calculée à partir des TMA de la NN et de 14% lorsqu'elle est calculée à partir des TMA du DGSFA. Finalement les catégories «fruits et jus de fruits » et «fruits secs» sont une source importante de contribution de la CTM à la moyenne de la distribution lorsqu'elle est calculée sur la base des TMA de la NN avec respectivement de 21% et de 14% de contribution.

Tableau 20. Pourcentage de contributions des différentes catégories alimentaires à la Consommation Théorique Maximale moyenne (1) et au 95^{ème} percentile (2) des sulfites basées sur la consommation alimentaire et les taux maximaux d'utilisation autorisés par le DGSFA et NN.

Catégorie alimentaire	% de contribution à la CTM (1) basée sur les TMA de la NN	% de contribution à la CTM (2) basée sur les TMA de la NN	% de contribution à la CTM (1) basée sur les TMA de la DGSFA	% de contribution à la CTM (2) basée sur les TMA de la DGSFA
Pain et Céréales	39%	11%	63%	64%
Légumes secs	<10%	85%	<10%	14%
Légumes	NC	NC	<1%	<1%
Fruits et jus de fruits	21%(3)	<10% (3)	<10% (3)	<10% (3)
Viandes	<10%	<10%	<10%	<1%
Poissons	NC	NC	NC	NC
Lait et produits laitiers	NC	NC	NC	NC
Graisses ajoutées	NC	NC	NC	NC
Boissons (4)	NC	NC	NC	NC
Fruits secs	14%	<10%	<10%	<10%
Sucreries	13%	<1%	<10%	<10%
Snacks	NC	NC	<1%	<1%
Plats composés (5)	<1%	<1%	<1%	<1%

CTM: Concentration Théorique Maximale.

TMA: Taux Maximaux d'utilisation Autorisés.

DGSFA: Draft General standard of Food Additifs, Codex Alimentarius Commission (1997).

NC: catégorie non contributrice.

NN: Normes Nationales.

(3) toute la contribution provient du jus de fruits uniquement.

(4) A l'exclusion de l'eau, du jus de fruits et du lait.

(5) Lahm bi ajin et pizzas.

3.3- Estimation de la consommation théorique maximale du BHA

Les résultats des rapports des CTM sur la DJA établie pour le BHA par le JECFA/SCF sont rapportés dans le tableau 18. Ces résultats montrent que, dans le cas du BHA, les consommations théoriques maximales au niveau moyen et au 95^{ème} percentile de la distribution, dépassent significativement la DJA, lorsqu'elles sont basées sur les taux maximaux d'utilisation autorisés indiqués par le DGSFA (respectivement 1700 et 3700% de la DJA); cependant dans le cas où elles sont basées sur les taux maximaux d'utilisation autorisés indiqués par la NN, le niveau moyen de la CTM est inférieure à la DJA (50% de la DJA) alors qu'elle est supérieure à la DJA pour la consommation au 95^{ème} percentile (150% de la DJA).

Les contributions (exprimée en pourcentage) des différentes catégories alimentaires aux CTM au niveau moyen (1) et au 95^{ème} percentile (2) de la distribution sont rapportées dans le tableau 21. Les résultats montrent que la catégorie «pains et céréales» est un contributeur majeur de la CTM moyenne qu'elles soient calculées à partir des TMA de la NN ou à partir des TMA du DGSFA. Le pourcentage de contribution de cette catégorie va de 34% à 42%. Cependant, la catégorie «fruits secs» est un contributeur principal de la CTM au 95^{ème} percentile de la distribution avec une contribution de 63% lorsqu'elle est calculée à partir des TMA de la NN et de 51% lorsqu'elle est calculée à partir des TMA du DGSFA. De plus la catégorie «sucreries» et la catégorie «snacks» sont des contributeurs majeurs de la CTM lorsqu'elle est calculée à partir des TMA de la NN avec plus de 20% de contribution à partir de ces deux catégories, alors que la catégorie «boissons» est un contributeur majeur de la CTM lorsqu'elle est calculée à partir des TMA de la DGSFA avec plus de 40% de contribution à partir de cette catégorie.

Tableau 21. Pourcentage de contributions des différentes catégories alimentaires à la Consommation Théorique Maximale moyenne (1) et au 95^{ème} percentile (2) du BHA basées sur la consommation alimentaire et les taux maximaux d'utilisation autorisés par le DGSFA et NN.

Catégorie alimentaire	% de contribution à la CTM (1) basée sur les TMA de la NN	% de contribution à la CTM (2) basée sur les TMA de la NN	% de contribution à la CTM (1) basée sur les TMA de la DGSFA	% de contribution à la CTM (2) basée sur les TMA de la DGSFA
Pain et Céréales	42%	16%	34%	<10%
Légumes secs	NC	NC	NC	NC
Légumes	NC	NC	NC	NC
Fruits et jus de fruits (3)	NC	NC	NC	NC
Viandes	<1%	<1%	<1%	<1%
Poissons	<10%	<10%	<10%	<10%
Lait et produits laitiers	NC	NC	NC	NC
Graisses ajoutées	<10%	<1%	<1%	<1%
Boissons (4)	NC	NC	40%	43%
Fruits secs	<10%	63%	<10%	51%
Sucreries	29%	12%	<10%	<1%
Snacks	12%	<10%	<1%	<1%
Plats composés (5)	<1%	<1%	<1%	<1%

CTM: Concentration Théorique Maximale.

TMA: Taux d'utilisation Maximaux Autorisés.

DGSFA: Draft General Standard for Food Additifs, Codex Alimentarius Commission (1997).

NN: Normes Nationales.

NS: inférieur à 1%.

NC: catégorie non contributrice.

(3) toute la contribution provient du jus de fruits uniquement

(4) A l'exclusion de l'eau, du jus de fruits et du lait

(5) Lahm bi ajin et pizzas

3.4- Estimation de la consommation théorique maximale du BHT

Les résultats des rapports des CTM sur la DJA établie pour le BHT par le JECFA/SCF sont rapportés dans le tableau 18. Ces résultats montrent que, dans le cas du BHT, les consommations théoriques maximales au niveau moyen et au 95^{ème} percentile de la distribution, dépassent significativement la DJA, lorsqu'elles sont basées sur les taux maximaux d'utilisation autorisés indiqués par le DGSFA (respectivement 160 et 330% de la DJA (JECFA)); mais également lorsqu'elles sont basées sur les taux maximaux d'utilisation autorisés indiqués par la NN (respectivement 200 et 400% de la DJA (SCF)).

Les contributions (exprimée en pourcentage) des différentes catégories alimentaires aux CTM au niveau moyen (1) et au 95^{ème} percentile (2) de la distribution sont rapportées dans le tableau 22. Les résultats montrent que la catégorie «pains et céréales» est un majeur contributeur des CTM qu'elles soient calculées à partir des TMA de la NN ou à partir des TMA du DGSFA. Le pourcentage de contribution de cette catégorie va de 14% jusqu'à 50%. De plus, la catégorie «sucreries» est un contributeur principal de la CTM moyenne et au 95^{ème} percentile avec une contribution respective de 33% et de 37% lorsqu'elle est calculée à partir des TMA de la NN, alors que la catégorie «boissons» est un contributeur principal de la CTM moyenne et au 95^{ème} percentile avec une contribution respective de 26% et de 28% lorsqu'elle est calculée à partir des TMA du DGSFA. Finalement la contribution de chacune des autres catégories aux CTM est trouvée d'être $\leq$ à 10% dans tous les cas, à l'exception de la contribution de la catégorie «snacks» qui est trouvée d'être de 12% pour la CTM moyenne lorsqu'elle est calculée sur la base des TMA du DGSFA.

Tableau 22. Pourcentage de contributions des différentes catégories alimentaires à la Consommation Théorique Maximale moyenne (1) et au 95^{ème} percentile (2) du BHT basées sur la consommation alimentaire et les taux maximaux d'utilisation autorisés par le DGSFA et NN.

Catégorie alimentaire	% de contribution à la CTM (1) basée sur les TMA de la NN	% de contribution à la CTM (2) basée sur les TMA de la NN	% de contribution à la CTM (1) basée sur les TMA de la DGSFA	% de contribution à la CTM (2) basée sur les TMA de la DGSFA
Pain et Céréales	50%	50%	27%	14%
Légumes secs	NC	NC	NC	NC
Légumes	NC	NC	NC	NC
Fruits et jus de fruits (3)	NC	NC	NC	NC
Viandes	<1%	<1%	<10%	<10%
Poissons	<10%	<10%	<10%	<10%
Lait et produits laitiers	NC	NC	NC	NC
Graisses ajoutées	<1%	<1%	<1%	<1%
Boissons (4)	NC	NC	26%	28%
Fruits secs	NC	NC	<10%	<10%
Sucreries	33%	37%	<10%	<10%
Snacks	12%	<10%	<1%	<1%
Plats composés (5)	<1%	<1%	<1%	<1%

CTM: Concentration Théorique Maximale.

TMA: Taux d'utilisation Maximaux Autorisés.

DGSFA: Draft General Standard of Food Additifs, Codex Alimentarius Commission (1997).

NS: inférieur à 1%.

NC: catégorie non contributrice.

NN: Normes Nationales.

(3) toute la contribution provient du jus de fruits uniquement.

(4) A l'exclusion de l'eau, du jus de fruits et du lait.

(5) Lahm bi ajin et pizzas.

4- Données analytiques

4.1- Les additifs alimentaires

Les analyses ont été effectuées en double pour chaque échantillon préparé. Le coefficient de variabilité était toujours inférieur à 10%. Les rendements d'extraction étaient supérieurs à 50% pour tous les additifs. Les limites de détection des méthodes utilisées pour le dosage des additifs alimentaires sont présentées dans le tableau 23.

Tableau 23. Limites de détection des additifs alimentaires recherchés.

Limite de détection (LOD) µg/kg d'aliment frais			
Produits alimentaires	Benzoates	Sulfites	BHA/BHT
Céréales	0.3	0.3	0.5
Produits à base de céréales	0.3	0.3	0.5
Sucreries	0.3	0.3	0.5
Légumineuses	0.3	0.3	a ₋
Boissons	0.3	0.3	a ₋
Lait et produits laitiers	0.3	a ₋	a ₋
Poissons	0.3	a ₋	0.5
Légumes	0.3	a ₋	
Fruits secs	a ₋	0.3	0.5
Viandes	a ₋	0.3	a ₋
Graisses ajoutés	0.3	a ₋	0.5
Plats composés	0.3	a ₋	a ₋
Snacks	a ₋	a ₋	0.5

^a - le tiret dénote qu'aucune analyse n'a été réalisée sur ce type d'aliment.

4.1.1- Niveaux de benzoates retrouvés dans les aliments analysés «tels que consommés»

La méthode utilisée pour la recherche et le dosage des benzoates a une courbe de calibration linéaire pour des concentrations allant de 0.3 mg/l à 1 g/l avec un coefficient de régression linéaire ($r(2)=0.9998$) dans la zone de ces concentrations. La sensibilité de cette méthode est de 0.1mg de benzoates/l de solution d'essai avec une limite de détection de 0.3 mg benzoates/l de solution d'essai. Les coefficients de variabilité à trois différents niveaux (bas, médian et haut) sont <6.2%. Les rendements d'extraction des benzoates vont de 50% (plats composés) à 98% (jus de fruits) ceci en fonction de la matrice alimentaire utilisée.

Au total 113 aliments ont été analysés pour la détermination de leur contenu en benzoates. Ceux-ci étaient de deux types: Les aliments consommés tels que achetés (90%) et les aliments consommés après traitement préalable (cuisson domestique par exemple) (10%). De plus les benzoates ont été détectés dans 93 (82%) aliments analysés dont 24 (26%) sont des aliments non autorisés à en contenir selon le DGSFA et 79 (70%) le sont selon la NN. Dans ce cas en appliquant les recommandations IPCS/Gems/Food pour le calcul des valeurs de la concentration moyenne des benzoates dans les différents aliments, les valeurs non détectées étaient considérées d'être égale à la moitié de la limite de détection (0.3 mg /kg).

Le tableau 24 présente le nombre d'analyses effectuées pour chaque type d'aliment, ainsi que la concentration moyenne des benzoates dans les différents aliments analysés. Les taux maximaux d'utilisations autorisés tels qu'ils sont indiqués dans le DGSFA et la NN ainsi que les rendements d'extraction pour les aliments analysés sont également présentés dans ce tableau.

Les résultats montrent que dans la majorité des cas (70% des échantillons) les concentrations moyennes en benzoates des aliments analysés sont supérieures aux TMA de la NN; alors qu'elles sont inférieures aux TMA du DGSFA. Les valeurs des concentrations alimentaires en benzoates sont situées entre la limite de détection et la moitié du TMA du DGSFA. Dans le seul cas du thon en conserve (3.5% des aliments analysés) la concentration moyenne des benzoates déterminée analytiquement dépasse le TMA du DGSFA: 1260 mg/kg vs 1000 mg/kg, soit une valeur de 126% de ce taux.

Tableau 24. Nombre d'analyse, taux maximaux d'utilisation autorisés, concentration analytique moyenne et le pourcentage du rendement d'extraction des benzoates.

Catégorie alimentaire	Types d'aliments	Nombre d'échantillons	DGSFA TMA(Codex Alimentarius Commission,1997) mg/kg	NN TMA (Libnor, 2003) Mg/kg	Taux analytiques moyens mg/kg	Rendement d'extraction En pourcentage
Pain et céréales	Biscuits bar	4	1000	0	23	95
Pain et céréales	Biscuits pack	4	1000	0	115	95
Pain et céréales	Pains	8	350	0	10	86
Sucreries	Candies	4	1500	1200	0.15	87
Fruits et jus de fruits	Jus de fruits	8	2100	150	245	98
Pain et céréales	Crackers	2	500	0	150	95
Lait et produits laitiers	Spécialités fromagères	2	2000	0	1210	86
Lait et produits laitiers	Fromage blanc	6	0	0	150	95
Lait et produits laitiers	Fromage jaune	4	0	0	60	83
Sucreries	Chewing gum	4	1500	1500	0.15	60
Légumes secs	Pois chiche	6	1000	0	93	87
Légumes secs	Fève	2	1000	0	580	85
Sucreries	Ice cream	3	500	0	15	89
Sucreries	Confitures	4	1000	500	0.15	85
Lait et produits laitiers	Laban	6	0	0	100	83
Lait et produits laitiers	Labneh	4	0	0	160	88
Plats composés	Lahm bi ajin	2	1000	0	0.15	50
Légumes secs	Lentilles en conserves	2	1000	0	130	88
Graisses ajoutées	Mayonnaise	2	60	0	20	89
Légumes	Pois en conserves	2	1000	0	0.15	89
Plats composés	Pizzas	4	1000	0	0.15	65
Pain et céréales	Potato chips	8	500	0	195	86
Boissons	Sodas	10	1000	200	120	98
Pain et céréales	Toasts	8	0	0	95	86
Poissons	Thon en conserve	4	1000	2000	1260	90
Total		113				

TMA: Taux Maximaux d'utilisation autorisés.

DGSFA: Draft General of Food Additifs.

NN: Norme National.

4.1.2- Niveaux des sulfites retrouvés dans les aliments analysés «tels que consommés»

La méthode utilisée pour la recherche et le dosage des sulfites a une limite de détection de 0.3 mg de sulfites /l de solution d'essai. La sensibilité de cette méthode est de 0.1 mg de sulfites /l de solution d'essai. Cette méthode est linéaire pour des concentrations allant de 0.3 mg de sulfites /l de solution d'essai à 0.3 g de sulfites /l de solution d'essai avec un coefficient de régression linéaire $r(2) > 0.999$. Les coefficients de variabilité à trois différents niveaux (bas, médian et haut) sont $< 6.2\%$. Les rendements d'extraction des sulfites vont de 58% (viandes) à 98% (jus des fruits) et ceci en fonction de la matrice alimentaire utilisée.

Au total 94 aliments ont été analysés pour la détermination de leur contenu en sulfites. Ceux-ci étaient de deux types: Les aliments consommés tels que achetés (85% des échantillons) et les aliments consommés après traitement préalable (cuisson...) (15% des échantillons). Les sulfites ont été détectés dans 68 (72%) aliments analysés et qui sont tous des aliments autorisés à contenir des sulfites selon le DGSFA alors que seulement 80 (85%) des aliments le sont selon la NN. Dans ce cas en appliquant les recommandations IPCS/Gems/Food pour le calcul des valeurs de la concentration moyenne des sulfites dans les différents aliments, les valeurs non détectées étaient considérées d'être égale à la moitié de la limite de détection (3 mg /kg).

Le tableau 25 présente le nombre des analyses effectuées pour chaque type d'aliment, ainsi que la concentration moyenne en sulfites de différents types d'aliments analysés. Les taux maximaux d'utilisations autorisés (TMA) tels qu'ils sont indiqués dans le DGSFA et la NN ainsi que les rendements d'extraction pour les aliments analysés sont également présentés dans ce tableau.

Les résultats montrent que les concentrations moyennes en sulfites des aliments analysés sont, dans 62% des échantillons, supérieures aux TMA de la NN; alors qu'elles sont inférieures aux TMA du DGSFA. En fait, les valeurs de ces concentrations sont situées entre la limite de détection et la moitié du TMA du DGSFA à l'exception des biscuits et de certains fruits secs (bizir et krikri) dont les valeurs sont proches (ou égales) aux TMA du DGSFA. De plus les concentrations en sulfites des aliments cuisinés sont nettement plus faibles que leurs TMA tels qu'ils sont indiqués dans le DGSFA et dans la NN. Enfin, six échantillons (2 mixed nuts, 2 cacahuètes et 2 crackers), soit 6% des produits analysés présentent des concentrations en sulfites supérieures à leurs TMA respectives tels qu'ils sont indiqués dans le DGSFA. Les valeurs de ces concentrations dans les mixed nuts, cacahuètes et crackers sont respectivement de 120%, 120% et 300% de ce taux.

Tableau 25. Nombre d'analyse, taux maximaux d'utilisation autorisés, concentration analytique moyenne et le pourcentage du rendement d'extraction des sulfites.

Catégorie alimentaire	Types d'aliments	Nombre d'échantillons	DGSFA TMA (Codex Alimentarius Commission, 1997) mg/kg	NN TMA (Libnor, 2003) mg/kg	Taux analytiques moyens mg/kg	Rendement d'extraction En pourcentage
Légumes secs	Haricot	2	2500	400	10	80
Pain et céréales	Biscuits bar	4	300	50	210	95
Pain et céréales	Biscuits pack	4	300	50	276	95
Pain et céréales	Pains	8	100	0	1.5	77
Sucreries	Cakes	10	300	0	100	86
Sucreries	Candies	4	2000	50	311	75
Fruits et jus de fruits	Jus de fruits	8	50	20	34	98
Sucreries	Chewing gums	4	2000	0	66	75
Légumes secs	Pois chiche	6	2500	400	12	83
Sucreries	Chocolat	4	2000	0	1.5	60
Pain et céréales	Crackers	2	50	50	195	87
Viandes	Burger viandes	2	450	450	1.5	58
Sucreries	Confitures	4	500	100	200	86
Fruits secs	Mixed nuts	2	500	500	600	85
Fruits secs	Bizir	2	500	500	500	83
Fruits secs	Krikri	2	500	500	450	88
Fruits secs	Cacahuète	2	500	500	600	80
Pain et céréales	Potato chips	8	200	50	35	88
Pain et céréales	Pommes frites	2	100	100	1.5	60
Viandes	Saucissons	2	500	450	1.5	89
Sucreries	Sucres	4	70	15	12	85
Pain et céréales	Toasts	8	0	0	1.5	76
Total		94				

TMA: Taux Maximaux d'utilisation autorisés.

DGSFA: Draft General of Food Additifs.

NN: Norme Nationale.

4.1.3- Niveaux du BHA retrouvés dans les aliments analysés «tels que consommés»

La méthode utilisée pour la recherche et le dosage du BHA a une courbe de calibration linéaire pour des concentrations allant de 1 mg/l à 0.5 g/l avec un coefficient de régression linéaire ($r(2) > 0.999$) dans la zone de ces concentrations. La sensibilité de cette méthode est de 0.1mg de BHA/l de solution d'essai avec une limite de détection de 1 mg de BHA/l de solution d'essai. Les coefficients de variabilité à trois différents niveaux (bas, médian et haut) sont $< 8\%$. Les rendements d'extraction du BHA vont de 53% (chocolat) à 95% (biscuits) ceci en fonction de la matrice alimentaire utilisée.

Au total 107 aliments ont été échantillonnés pour la détermination de leur contenu en BHA. Les aliments consommés tels que achetés représentaient la totalité des échantillons. Le BHA a été détecté dans 90 (84%) aliments analysés et que tous ces aliments sont autorisés à contenir du BHA selon le DGSFA alors que 93 (87%) des aliments le sont selon la NN. Dans ce cas en appliquant les recommandations IPCS/Gems/Food dans le calcul des valeurs de la concentration moyenne du BHA dans les différents aliments, les valeurs non détectées étaient considérées d'être égale à la moitié de la limite de détection (1 mg /kg).

Le tableau 26 présente le nombre d'analyses effectuées pour chaque type d'aliment, ainsi que la concentration moyenne en BHA de différents types d'aliments analysés. Les taux maximaux d'utilisations autorisés (TMA) tels qu'ils sont indiqués dans le DGSFA et la NN ainsi que les rendements d'extraction pour les aliments analysés sont également présentés dans ce tableau.

Les résultats montrent que dans 37% des échantillons, les concentrations moyennes en BHA des aliments analysés sont supérieures aux TMA de la NN alors qu'elles étaient inférieures aux TMA du DGSFA. En fait, ces concentrations sont situées entre la limite de détection et la moitié du TMA du DGSFA à l'exception des biscuits, des cakes, des croissants et des doughnuts dont les valeurs approchaient (ou été égales) des TMA du DGSFA. Enfin, deux échantillons de crackers, soit 2% des produits analysés présentent des concentrations en BHA supérieures au TMA tels qu'il est indiqué dans le DGSFA. Les valeurs de ces concentrations sont 200% ce taux.

Tableau 26. Nombre d'analyse, taux maximaux d'utilisation autorisés, concentration analytique moyenne et pourcentage du rendement d'extraction du BHA.

Catégorie alimentaire	Types d'aliments	Nombre d'échantillons	DGSFA TMA (Codex Alimentarius Commission, 1997) mg/kg	NN TMA (Libnor, 2003) mg/kg	Taux analytiques moyens mg/kg	Rendement d'extraction En pourcentage
Pain et céréales	Biscuits bar	4	100	28	100	95
Pain et céréales	Biscuits pack	4	100	28	100	95
Pain et céréales	Pain	8	50	2	10	76
Graisses ajoutées	Beurre	2	200	200	0.5	67
Sucreries	Cakes	10	25	10	20	80
Sucreries	Candies	4	100	0	50	65
Pain et céréales	Crackers	2	50	28	100	90
Sucreries	Chewing gum	4	1000	400	75	65
Sucreries	Chocolat	4	100	60	50	53
Pain et céréales	Cornflakes	8	50	2	15	70
Snacks	Croissants	6	25	40	20	87
Snacks	Doughnuts	4	25	20	20	85
Sucreries	Ice cream	3	0	0	0.5	89
Snacks	Manakeesh	4	50	18	0.5	85
Graisses ajoutées	Mayonnaise	2	140	200	0.5	63
Fruits secs	Mixed nuts	2	200	200	20	68
Fruits secs	Bizir	2	200	200	20	70
Fruits secs	Krikri	2	200	200	20	70
Fruits secs	Cacahuète	2	200	200	20	69
Graisses ajoutés	Huile d'olive	2	0	0	0.5	89
Pain et céréales	Potato chips	8	200	70	55	65
Boissons	Sodas	10	1000	0	5	76
Graisses ajoutées	Tahineh	2	140	0	0.5	90
Pain et céréales	Toasts	8	50	8	10	76
Poissons	Thon en conserve	4	200	0	0.5	90
Total		107				

TMA: Taux Maximaux d'utilisation autorisés.

DGSFA: Draft General of Food Additifs.

NN: Norme Nationale.

4.1.4- Niveaux du BHT retrouvé dans les aliments analysés «tels que consommés»

La méthode utilisée pour la recherche et le dosage du BHT a une courbe de calibration linéaire pour des concentrations allant de 1 mg/l à 0.5 g/l avec un coefficient de régression linéaire ($r(2) > 0.99$) dans la zone de ces concentrations. La sensibilité de cette méthode est de 0.1mg de BHT/l de solution d'essai avec une limite de détection de 1 mg de BHT/l de solution d'essai. Les coefficients de variabilité à trois différents niveaux (bas, médian et haut) sont $< 0.9\%$. Les rendements d'extraction du BHT vont de 53% (crackers) à 95% (biscuits) ceci en fonction de la matrice alimentaire utilisée.

Au total 107 aliments ont été analysés pour déterminer leur contenu en BHT. Les aliments consommés tels que achetés représentaient la totalité des échantillons. De plus le BHT n'a été détecté que dans 8 (7%) aliments analysés y compris 4 (3.5%) aliments non autorisés selon le DGSFA et la NN. Dans ce cas en appliquant les recommandations IPCS/Gems/Food pour le calcul des concentrations moyennes en BHT des aliments analysés, deux scénarios ont été élaborés: le premier considère que les valeurs non détectées sont égales à zéro (scénario 1), alors que le second considère que ces valeurs sont égales à la limite de détection (1mg /kg) (scénario 2).

Le tableau 27 présente le nombre d'analyses effectuées pour chaque type d'aliment, ainsi que la concentration moyenne en BHT de différents types d'aliments analysés. Les taux maximaux d'utilisations autorisés (TMA) tels qu'ils sont indiqués dans le DGSFA et la NN ainsi que les rendements d'extraction pour les aliments analysés sont également présentés dans ce tableau.

Les résultats montrent que les concentrations du BHT dans les aliments autorisés sont inférieures aux TMA du DGSFA et de la NN. En fait, ces valeurs sont situées entre la limite de détection et la moitié du TMA de la NN.

Tableau 27. Nombre d'analyse, taux maximaux d'utilisation autorisés, concentration analytique moyenne et taux de recouvrement du BHT.

Catégorie alimentaire	Types d'aliments	Nombre d'échantillons	DGSFA TMA (Codex Alimentarius Commission, 1997) mg/kg	NN TMA (Libnor, 2003) mg/kg	Taux analytiques moyens mg/kg (1)	Taux analytiques moyens mg/kg (2)	Rendement d'extraction en Pourcentage
Pain et céréales	Biscuits bar	4	25	14	0	0	95
Pain et céréales	Biscuits pack	4	25	14	0	1	95
Pain et céréales	Pain	8	50	2	0	1	76
Graisses ajoutées	Beurre	2	200	100	0	1	67
Sucreries	Cakes	10	25	5	0	1	80
Sucreries	Candies	4	0	0	50	50	65
Sucreries	Chewing gums	4	750	400	220	220	90
Pain et céréales	Cornflakes	8	50	0	0	1	65
Pain et céréales	Crackers	2	50	14	0	1	53
Snacks	Croissant	6	25	20	0	1	70
Snacks	Doughnuts	4	25	10	0	1	87
Sucreries	Ice cream	3	0	0	0	1	85
Snacks	Manakeesh	4	200	7	0	1	89
Graisses ajoutées	Mayonnaise	2	60	0	0	1	85
Fruits secs	Mixed nuts	2	100	0	0	1	63
Fruits secs	Bizir	2	100	0	0	1	68
Fruits secs	Krikri	2	100	0	0	1	70
Fruits secs	Cacahuète	2	100	0	0	1	70
Graisses ajoutées	Huile d'olive	2	0	0	0	1	69
Pain et céréales	Potato chips	8	200	35	0	1	89
Boissons	Sodas	10	200	0	0	1	65
Graisses ajoutées	Tahineh	2	100	0	0	1	76
Pain et céréales	Toasts	8	50	4	0	1	90
Poissons	Thon en conserve	4	100	0	0	1	76
Total		107					

TMA: Taux Maximaux d'utilisation autorisés.

DGSFA: Draft General of Food Additifs.

DUE: Directive de l'Union Européenne.

(1): Pour le calcul, les niveaux non détectés sont assumés d'être égales à zéro.

(2): Pour le calcul, les niveaux non détectés sont assumés d'être égales à la limite de détection.

4.2- les mycotoxines

Les limites de détection des méthodes utilisées pour le dosage des différentes mycotoxines sont présentées dans le tableau 28. Ce tableau montre que ces limites de détection sont variables en fonction de la méthode utilisée et de la matrice alimentaire. De plus la description des données analytiques obtenues pour l'OTA, les aflatoxines BG et le DON est présentée dans les tableaux 29, 30 et 31. Cette description inclut pour chaque type d'aliment, le nombre d'échantillons analysés, le nombre (pourcentage) des valeurs non détectées, les niveaux moyens de la contamination et leur déviation standards ainsi que la valeur maximale du niveau détecté. Il est important de noter que les données de contamination qui ont été obtenus pour les céréales et les produits à base de céréales représente une couverture de presque la totalité (>99%) de ces aliments tels que déclarés d'être consommés par les deux groupes de population étudiés. Finalement il a été impossible de connaître la source des denrées alimentaires ou tout au moins celle de la matière première (comme le blé rentrant dans la compositions des produits à base de céréales) afin d'identifier la source de contamination vu l'absence de ce type d'information des données communiquées par les laboratoires. Cependant une synthèse de l'importation des céréales à partir des données d'importation/exportation communiquées par la chambre de commerce et d'industrie libanaise pour les céréales est présentée en annexe 6.

Tableau 28. Limites de détection des mycotoxines alimentaires recherchés.

Limite de détection (LOD) µg/kg d'aliment frais			
Produits alimentaires	Ochratoxine A (OTA)	Aflatoxines BG	Déoxynivalénol (DON)
Céréales	0.5 or 1 ^a	0.5-0.9	1.25-30 ^a
Produits à base de céréales	0.5 or 1 ^a	0.5-0.9	1.25-30 ^a
Riz, Semoule	0.25	0.5	^b -
Légumineuses	0.05	0.5	^b -
Fruits secs	0.5	0.5	^b -

^a Limite of détection variable en fonction du laboratoire où s'est déroulé l'analyse.

^b - le tiret dénote qu'aucune analyse n'a été réalisée sur ce type d'aliment.

4.2.1- Niveaux d'ochratoxine A retrouvés dans les aliments «tels que consommés»

Les résultats présentés dans le tableau 29 montrent que 277/359 échantillons, soit plus de 77% des échantillons présentent des niveaux de contamination inférieurs à la limite de détection. 80 (21%) échantillons présentent des niveaux de contamination compris entre la limite de détection et 3 µg/kg correspondant à la limite réglementaire fixée au niveau de la Communauté Européenne pour les produits destinés à la consommation humaine (EC, 2001). Deux échantillons (moins que 1% des échantillons) présente une teneur supérieure à cette limite. Il s'agit de deux échantillons de biscuits produits localement ayant une concentration de 5 µg/kg.

Tableau 29. Description des données de contamination de l'OTA.

Aliment	Nombre de valeurs mesurées	Nombre (pourcentage) de valeurs non détectées	Facteur de Conversion	Niveau moyen de la contamination par l'OTA (µg/kg) Scénario 1 ^a	Niveau moyen de la contamination par l'OTA (µg/kg)± DS scénario 2 ^b	Niveau maximal d' OTA (µg/kg)
Pois cuit	13	13(100%)	0.85	0.00	0.04	0.00
Biscuits	20	16(80%)	^d -	0.47	0.87	5.00
Pain	40	24(60%)	^d -	0.55	0.83	2.00
Gâteau	20	14(70%)	^d -	0.27	0.64	1.25
Pois chiche moutabal	14 ^c	14(100%)	0.75	0.00	0.04	0.00
Pois chiche cuit	14 ^c	14(100%)	0.50	0.00	0.03	0.00
Chocolat	7	7(100%)	^d -	0.00	0.05	0.00
Cornflakes	10	8(80%)	^d -	0.12	0.56	1.00
Croissant	20	14(70%)	^d -	0.33	0.68	1.30
Doughnuts	20	16(80%)	^d -	0.12	0.50	1.00
Falafel	14 ^c	14(100%)	0.46	0.00	0.02	0.00
Kaak assrounieh	20	12(60%)	^d -	0.46	0.76	2.10
Kaak tea	20	12(60%)	^d -	0.48	0.78	2.00
Lahm bi ajin	20	15(75%)	^d -	0.16	0.77	1.00
Lentilles cuites	13	11(84%)	0.50	0.08	0.12	1.00
Manakeesh	20	15(75%)	^d -	0.26	0.63	1.15
Viande kibbeh	13	8(61%)	0.10	0.02	0.03	1.00
Fruits secs	20	20(100%)	^d -	0.00	0.50	0.00
Pâtes à sauce rouge	4	4(100%)	0.75	0.00	0.37	0.00
Petit pois	12	12(100%)	0.85	0.00	0.04	0.00
Pizza	20	15(75%)	^d -	0.25	0.75	1.50
Riz cuit	13 ^c	13(100%)	^d -	0.00	0.25	0.00
Riz à viande	13 ^c	13(100%)	0.75	0.00	0.18	0.00
Toast	20	14(70%)	^d -	0.50	0.80	2.00

^a DS: Déviation Standard.

^b Scénario 1: les valeurs non détectées ont été remplacées par zéro.

^c Scénario 2: valeurs non détectées ont été remplacées par la limite de détection.

^d le même échantillon d'aliments bruts a servi pour la dérivation des valeurs de contamination de plusieurs aliments « tels que consommés » après l'application de différents facteurs de conversion.

^e le tiret signifie que l'usage d'un facteur de conversion n'était pas nécessaire pour dériver la valeur analytique de l'aliment.

4.2.2- Niveaux d'aflatoxines BG retrouvés dans les aliments «tels que consommé »

Les résultats présentés dans le tableau 30 montrent que 999/1160 échantillons, soit plus de 86% des échantillons présentent des niveaux de contamination inférieurs à la limite de détection. 151 (13%) échantillons présentent des niveaux de contamination compris entre la limite de détection et 4 µg/kg correspondant à la limite réglementaire fixée au niveau national et à celui de la Communauté Européenne pour les produits destinés à la consommation humaine (LIBNOR, 2004/ EC, 2001). Uniquement dix échantillons (moins que 1% des échantillons) présente une teneur supérieure à cette limite. Il s'agit de deux échantillons de chocolats contenant des fruits secs produits localement et ayant une teneur en aflatoxines BG de 6 µg/kg. Il n'a pas été possible de déterminer précisément si cette valeur est due à la composante chocolat, à la composante fruits secs, voire aux deux. Les autres échantillons sont des fruits secs importés qui ont un niveau de contamination en aflatoxines BG de 8 µg/kg correspondant au double de la limite nationale.

Tableau 30. Description des données de contamination des aflatoxines BG.

Aliment	Nombre de valeurs mesurées	Nombre (pourcentage) de valeurs non détectées	Facteur de Conversion	Niveau moyen de la contamination par les aflatoxines BG (µg/kg) Scénario 1 ^a	Niveau moyen de la contamination par les aflatoxines BG (µg/kg) scénario 2 ^b	Niveau maximal des aflatoxines BG (µg/kg)
Pois cuit	100	100(100%)	0.85	0.00	0.42	0.00
Biscuits	70	63(90%)	^d -	0.17	0.68	2.00
Pain	80	67(83%)	^d -	0.17	0.96	1.30
Gâteau	30	27(90%)	^d -	0.19	0.64	1.40
Pois chiche moutabal	100 ^c	100(100%)	0.75	0.00	0.37	0.00
Pois chiche cuit	100 ^c	100(100%)	0.50	0.11	0.25	0.00
Chocolat	30	27(90%)	^d -	0.33	0.78	6.00
Cornflakes	30	30(100%)	^d -	0.00	0.5	0.00
Croissant	30	27(90%)	^d -	0.10	0.56	1.20
Doughnuts	30	25(83%)	^d -	0.20	0.61	1.50
Falafel	100 ^c	100(100%)	0.46	0.00	0.23	0.00
Kaak assrounieh	40	32(80%)	^d -	0.14	0.66	1.30
Kaak tea	40	32(80%)	^d -	0.33	0.66	2.10
Lahm bi ajin	40	32(80%)	^d -	0.11	0.65	1.10
Lentilles cuites	130	130(100%)	0.50	0.00	0.25	0.00
Manakeesh	40	32(80%)	^d -	0.10	0.68	1.00
Viande kibbeh	40	40(100%)	0.10	0.00	0.05	0.00
Fruits secs	200	120(60%)	^d -	1.00	1.33	8.00
Pâtes à sauce rouge	70	70(100%)	0.75	0.00	0.35	0.00
Pizza	20	16(80%)	^d -	0.13	0.74	1.50
Toast	40	29(72%)	^d -	0.35	0.71	2.00

^a Scénario 1: les valeurs non détectées ont été remplacées par zéro.

^b Scénario 2: valeurs non détectées ont été remplacées par la limite de détection.

^c le même échantillon d'aliments bruts a servi pour la dérivation des valeurs de contamination de plusieurs aliments « tels que consommés » après l'application de différents facteurs de conversion.

^d- le tiret signifie que l'usage d'un facteur de conversion n'était pas nécessaire pour dériver la valeur analytique de l'aliment

4.2.3- Niveaux de DON retrouvés dans les aliments «tels que consommés»

Les résultats présentés dans le tableau 31 montrent que 116/260 échantillons, soit 45% des échantillons présentent des niveaux de contamination supérieurs à la limite de détection. 134 (51%) échantillons présentent des niveaux de contamination compris entre la limite de détection et 500 µg/kg. Uniquement dix échantillons (4% des échantillons) présentent une teneur comprise entre 500 µg/kg et 2000 µg/kg correspondant à la limite réglementaire fixée au niveau de la Communauté Européenne pour les produits destinés à la consommation humaine (EC, 2000). Ceux-ci sont des échantillons de pains ayant une teneur en DON située entre de 500 µg/kg et 700 µg/kg.

Tableau 31. Description des données de contamination du déoxynivalénol (DON).

Aliment	Nombre de valeurs mesurées	Nombre (pourcentage) de valeurs non détectées	Facteur de Conversion	Niveau moyen de la contamination par le DON (µg/kg)	Niveau maximal du DON (µg/kg)
Biscuits	20	10(50%)	^a -	21	70
Pain	40	18(45%)	^a -	176	700
Gâteaux	20	5(25%)	^a -	70	100
Cornflakes	20	6(30%)	^a -	63	100
Croissant	20	10(50%)	^a -	56	120
Doughnuts	20	8(40%)	^a -	70	130
Kaak assrounieh	20	10(50%)	^a -	48	130
Kaak tea	20	10(50%)	^a -	95	220
Lahm bi ajin	20	9(45%)	^a -	86	240
Manakeesh	20	10(50%)	^a -	88	300
Pizza	20	10(50%)	^a -	85	200
Toast	20	10(50%)	^a -	48	120

a- le tiret signifie que l'usage d'un facteur de conversion n'était pas nécessaire pour dériver la valeur analytique de l'aliment.

5. Evaluation scientifique des risques

5.1- Présentation des résultats

Les résultats sont décrits en deux parties. La première partie traitera des additifs alimentaires et la deuxième des mycotoxines. Dans chacune de ces parties, les résultats sont, pour chaque substance étudiée, présentés sous forme de fiche synthétique en suivant les étapes du processus d'évaluation des risques. Chaque fiche se présente comme suit:

Aperçu général: un rappel synthétique sur la nature du danger, ses caractéristiques physicochimiques, ainsi que son usage et son mécanisme d'action (pour les additifs alimentaires) est présenté dans cette partie.

Evaluation et caractérisation du danger: un rappel synthétique des connaissances toxicologiques et des VTR relatives à l'élément étudié est présenté dans cette partie. Cependant il est important de noter qu'uniquement des VTR définies pour des expositions chroniques, ou subchroniques, de la population générale sont présentées dans cette recherche.

Evaluation de l'exposition: des tableaux d'estimation des expositions moyennes et celles des forts quantiles sont présentés dans cette partie. Les tranches d'âge prises en compte sont les enfants de 9-14 ans et les adolescents «normo-évaluants» de 15-18 ans. Il faut rappeler que l'apport total pour les forts quantiles de consommation et d'exposition est calculé pour chaque individu sur la base de son poids corporel réel mesuré. Cette valeur ne correspond pas à la somme des forts quantiles de consommation ou d'exposition de chaque groupe d'aliment pris en compte, car ce ne sont pas les mêmes forts consommateurs qui sont caractérisés pour chaque groupe d'aliment. La contribution moyenne, exprimée en pourcentage, de chaque catégorie alimentaire à l'exposition totale des substances étudiées est présentée dans le tableau. Par ailleurs, il est précisé dans le texte quand cela est nécessaire, le ou les vecteurs majoritairement contributeurs à cette exposition.

Caractérisation du risque: un tableau de synthèse des pourcentages de contribution du niveau moyen, du P75 et du P95 de la population exposée aux VTR établies par les comités d'experts scientifiques JECFA et SCF est présenté. Le pourcentage d'individus exposés au-dessus de la VTR est également présenté dans ce tableau.

5.2- les additifs alimentaires

5.2.1- L'acide benzoïque et ses sels de sodium, de potassium et de calcium

(E210 : acide benzoïque (C_6H_5COOH), E211 : benzoate de sodium (C_6H_5COONa), E212 : benzoate de potassium (C_6H_5COK), E213 : benzoate de calcium ($(C_6H_5CO)_2Ca$)).

DJA : 5mg/ kg de poids corporel /jour (JECFA, SCF)

a- Aperçu général

L'acide benzoïque et ses sels se présentent sous forme de solides blancs (BF Kalama, 1999). L'acide benzoïque est légèrement soluble dans l'eau alors que la solubilité dans l'eau de ses sels (benzoates de sodium) est environ 200 fois plus élevée (Maki et Suzuki, 1985).

L'acide benzoïque et ses sels sont des antibactériens et des antifongiques efficaces. Ils sont très utilisés pour protéger les denrées contre les moisissures et les levures. Ces composés n'agissent qu'aux pH inférieurs à 4 car c'est la forme non dissociée qui est active (Davidson, 1991). Par la suite l'usage de ces additifs est limité aux produits qui sont de nature acide tels que les boissons non alcooliques, les jus de fruits, les salades, les produits laitiers, les confitures..... En fait, plus le pH est bas plus l'acide benzoïque est actif, en conséquence la quantité d'additif à introduire dans l'aliment est moins importante (Chipley, 1983). Ces additifs sont fréquemment associés aux sorbates car il existe une synergie importante entre les deux types de composés (Davidson, 1991). Leur utilisation comme conservateurs est réglementée.

Le mécanisme d'action de ces composés n'est pas complètement élucidé à ce jour. Cependant certains auteurs suggèrent qu'ils inhibent le transport des substrats, la phosphorylation oxydative du système de transport, la capture des acides aminés et certains enzymes dans les cellules microbiennes comme celles qui contrôlent le métabolisme de l'acide acétique et la phosphorylation oxydative (Maga et Anthony, 1995).

b- Identification et caractérisation du danger

Après ingestion l'acide benzoïque et ses sels sont rapidement résorbés dans les voies digestives et métabolisés dans le foie par conjugaison avec la glycine pour donner l'acide hippurique (Fig.10)(Fuji et al., 1991).

Ce dernier est rapidement éliminé dans les urines: 75-100% de ces additifs sont éliminés sous forme d'acide hippurique dans les premières 6 heures suivant leur administration. De plus lors de l'administration de fortes doses de ces additifs, le reste des benzoates non excrétés sous forme d'acide hippurique suite à une déplétion en glycine peut être conjugué avec l'acide glucuronique et excrété ensuite dans les urines (WHO (b), 1996). En raison de la rapidité du métabolisme et de l'excrétion, il n'y a vraisemblablement pas d'accumulation des benzoates ou de leurs métabolites (Kubota et Ishizaki, 1991, Kubota et al. 1988).

contre l'administration à 1000 mg/kg p.c./j chez la rate gravide entre le 9^{ème} et le 11^{ème} jour de gestation a permis de mettre en évidence un léger accroissement des morts *in utero* et une réduction du poids des fœtus ainsi que quelques malformations. Aucun effet tératogène n'a été enregistré sur l'embryon de poulet à la dose de 5 mg/œuf (Dawson et al., 1996; Verrett et al., 1980). En ce qui concerne les benzoates, plusieurs études ont été menées sur un certain nombre d'espèces (rats, souris, lapins et hamsters) et si des effets embryotoxiques et foetotoxiques ou même des malformations ont été observées, c'est uniquement à des doses déjà toxiques pour les mères (WHO, 1996 (b)). Une étude d'alimentation sur des rats a permis de fixer à environ 1310 mg/kg p.c. par jour la DSEO (Hardin et al., 1987). Les données concernant ses divers précurseurs confirment l'hypothèse selon laquelle l'acide benzoïque n'a vraisemblablement pas d'effets indésirables sur la reproduction aux doses qui ne sont pas toxiques pour la mère (WHO, 1999 (c)).

Mutagenèse: L'acide benzoïque a donné des résultats négatifs dans un certain nombre de tests sur bactéries ou cellules mammaliennes, mais les tests *in vivo* sont inexistants (Zieger et al., 1988; Nakamura et al., 1987; Ishidate et al., 1984). Le benzoate de sodium s'est également révélé inactif dans le test d'Ames avec ou sans activation métabolique (Priva et al., 1991; Ishidate et al., 1984; McCann et al., 1975), mais il a donné des résultats systématiquement positifs sur les cellules mammaliennes (Ishidate et al., 1988; Ishidate et al., 1984). Dans une étude *in vivo* (test de létalité dominante chez le rat) on a également obtenu un résultat positif (WHO, 2000(a)). De plus le benzoate de sodium induit des aberrations chromosomiques dans les cellules de rat et possède une activité mutagène révélée par le REC essais. Dans ces conditions, on ne peut pour l'instant exclure que le benzoate de sodium ait une activité génotoxique (WHO, 2000(a)).

Effets chez l'Homme: l'homme présente une grande échelle de tolérance au benzoate de sodium (dose de 6 g à 40 g) (WHO, 1974). Les effets observés chez des volontaires sont essentiellement d'ordre gastro-intestinal (brûlure d'estomac notamment) vraisemblablement dus au déséquilibre acido-basique. L'ingestion de 0,4 g d'acide benzoïque pendant 62 jours n'a entraîné aucune manifestation toxique chez un groupe de 9 volontaires (WHO, 2000(a)). Différents tests effectués sur la peau, les yeux et diverses muqueuses d'animaux montrent que l'acide benzoïque a un faible pouvoir irritant (Brasch et al., 1993). Chez l'homme il est, également, faiblement irritant (Lahti et Hannuksela, 1981). Des tests de sensibilisation conduits chez des volontaires n'ont pas montré de signe de capacités allergisantes ou sensibilisantes (Bindslev-Jensen, 1998). Par contre les personnes souffrant de rhinite chronique, d'urticaire ou d'asthme voient leurs symptômes exacerbés après ingestion des benzoates (WHO, 2000(a); Clemmensen et Hjorth, 1982).

La JECFA a établi une **DJA** de 5 mg/ kg p.c./jour pour l'acide benzoïque et ses sels en se basant sur l'étude portée sur quatre générations (DSEO de 500mg / kg p.c. /jour (c'est la dose la plus élevée qui a été testée), facteur de sécurité = 100) (WHO, 1997(b)). Ceci est soutenu par deux études à court terme où aucun effet nocif n'a été observé à des doses plus élevées que 647-825mg / kg p.c. /jour, et par le fait qu'aucun effet adverse sérieux n'a été rapporté après l'usage thérapeutique de benzoate de sodium à des doses de 250-500mg /kg p.c. par jour chez l'homme, bien qu'une anorexie et des vomissements occasionnelles ont été observés. Cette valeur a été également reprise par la SCF (Verger et al., 1998).

c- Evaluation de l'exposition

Les résultats montrent que tous les enfants et tous les adolescents sont des consommateurs des benzoates.

Les résultats présentés aux tableau 32 et 33 montrent que l'exposition moyenne aux benzoates pour le groupe totale des enfants est de 2.2 mg/kg p.c./j et de 1.6 mg/kg p.c./j pour le groupe total des adolescents. Au 75ème percentile et au 95ème percentile, l'exposition théorique calculée est respectivement de 3.1 mg/kg p.c./j et de 4 mg/kg p.c./j pour le groupe total d'enfants et respectivement de 2 mg/kg p.c./j et de 3.6 mg/kg p.c./j pour le groupe total d'adolescents.

Les principaux contributeurs et le pourcentage de contribution aux expositions alimentaires des benzoates pour les 5 % des consommateurs au fort quantile d'expositions sont présentés dans les tableaux 34 et 35. Les résultats montrent que les principales sources alimentaires de l'exposition aux benzoates sont les jus de fruit et les sodas avec respectivement plus que 50 % de contribution par ces deux aliments pour les deux groupes de population étudiés. De plus les pois chiches (pour les enfants) et le thon en conserves (pour les adolescents) sont une source importantes d'apports alimentaires en benzoates avec plus que 20% de contribution pour chacun de ces deux aliments. Finalement, les autres aliments analysés ne contribuent que faiblement (apports < 10%) à cette exposition.

d- Caractérisation du risque

Le tableau 36 montre que, pour les benzoates, le niveau moyen, le percentile 75 (P75) et le percentile 95 (P95) de la population exposée sont inférieurs à la DJA fixée à 5 mg/kg p.c./j par le JECFA/SCF. Les expositions à ces trois niveaux de la distribution sont respectivement de 44%, 62% et 80% de la DJA pour le groupe d'enfants et de 32%, 40% et 72% de la DJA pour le groupe d'adolescents.

Le pourcentage des enfants ayant une exposition dépassant la DJA est de 3%. Aucun (0%) des adolescents n'a une exposition qui dépasse la DJA.

Finalement en comparant les deux groupes de sujets définis au départ, les enfants ayant un âge situé entre 9 et 14 ans étaient les plus exposé aux benzoates lorsque l'exposition est exprimée en kg du poids corporel ($p < 0.01$ entre les deux groupes).

5.2.2- Les sulfites

(E220: dioxyde de soufre, anhydride sulfureux (SO_2); E221: sulfites de sodium (Na_2SO_3); E222: bisulfite, sulfite acide de sodium (NaHSO_3); E223: disulfite de sodium, métabisulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$); E224: disulfite de potassium, métabisulfite de potassium ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$); E226: sulfite de calcium (CaSO_3); E227: bisulfite de calcium ($\text{Ca}(\text{HSO}_3)_2$); E228: bisulfite de potassium (KHSO_3))

DJA: 0.7 mg/ kg de poids corporel /jour exprimé en SO_2 (JECFA, SCF)

a- Aperçu général

Utilisés comme antiseptique, bactériostatique et/ou bactéricide, les sulfites préviennent le développement des bactéries acétiques et lactiques. Ils sont moins efficaces contre les levures. Ils possèdent un pouvoir réducteur élevé. De ce fait ils protègent les préparations contre le brunissement procédant des mécanismes enzymatiques ou non enzymatiques. Les sulfites sont largement utilisés pour le blanchiment des coques dures de fruits (noix par exemple) mais ne pénètrent pas dans la partie consommable des fruits. Les sulfites améliorent également les propriétés élastiques des pâtes (Denil, 2004; EUFIC, 2004; Codex Alimentarius, 1999 (a); Davidson, 1991; Hanssen, 1987; Furia, 1980). Les effets des sulfites dans les aliments sont liés au SO_2 et donc à la vitesse à laquelle l'additif va libérer le sulfure lié (Parish et Davidson, 1989).

Les sulfites agissent par plusieurs mécanismes d'action. Ils inhibent la polyphénol oxydase, réagissent avec l'oxygène et diminuent l'oxydation de composés oxydables, et se combinent aux composés carbonylés prolongeant ainsi la période d'induction de la réaction de Maillard et repoussant d'autant l'apparition du brunissement. Ils coupent les liaisons intercalaires des protéines (en particulier du gluten) au niveau des ponts disulfures des cystéines en formant des résidus thiols et thiosulfonates (Ough, 1993).

b- Identification et caractérisation du risque

Après ingestion les sulfites sont rapidement absorbés dans les voies digestives avec des pourcentages allant jusqu'à 70-95% (Constantin et al., 1996). Ils sont principalement métabolisés dans le foie par la sulfite oxydase pour donner les sulfates qui sont éliminés par voie rénale (Constantin et al., 1996, WHO, 1974). De plus, le dioxyde de soufre est fortement fixé aux protéines plasmatiques sous forme de S-sulfonates. Ces derniers sont graduellement éliminés du sang par un mécanisme qui à présent reste non élucidé (Wever, 1985). Les sulfites sont des forts inhibiteurs de certaines déshydrogénases tels que la lactate déshydrogénase et la malate déshydrogénase: 50% des déshydrogénases sont inhibés avec des concentrations de sulfites de l'ordre de 10^{-5}M (Chamulitrat, 1999; Wever, 1986; WHO, 1974). Les sulfites réagissent avec un bon nombre de composés tels que les sucres, les acides gras et les protéines, donnant des dérivés thiosulfatés, sulfonates et sulfoxydés dont on ne connaît pas la toxicité. Ceci fait l'objet de travail en cours. Les formes liés des sulfites, résultant de l'interaction entre les sulfites avec les sucres, les acides gras et les protéines, tels que l'acétaldéhyde hydroxysulfonate (forme majeure et très stable des sulfites liés dans les aliments et boissons fermentés) sont éliminées sous forme de sulfites par voie urinaire (Hui et al., 1989). En raison de la rapidité du métabolisme et de l'excrétion, il n'y a vraisemblablement pas d'accumulation des sulfites ou de leurs métabolites dans l'organisme (Gibson et Strong, 1974).

La toxicité aiguë par voie orale des sulfites est faible: la DL50 par voie orale est supérieure à 750 mg/kg p.c. chez les souris et les lapins (WHO, 1974).

Les études **de toxicité à court terme** des sulfites chez les rats ont révélé la présence d'un retard de la croissance ainsi que des modifications histopathologiques au niveau de l'estomac après l'administration des doses élevées dans l'alimentation (>1%) pendant 8 semaines. Les modifications histopathologiques de l'estomac incluaient une irritation locale, une hyperplasie, une inflammation et du sang dans les selles. Les autres effets observés étaient les suivants: une anémie, un élargissement de la rate, une hématopoïèse, la diarrhée et une hyperleucocytose (WHO, 1974).

Les études de toxicité subchronique effectuées sur des rats rendus déficients en oxydase (qui sont un meilleur modèle de l'homme) ont montré qu'à forte dose les sulfites pouvaient induire une anémie et une carence en thiamine suite à une destruction de la thiamine et une réaction sur la cyanocobalamine présentes dans les aliments ou le colon. Ces effets ne sont donc pas attribuables à une exposition systématique aux sulfites (Gunnison et al., 1980).

On ne dispose que d'un nombre limité d'études portant sur **la toxicité à long terme** des sulfites et il n'existe pas d'études qui soient spécialement consacrées à la recherche d'effets cancérogènes éventuels (WHO, 2000 (b); WHO, 1974). Les études d'alimentation effectuées pendant deux ans chez des rats ont montré une absence d'effet sur la croissance, la consommation alimentaire, le gain de poids corporel, le poids des organes, le taux de mortalité ainsi que sur la fonction de reproduction et de lactation lorsque les sulfites sont administrés à des doses $\leq 0.075\%$ d'équivalent en dioxyde de soufre dans l'alimentation. De plus d'autres études de toxicité à long terme n'ont montré aucun effet significatif sur l'ensemble des paramètres biologiques et les grandes fonctions physiologiques chez les souris, le rat, le lapin et le porc. Ces études n'ont également pas permis de mettre en évidence d'effet cancérogène pour les sulfites (WHO, 2000 (b); WHO, 1974).

Toxicité de la reproduction: on dispose d'un nombre d'études limitées qui n'indiquent aucun effet indésirable sur la fertilité, la reproduction ou le développement (Dulak et al., 1984). De plus deux études de tératogénicité, dans lesquelles les sulfites sont administrés par l'intermédiaire de la nourriture sont disponibles. Cependant elles ne sont pas conduites d'une façon satisfaisante puisqu'elles n'ont pas couvert toute la période de l'organogenèse (WHO, 2000 (b)). Une toxicité maternelle a été démontrée dans ces deux études à des doses ≥ 840 mg/kg p.c/j. Pas d'effets embryotoxiques et foetotoxiques ont été notés à des doses inférieures à celle-ci.

Mutagenèse: bien que non mutagène et non cancérogène *in vivo* chez le rongeur, les sulfites présentent un pouvoir mutagène chez les microorganismes et pourraient conduire à des aberrations chromosomiques. En fait les sulfites ont été trouvés capables de provoquer des mutations ponctuelles au niveau chromosomique entraînant la conversion de la cytosine (base nucléique retrouvée dans l'ADN et l'ARN) en uracile (base nucléique retrouvée uniquement dans l'ADN) au cours de plusieurs tests de génotoxicité conduits *in vitro* (Nakamura et al., 1987; WHO, 1974). Cependant une étude conduite chez deux espèces de rongeurs (hamsters et souris) rendus déficients en sulfite oxydase et utilisant trois systèmes de tests (test d'échange de chromatide sœur, test d'aberration chromosomique et le test de micronucléus) a montré une absence d'induction d'effet génotoxique et une absence d'aberration chromosomique causés par les sulfites chez ces deux espèces même si l'activité de l'oxydase a été rendue à son minimum (WHO, 2000 (b)). Ce résultat est en consistance avec la forte

réactivité des sulfites et leur inactivation rapide chez les mammaliens (Renner et Wever, 1982).

Effets chez l'Homme: 4 à 5.8 g de sulfites de sodium peuvent causer, chez l'homme, des symptômes toxiques incluant une irritation sévère de l'estomac et des intestins. Cependant il est important de noter que le réflexe de vomissement apparaît chez l'homme avec des doses de sulfites équivalentes à 250 mg (3,5 mg/kg p.c./j) (WHO, 1974).

De plus les effets toxiques majeurs des sulfites, chez l'homme, sont d'ordre allergique ou découlent, chez certains sujets, d'une déficience congénitale en sulfite oxydase. Un pourcentage non négligeable de la population (5 à 11% selon les sources) est sensible aux sulfites (Lester, 1995). La majorité des asthmatiques est également sensible à ces additifs (Vally et Thompson, 2001; Reus et al., 2000; Arai et al., 1998). Selon le degré de sensibilisation les effets se caractérisent par un prurit, un urticaire, des troubles fonctionnels intestinaux, de la tachycardie, un choc anaphylactique, un coma pouvant aller jusqu'au décès (ces dernières manifestations étant extrêmement rares) (Reus et al., 2000; Arai et al., 1998; Lester., 1995; Garcia et al., 1994).

La JECFA a établi une **DJA** de 0.7 mg/ kg p.c. /jour (WHO, 1987 (b)) pour ce groupe de ces substances en se basant sur des études à long terme, incluant une étude de toxicité de la reproduction, effectuées chez des rats rendus déficients en sulfite oxydase (DSEO de 0.25% de sodium métabisulfite dans les aliments supplémentés en thiamine, équivalente à 70 mg/kg p.c. /jour de dioxyde de soufre, facteur de sécurité = 100). Ceci est soutenu par une étude à court terme (8 semaines) chez deux groupes de rats dont l'un est rendu déficient en oxydase et dans laquelle la DSEO pour les lésions gastriques était trouvée d'être équivalente à 70 mg/kg p.c. /jour de dioxyde de soufre. A noter que les rats déficients en sulfite oxydase représentent un meilleur modèle de l'homme (Gunnison et al., 1981). Cette valeur a été également reprise par la SCF (Leclercq et al., 2000 (b)).

c- Evaluation de l'exposition

Les résultats présentés aux tableaux 32 et 33 montrent que 117 (90%) enfants et 86 (86%) adolescents, soit en moyenne 88% des sujets sont des consommateurs de sulfites. L'apport moyen estimé pour le groupe totale des élèves en sulfites est de 0.50 mg/kg p.c./j pour le groupe total d'enfants et de 0.30 mg/kg p.c./j pour le groupe total des adolescents. L'exposition moyenne, les expositions au 75^{ème} percentile et au 95^{ème} percentile pour les groupes de consommateurs sont respectivement de 0.57 mg/kg p.c./j, de 0.60 mg/kg p.c./j et de 1.90 mg/kg p.c./j pour le groupe des enfants et respectivement de 0.32 mg/kg p.c./j, de 0.40 mg/kg p.c./j et de 1.21 mg/kg p.c./j.

Les principaux contributeurs et le pourcentage de contribution aux expositions alimentaires des sulfites pour les 5 % des consommateurs aux forts quantiles d'expositions sont présentés dans les tableaux 34 et 35. Les résultats montrent que les principales sources alimentaires de l'exposition aux sulfites pour les deux groupes de population exposés sont les fruits secs avec plus de 80% d'apports par ce type d'aliments alors que tous les autres aliments analysés ne contribuent que faiblement (apports < 10%) à cette exposition.

d- Caractérisation du risque

Le tableau 36 montre que, pour les sulfites, le niveau moyen et le percentile 75 (P75) de la population exposée sont inférieurs à leur DJA respective fixée à 0.7 mg/kg p.c./j par le JECFA/SCF pour les deux groupes de population étudiés alors que l'exposition au 95^{ème} percentile (P95) de la distribution de l'exposition dépasse la DJA pour ces deux groupes. Les expositions à ces trois niveaux de la distribution sont respectivement de 81%, 85% et 271% de la DJA pour le groupe des enfants et respectivement de 48%, 57% et 172% de la DJA pour le groupe d'adolescents.

Le pourcentage des enfants et des adolescents ayant une exposition dépassant la DJA sont respectivement de 18% et de 14%.

Finalement en comparant les deux groupes de sujets, les enfants ayant un âge situé entre 9 et 14 ans étaient les plus exposés aux sulfites lorsque l'exposition est exprimée en kg du poids corporel ($p < 0.01$ entre les deux groupes).

5.2.3- Le butylhydroxyanisole

(E320: BHA, 2-(1-1 diméthylethyl)-4-métoxyphénol) et 3-(1-1 diméthylethyl)-4-métoxyphénol)

DJA: 0.5 mg/ kg de poids corporel /jour (JECFA, SCF)

106

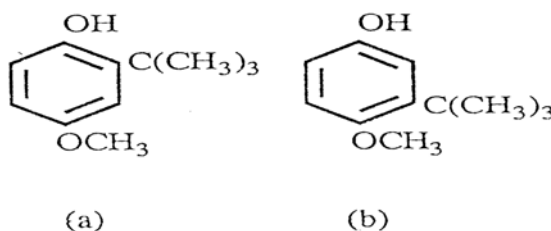


Figure 11. Structure du BHA.

a- Aperçu Général

Le BHA (Fig.11) est très utilisé dans le domaine agro-alimentaire pour prévenir ou retarder les phénomènes d'oxydations des aliments. Le BHA est utilisé dans les graisses et les huiles, les aliments contenant de la matière grasse, en pâtisserie, en confiserie, dans les huiles essentiels et dans les matériaux d'emballage. Le BHA utilisé est un mélange de deux isomères, le 2-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole (2-BHA (Fig.11a)) et le 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole (3-BHA (Fig.11b)), avec le composé commercial contenant 90% du 3-isomère (ACS, 1992). Le BHA se présente sous forme de cristaux blancs ou légèrement jaunâtre. Il est soluble dans les lipides

et insoluble dans l'eau. Il supporte des températures très élevées et par la suite peut être retrouvé dans les aliments après leurs fritures ou leurs traitements thermiques. Le BHA agit comme catalyseur négatif et empêche la réaction en chaîne des phénomènes d'oxydation. L'antioxygène agit le plus souvent en jouant le rôle d'accepteur de radicaux libres, il forme un radical anti-oxygène stabilisé par résonance (Coppen, 1989). Ce mécanisme s'accompagne de la consommation de molécules d'antioxygènes. La molécule mère peut être régénérée sous l'action d'agents réducteurs (appelés agents synergiques) (Edlefsen et Brewer, 1995).

b- Identification et évaluation du danger

L'absorption et le métabolisme du BHA ont été étudiés chez les rats, les lapins, les chiens, les singes et l'homme. Le BHA est absorbé rapidement du tractus gastro-intestinal, métabolisé puis complètement excrété chez les rats, les lapins, les chiens et l'homme (WHO, 1976). Il n'y a pas d'évidence d'accumulation tissulaire du BHA chez les rats et les chiens. Les principaux métabolites du BHA sont les glucuronides, les sulfates d'éther, et les phénols libres. Les métabolites du BHA sont excrétés dans les urines alors que le BHA non métabolisé est éliminé dans les fèces. La proportion de différents métabolites est variable en fonction de l'espèce et en fonction des différents niveaux de dosage. Chez l'homme, 22-72% d'une dose orale de 0.5-0.7mg /kg p.c. de BHA sont éliminés sous forme de glucuronides dans les 24 heures suivant son administration, moins que 1% sous forme de BHA et des quantités infiniment faible sous forme de sulfates d'éthers (Geyer et al., 1986). La rétention tissulaire du BHA est plus importante chez l'homme que chez les rats (Conacher et al., 1986, WHO, 1976). De plus, il a été démontré que des doses beaucoup plus faibles sont nécessaires pour atteindre un niveau plasmatique déterminé chez l'homme que celles nécessaires chez les rats (WHO, 1989).

Chez les rongeurs, **la toxicité aiguë par voie orale** du BHA est faible (la DL50 est ≥ 2200 mg/kg p.c. chez les rats et ≥ 2000 mg/kg p.c. chez les souris) (WHO, 1976, WHO, 1974).

Des **études de toxicité orale à court terme** effectuées sur des rats et les souris ont montré que le BHA à fortes doses (≥ 500 mg/kg p.c/j) était capable d'induire une augmentation du poids hépatique relatif (WHO, 1976). Chez les rats cette augmentation suit une voie complexe, qui dépend du mode d'administration de l'additif. En fait lorsque le BHA est administré par voie naso-gastrique, l'augmentation du poids hépatique relative suivait un cours de temps bimodal avec deux maximum observés aux 2^{ème} et 10^{ème} jours et une augmentation hautement significative au 7^{ème} jour ; alors que lorsqu'il est administré par l'intermédiaire de l'alimentation, l'élargissement hépatique n'était apparent qu'au 5^{ème} jour avec un seul maximum observable au 11^{ème} jour (WHO, 1989). Une étude préliminaire de l'ultra structure n'a révélé aucune anormalité alvéolaire au niveau du foie (WHO, 1989). Les autres effets constatés chez les rats et les souris à court terme (WHO, 1976) étaient un retard de la croissance et une réduction de l'activité des enzymes: catalases, peroxydases, et cholinestérases et une induction d'un certain nombre de systèmes enzymatiques hépatiques tels que l'époxyde hydrolase, le glutathione-S-transférase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase et le biphenyl-4-hydroxylase (WHO, 1989, WHO, 1976, WHO, 1974). L'administration du BHA chez les chiens à des taux de 1 et 1.3% ont été capables d'induire un élargissement hépatique, une prolifération du réticulum endoplasmique lisse et une augmentation de l'activité des enzymes hépatiques (WHO, 1989). L'administration des doses de 500 mg/kg p.c./j de BHA sur 28 jours ont été capables d'induire une hypertrophie hépatique et une prolifération du réticulum endoplasmique chez les singes. Cependant des différences sont observables entre les singes et les rats. En fait chez les singes, une réduction

de l'activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase et une augmentation de l'activité de la nitroanisole deméthylase ont été notées, alors que chez les rats pour des doses similaires aucune modification touchant ces enzymes n'a pas été observée (WHO, 1976).

Les premières **études de toxicité à long terme et de cancérogenèse** qui ont été effectuées ont rapporté que le BHA n'était pas capable de provoquer d'effets adverses chez les rats après 22 mois et chez les chiens après 15 mois d'exposition (WHO, 1976). Cependant, des études plus récentes ont montré que chez les rats et les hamsters, l'administration du BHA à des taux de 2% a résulté en une incidence élevée de papillomes chez presque 100% des animaux traités et des carcinomes des cellules squameuses de la partie antérieure de l'estomac chez 10-30% des animaux traités (Hirose et al., 1987; Ito et al., 1982). Les hamsters ont été trouvés d'être plus sensibles au BHA (Hirose et al., 1986). Les doses inférieures du BHA (0.5%) n'ont pas entraîné l'apparition des néoplasmes mais l'apparition d'une hyperplasie de la partie antérieure de l'estomac (Hirose et al., 1987). Verhagen et al. ont observé que chez les rats, non seulement la partie antérieure de l'estomac, mais aussi l'estomac glandulaire, l'intestin grêle, les tissus colorectales et les tissus oesophagiens sont susceptibles aux effets prolifératives du BHA (Verhagen et al., 1990). Une incidence inférieure de ces lésions a été observée chez les souris nourries avec du BHA à 0.5 - 1%, (Williams et al., 1990(a)).

Dans le but de déterminer lequel des isomères du BHA était cancérogène, ou si les isomères ont une action synergiste, des études d'alimentation ont été conduites avec des isomères purs et du BHA chez les hamsters pendant 1-4 semaines. Des effets adverses sévères ont été observés avec le BHA et l'isomère 3-BHA. Dans une autre étude, il a été observé qu'en plus de 3-BHA, deux métabolites p-ter-butyl phénol et 2-tert-butyl-4-methylphénol induisaient aussi l'apparition des papillomes au niveau de la partie antérieure de l'estomac (WHO, 1989). Chez les rats auxquels on a administré 1g/kg p.c. du 2-BHA une induction des papillomes au niveau de la partie antérieure de l'estomac a été également notée (Whysner et al., 1994). L'hyperplasie de la partie antérieure de l'estomac a été trouvée d'être réversible, mais le temps nécessaire pour la récupération dépendait de la durée et du niveau du traitement (Pascal, 1999). Chez les rats nourris avec du BHA à des taux de 0.1%-2% pendant 13 semaines, l'hyperplasie de la partie antérieure de l'estomac retournait au normal après 9 semaines d'arrêt du traitement. Chez les rats nourris avec du BHA à 2% pendant 1, 2 et 4 semaines, suivi de quatre semaines de récupération, l'hyperplasie légère et les modifications épithéliales observées chez le groupe traité pendant 1 semaine ont presque complètement disparu; alors que les modifications plus sévères observées chez les groupes traités pendant 2 et 4 semaines ont partiellement régressé au cours de la période de récupération (Williams et al., 1990 (a)).

A cause de la possibilité de pertinence de ces observations chez l'homme, des études ont été conduites chez d'autres espèces tels que les singes, les chiens et les porcs, qui comme les êtres humains sont dépourvus d'une partie antérieure de l'estomac. Chez ces animaux il a été trouvé que le BHA n'entraînait pas de modifications histopathologiques au niveau de l'estomac et de l'œsophage (Pascal, 1999). Cependant chez les singes, le BHA à des doses de 0.125 ou 500 mg/kg p.c./j, administré par gavage pendant 84 jours a entraîné une augmentation de 40% de l'indice mitotique à la partie inférieure de l'œsophage chez les groupes traités avec les fortes doses (Pascal, 1999). Chez les chiens nourris avec du BHA à des taux de 0.25, 0.5, 1 et 1.3% pour 6 mois, l'apparition de modifications histopathologiques au niveau de l'estomac, de l'œsophage ou du duodénum n'a pas été noté. Seule une augmentation du poids hépatique a été observée. Chez les porcs l'administration du BHA à

des taux correspondant à 50, 200, 400 mg/kg p.c./j du jour de leur croisement au 110^{ème} jour de la période de gestation, a résulté en une prolifération et des modifications para kératotiques au niveau de l'épithélium oesophageale chez quelques porcs des groupes traités avec les doses les plus fortes doses. Pas de papillomes ni de modifications au niveau de l'estomac glandulaire ont pu être observés (Williams et al., 1990(a)).

Le mécanisme par lequel le 3-BHA induit les carcinomes au niveau de la partie antérieure de l'estomac n'est pas clair. Des études ont suggéré que deux facteurs pourraient être d'importance (Whysner et al., 1994). L'un des deux implique la déplétion en groupement thiol. Le second est une attaque par les métabolites réactives du 3-BHA ou des produits secondaires formés par ces métabolites au niveau des constituants cellulaires. D'autres études ont indiqué que le BHA avait un effet sur les systèmes membranaires, bloquant l'échange entre les hépatocytes et les cellules épithéliales (Williams et al., 1990 (a)). Les données suggèrent fortement que le BHA est un épigénétique qui produit une néoplasie de la partie antérieure de l'estomac à travers un effet promoteur (Whysner et al., 1994).

Le BHA a un effet promoteur ou inhibiteur sur les effets cancérigènes de certains produits chimiques cancérigènes. Le BHA favorise l'apparition du cancer de la partie antérieure de l'estomac initiée soit par le N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine soit par le N-méthylnitrosourée (MNU) chez les rats (Fukushima et al., 1987 (b); Takahashi et al., 1986; Shirai et al., 1984). Le BHA a un effet promoteur sur la cancérogenèse de la vessie initiée par le MNU ou par le N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine et la cancérogenèse de la thyroïde initiée par la MNU chez les rats (Shirai et al., 1991; Hagiwara et al., 1989; Fukushima et al., 1987(a)). Le BHA a un effet inhibiteur du cancer hépatique initié soit par le diethylnitrosamine ou le N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine et le cancer mammaire initié par le 7,12-diméthyl-benz(a) anthracène (Imaida et al., 1988).

Effets sur la reproduction: Des études conduites chez les souris, les rats, les hamsters, les lapins, les singes et les porcs, ont montré que le BHA n'a pas des effets adverses sur la fonction de reproduction ni des effets tératogènes (Hardin, 1987; Allen, 1976). Cependant le BHA a été rapporté de causer des anomalies comportementales chez les souris. En fait des souris exposées au BHA par l'intermédiaire de leurs mères pendant la gestation et la lactation (0.5%) et puis directement pour une durée de 3 semaines ont montré une réduction significative de l'activité exploratrice, du sommeil et du réflexe d'orientation ainsi qu'un ralentissement de l'apprentissage. Dans une autre étude, il a été observé une réduction du niveau de la sérotonine, de l'activité de la cholinestérase et des modifications des taux de noradrénaline au niveau du cerveau du souris nouveau né, et il a été postulé que ses modifications sont à l'origine des anomalies comportementales observées (Stokes et Scudder, 1974).

Mutagenèse: contrairement aux agents cancérigènes qui provoquent des lésions de l'ADN (génétoxicité) pouvant conduire à l'activation d'oncogène ou à l'inactivation d'anti-oncogène, le BHA n'est pas génotoxique (Williams et al., 1990 (b); Ishidate et al., 1984). En fait le BHA a donné des résultats négatifs dans un certains nombre de tests effectués sur des bactéries ou sur des cellules mammaliennes *in vitro* tels que le test d'ames, le test d'échange de chromatide sœur, essai de mutagenèse cellulaire et le test d'aberration chromosomique (Williams et al., 1990 (b); Richer et al., 1989; Hageman et al., 1988; Ishidate et al., 1988). *In vivo* le BHA a également donné des résultats négatifs dans les tests de létalité dominante et dans le test des cellules de la moelle osseuse chez les rats (WHO, 1989). Généralement il est reconnu que le BHA agit en tant que promoteur des tumeurs.

Effets chez l'Homme: les observations des effets du BHA chez les hommes ont concerné uniquement son aspect toxicocinétique qui a été décrit ultérieurement.

La JECFA a établi une **DJA** de 0.5 mg/ kg p.c. /jour (WHO, 1989) pour cette substance en se basant sur des études à long terme effectuées chez des rats et par application d'un facteur de sécurité égal à 100 à la DSEO pour l'induction d'une hyperplasie au niveau de l'estomac (0.1% de BHA dans l'alimentation, équivalente à 50 mg/kg p.c. /jour de BHA). Cette valeur a été également reprise par la SCF (Leclerq et al., 2000(a)).

c- Evaluation de l'exposition

Les résultats montrent que la totalité des enfants et 99/100 des adolescents, soit plus que 99 % du groupe total des sujets sont des consommateurs du BHA.

Les tableaux 32 et 33 montrent que l'apport moyen estimé pour le groupe totale des enfants en BHA est de 0.17 mg/kg p.c./j et de 0.12 mg/kg p.c./jour pour le groupe des adolescents. L'exposition moyenne, au 75^{ème} percentile et au 95^{ème} percentile du groupe des consommateurs sont respectivement de 0.17 mg/kg p.c./j, de 0.22 mg/kg p.c./j et de 0.36 mg/kg p.c./j pour le groupe des enfants et respectivement de 0.13 mg/kg p.c./j, de 0.16 mg/kg p.c./j et de 0.24 mg/kg p.c./j. Les principaux contributeurs et le pourcentage de contribution aux expositions alimentaires du BHA pour les 5 % des consommateurs aux forts quantiles d'expositions sont présentés dans les tableaux 34 et 35. Les résultats montrent que les principales sources alimentaires de l'exposition au BHA sont les biscuits, les crackers et les potato chips avec plus que 75% d'apports par ces aliments pour les deux groupes de population étudiés alors que les autres aliments analysés ne contribuent que faiblement (apports < 10%) à cette exposition.

d- Caractérisation du risque

Le tableau 36 montre que, pour le BHA, le niveau moyen, le percentile 75 (P75) et le percentile 95 (P95) de la population exposée sont inférieurs à la DJA respective fixée à 0.5 mg/kg p.c./j par le JECFA/SCF. Les expositions à ces trois niveaux de la distribution sont respectivement de 34%, 44% et 72% de la DJA pour le groupe des enfants et respectivement de 26%, 32% et 48% de la DJA pour le groupe d'adolescents.

Le pourcentage des enfants ayant une exposition dépassant la DJA est de 2% alors qu'aucun adolescent n'a une exposition qui dépasse la DJA.

Finalement en comparant les deux groupes de sujets définis au départ, les enfants ayant un âge situé entre 9 et 14 ans étaient les plus exposés au BHA lorsque l'exposition est exprimée en kg du poids corporel ($p < 0.01$ entre les deux groupes).

5.2.4- Le butylhydroxytoluène

(E321: BHT, 2,6-bis(1-1 diméthyléthyl)-4-méthylphénol)

DJA: 0.3 mg / kg de poids corporel /jour (JECFA)

DJA: 0.05 mg / kg de poids corporel /jour (SCF)

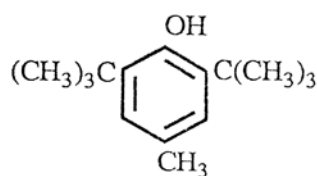


Figure12. Structure du BHT.

a- Aperçu général

Le BHT (Fig.12) est très utilisé dans le domaine agro-alimentaire pour prévenir ou retarder les phénomènes d'oxydations des aliments. Le BHT est utilisé dans les graisses et les huiles, les aliments contenant de la matière grasse, les produits allégés en matière grasse, en confiseries, dans les huiles essentiels et les matériaux d'emballage. Il est également utilisé en association avec d'autres antioxydants tels que le BHA, le propyl gallate et l'acide citrique (ACS, 1992). Le BHT se présente sous forme de cristaux blancs ou légèrement jaunâtre. Il est soluble dans les lipides et insoluble dans l'eau. Il est instable aux températures élevées et par la suite il est sujet à des pertes durant les traitements thermiques des aliments. Le BHT agit comme catalyseur négatif et empêche la réaction en chaîne des phénomènes d'oxydation (Coppen, 1989). L'antioxygène agit le plus souvent en jouant le rôle d'accepteur de radicaux libres, il forme un radical anti-oxygène stabilisé par résonance. Ce mécanisme s'accompagne de la consommation de molécules d'antioxygènes. La molécule mère peut être régénérée sous l'action d'agents réducteurs (appelés agents synergiques) (Edlefsen et Brewer, 1995).

b- Identification et évaluation du danger

L'absorption, le métabolisme et l'excrétion du BHT ont été étudiés chez les rats, les lapins, les chiens, les singes et l'homme. D'une façon générale, le BHT subit un métabolisme oxydatif (WHO, 2000 (c)) par l'intermédiaire du système de mono oxygénase microsomale. Chez les rats, les lapins et les singes l'oxydation du groupe *p*-methyl domine, alors que chez les êtres humains les groupes *tert*-butyl sont oxydés. Chez les souris, l'oxydation des groupes *p*-methyl et *tert*-butyl est observée (Matsuo et al., 1984). Le métabolisme du BHT est plus lent et plus compliqué que celui du BHA. Un nombre limité d'études chez l'homme (administration d'une seule dose de 0.5 mg/kg p.c.) ont indiqué que le métabolite majeur du BHT est une forme d'un éther glucuronide insoluble (5-carboxy-7- (1-carboxy-1-methyl ethyl) -3,3-dimethyl-2-hydroxy-2,3-dihydro benzofuran); et que 50% du BHT sont excrétés dans les urines au cours des premières 24 heures, suivi d'une excrétion plus lente au cours des 10 jours suivant l'administration du BHT (Conacher et al. 1986). L'élimination relativement lente du BHT a été attribuée à la présence d'un cycle entérohépatique (Takahashi, 1990).

D'autres études suggèrent que la voie biliaire peut jouer un rôle important dans l'élimination du BHT et que le cycle antérohépatique existe chez l'homme. Verhagen et al. ont rapporté l'existence des différences dans la cinétique du BHT entre l'homme et le rat en terme de concentration plasmatique, métabolisme et rétention tissulaire. Ils ont conclu que ses différences étaient trop larges pour permettre une caractérisation du danger pour le BHT en se basant sur sa cinétique et son métabolisme (Verhagen et al., 1989).

Chez de nombreuses espèces (rat, souris, lapin et chat) la **toxicité aiguë par voie orale** du BHT est faible ($DL_{50} \geq 1000$ mg/kg) (WHO, 1976).

Les études de **toxicité à court terme** effectuées initialement chez les rats ont montré que le BHT administré pendant 5 semaines à des taux de 0.3-0.5% provoquaient une augmentation du taux de cholestérol sérique et celui des phospholipides ainsi qu'un ralentissement de la croissance et une augmentation du poids hépatique (WHO, 1976). Cependant aucun effet adverse n'a été observé lorsque le BHT a été administré à des taux de 0.1% chez le rat et le lapin, et à des taux de 0.17-0.94 mg/kg p.c. chez les chiens (WHO, 1976).

Les taux élevés du BHT avaient un effet toxique sur le foie, les reins et sur le mécanisme de la coagulation sanguine et aussi sur les poumons.

Toxicité hépatique du BHT: Des études effectuées sur des rats et des souris, ont révélé que le BHT à des doses de 500 mg/kg p.c./j ont été capables d'induire un élargissement hépatique au cours des deux premiers jours et une stimulation de l'activité des enzymes microsomaux responsables du métabolisme des xénobiotiques. Ces effets ont été trouvés d'être réversibles (WHO, 1976). Dans une autre étude, il a été observé que l'administration du BHT à des taux de 0.001-0.5 % a résulté en une augmentation du poids hépatique et en une induction de l'activité de bi-phényl 4 hydroxylase hépatique. Lorsque des doses de 500 mg/kg p.c./j de BHT ont été administrées pendant 14 jours, une réduction de l'activité de glucose-6-phosphatase indiquant une altération hépatique précoce a été notée (WHO, 1976). L'administration du BHT, chez les rats par gavage à des doses de 25, 50, 250 et 500 mg/kg p.c./j sur 21 jours a résulté en une hépatomégalie dont la sévérité était dose dépendante, et à la dose la plus élevée, en une nécrose hépatocytaire péri portale progressive (Powell et al., 1986). Ces lésions péri portales ont été associées à une prolifération du conduit biliaire, une fibrose persistante et des réactions cellulaires inflammatoires. Cependant à la dose de 25mg/kg p.c./j aucun effet adverse n'a été observé. L'administration de doses sublétales de 1000-1250 mg/kg p.c./j de BHT pendant 4 jours a entraîné l'apparition d'une nécrose centrolobulaire au cours des 48 heures suivant cette administration. Chez les souris, l'administration des taux de 0.75% de BHT sur 12 mois a résulté en une hyperplasie du conduit biliaire (WHO, 1976). L'hypertrophie hépatique était associée à une prolifération de réticulum endoplasmique lisse, une augmentation des taux du cytochrome P-450 et une induction d'un certain nombre d'enzymes y compris la glutathione-S-transférase, la glutathione réductase, la thymidine kinase, la nitroanisole déméthylase, l'époxyde hydrolase et l'aminopyrène déméthylase. Ces modifications étaient réversibles après l'arrêt du traitement (WHO, 1976). Chez les singes l'administration du BHT à des doses de 500 mg/kg p.c./j pendant 14 jours a causé une légère hépatomégalie, une prolifération modérée du réticulum endoplasmique lisse, une réduction de l'activité de la glucose-6-phosphatase et une augmentation de l'activité de la nitroanisole déméthylase. La dose de 50 mg/kg p.c./j n'a pas été associée à l'apparition d'effets secondaires (WHO, 2000 (c)).

Toxicité rénale du BHT: La toxicité rénale du BHT a été rapportée chez les rats et chez les souris. En fait dans des études récentes, il a été rapporté que, chez les souris, l'administration des doses élevées du BHT (1.35-5% pendant 30 jours) a été capable de causer des néphroses toxiques avec des lésions tubulaires. Ces effets qui étaient dose dépendant, se sont présentés sous forme de patches irréguliers ou sous forme de kystes (Takahashi, 1992; Meyer et al. 1989).

Effet sur la coagulation sanguine du BHT: Le BHT a été également rapporté de causer des hémorragies intensives internes et externes chez les rats qui étaient provoquées par une altération du mécanisme de la coagulation sanguine, résultant en un accroissement de la mortalité (Tahakashi, 1992; Takahashi, 1991; Takahashi, 1987; Takahashi, 1986; Takahashi et Hiraga, 1984; Takahashi et Hiraga, 1981 (b); Takahashi et Hiraga, 1978 (a) et (b)). La dose minimale responsable de ces effets était trouvée d'être 7.5 mg/kg p.c./j. L'altération de la coagulation sanguine observée était due à une hypo thrombopénie résultant de l'inhibition de l'activité de la phylloquinone époxyde réductase hépatique par le BHT méthide quinone, l'un des métabolites réactives du BHT (Takahashi, 1979; Takahashi et Hiraga, 1981 (a)). L'administration de la vitamine K prévenait les hémorragies BHT-induites (Takahashi et Hiraga, 1979). Cependant une autre étude a suggéré que le BHT pourrait inhiber l'absorption de la vitamine K au niveau des intestins ou sa capture au niveau du foie (Cottrell et al., 1994). En fait une augmentation de l'élimination fécale de la vitamine K a été noté chez les rats recevant le BHT à des doses de 0.25% pendant 2 semaines. Le BHT a été également rapporté de modifier la morphologie des plaquettes sanguines et leur composition en acide gras, ainsi que la perméabilité vasculaire, ce qui pourrait jouer un rôle dans son effet hémorragique (Takahashi et Hiraga, 1984). Chez les souris, il a été observé que le BHT administré à des taux de 0.5, 1 ou 2% pendant 21 jours a causé des hémorragies massives au niveau des poumons et une stase sanguine dans divers organes cependant une diminution légère de l'activité de la coagulation sanguine a été observée. Il a été alors suggéré que les hémorragies pulmonaires sont attribués à une atteinte pulmonaire sévère et non pas à l'altération du mécanisme de la coagulation sanguine comme celle observée chez les rats (Takahashi, 1992). Des taux de 0-2% de BHT ont été trouvés d'être incapables de causer une hémorragie significative chez les porcs, les chiens et les lapins, toutefois une légère réduction de l'indice prothrombinique a été notée au taux de 1% chez les porcs (Takahashi, 1992, Takahashi et al., 1980). Le BHT méthide quinone n'a également pas été détecté chez les porcs (WHO, 2000 (c)).

Toxicité pulmonaire du BHT : Plusieurs études ont montré que le BHT cause une toxicité pulmonaire aigue chez les souris à des doses de 400-500 mg/kg p.c./j. Les effets observés ont inclus une hypertrophie, une hyperplasie et un épaississement général de la paroi alvéolaire des poumons. Une prolifération substantielle des cellules pulmonaires associée à une augmentation dose dépendante de l'ADN, de l'ARN et des lipides dans les poumons a été également observée. L'effet était généralement réversible après arrêt du traitement (Witshi et Morse, 1985, Saheb et Witshi, 1975). Cependant, l'exposition à un nouveau stress après l'administration du BHT était capable d'arrêter le processus de réparation aboutissant ainsi à une fibrose pulmonaire (Witshi et al., 1981). Les événements morphologiques et cytodynamiques observés ont inclus un œdème pulmonaire et une infiltration des cellules épithéliales de type I suivi d'une nécrose multifocale, d'une destruction de la barrière air-sang, et d'une exsudation de la fibrine au cours du second jour suivant l'administration d'une seule dose de 400 mg/kg.p.c. de BHT par voie intra péritonéale (Adamsom et al., 1977). Des études de l'ultra structure ont indiqué que les cellules de type I étaient altérées au premier jour et que la destruction cellulaire était complète au 2-3^{ème} jour. L'élongation des cellules du type II ayant un large nucléus et un cytoplasme abondant était évidente au jour 2-7 (Hirai et al. 1983).

Il a été alors postulé que le BHT cause une lyse et une mort cellulaire comme résultante de son interaction avec la membrane cellulaire (Witshi, 1986).

Les premières études de **toxicité à long terme et de cancérogenèse** effectuées ont montré une absence d'effets adverses chez les rats nourris avec le BHT à des taux de 0.2, 0.5, 0.8 et 1% pour deux ans (WHO, 1976). Dans une étude d'alimentation chronique (104 semaines) chez les rats (Hirose et al. 1981), il a été rapporté que des taux de 0.25 et 1% de BHT n'étaient pas cancérogènes. Les rats traités de chaque sexe ont montré un ralentissement de gain de poids corporel et une augmentation du poids hépatique. Seuls les mâles ont présenté une élévation du taux de γ glutamyl transférase. Des tumeurs ont été observées dans divers organes, mais leur incidence n'était pas statistiquement significative (CEFIC, 1989). Dans une étude de cancérogenèse sur 2 générations avec une exposition intra utérine chez les rats (Price, 1994), le BHT a été administré à des doses de 25, 100 ou 500 mg/kg p.c. à partir de la 7^{ème} semaine de la naissance jusqu'à la mise à bas de la génération F1. La génération F1 a été exposée à des doses de 25, 100 ou 250 mg/kg p.c./j dès leur naissance jusqu'au 144^{ème} semaine de leur âge. Les rats sevrant traités, surtout les mâles, avaient des poids corporels plus faibles comparés à ceux du contrôle. Des augmentations dose dépendantes du nombre des adénomes hépatocellulaire et des carcinomes étaient statistiquement significatives chez les rats mâles F1. Chez les femelles F1 les augmentations étaient uniquement significatives pour les adénomes. Cependant, toutes les tumeurs étaient détectées lorsque les rats F1 avaient un âge de 2 ans. Contrairement au BHA, le BHT n'avait pas d'effet adverse sur la partie antérieure de l'estomac des rats et des hamsters au taux de 1% (WHO, 2000 (c)).

Chez les souris, les études de cancérogenèse ont été effectuées sur différentes souches. Dans une étude de 2 ans chez des souris B6C3F1, il a été rapporté que les taux de 0, 0.1, 0.5% de BHT n'étaient pas cancérogènes (Shirai et al.1982). Cependant une réduction du gain de poids corporel a été notée, cet effet étant plus prononcé chez les mâles. Les lésions non néoplasiques liées au traitement étaient présentées sous forme d'une infiltration lymphatique des poumons chez les femelles et de la vessie chez les deux sexes exposés au taux le plus élevé. Des tumeurs ont été observées dans des organes variés, leur incidence était élevée au niveau des poumons, du foie et des nodules lymphatiques, mais cette incidence n'était pas statistiquement significative. Dans une seconde étude effectuée chez la même espèce des taux plus élevées (1 et 2% dans la nourriture), ont été capables de causer une augmentation significative dose dépendante des adénomes hépatocellulaires et des foci d'altération au niveau du foie chez les mâles uniquement (Inai et al., 1988). Chez les souris BALB/c exposées au BHT à des taux de 0.75% pendant 16 mois, une augmentation de l'incidence des tumeurs pulmonaires et des kystes hépatiques a été rapportée (WHO, 1976). Chez les souris CF1 une augmentation dose dépendante de la survenue des tumeurs bénignes mais aussi malignes au niveau des poumons chez les deux sexes et des tumeurs ovariennes bénignes chez les femelles a été rapportée (WHO, 2000 (b)). Chez les souris C3H, qui sont plus susceptibles d'avoir des tumeurs hépatiques spontanées avec l'âge, le BHT administré à des taux de 0.05 ou 0.5% pour 10 mois a entraîné une augmentation de l'incidence des tumeurs hépatiques, qui n'était pas dose dépendante. L'incidence des tumeurs pulmonaires a été augmentée chez les mâles au deux niveaux de dosage et chez les femelles qui sont soumises au niveau élevé du dosage (Lindenschmidt et al., 1986).

Plusieurs études ont été conduites pour la mise en évidence de l'effet promoteur du BHT sur la cancérogenèse induite par des produits chimiques. L'effet promoteur du BHT dépend d'un certain nombre de facteurs incluant les organes cibles, le type du carcinogène, les différences entre les espèces et les souches, le type d'alimentation utilisé, et aussi le temps

d'administration (Richer et al., 1989). D'une façon générale, le BHT a entraîné une inhibition de l'induction des néoplasmes au niveau des poumons et de la partie antérieure de l'estomac chez les souris, et au niveau des poumon (Witshi, 1991; Witshi, 1986; Witshi et Kehrer 1982, Witshi et Lock, 1981), du foie (Williams et al., 1991) et de la partie antérieure de l'estomac chez les rats quand il est administré avant ou avec le carcinogène (Hirose et al., 1993). Par contre, le BHT avait un effet promoteur sur la cancérogenèse de la vessie et de la thyroïde (WHO, 2000 (c); Sondergard et Olsen, 1982)).

Mutagenèse: *in vitro*, le BHT a donné des résultats négatifs dans le test d'Ames avec ou sans activation métabolique (Hageman et al. 1988; Zeiger et al., 1988) alors qu'il s'est révélé positif dans les tests sur les cellules mammaliennes et dans le test d'aberration chromosomique (WHO, 2000 (b)). *In vivo* le BHT a donné des résultats négatifs dans trois tests de létalité dominante chez les souris et un test d'aberration chromosomique chez les rats (Bomhard et al., 1992, Williams et al., 1984). Cependant le BHT à forte dose a donnée des résultats positifs chez les rats dans deux tests de létalité dominante (WHO, 1996 (a)). Généralement les effets mutagènes du BHT sont uniquement observés avec les doses élevées.

Effets sur la reproduction: les faibles doses du BHT ont été rapportées de ne pas avoir des effets adverses sur la fonction de reproduction et sur le développement ni d'être tératogènes par des études de reproduction à une ou plusieurs générations effectuées chez les rats, les souris, les hamsters, les lapins et les singes ((WHO, 2000 (c)); Olsen, 1986; Allen, 1976). La DSEO était de 50 mg/kg p.c./j. A des doses plus élevées (500 mg/kg p.c./j), certains des effets significatifs observés incluaient un effet qui était dose dépendant sur la taille de la portée, le nombre de mâle par portée, et sur le gain de poids corporel durant la période de lactation chez les rats, alors que chez les souris une prolongation du temps de la mise à bas, un nombre réduit des petits par portée et une réduction du poids corporel des petits ont été observés (WHO, 2000 (c)).

De plus, dans un test de toxicité du développement neuro-comportemental effectué chez les petits des rats nourris avec 0.5% de BHT avant leur croisement, durant la gestation et durant la lactation n'a pas révélé la présence d'une toxicité spécifique du BHT sur le système nerveux central (Vorhees et al., 1981). Cependant, d'autres études ont montré que les souris sevrés nourris avec 0.5% de BHT pour trois semaines, et dont les parents ont été maintenus au même niveau de dosage durant leur croisement, la gestation et la période du pré sevrage, ont présenté une réduction du sommeil, une augmentation de l'agression socialement induite ou celle induite par l'isolation et des difficultés d'apprentissage dans les conditions expérimentales employées (Meyer et Hanssen, 1980; Stokes et Scudder, 1974).

Effets chez l'Homme: Des tests de sensibilisation conduits chez des volontaires souffrant d'urticaire chronique, de dermatite atopique, d'eczéma ou de dermatite de contacte, n'ont pas montré des signes de capacités allergisantes ou sensibilisantes pour le BHT (Garcia et al., 1994; Young et al., 1987). Par contre, une autre étude a montré que chez certaines personnes souffrant d'urticaire idiopathique chronique, le BHT a été identifié en tant qu'agent causatif. L'élimination de la consommation des aliments contenant du BHT a résulté en une réduction de la sévérité et de la fréquence des épisodes d'urticaires (WHO, 2000).

Dans le cadre de l'implication de l'induction enzymatique dans le développement de l'altération hépatocellulaire associé avec l'administration de doses répétées du BHT, il a été conclu, que dans ce cas, l'induction enzymatique est l'indice le plus sensible de l'effet hépatique du BHT. Un seuil bien défini de 100 mg/kg p.c./j et une DSEO de 25 mg/kg p.c./j ont été tirés d'une étude de toxicité à long terme (induction d'enzymes hépatique) et des

études de reproduction effectuées chez des rats. Un facteur de sécurité de 100 a été utilisé pour obtenir une **DJA** de 0.3 mg /kg p.c./j selon le JECFA (WHO, 1995). Cependant la DJA fixée par le SCF, qui est 6 fois inférieure à celle fixée par la JECFA (0.05 mg /kg p.c./j), a été fixée en 1989 en s'appuyant sur la dose maximale sans effet observable obtenue chez les rats dans les études portant sur la reproduction, l'induction d'une hyperthyroïdie et les effets hémorragiques (SCF, 1989).

c- Evaluation de l'exposition

Les résultats montrent que tous enfants et tous les adolescents sont des consommateurs du BHT dans le cas des deux scénarios. Les tableaux 32 et 33 montrent que l'exposition moyenne au BHT estimée pour les groupes de population étudiés varie de 0.022 mg/kg p.c./j (scénario 1) à 0.030 mg/kg p.c./jour (scénario 2) pour les enfants âgés 9-14 ans, et de 0.013 mg/kg p.c./j (scénario 1) à 0.018 mg/kg p.c./j (scénario 2) pour les adolescents âgés 15-18 ans. L'exposition au 75th percentile varie de 0.030 mg/kg p.c./j (scénario 1) à 0.039 mg/kg p.c./j (scénario 2) pour les enfants et de 0.020 mg/kg p.c./j (scénario 1) à 0.022 mg/kg p.c./j (scénario 2) pour les adolescents. Finalement l'exposition au 95th percentile varie de 0.070 mg/kg p.c./j (scénario 1) à 0.076 mg/kg p.c./semaine (scénario 2) pour les enfants et de 0.047 mg/kg p.c./j (scénario 1) à 0.054 mg/kg p.c./jour (scénario 2) pour les adolescents.

Les principaux contributeurs et le pourcentage de contribution aux expositions alimentaires des BHT pour les 5 % des consommateurs aux forts quantiles d'expositions sont présentés dans les tableaux 34 et 35. Les résultats montrent que les principales sources alimentaires de l'exposition aux BHT pour les deux scénarios sont les chewing gum et les candies avec plus que 90% d'apports par ces deux catégories selon les deux scénarios pour les deux groupes de population étudiés.

d- Caractérisation du risque

Les résultats (tableau 36) montrent que, pour le BHT, le niveau moyen, le percentile 75 (P75) de l'exposition sont inférieurs à la DJA fixée à 0.05 mg/kg p.c./jour par le SCF pour les deux groupes de population étudiés. Les expositions à ces deux niveaux de la distribution contribuent respectivement de 52% et 69% de la DJA pour le groupe des enfants et respectivement de 31% et 42% de la DJA pour le groupe des adolescents.

De plus, les résultats montrent que les percentiles 95 (p95) de l'exposition dépassent la DJA pour les deux groupes de population étudiée avec des pourcentages de contribution de 145% de la DJA pour le groupe des enfants et de 101% de la DJA pour le groupe des adolescents.

La proportion d'enfants et d'adolescents dont l'exposition théorique dépasse la DJA établie par le SCF est respectivement de 12% et 9% selon les deux scénarios.

Finalement en comparant les deux groupes de sujets définis au départ, les enfants ayant un âge situé entre 9 et 14 ans sont les plus exposés au BHT lorsque l'exposition est exprimée en kg du poids corporel ($p < 0.01$ entre les deux groupes).

Tableau 32. Les expositions alimentaires des enfants âgés 9-14 ans aux benzoates, aux sulfites, au BHA et au BHT calculées à partir des données de consommation et des taux analytiques.

Enfants (9-14 ans) (n=130)					
Additifs alimentaires	pourcentage de consommateurs %	exposition moyenne du groupe total mg/kg p.c.	exposition moyenne du groupe de consommateurs mg/kg p.c.	P75 du groupe de consommateurs mg/kg p.c.	P95 du groupe de consommateurs mg/kg p.c.
Benzoates	100	2.2	2.2	3.10	4.00
Sulfites	90	0.5	0.57	0.60	1.90
BHA	100	0.17	0.17	0.22	0.36
BHT (scénario1)¹	100	0.022	0.022	0.030	0.070
BHT (scénario2)²	100	0.030	0.030	0.039	0.076

¹ Scénario 1: les valeurs non détectées sont remplacées par zéro.

² Scénario 2: les valeurs non détectées sont remplacées par la limite de détection.

Tableau 33. Les expositions alimentaires des adolescents âgés 15-18 ans aux benzoates, aux sulfites, au BHA et au BHT calculées à partir des données de consommation et des taux analytiques.

Adolescents (15-18 ans) (n=100)					
Additifs alimentaires	Pourcentage de consommateurs %	exposition moyenne du groupe total mg/kg p.c.	exposition moyenne du groupe de consommateurs mg/kg p.c.	P75 du groupe de consommateurs mg/kg p.c.	P95 du groupe de consommateurs mg/kg p.c.
Benzoates	100	1.6	1.6	2.00	3.60
Sulfites	86	0.30	0.34	0.40	1.21
BHA	99	0.12	0.13	0.16	0.24
BHT (scénario1)¹	100	0.013	0.013	0.020	0.047
BHT (scénario2)²	100	0.018	0.018	0.022	0.054

¹ Scénario 1: les valeurs non détectées sont remplacées par zéro.

² Scénario 2: les valeurs non détectées sont remplacées par la limite de détection.

Tableau 34. Les principaux contributeurs et le pourcentage de contribution aux expositions alimentaires aux benzoates, sulfites, BHA et BHT pour les 5 % des enfants consommateurs aux forts quantiles d'expositions.

Enfants (9-14 ans) (n=130)					
Types d'aliments	Contribution aux benzoates %	Contribution aux sulfites %	Contribution aux BHA %	Contribution aux BHT (1) %	Contribution aux BHT (2) %
Biscuits	< 10	< 10	52	NC	< 10
Jus de fruits	40	< 10	NA	NA	NA
Candies	< 10	< 10	< 10	70	55
Chewing gums	< 10	< 10	< 10	30	35
Pois chiche	20	NC	NA	NA	NA
Crackers	< 10	NC	16	NC	< 10
Potato chips	< 10	< 10	11	NC	< 10
Sodas	15	NA	< 10	NC	< 10
Fruits secs	NA	80	< 10	NC	< 10
Thon en conserve	10	NA	NC	NC	NC
Autres	13	17	25	0	10

NA: Additif alimentaire non analysé dans ce type d'aliment.

NC: Aliments non trouvé d'être contributeur à l'exposition du fort percentile de l'additif alimentaire.

(1): Assumant que les niveaux non détectés sont égales à zéro.

(2): Assumant que les niveaux non détectés sont égales à la limite de détection.

Tableau 35. Les principaux contributeurs et le pourcentage de contribution aux expositions alimentaires aux benzoates, sulfites, BHA et BHT pour les 5 % des adolescents consommateurs aux forts quantiles d'expositions.

Adolescents (15-18 ans) (n=100)					
Types d'aliments	Contribution aux benzoates %	Contribution aux sulfites %	Contribution aux BHA %	Contribution aux BHT (1) %	Contribution aux BHT(2) %
Biscuits	< 10	< 10	48	NC	< 10
Jus de fruits	30	< 10	NA	NA	NA
Candies	< 10	< 10	< 10	30	35
Chewing gums	< 10	< 10	< 10	70	55
Pois chiche	10	NC	NA	NA	NA
Crackers	< 10	NC	12	NC	< 10
Potato chips	< 10	< 10	16	NC	< 10
Sodas	25	NA	< 10	NC	< 10
Fruits secs	NA	86	< 10	NC	< 10
Thon en conserve	24	NA	NC	NC	NC
Autres	13	17	25	0	10

NA: Additif alimentaire non analysé dans ce type d'aliment.

NC: Aliments non trouvé d'être contributeur à l'exposition du fort percentile de l'additif alimentaire.

(1): Assumant que les niveaux non détectés sont égales à zéro.

(2): Assumant que les niveaux non détectés sont égales à la limite de détection.

Tableau 36. Caractérisation du risque aux additifs alimentaires des groupes de population étudiés.

Additif alimentaire	DJA mg/kg p.c./j	Enfants (9-14 ans) (n=130)				Adolescents (15-18 ans) (n=100)			
		Exposition moyenne/DJA % ADI	P75 /DJA % ADI	P95 /DJA % ADI	% ^a	Exposition moyenne/DJA % ADI	P75 /DJA % ADI	P95 /DJA % ADI	% ^a
Benzoates	0-5	44	62	80	3	32	40	72	0
Sulfites	0-0.7	81	85	271	18	48	57	172	14
BHA	0-0.5	34	44	72	2	26	32	48	0
BHT	0-0.05	52	69	145	12	31	42	101	9

a: Pourcentage de sujet dépassant la DJA

5.3- Les mycotoxines

5.3.1- L'ochratoxine A (OTA)

a- Aperçu général

L'ochratoxine A dont la structure chimique est rapportée à la figure 13 est produite par une seule espèce du genre *Penicillium* (*P. Verrucosum*) et par divers espèces du genre *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. carbionarius* et plus rarement *A. niger*). Ces espèces diffèrent par leurs niches écologiques, les denrées sur lesquelles elles se développent et produisent l'ochratoxine et leur fréquence d'apparition dans différentes régions géographiques, comme l'illustre le tableau 37. Il est important de noter que les conditions optimales de production de l'ochratoxine A par chacune de ces espèces sont encor mal connues et peuvent différer des conditions optimales de croissance de ces moisissures (Pitt, 2000(b)). Ainsi, tandis qu'il est admis que l'infection des denrées par les moisissures peut se produire aussi bien aux champs que pendant le stockage, la synthèse post récolte des métabolites secondaires est considéré comme le facteur principal de contamination des denrées à l'ochratoxine A. L'OTA est stable dans les conditions thermiques et chimiques normalement utilisées dans l'industrie de transformation des matières premières pour des produits destinés à l'alimentation humaine ou animale.

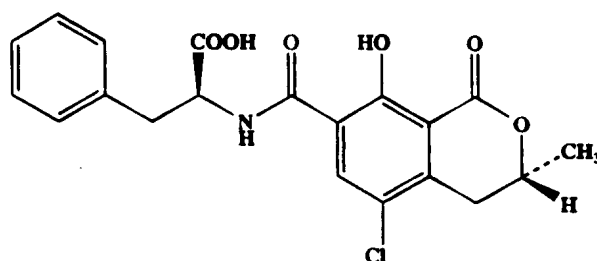


Figure 13. Structure de l'OTA.

Tableau 37. Denrées et régions concernées par la contamination à l'ochratoxine A en fonction de l'espèce microbienne.

Espèces productrices	Denrées contaminées (directement ou indirectement)	Régions concernées
<i>Penicillium Verrucosum</i>	Céréales, produits céréaliers, viande et abats de porc	Régions tempérées (Canada et Europe Centrale et du Nord)
<i>Aspegillus Ochraceus</i>	Nombreuses denrées stockées et déshydratées: café vert grain, poisson fumé séché, fruits secs, haricots secs, noisettes, cacahuètes, amandes, céréales (mais rarement source de contamination substantielle), etc...	Régions tropicales, subtropicales et méditerranéennes
<i>Aspergillus Carbionarius</i>	Raisins de table, raisins secs, vin et café	Régions tropicales, subtropicales et méditerranéennes

b- identification et caractérisation du danger

Initialement incriminée dans la survenue de néphropathies en élevage porcin, cette mycotoxine est néphrotoxique chez toutes les espèces mammifères testées (Krogh, 1992). L'ochratoxine A est également immunotoxique, hématotoxique, génotoxique, tératogène et cancérogène.

Néphrotoxicité: Le mécanisme de la toxicité rénale de l'OTA a été élucidé par de nombreuses études. En fait l'OTA a été trouvée d'être un puissant inhibiteur de l'activité phosphoénolpyruvate carboxykinase rénale *in vivo*, et par suite de la néoglucogenèse (Meisner et Meisner, 1981). En outre, elle diminue l'activité respiratoire mitochondriale et la capture du calcium par la mitochondrie, alors que la concentration calcique intracytosolique reste élevée (Aleo et al., 1991). Une augmentation de l'activité de la pompe à calcium ATP-dépendante au niveau du réticulum endoplasmique du cortex rénal a été observée *in vivo* pour restaurer l'homéostasie calcique cytoplasmique (Rahimtula et Chong, 1991). Cette augmentation de l'activité de la pompe à calcium est inconsistante avec l'hypothèse de la peroxydation lipidique qui inhibe cette activité (Chong et Rahimtula, 1992). De nombreuses études portant sur l'effet de l'OTA sur la fonction rénale ont révélé que l'OTA a plusieurs sites d'action toxique tout au long du néphron. Donc, l'OTA n'agit pas majoritairement sur le tube proximal comme les autres mycotoxines; par contre, il semble que les parties post proximales du néphron constituent la cible principale à la suite d'une exposition aigue (Gekle et al., 1993).

Effet sur le système immunitaire: l'ochratoxine A induit une déplétion des cellules lymphoïdes particulièrement dans le thymus et la rate dans diverses espèces animales (Pestka et Bondy, 1990). Autre que la lymphopénie, une neutropénie et une éosinophilie sont notées chez la souris (Muller et al., 1995). La réponse proliférative des lymphocytes T murins (Prior et Sisodia, 1982) et bovins (Charoenpornsook et al., 1998) aux mitogènes est également diminuée ainsi que celle des lymphocytes périphériques humains (Stormer et Lea, 1995). Les effets de l'OTA sur l'activité des NK ont été évalués en se basant sur des observations montrant l'effet cancérogène de l'OTA.

La suppression de l'activité NK chez la souris semble être due à une inhibition spécifique de la sécrétion de l'INF- γ (Luster et al., 1987). D'autre part, l'OTA provoque des altérations structurales et fonctionnelles de la souris traitée avec 80 mg/kg p.c. pendant 8 jours. Boorman et al. ont noté une réduction de la taille du thymus et une dépression des cellules souches pluripotentes et les cellules précurseurs des granulocytes et macrophages dans la moelle osseuse ainsi qu'une activation des macrophages (Boorman et al., 1984). De plus, une réduction du nombre des splénocytes et une nécrose des centres germinaux de la rate et des ganglions lymphatiques sont aussi observées (Kuiper Goodman et Scott, 1989). En outre, l'exposition chronique à l'OTA par voie orale du poulet entraîne une diminution des rejets des greffes et du nombre des lymphocytes T (Singh, 1990). Le 4R-OH-OTA, un métabolite de l'OTA, est aussi immunosuppresseur que l'OTA (Creppy et al., 1983). L'OTA a des effets divers sur les immunoglobulines sériques selon les espèces. La production d'anticorps en présence d'antigènes thymus dépendants et indépendants est supprimée chez la souris et le cobaye traités avec l'OTA par injection péritonéale (Creppy et al., 1983). Par contre, lorsque administrée par voie orale qui reflète la voie naturelle de l'exposition à cette toxine, l'OTA n'aurait pas d'effet sur l'immunité humorale et sur l'immunocompétence des animaux (Prior et Sisodia, 1982). Il en est de même chez les descendants de souris exposées à de faibles doses d'OTA par voie orale (Thuvander et al., 1996).

Génotoxicité: les premières évaluations de la génotoxicité de l'ochratoxine A utilisant les modèles microbiens ont donné des résultats négatifs (Kuiper Goodman et Scott, 1989). En revanche, d'autres études ont montré que le test d'Ames de mutagenèse (ou de même le test de bioluminescence bactérienne) n'est positif qu'en présence de l'OTA préalablement métabolisée en présence de culture hépatocytaire (Malaveille, 1994; Henning A et al., 1991) ou de microsome rénaux (Obrecht-pflumio et al., 1999). Des évaluations ultérieures ont montré que l'OTA est génotoxique dans le test d'échange de chromatide sœur et avec le test de réparation de l'ADN (Bendele et al., 1985) et qu'elle induisait aussi la formation de micronoyaux dans les cultures de cellules de vésicules séminales ovines (Degen et al., 1997). En 1985, Creppy et al. ont montré que l'OTA induisait des cassures mono-brin de l'ADN dans différents tissus ou cellules de souris *in vivo et in vitro* (Creppy et al., 1985). De plus il a été montré que l'ochratoxine A induisait la formation d'adduits à l'ADN dans la rate, le foie et le rein des souris, et que cet effet était dose dépendant. Le nombre d'adduits à l'ADN était surtout très élevé dans les reins et la vessie des souris traitées. La diminution du nombre d'adduits, probablement due à la réparation, est plus rapide dans le foie et la rate que le rein (Pfohl-Leskowicz et al., 1991). Les adduits à l'ADN ont aussi été observés dans plusieurs types de culture cellulaire traitées avec l'OTA: cellules rénales de singe (Grosse et al., 1995(a)), cellules épithéliales bronchiques humaines (Grosse et al., 1995 (b)) et cellule épithéliales porcines vésicales (Dorrenhaus et Follmann, 1997). Certaines études ont montré que l'indométacine et l'aspirine ont un effet protecteur contre la formation des adduits à l'ADN dans les reins et la vessie de souris traitées par l'OTA (Obrecht-Pflumio, 1996) et contre la néphrotoxicité chez le rat (Baudrimont, 1995), mais ceci n'est pas observé avec tous les types cellulaires (Degen et al., 1997). La protection par l'indométacine, un inhibiteur de la prostaglandine-H- synthétase et la lipooxygénase, ne semble pas être due à une réduction de la production de radicaux libres. Cependant elle peut être expliquée par deux mécanismes: 1) l'indométacine déplace l'OTA de l'albumine et permet ainsi son élimination, 2) ou bien elle favorise l'élimination de l'OTA en diminuant son cycle entérohépatique. Ceci est controversé avec le fait qu'une fraction libre plus élevée d'OTA augmente la toxicité *in Vitro* (Degen et al., 1997). D'autres études ont révélé une corrélation entre la génotoxicité de l'OTA et l'action simultanée du CYP 2C et de la glutathion-S-transférase microsomale pour donner des métabolites réactifs qui sont susceptibles d'interagir au niveau des résidus guanine de l'ADN pour former des adduits (El

Adlouni et al., 2000). D'autres études contredisent le principe de métabolites réactifs et supportent le rôle du stress oxydatif (Gillman et al., 1999) et la formation d'hydropéroxydes (Omar et al., 1990). Enfin des études récentes ont conclu que l'OTA n'induit pas la formation d'adduits à l'ADN chez des rats traités avec 2 mg/kg p.c./jour pendant deux semaines et qu'elle n'est pas mutagène dans le test d'Ames (Follmann et Lucas, 2003).

Cancérogénèse: les études conduites chez les rongeurs ont montré que cette mycotoxine est cancérogène avec induction des tumeurs rénales, hépatiques, mammaires et testiculaires (Schwartz, 2002). Les lésions tumorales retrouvées au niveau rénal prédominent, ce qui est probablement une conséquence du fait que la cible primaire de l'OTA est l'épithélium des tubules proximaux au niveau du cortex interne et de la medulla externe. L'OTA est cancérogène chez la souris avec une dose TD50 (tumorigenic dose rate) de 4500 µg/kg p.c./jour, et chez le rat avec une TD50 de 74 µg/kg p.c./jour, montrant que le rat est beaucoup plus sensible aux effets cancérogènes de l'OTA (Kuiper Goodman et Scott, 1989).

Observations chez l'homme: l'ochratoxine A a été évoquée d'être impliquée dans la survenue d'une entité nosologique endémique dans les Balkans: la néphropathie endémique des Balkans (BEN), néphropathies tubulo-interstitielle chronique (Steyns, 1993). En fait des similitudes ont été observées entre la néphropathie porcine et la BEN conduisant à proposer l'ochratoxine A comme l'un des agents pouvant jouer un rôle dans l'étiologie de cette maladie. Cependant aucune conclusion claire n'a pu être tirée sur la nature et l'importance du rôle de l'ochratoxine A dans cette maladie qui semble être multifactorielle (EFSA, 2006).

L'ochratoxine A a été classée dans le groupe 2b par l'IARC (IARC, 1993 (c)), c.à.d. qu'il existe des preuves suffisantes de sa cancérogénicité expérimentale chez l'animal, mais des preuves insuffisantes chez l'homme. L'ochratoxine A est considérée comme possiblement cancérogène chez l'homme en attendant l'apport des preuves épidémiologiques.

Deux types de caractérisation du danger ont été menés, l'un à partir des données de néphrotoxicité et l'autre sur la base de son caractère cancérogène. En fait le JECFA a proposé une dose hebdomadaire tolérable de 100 ng/kg p.c./semaine qui correspond à une DJTP d'environ 14.3 ng/kg p.c./jour en se basant sur l'étude ayant mis en évidence la dose avec effet la plus basse chez l'espèce la plus sensible au niveau rénal (porc) (JECFA, 1995). Le SCF quant à lui s'est prononcé en faveur d'une DJT de 35ng/kg/p.c./jour, basée sur la cancérogénicité de l'ochratoxine A, correspondant à un niveau de risque de 1: 100000 (application d'un facteur de sécurité de 5000 à la TD05, dose à laquelle 5% des animaux testés développent une tumeur) (SCF, 1998). Cette valeur a été révisée par l'EFSA en 2006 pour qu'elle soit basée sur la néphrotoxicité de l'OTA après que des études récentes ont mis en évidence l'absence d'adduits OTA-ADN spécifiques. En fait l'EFSA a proposé une dose hebdomadaire tolérable de 120 ng/kg p.c./semaine en se basant sur l'étude ayant mis en évidence la dose avec effet la plus basse chez l'espèce la plus sensible au niveau rénal (porc) qui est fixé à 8 ng/kg p.c./jour et en appliquant un facteur de sécurité composé de 450 à cette dose (EFSA, 2006).

c- Evaluation de l'exposition

Les tableaux 38 et 39 montrent que l'exposition moyenne à l'OTA estimé pour les groupes de population étudiés varie de 17.48 ng/kg p.c./semaine (scénario 1) à 38.57 ng/kg p.c./semaine (scénario 2) pour les enfants âgés 8-14 ans, et de 14.16 ng/kg p.c./semaine (scénario 1) à 28.77 ng/kg p.c./semaine (scénario 2) pour les adolescents âgés 15-18 ans. L'exposition au 75th percentile varie de 21.56 ng/kg p.c./semaine (scénario 1) à 42.35 ng/kg p.c./semaine (scénario 2) pour les enfants et de 18.34 ng/kg p.c./semaine (scénario 1) à 34.79 ng/kg p.c./semaine (scénario 2) pour les adolescents. Finalement l'exposition au 95th percentile varie de 31.01 ng/kg p.c./semaine (scénario 1) à 57.54 ng/kg p.c./semaine (scénario 2) pour les enfants et de 24.01 ng/kg p.c./semaine (scénario 1) à 43.61 ng/kg p.c./semaine (scénario 2) pour les adolescents.

Les vecteurs contribuant le plus à l'exposition moyenne totale pour les deux groupes de population est représenté à hauteur de 70% par les céréales et les produits à base de céréales incluant les pains, les manakeesh, les biscuits et les gâteaux. Les légumineuses et les fruits secs contribuent à des niveaux inférieurs à 10% de l'exposition alimentaire totale.

d- Caractérisation du risque

Les résultats (tableau 44) montrent que, pour l'ochratoxine A, le niveau moyen, le percentile 75 (P75) et le 95^{ème} percentile (P95) de l'exposition sont inférieurs à la DHTP fixée à 100 ng/kg p.c./semaine par le JECFA pour les deux groupes de population étudiés. Les expositions à ces trois niveaux de la distribution contribuent respectivement de 28% (17%- 39%), 31% (21%- 42%) et 44% (31%- 57%) de la DHTP pour le groupe des enfants et respectivement de 21% (14%- 28%), 27% (18%- 35%) et 34% (24%- 43%) de la DHTP pour le groupe des adolescents.

La proportion d'enfants dont l'exposition théorique dépasse la DHTP établie par le JECFA est de 1% (pour les deux scénarios). Aucun des adolescents n'a une exposition qui dépasse cette DHTP.

Finalement en comparant les deux groupes de sujets définis au départ, les enfants ayant un âge situé entre 9 et 14 ans sont les plus exposés à l'ochratoxine A lorsque l'exposition est exprimée en kg du poids corporel ($p < 0.05$ entre les deux groupes).

Tableau 38. Estimation de l'exposition à l'ochratoxine A (OTA) des enfants.

Enfants (9-14 ans) (n=130)											
	Consommation (g/week)			Exposition (ng/kg p.c. ^a /week)							
				Scénario 1 ^b				Scénario 2 ^c			
Aliment	Moyenne	p75	p95	Moyenne	p75	p95	% ^d	Moyenne	p75	p95	% ^d
Pois cuits	201.39	^e -	1443.75	0.00	0.00	0.00	0	2.10	0.00	13.79	5
Biscuits	107.45	210.00	420	1.26	2.80	5.74	7	2.31	5.25	10.64	6
Pains	685.44	840.00	1919.75	9.45	11.55	17.36	54	14.56	17.85	26.81	38
Gâteaux	100.94	^e -	875	0.70	0.00	5.88	4	1.61	0.00	14.00	4
Pois chiche moutabal	23.66	^e -	^f -	0.00	0.00	0.00	0	0.07	0.00	4.20	0
Pois chiche cuits	58.17	^e -	^f -	0.00	0.00	0.00	0	0.07	0.00	0.84	0
Chocolats	21	^e -	210	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.56	0
Cornflakes	88.83	^e -	210	0.14	0.00	1.19	1	0.28	0.00	2.94	1
Croissants	71.05	^e -	^f -	0.56	0.00	0.00	3	1.19	0.00	0.00	3
Doughnuts	7.56	^e -	^f -	0.07	0.00	0.00	0	0.14	0.00	0.00	0
Falafel	4.06	^e -	^f -	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00	0
Kaak assrounieh	12.95	^e -	^f -	0.14	0.00	0.00	1	0.21	0.00	0.00	1
Kaak tea	22.61	^e -	210	0.28	0.00	2.52	2	0.42	0.00	4.13	1
Lahm bi ajin	64.61	^e -	^f -	0.42	0.00	0.00	2	1.40	0.00	0.00	4
Lentilles cuites	96.95	^e -	^f -	0.00	0.00	0.00	0	0.14	0.00	0.00	0
Manakeesh	350	560.00	770	3.08	5.60	10.01	18	7.42	9.38	12.11	19
Viande kibbeh	59.22	^e -	^f -	0.07	0.00	0.00	0	0.14	0.00	0.00	0
Fruits secs	38.78	^e -	385	0.84	0.00	5.60	5	3.64	0.00	5.46	9
Pâtes à sauce rouge	129.22	^e -	^f -	0.00	0.00	0.00	0	1.19	0.00	0.00	3
Petit pois cuits	188.44	^e -	^f -	0.00	0.00	0.00	0	0.21	0.00	0.00	1
Pizzas	43.05	^e -	^f -	0.40	0.00	0.00	3	0.77	0.00	0.00	2
Riz bouillis	269.78	^e -	525	0.00	0.00	0.00	0	0.35	0.00	1.33	1
Riz à viande	183.05	^e -	^f -	0.00	0.00	0.00	0	0.28	0.00	0.00	1
Toasts	3.22	^e -	^f -	0.07	0.00	0.00	0	0.07	0.00	0.00	0
Total				17.48	21.56	31.01	100	38.57	42.35	57.54	100

- ^a p.c. = poids corporel.
- ^b Scénario 1: les valeurs non détectées sont remplacées par zéro.
- ^c Scénario 2: les valeurs non détectées sont remplacées par la limite de détection.
- ^d Le pourcentage de contribution de chaque aliment à l'exposition total moyenne à l'OTA.
- ^e Le tiret signifie qu'il y a moins de 25% de consommateurs pour l'aliment considéré et que la valeur au p75 est de 0.
- ^f Le tiret signifie qu'il y a moins de 25% de consommateurs pour l'aliment considéré et que la valeur au p75 est de 0.

Tableau 39. Estimation de l'exposition à l'ochratoxine A (OTA) des adolescents.

Adolescents (15-18 ans) (n=100)											
Aliment	Consommation (g/week)			Exposition (ng/kg p.c. ^a /semaine)							
				Scénario 1 ^b				Scénario 2 ^c			
	Moyenne	p75	p95	Moyenne	p75	p95	% ^d	Moyenne	p75	p95	% ^d
Pois cuits	38.78	^e ₋	^f ₋	0.00	0.00	0.00	0	0.28	0.00	0.00	1
Biscuits	43.68	175.00	350	0.84	1.75	3.85	6	1.54	3.85	7.14	5
Pains	882	1540.00	2240	8.12	11.55	14.14	58	12.53	17.85	21.84	44
Gâteaux	147.28	^e ₋	875	0.70	0.00	3.92	5	1.61	0.00	9.31	6
Pois chiche moutabal	49.91	^e ₋	560	0.00	0.00	0.00	0	0.28	0.00	0.28	1
Pois chiche cuits	24.92	^e ₋	^f ₋	0.00	0.00	0.00	0	0.21	0.00	0.00	1
Chocolats	14.56	^e ₋	210.00	0.21	0.00	0.35	1	0.07	0.00	0.35	<1
Cornflakes	140.56	^e ₋	420.00	0.07	0.00	0.77	0	0.14	0.00	1.96	0
Croissants	30.52	^e ₋	^f ₋	0.14	0.00	0.00	1	0.40	0.00	0.00	1
Doughnuts	33.25	^e ₋	^f ₋	0.14	0.00	0.00	1	0.35	0.00	0.00	1
Falafel	15.61	^e ₋	^f ₋	0.00	0.00	0.00	0	0.07	0.00	0.00	<1
Kaak assrounieh	16.66	^e ₋	^f ₋	0.14	0.00	0.00	1	0.21	0.00	0.00	1
Kaak tea	24.92	^e ₋	210.00	0.21	0.00	1.68	1	0.33	0.00	2.73	1
Lahm bi ajin	93.59	^e ₋	^f ₋	0.42	0.00	0.00	3	1.12	0.00	0.00	4
Lentilles cuites	95.62	^e ₋	^f ₋	0.00	0.00	0.00	0	0.07	0.00	0.00	<1
Manakeesh	347.2	700.00	1540.00	1.54	2.66	6.65	11	3.75	7.00	16.17	13
Meat kibbeh	41.58	^e ₋	^f ₋	0.00	0.00	0.00	0	0.07	0.00	0.00	<1
Fruits secs	94.29	^e ₋	525.00	0.49	0.00	4.34	3	1.05	0.00	9.94	4
Pâtes à sauce rouge	224.56	^e ₋	1400.00	0.00	0.00	0.00	0	1.40	0.00	10.64	5
Petit pois cuits	69.3	^e ₋	^f ₋	0.00	0.00	0.00	0	0.07	0.00	0.00	<1
Pizzas	221.76	532.00	1050.00	1.00	8.61	15.75	7	2.80	12.25	26.25	10
Riz cuits	147.63	^e ₋	1050.00	0.00	0.00	0.00	0	0.14	0.00	0.91	<1
Riz à viande	218.33	^e ₋	^f ₋	0.00	0.00	0.00	0	0.14	0.00	0.00	<1
Toasts	12.46	^e ₋	^f ₋	0.14	0.00	0.00	1	0.14	0.00	0.00	<1

Total	38.78			14.16	18.34	24.01	100	28.77	34.79	43.61	100
-------	-------	--	--	-------	-------	-------	-----	-------	-------	-------	-----

^a p.c. = poids corporel.

^b Scénario 1: les valeurs non détectées sont remplacées par zéro.

^c Scénario 2: les valeurs non détectées sont remplacées par la limite de détection.

^d Le pourcentage de contribution de chaque aliment à l'exposition total moyenne à l'OTA.

^e Le tiret signifie qu'il y a moins de 25% de consommateurs pour l'aliment considéré et que la valeur au p75 est de 0.

^f Le tiret signifie qu'il y a moins de 25% de consommateurs pour l'aliment considéré et que la valeur au p75 est de 0.

5.3.2- Les aflatoxines BG

a- Aperçu général

Les aflatoxines constituent le groupe de mycotoxines le plus étudié (plus de 5000 publications). Ce groupe inclut les aflatoxines B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂. Les aflatoxines B₁, B₂, G₁, G₂ sont sécrétées par *Aspergillus Flavus* et *Aspergillus Parasiticus* dans les zones humides tropicales et subtropicales. Les denrées les plus contaminées sont l'arachide, le maïs, les graines de coton, les céréales, les fruits secs et les épices (Diop et al. 2000, Pitt J., 2000 (a)). Les conditions optimales de production des aflatoxines par chacune de ces espèces sont encore mal connues et peuvent différer des conditions optimales de croissance de ces moisissures (Pitt et al., 2000). Cependant ces conditions sont fortement soumises aux facteurs environnementaux tel que le degré de l'humidité, la température, l'aération et la nature du milieu. De plus tandis qu'il est admis que l'infection des denrées par les moisissures peut se produire aussi bien aux champs que pendant le stockage, la synthèse post récolte des métabolites secondaires est considéré comme le facteur principal de contamination des denrées aux aflatoxines.

L'aflatoxine B₁ est considéré comme étant la plus toxique des aflatoxines. L'aflatoxine M₁ et l'aflatoxine M₂ sont des métabolites hydroxylés de l'aflatoxine B₁ et de l'aflatoxine B₂ retrouvées dans le lait des vaches laitières nourries avec des aliments contaminés par l'aflatoxine B₁ ou B₂. Généralement 1 à 3% d'aflatoxine B₁ sont métabolisés sous forme d'aflatoxine M₁ (Neal et al., 1998). Cependant ces taux sont variables en fonction de la saison, des vaches et d'une allaité à l'autre (Hussein et Brasel, 2001). De plus l'aflatoxine M₁ est thermostable et n'est donc pas détruite par la pasteurisation ni par les processus de fabrication des fromages et par la suite elle est retrouvée dans le lait pasteurisé et les produits laitiers fabriqués à partir du lait cru contaminé par l'aflatoxine M₁.

Les aflatoxines sont stables et assez résistantes à la dégradation. L'efficacité de quelques processus pour la réduction des concentrations des aflatoxines dans les aliments peut être affectée par beaucoup de facteurs, tels que la présence de protéines, du pH, de la température et de la durée du traitement. Le traitement commercial des produits crus en utilisant des régimes de nettoyage comprenant l'élimination des particules cassées et l'assortissement peut réduire considérablement la concentration en aflatoxines.

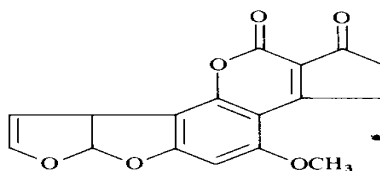


Figure 14. Structure de l'aflatoxine B₁.

b- Evaluation et caractérisation du danger

Les aflatoxines sont hépatotoxiques, immunotoxiques, tératogènes, génotoxiques et cancérogènes. L'aflatoxine B₁, dont la structure est présentée à la figure 14, est la plus cancérogène et la plus toxique parmi les aflatoxines, surtout au niveau du foie. L'aflatoxine M₁ est autant hépatotoxique et cancérogène que l'aflatoxine B₁. Par contre, il a été montré que l'aflatoxine M₁, contrairement à l'aflatoxine B₁, est cytotoxique pour les types cellulaires ne possédant pas d'activité métabolique (Neal et al., 1998).

La **toxicité aiguë** (WHO, 1998) des aflatoxines a été démontrée chez une grande variété de mammifères, poissons, oiseaux, lapins, chiens et primates. Les canards, les dindes et la truite sont tous hautement susceptibles aux aflatoxines. L'âge, le sexe et le statut alimentaire tous affectent le degré de toxicité des aflatoxines. Les jeunes animaux ainsi que les mâles sont particulièrement plus susceptibles. Pour la plupart des espèces la DL50 (dose létale) est entre 0.5 et 10mg/kg p.c. Le foie est le principal organe cible de la toxicité bien que le site de l'effet hépatique est variable selon les espèces (McLean et Dutton, 1995). Des effets sur les poumons, le myocarde et les reins ainsi qu'une accumulation dans le cerveau ont été également observés (Eaton et Groopman, 1994). Des effets tératogéniques suivant l'administration des doses élevées de l'aflatoxine ont été rapportés dans quelques espèces (WHO, 1998).

Effet sur le système immunitaire: les aflatoxines inhibent l'immunité à médiation cellulaire et la phagocytose chez le rat et le poulet (Pier, 1986). De faibles doses d'aflatoxine B₁ (120-280ppb) sont capables d'inhiber la phagocytose *in vivo* et *in vitro* et d'induire une leucopénie chez le porc avec une diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (Oswald et Comera, 1998). La fonction des cellules phagocytaires humaines est aussi vulnérable puisque l'aflatoxine B₁ entre 0.1 et 1 ng/ml serait cytotoxique pour les monocytes périphériques humains (Cusumano et al, 1996). Par ailleurs, l'aflatoxine exerce un effet mitogène sur les lymphocytes humains périphériques à une concentration située entre 10 et 100 µg/l, ce qui suggère que les aflatoxines sont immunomodulatrices plutôt qu'immunosuppressives (Bondy et Pestka, 2000). Une autre étude récente effectuée sur des rats exposés à l'aflatoxine B₁ d'une manière intermittente (exposition pendant 4 semaines et arrêt pour 4 semaines) pendant 40 semaines a conclu que selon la fenêtre d'exposition et en fonction de la dose et du temps, l'aflatoxine B₁ peut être immunostimulatrice ou immunosuppressive (Hinton et al., 2003). Il est également important de noter que des études ultrastructurales montrent que l'aflatoxine B₁ entraîne une détérioration sélective de la mitochondrie dans les lymphocytes murins et n'affecte pas les autres organelles cellulaires ainsi que les structures lymphocytaires (Rainbow et al., 1994).

Génotoxicité: L'aflatoxine B₁ a été trouvée d'être mutagène et cytotoxique dans tous les tests de génotoxicité conduits *in vivo* et *in vitro* (WHO, 1998). De plus des études récentes ont montré qu'elle induisait une augmentation de la synthèse non programmée de l'ADN d'une façon dose dépendante dans les hépatocytes des souris, des rats, des singes et des hommes, l'homme et le rat étant les deux espèces les plus sensibles (Steinmetz et al., 1988). L'aflatoxine B₁ produit la formation des adduits à l'ADN, se liant préférentiellement aux résidus guanines dans les zones riches en guanine-cytosine et induit des substitutions des guanines en thymines d'une façon presque exclusive (Hussain, 1999; Wang et Groopmann, 1999; Steyen, 1998, McLean et Dutton, 1995). Finalement il a été montré que le codon 249, un site dans p53, est le point chaud de l'effet mutagène de l'aflatoxine B₁ (Angilar, 1993; Bressac, 1991), ce type de mutations étant généralement suivi par une perte du second allèle fonctionnel des gènes de suppression des tumeurs.

Cancérogénèse: Les études subchroniques et chroniques ont montré que les aflatoxines B₁, G₁, M₁ seuls ou en mélange étaient susceptibles d'induire l'apparition des lésions hépatiques qui se transformaient en cancer chez de nombreuses espèces animales. Des faibles taux alimentaires (1 µg/kg d'aliments) d'aflatoxine B₁ ont été capables de causer l'apparition du cancer hépatique chez les rats. Bien qu'une DSEO claire n'a pas été démontrée dans ces études, la DSEO pour l'aflatoxine B₁ a été estimée à 0.75 µg/kg p.c./jour, en utilisant le test de Fisher (Kuiper-Goodman, 1991). Similairement, pour l'aflatoxine M₁ la DSEO a été estimée respectivement à <2.5 µg/kg/p.c./jour. Dans ces études, la DT₅₀, utilisée en tant qu'indicateur du potentiel cancérogène de la substance, a été estimée à 1.15 et 10.38 µg/kg p.c. par jour respectivement pour l'aflatoxine B₁ et l'aflatoxine M₁. Bien que l'aflatoxine B₁ soit cancérogène chez toutes les espèces étudiées, des différences significatives entre les espèces vis-à-vis de leur susceptibilité existent (WHO, 1998). Ces différences peuvent être expliquées en partie, par la variabilité métabolique qui existe entre les espèces. Certains facteurs peuvent modifier la cancérogénèse de l'aflatoxine B₁. Chou et al., ont démontré en 1993 que des rats soumis à un régime alimentaire restreint en calories et exposés à l'aflatoxine présentaient une réduction de l'association de cette aflatoxine à l'ADN hépatique et rénal et une réduction des lésions hépatocellulaires induites par l'aflatoxine (Chou et al., 1993). Une autre étude a montré qu'un régime alimentaire réduit en protéines, entraînait, chez les rats exposés à l'aflatoxine B₁, une réduction de l'apparition des lésions hépatiques quelles soient cancérogènes ou non, même lorsque la consommation calorique était élevée (Youngman et Campbell, 1992). Finalement les effets de différents types de régimes alimentaires sur la toxicité hépatique de l'aflatoxine B₁ ont été étudiés chez les rats. Les auteurs ont conclu qu'il n'y avait pas de différences significatives entre les différents régimes alimentaires sur la toxicité de l'aflatoxine B₁ et que, d'une façon générale, les régimes alimentaires riches en lipides sont susceptibles d'induire le cytochrome 1A1 et 2B1 ce qui suggère une meilleure détoxification de l'aflatoxine B₁, (Hasler et al., 1994).

Observations chez l'homme: une augmentation de l'incidence du cancer de foie a été observée dans les populations (en Afrique et en Chine) qui consommaient d'aliments contaminés par les aflatoxines (Hussain, 1999). De plus des mutations (G:C→T:A) au niveau du codon 249 du gène p53 (Aguilar, 1993; Bressac, 1991), un gène suppresseur des tumeurs, ont été retrouvées dans des carcinomes hépatiques humains probablement dues à l'exposition à l'aflatoxine B₁. Ceci fut contesté par d'autres études *In Vitro* où le codon 249 ne semble pas être une cible de l'aflatoxine B₁ (Chan et al., 2003, Denissenko et al., 1998). Cependant il ne faut pas oublier que le cancer hépatique est multifactoriel et que la co-infection par le virus de l'hépatite B (HBV) des gens exposés à l'aflatoxine B₁ pourrait expliquer cette différence.

L'aflatoxine B₁ et le mélange des aflatoxines ont été classés par l'IARC (International Agency for Research on Cancer) dans le groupe 1 comme cancérogène avéré alors que l'aflatoxine M₁ a été classée par l'IARC dans le groupe 2b comme possiblement cancérogène pour l'homme (IARC, 1993, (a)).

Dans le cas des cancérogènes génotoxiques, substances à effets sans seuil, on considère qu'il est impossible de calculer une dose tolérable et que la seule approche réaliste est de réduire l'exposition à un niveau aussi faible que possible (approche du SCF et du JECFA). Cependant les toxicologues peuvent calculer des valeurs indicatives en utilisant des modèles d'extrapolation mathématiques de quantification du risque ou des facteurs de sécurité de 2000 à 5000. A partir d'études de cancérogénèse hépatique menées chez le rat, on obtiendrait des doses limites extrapolées pour l'homme voisines de 0.15 ng/kg p.c./j pour l'aflatoxine B₁ et de 0.2 ng/kg p.c./j pour l'aflatoxine M₁ (CSHPF, 1999). Le JECFA (JECFA, 1999) et le SCF

(SCF, 1994) ont conclu que même de très faibles niveaux d'exposition aux aflatoxines 1ng/kg p.c./j voire moins, contribuent toujours au risque de cancer de foie.

c- Evaluation de l'exposition

Les tableaux 40 et 41 montrent que l'exposition moyenne aux aflatoxines BG estimé pour les groupes de population étudiés varie de 1.82 ng/kg p.c./jour (scénario 1) à 5.18 ng/kg p.c./jour (scénario 2) pour les enfants âgés 8-14 ans, et de 1.1 ng/kg p.c./jour (scénario 1) à 4.04 ng/kg p.c./ jour (scénario 2) pour les adolescents âgées 15-18 ans. L'exposition au 75th percentile varie de 2.31 ng/kg p.c./jour (scénario 1) à 5.95 ng/kg p.c./jour (scénario 2) pour les enfants et de 1.80 ng/kg p.c./jour (scénario 1) à 4.90 ng/kg p.c./jour (scénario 2) pour les adolescents. Finalement l'exposition au 95th percentile varie de 3.43 ng/kg p.c./jour (scénario 1) à 7.69 ng/kg p.c./jour (scénario 2) pour les enfants et de 3.00 ng/kg p.c./jour (scénario 1) à 6.50 ng/kg p.c./ jour (scénario 2) pour les adolescents.

Les vecteurs contribuant le plus à l'exposition moyenne totale pour les deux groupes de population est représenté à hauteur de 50% par des céréales et des produits à base de céréales incluant les pains, les manakeesh, les biscuits et les gâteaux. Les fruits secs sont une autre source d'exposition aux aflatoxines avec une contribution de plus que 20% à partir de ce type d'aliments. Les légumineuses et les autres produits à base de céréales contribuent à des niveaux inférieurs à 10% de l'exposition alimentaire totale.

d- Caractérisation du risque

Les résultats (tableau 44) montrent que, pour les aflatoxines BG, le niveau moyen, le percentile 75 (P75) et le 95^{ème} percentile (P95) de l'exposition dépassent la DJTP fixée à 1 ng/kg p.c./jour par le JECFA/SCF pour les deux groupes de population étudiés. Les expositions à ces trois niveaux de la distribution sont respectivement de 330% (147%- 518%), 413% (231%- 595%) et 556% (343%- 769%) de la DJTP pour le groupe des enfants et respectivement de 257% (110% - 404%), 337% (180%- 494%) et 475% (300%- 650%) de la DJTP pour le groupe des adolescents.

58% (scénario 1) /95% (scénario 2) des enfants ont une exposition théorique qui dépasse la DJTP établie par le JECFA/SCF. De plus, 52% (scénario1) /93% (scénario2) des adolescents dépassent cette valeur également.

Finalement en comparant les deux groupes de sujets définis au départ, les enfants ayant un âge situé entre 9 et 14 ans sont les plus exposés aux aflatoxines BG lorsque l'exposition est exprimée en kg du poids corporel ($p < 0.05$ entre les deux groupes).

Tableau 40. Estimation de l'exposition alimentaire aux aflatoxines BG des enfants.

Enfants (9-14ans) (n=130)											
Aliment	Consommation (g/day)			Exposition (ng/kg p.c. ^a /day)							
				Scénario 1 ^b				Scénario 2 ^c			
	Moyenne	p75	p95	Moyenne	p75	p95	% ^d	Moyenne	p75	p95	% ^d
Pois cuits	28.77	e ₋	206.25	0.00	0.00	0.00	0	0.30	0.00	2.36	6
Biscuits	15.35	30.00	60.00	0.07	0.20	0.30	5	0.26	0.51	1.19	5
Pains	97.92	120.00	274.25	0.64	0.78	1.17	43	1.68	2.04	3.06	32
Gâteaux	14.42	e ₋	125.00	0.07	0.00	0.60	5	0.23	0.00	2.00	4
Pois chiche moutabal	3.38	e ₋	f ₋	0.00	0.00	0.00	0	0.05	0.00	0.00	1
Pois Chiche cuits	8.31	e ₋	f ₋	0.00	0.00	0.00	0	0.06	0.00	0.00	1
Chocolats	3.00	e ₋	30.00	0.09	0.00	0.41	6	0.25	0.00	0.98	5
Cornflakes	12.69	e ₋	30.00	0.00	0.00	0.00	0	0.04	0.00	0.38	1
Croissants	10.15	e ₋	f ₋	0.03	0.00	0.00	2	0.14	0.00	0.00	3
Doughnuts	1.08	e ₋	f ₋	0.01	0.00	0.00	<1	0.02	0.00	0.00	<1
Falafel	0.58	e ₋	f ₋	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00	0
Kaak assrounieh	1.85	e ₋	f ₋	0.01	0.00	0.00	<1	0.03	0.00	0.00	1
Kaak tea	3.23	e ₋	30.00	0.03	0.00	0.25	2	0.05	0.00	0.49	1
Lahm bi ajin	9.23	e ₋	f ₋	0.03	0.00	0.00	2	0.15	0.00	0.00	3
Lentilles cuites	13.85	e ₋	f ₋	0.00	0.00	0.00	0	0.09	0.00	0.00	2
Manakeesh	50.00	80.00	110.00	0.18	1.40	1.54	12	1.16	3.40	3.74	22
Viande kibbeh	8.46	e ₋	f ₋	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00	0
Fruits secs	5.54	e ₋	55.00	0.29	0.00	2.50	20	0.38	0.00	3.25	7
Pâtes à sauce rouge	18.46	e ₋	f ₋	0.00	0.00	0.00	0	0.17	0.00	0.00	3
Pizzas	6.15	e ₋	f ₋	0.02	0.00	0.00	1	0.11	0.00	0.00	2
Toasts	0.46	e ₋	f ₋	0.00	0.00	0.00	0	0.01	0.00	0.00	<1
Total				1.47	2.31	3.43	100	5.18	5.95	7.69	100

^a p.c. = poids corporel.

^b Scénario 1: les valeurs non détectées sont remplacées par zéro.

^c Scénario 2: les valeurs non détectées sont remplacées par la limite de détection.

^d Le pourcentage de contribution de chaque aliment à l'exposition total moyenne à l'OTA.

^e Le tiret signifie qu'il y a moins de 25% de consommateurs pour l'aliment considéré et que la valeur au p75 est de 0.

^f Le tiret signifie qu'il y a moins de 25% de consommateurs pour l'aliment considéré et que la valeur au p75 est de 0.

Tableau 41. Estimation de l'exposition alimentaire aux aflatoxines BG des adolescents.

Adolescents (15 -18 ans) (n=100)											
Aliment	Consommation (g/day)			Exposition (ng/kg p.c. ^a /day)							
				Scénario 1 ^b				Scénario 2 ^c			
	Moyenne	p75	p95	Moyenne	p75	p95	% ^d	Moyenne	p75	p95	% ^d
Pois cuits	5.54	e ₋	f ₋	0.00	0.00	0.00	0	0.04	0.00	0.00	1
Biscuits	6.24	25.00	50.00	0.04	0.10	0.20	4	0.17	0.39	0.79	4
Pains	126.00	220.00	320.00	0.38	0.78	0.95	34	1.43	2.04	2.50	36
Gâteaux	21.04	e ₋	125.00	0.07	0.00	0.40	6	0.23	0.00	1.33	6
Pois chiche moutabal	7.13	e ₋	80.00	0.00	0.00	0.00	0	0.04	0.00	0.49	1
Pois chiche cuits	3.56	e ₋	f ₋	0.00	0.00	0.00	0	0.03	0.00	0.00	1
Chocolats	2.08	e ₋	30.00	0.11	0.00	0.28	10	0.26	0.00	0.71	6
Cornflakes	20.08	e ₋	60.00	0.00	0.00	0.00	0	0.02	0.00	0.25	0
Croissants	4.36	e ₋	f ₋	0.01	0.00	0.00	1	0.04	0.00	0.00	1
Doughnuts	4.75	e ₋	f ₋	0.02	0.00	0.00	2	0.05	0.00	0.00	1
Falafel	2.23	e ₋	f ₋	0.00	0.00	0.00	0	0.01	0.00	0.00	0
Kaak assrounieh	2.38	e ₋	f ₋	0.01	0.00	0.00	1	0.03	0.00	0.00	1
Kaak tea	3.56	e ₋	30.00	0.02	0.00	0.17	2	0.04	0.00	0.33	1
Lahm bi ajin	13.37	e ₋	f ₋	0.03	0.00	0.00	3	0.13	0.00	0.00	3
Lentilles cuites	13.66	e ₋	f ₋	0.00	0.00	0.00	0	0.06	0.00	0.00	1
Manakeesh	49.60	100.00	220.00	0.10	0.55	1.03	9	0.57	1.23	2.49	14
Meat kibbeh	5.94	e ₋	f ₋	0.00	0.00	0.00	0	0.00	0.00	0.00	0
Fruits secs	13.47	e ₋	75.00	0.23	0.00	2.00	21	0.27	0.00	2.60	7
Pâtes à sauce rouge	32.08	e ₋	200.00	0.00	0.00	0.00	0	0.20	0.00	2.22	5
Pizzas	31.68	76.00	150.00	0.07	0.30	0.65	6	0.40	1.67	3.70	10
Toasts	1.78	e ₋	f ₋	0.01	0.00	0.00	1	0.02	0.00	0.00	1
Total				1.1	1.80	3.00	100	4.04	4.94	6.50	100

^a p.c. = poids corporel.

^b Scénario 1: les valeurs non détectées sont remplacées par zéro.

^c Scénario 2: les valeurs non détectées sont remplacées par la limite de détection.

^d Le pourcentage de contribution de chaque aliment à l'exposition total moyenne à l'OTA.

^e Le tiret signifie qu'il y a moins de 25% de consommateurs pour l'aliment considéré et que la valeur au p75 est de 0.

^f Le tiret signifie qu'il y a moins de 25% de consommateurs pour l'aliment considéré et que la valeur au p95 est de 0.

5.3.3- Le déoxynivalénol (DON)

a- Aperçu général

Le déoxynivalénol (Fig.15) fait partie des tricothécènes qui sont des mycotoxines produites par des moisissures du genre *Fusarium*. Approximativement vingt quatre espèces de *Fusarium* sont connues pour produire des tricothécènes. Parmi ces contaminants naturels des céréales actuellement identifiés, comme les plus répandus dans la production agricole, on trouve:

- le type A, comprenant la T-2 toxine, HT-2 toxine, T-2 triol, diacétoxyscirpénol et la monoacétoxyscirpénol.
- le type B, comprenant le déoxynivalénol (DON), le nivalénol (NIV), le 3-acétyldéoxynivalénol, le 15-acétyldéoxynivalénol et la fusarénone X.

Les denrées les plus contaminées sont les céréales, surtout le maïs, le blé et le riz (Pitt et al., 2000). Tandis qu'il est admis que l'infection des denrées par les moisissures peut se produire aussi bien aux champs que pendant le stockage, la synthèse avant la récolte des métabolites secondaires est considéré comme le facteur principal de contamination des denrées au DON. Les tricothécènes sont thermostables et par la suite vont persister dans les aliments à base de céréales transformés et cuisinés. Cependant ils sont solubles dans l'eau et une bonne partie des tricothécènes sera éliminée dans les eaux de lavage. Finalement le transfert du DON dans les produits animaux via une alimentation animale contaminée est extrêmement faible (Prelusky, 1994; Steyn, 1993).

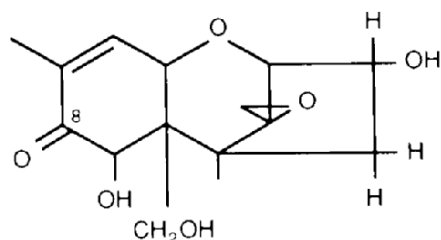


Figure 15. Structure du déoxynivalénol.

b- Evaluation et caractérisation du danger

Le DON est hématotoxique, myélotoxique, immunotoxique, et neurotoxique.

La **toxicité aigue** du DON est caractérisée par un vomissement (surtout chez le porc), diminution de la consommation alimentaire allant jusqu'au refus de l'alimentation, réduction du poids corporel et la diarrhée. L'intoxication aigue par le DON peut produire une nécrose de plusieurs types de tissus tels que le tractus digestif, les tissus lymphoïdes, et les tissus de la moelle osseuse (Blender et al., 1991).

Les études de **toxicité subchronique et chronique**, effectuées sur les souris, les rats et les porcs ont montré que le DON, administré par voie orale, entraînait la réduction de la consommation alimentaire, un ralentissement du gain de poids corporel et un changement de certains paramètres sériques incluant les immunoglobulines sériques (Bennett et Klich, 2003).

Effet sur le système immunitaire: les tricothécènes sont immunosuppressives ou immunomodulatrices, donc ils peuvent induire ou réprimer la réponse proliférative des lymphocytes selon la dose et le mode d'exposition (Hughes et al., 1989). Des études ont montré que l'exposition répétée à ces mycotoxines augmente la susceptibilité des animaux à divers pathogènes comme *Mycobacterium*, *Candida*, *Salmonella* et *Aspergillus* (Bondy et Pestka, 2000). D'autres études ont montré que le DON a un effet immunosuppresseur sur des lymphocytes périphériques humains et qu'il induisait une diminution de l'activité des cellules NK (Meky et al., 2001). Par ailleurs les auteurs ont trouvé que le DON induisait l'expression de la cyclooxygénase 2 (COX-2) dans les macrophages murins *in vitro* et chez la souris *in vivo*, ce qui contribue à l'induction de l'expression du gène de l'IL-6 (Moon et Pestka, 2003). La capacité de COX-2 à induire la production d'IL-6 pourrait être un mécanisme important pour l'induction de la néphropathie à IgA par le DON et d'autres effets immunotoxiques (Poapolathep et al., 2003). L'immunosuppression induite par le DON est surtout expliquée par le fait que ces composés sont capables de se lier aux ribosomes et d'inhiber par la suite la synthèse protéique (Poapolathep et al., 2003). Ces inhibiteurs de la traduction vont activer le MAPK et par la suite l'apoptose selon un processus nommé «réponse au stress ribotoxique» (Zhou et al., 1991). En revanche Shifrin et Anderson (1999) ont constaté que l'inhibition de la synthèse protéique ne serait pas en corrélation avec l'activation du p38 MAPK, et l'apoptose (Shifrin et Anderson, 1999). Par ailleurs, une toxicité hématologique est aussi observée au niveau des cellules souches érythroïétiques (Rio et al., 1997).

Génotoxicité, les tricothécènes incluant le DON sont des inhibiteurs de la synthèse de l'ADN et des protéines. Cependant aucune étude n'a montré que le DON était mutagène ou cancérogène. En fait le DON a donné des résultats négatifs dans le test d'Ames et dans l'essai de mutation aux hépatocytes médités effectué avec les cellules pulmonaires des cobayes et utilisant des concentrations cytotoxiques du DON (Bennett et Klich, 2003).

Observations chez l'Homme: les intoxications par le DON suite à la consommation d'aliments contaminés ont entraîné, chez l'homme, l'apparition d'une variété d'effets incluant une douleur abdominal, vertige, maux de tête, irritation du pharynx, nausée, vomissement et de la diarrhée hémorragique. Cependant comme il est fortement probable que d'autres substances sont présentes avec le DON il est difficile de corréler les résultats obtenus en expérimentation animale aux observations humaines (WHO, 2001).

Le DON a été classé par l'IARC (International Agency for Research on Cancer) dans la catégorie I (preuve insuffisante) (IARC, 1993 (b)).

Le JECFA a établi pour le DON en 2001 (JECFA, 2001) une DJT de 1µg/kg p.c./j en se basant sur une étude chronique sur les souris (DSEO= 0.1 mg/kg p.c./jour, effets réduction de croissance, facteur de sécurité= 100). Cette valeur a été également reprise par le SCF en 2002 (SCF, 2002).

c- Evaluation de l'exposition

Les tableaux 42 et 43 montrent que l'exposition moyenne au DON estimé pour les groupes de population étudiés varie de 496 ng/kg p.c./jour pour les enfants âgés 8-14 ans à 392 ng/kg p.c./jour pour les adolescents âgés 15-18 ans. L'exposition au 75th percentile varie de 639 ng/kg p.c./jour pour les enfants à 459 ng/kg p.c./jour pour les adolescents. Finalement l'exposition au 95th percentile varie de 975 ng/kg p.c./jour pour les enfants à 664 ng/kg p.c./jour pour les adolescents. Les vecteurs contribuant le plus à l'exposition totale moyenne pour les deux groupes de population sont les pains et les manakeesh avec plus que 56% de contribution à l'exposition par ces deux aliments.

d- Caractérisation du risque

Les résultats (tableau 44) montrent que, pour le DON, le niveau moyen, le percentile 75 (P75) et le 95^{ème} percentile (P95) de l'exposition sont inférieurs à la DJTP fixée à 1000 ng/kg p.c./jour par le JECFA/SCF pour les deux groupes de population étudiés. Les expositions à ces trois niveaux de la distribution contribuent respectivement de 50%, 64% et 98% de la DJTP pour le groupe des enfants et respectivement de 40%, 46% et 66% de la DJTP pour le groupe des adolescents.

La proportion d'enfants et d'adolescents dont l'exposition théorique dépasse la DJTP établie par le JECFA/SCF est respectivement de 3% et 1%.

Finalement en comparant les deux groupes de sujets définis au départ, les enfants ayant un âge situé entre 9 et 14 ans sont les plus exposés au DON lorsque l'exposition est exprimée en kg du poids corporel ($p < 0.05$ entre les deux groupes).

Tableau 42. Estimation de l'exposition alimentaire au déoxynivalénol (DON) des enfants.

Enfants (9-14 ans) (n=130)							
Aliment	Consommation (g/day)			Exposition (ng/kg p.c. ^a /day)			
	Moyenne	P75	P95	Moyenne	p75	p95	% ^b
Biscuits	15.35	30.00	60.00	10.65	60.00	70.64	2
Pains	97.92	120.00	274.25	220.00	380.00	800.00	44
Gâteaux	14.42	^c -	125.00	60.25	0.00	367.00	12
Cornflakes	12.69	^c -	30.00	10.48	0.00	205.00	2
Croissants	10.15	^c -	^d -	22.00	0.00	0.00	5
Doughnuts	1.08	^c -	^d -	2.20	0.00	0.00	<1
Kaak assrounieh	1.85	^c -	^d -	3.70	0.00	0.00	<1
Kaak tea	3.23	^c -	30.00	12.30	0.00	167.00	2
Lahm bi ajin	9.23	^c -	^d -	57.00	0.00	0.00	12
Manakeesh	50.00	80.00	110.00	87.00	90.00	100.40	17
Pizzas	6.15	^c -	^d -	9.60	0.00	0.00	2
Toasts	0.46	^c -	^d -	0.70	0.00	0.00	<1
Total				496.00	639.00	975.00	100

^a p.c. = poids corporel.^b Le pourcentage de contribution de chaque aliment à l'exposition total moyenne à l'OTA.^c Le tiret signifie qu'il y a moins de 25% de consommateurs pour l'aliment considéré et que la valeur au p75 est de 0.^d Le tiret signifie qu'il y a moins de 25% de consommateurs pour l'aliment considéré et que la valeur au p95 est de 0.**Tableau 43.** Estimation de l'exposition alimentaire au déoxynivalénol (DON) des adolescents.

Adolescents (15 -18 ans) (n=100)							
Aliment	Consommation (g/day)			Exposition (ng/kg p.c. ^a /day)			
	Moyenne	P75	P95	Moyenne	p75	p95	% ^b
Biscuits	6.24	25.00	50.00	2.50	22.80	46.40	<1
Pains	126.00	220.00	320.00	218.00	365.00	510.00	55
Gâteaux	21.04	^c -	125.00	32.30	0.00	165.70	8
Cornflakes	20.08	^c -	60.00	3.30	0.00	25.80	1
Croissants	4.36	^c -	^d -	8.80	0.00	0.00	2
Doughnuts	4.75	^c -	^d -	9.90	0.00	0.00	3
Kaak assrounieh	2.38	^c -	^d -	2.50	0.00	0.00	<1
Kaak tea	3.56	^c -	30.00	5.30	0.00	63.20	1
Lahm bi ajin	13.37	^c -	^d -	23.50	0.00	0.00	6
Manakeesh	49.60	100.00	220.00	50.10	120.00	222.50	13
Pizzas	31.68	76.00	150.00	34.50	98.00	142.00	9
Toasts	1.78	^c -	^d -	1.40	0.00	0.00	<1
Total				392.00	459.00	664.00	100

^a p.c. = poids corporel.^b Le pourcentage de contribution de chaque aliment à l'exposition total moyenne à l'OTA.^c Le tiret signifie qu'il y a moins de 25% de consommateurs pour l'aliment considéré et que la valeur au p75 est de 0.^d Le tiret signifie qu'il y a moins de 25% de consommateurs pour l'aliment considéré et que la valeur au p95 est de 0.

Tableau 44. Caractérisation du risque aux mycotoxins des groupes de population étudiés.

Mycotoxine	Valeur Toxicologique de référence (VTR) SCF ^a (EFSA) ^b /JECFA ^c (ng/kg p.c. ^d /jour (semaine))	Enfants (9-14 ans)(n=130)				Adolescents (15-18 ans) (n=100)			
		% VTR ^e SCF (EFSA) /JECFA				% TRV ^e SCF (EFSA) /JECFA			
		Mean	p75	p95	% ^f	Mean	p75	p95	% ^f
Ochratoxin A (OTA)	120/100 ^g	23/28	26/31	37/44	1/1 (scénario 1 et 2)	18/21	22/27	28/34	0/0 (scénario 1 et 2)
Aflatoxines (BG)	1.00 ^h	330	413	556	58 (scénario 1)/95 (scénario2)	257	337	475	52 (scénario 1)/93 (scénario2)
Deoxynivalenol (DON)	1000 ^h	50	64	98	3	40	46	66	1

^a SCF: Scientific Committee for Food.

^b EFSA: European Food Safety Authority.

^c JECFA: Joint Expert Committee On Food Additifs and Contaminants.

^d p.c. = Body Weight.

^e Le pourcentage représente le rapport entre la moyenne de l'exposition obtenue à partir de deux scénarios et la Valeur Toxicologique de référence proposée pour chaque mycotoxine.

^f Le pourcentage représente le rapport entre le nombre de consommateurs dépassant la Valeur Toxicologique de référence et le le nombre total des sujets.

^g La Valeur Toxicologique de référence est exprimée en ng/kg p.c./semaine.

^h La Valeur Toxicologique de réfère

Discussion, Conclusion et Recommandations générales

1- Evaluation des risques microbiologiques

La situation semble être rassurante pour la population libanaise de point de vue risque microbiologique lié à la consommation des produits confectionnés par les industries agroalimentaires libanaises. En fait les résultats de cette recherche ont montré que le taux des produits non conformes aux normes était relativement faible (35% des produits laitiers analysés (soit 9 % du total des produits analysés), et que la contamination de ces aliments par des bactéries pathogènes était inexistante. De plus une comparaison de nos résultats à ceux obtenus par des recherches réalisées initialement dans ce domaine permet de dégager une tendance vers la baisse des contaminations microbiologiques de ce type d'aliments. Les pourcentages des produits non conformes aux normes microbiologiques ont passé de 60% pour les produits laitiers (Zaker, 1993), 50% pour les boissons (boissons gazeuses et jus de fruits) (Daher, 1994), 30% pour les produits en conserve (Safi, 1993), à 45% pour les produits laitiers (Shamasian, 1998), 20% pour les boissons (Baddoura, 2000), 10% pour les produits en conserve (IRAL, 1998) et à 35% pour les produits laitiers, 0% pour les boissons, 0% pour les produits en conserve en 2003 (résultats de notre recherche). Les germes de contamination de ces produits étaient variables mais il s'agissait surtout des bactéries non pathogènes témoins de conditions d'hygiène déficiente (pour les boissons, les conserves et les produits laitiers) mais aussi des bactéries pathogènes à l'homme (pour les produits laitiers, brucella (5%) et *Staphylococcus Aureus* (10%)). Par ailleurs, une étude plus récente portant sur la qualité microbiologique du lait et des produits laitiers a donné des résultats comparables à nos résultats et a permis de souligner un point essentiel sur l'origine de ces contaminations qui était attribuable non seulement à la matière première mais surtout à des contaminations qui ont eu lieu au sein même des industries. L'auteur a conclu alors qu'il était indispensable d'améliorer la condition hygiénique aux seins des industries productrices des produits laitiers pour assurer leur qualité microbiologique (Dagher, 2002).

L'analyse de ces données permet donc de conclure sur le fait que les dangers microbiologiques associés à ce type d'aliments semblent en voie d'être maîtrisés.

En fait de nombreux efforts ont été effectués dans le but d'une meilleure maîtrise des risques microbiologiques des denrées alimentaires. Ces efforts se sont traduits par la fixation des normes et des systèmes de contrôle et de surveillance par les autorités gouvernementales et par l'implantation des systèmes de prévention (HACCP) et de contrôle par les industriels au sein de leurs industries.

Ceci est du au fait que la qualité microbiologique des aliments a toujours constitué une préoccupation majeure tant pour les autorités gouvernementales que pour les industriels. D'une part, les altérations de la qualité microbiologique des denrées alimentaires a d'importantes conséquences sanitaires, sociales et économiques qui parfois, peuvent atteindre un état de crise. Les pertes des denrées alimentaires a été estimée à plusieurs millions de dollars dans les pays en voie de développement alors que les coût des conséquences sanitaires des cas d'origine microbiologique ont été estimés à plus de 4.8 billions de dollars dans les pays développés (Cateau, 1999). De plus ces conséquences sont directes et immédiates. D'autre part, la dimension psychologique, et sociologique et notamment la valeur symbolique de l'altération de la qualité microbiologique des aliments font du risque microbiologique un risque très particulier à forte charge émotionnelle. En effet, la qualité microbiologique est souvent considérée comme étant l'indicateur majeur de la qualité générale du produit alimentaire (Canet, 1999). Il semble donc être imputable aux industriels d'assurer la qualité

microbiologique des aliments qu'ils produisent pour gagner la confiance des consommateurs et éviter les pertes économiques.

Cependant, des observations dégagées des résultats de l'étude microbiologique réalisée dans le cadre de cette thèse relatives 1) à la différence significative des taux de contamination microbiologique entre les deux saisons de certains produits analysés qui va en parallèle avec une différence significative, et inversement proportionnelle à cette contamination, des teneurs en benzoates de ces mêmes aliments, 2) à l'absence d'additifs alimentaires dans les produits laitiers dont les taux de contamination sont non conformes aux normes et 3) aux types des contaminations rencontrés dans ces produits associés aux observations des résultats de l'étude réalisé sur la source de contamination des produits laitiers (Dagher, 2002) laisse poser la question que si la conformité aux normes de ces produits est la résultante de l'application des systèmes de contrôle et de prévention (plan HACCP) ou bien c'est la résultante d'un usage inapproprié de certains additifs pour masquer les techniques défectueuses de point de vue hygiénique afin d'assurer la qualité microbiologique. Cette dernière observation souligne la nécessité d'un examen de la situation d'une façon plus détaillée, et de rechercher l'usage des conservateurs dans les produits analysés avant de juger sur l'efficacité des mesures appliquées par les industriels et de conclure sur la véritable qualité microbiologique. De plus il s'avère être indispensables aux autorités gouvernementales de développer des plans d'inspections des usines mêmes et non seulement des produits finis et de coupler ces plans à un développement des systèmes de contrôle et de surveillance toxicologique en relation à l'usage d'additifs alimentaires.

2- Evaluation préliminaire des expositions aux additifs alimentaires

L'évaluation des expositions réalisées à la première étape par l'usage d'une méthode traditionnelle (CMT) a montré un risque de dépassement des DJA pour les benzoates, les sulfites, le BHA et le BHT lorsque les calculs des CMT étaient basées sur les TMA tels qu'ils sont indiqués dans le DGSFA, et pour les sulfites, le BHA et le BHT lorsque ses calculs étaient basées sur les TMA tels qu'ils sont indiqués dans la NN; permettant ainsi de conclure sur le fait que ces additifs alimentaires constituent des risque alimentaires potentiels pour les sous groupes de la population étudiés, et nécessitent par la suite l'emploi d'une méthode plus précise pour évaluer l'exposition actuelle à ces additifs.

En fait l'approche traditionnelle utilisée à cette étape est basée sur des larges suppositions; elle est donc inappropriée pour la prédiction de ce que les consommateurs sont actuellement entrain d'ingérer parce qu'elle est conçu à couvrir le scénario «le plus défavorable». Cependant elle est utile en tant qu'outil de sélection permettant d'identifier parmi les additifs ceux dont la DJA peut être dépassée (nécessitant donc une analyse plus détaillé) ainsi que les groupes d'aliments qui sont les sources potentielles d'exposition aux additifs alimentaires (HMSO, 1993).

En effet, même si les données alimentaires utilisées dans cette étape sont raffinées à un niveau approprié, les suppositions faites sur la présence et la concentration (TMA dans tous les aliments qui sont autorisés) des additifs alimentaires aboutissent également à une surestimation de l'exposition. En fait les TMA sont généralement utilisés comme indicateurs des taux les plus élevés qui sont permis dans les aliments. Dans le cas des additifs alimentaires ces taux sont basés sur leur fonction technologique. L'usage de ces taux va entraîner une surestimation des

résidus présents dans les aliments. En fait les additifs ne sont pas systématiquement utilisés dans tous les aliments autorisés: le choix et la concentration en additif varient significativement entre les produits et les fabricants. De plus cette approche suppose l'usage exclusif de chacun des additifs étudiés seuls alors qu'ils sont groupés dans la législation avec d'autres additifs qui remplissent les mêmes fonctions technologiques et par la suite peuvent être utilisés en alternative ou en complémentarité, dans ce dernier cas chaque additif est utilisé à une concentration inférieure au TMA. L'usage des additifs en association est commun puisque de nombreux mélanges ont des effets synergistes (Edlefsen et brewer, 1995). Par ailleurs, les processus de traitement utilisés dans la production de nombreux aliments, et les préparations domestiques peuvent entraîner des pertes importantes en additifs dans le produit final (Nunn, 1991). Citons par exemple que 35% du BHT est perdu des biscuits au cours des traitements thermiques et que cette perte atteint 80% des huiles après trois batch de pommes frites (Leclercq et al., 2000 (a)). Les caractéristiques de certains additifs (volatilité des sulfites et décomposition du BHA par les procédés de traitement thermique, par exemple) fait que le contenu en additifs des aliments juste produits est différent des produits prêts à être consommés. Finalement, des techniques additionnelles ou alternatives peuvent être utilisés pour la conservation des aliments (pasteurisation, déshydratation, congélation...) ce qui limite l'usage des additifs pour la conservation des aliments.

Par ailleurs, les résultats de cette étape ont mis en évidence l'existence d'une différence significative entre les CMT calculées pour chaque sujet en fonction de la réglementation adoptée. En fait, les estimations de l'exposition alimentaire basée sur la consommation alimentaire individuelle et les TMA du DGSFA ont toujours excédé (d'une façon significative) les estimations basées sur les TMA des NN. Ceci résulte du fait que les additifs alimentaires sont permis dans une plus grande variété d'aliments et à des TMA nettement plus élevés que ceux des NN. De plus il a été démontré que les valeurs élevées des TMA du DGSFA sont la conséquence du groupement alimentaire, dans lequel un type d'aliment ayant un TMA élevé va entraîner le TMA de toute la catégorie à laquelle il appartient, à ce niveau élevé (WHO, 1997). Dans ce cas, il sera préférable de séparer celui ci des autres aliments de la même catégorie, ce qui permet de réduire les TMA de la catégorie et par la suite obtenir des estimations d'exposition potentiellement plus faible, et donc plus réalistes. Ces observations permettent donc de souligner l'importance de l'influence des normes régularisant les niveaux de présence des additifs alimentaires dans les différents aliments et la façon par laquelle les TMA ont été attribués aux différents aliments (niveau d'agrégation) sur les niveaux potentiels d'exposition aux additifs alimentaires.

Finalement les résultats de cette étape ont permis de mettre en évidence que les normes établies par les autorités gouvernementales pour régulariser les taux des sulfites, du BHA et du BHT dans les différents aliments sont inadéquats pour protéger les sous groupes de la population étudiés contre les risques alimentaires que ces additifs peuvent représenter à ceux ci. En fait les autorités gouvernementales ont adopté les normes des directives de l'Union Européenne relatives aux additifs alimentaires ceci pour des raisons commerciales et politique. Les normes relatives à ces additifs doivent être révisées et des normes plus adaptées à la population libanaise doivent être établies ceci sans compromettre la fluidité des échanges commerciaux avec l'Europe. De plus il s'avère utile de répéter ce type d'évaluation pour d'autres additifs alimentaires qui constituent des préoccupations à un niveau international afin d'évaluer la pertinence des normes nationales établies pour ces additifs sur la protection des différents groupes de la population libanaise vis à vis de ces additifs d'une part et d'autre part d'identifier ceux qui constituent des risques alimentaires potentiels pour la population libanaise et qui nécessitent par la suite une évaluation plus précise de l'exposition.

3- données analytiques pour les additifs alimentaires et les mycotoxines

3.1- Les additifs alimentaires

La recherche et le dosage des additifs alimentaires ont concerné les quatre additifs alimentaires. Malgré que les résultats de l'évaluation préliminaire de l'exposition aux benzoates basée sur les TMA de la NN aient montré l'absence de la nécessité d'une analyse plus détaillée pour les benzoates, ceux-ci n'ont pas été exclus lors de l'exécution de cette étape pour deux raisons. D'une part, les principaux contributeurs de l'exposition alimentaire aux benzoates ont été trouvés d'être les sodas et les jus de fruits qui sont régulièrement consommés par 30%-60% des groupes de la population libanaise étudiés. D'autre part, la quasi totalité de ces produits est fabriquée localement. Comme les taux de benzoates peuvent être très variables en fonction des producteurs et peuvent être alors proches, égales ou supérieures aux limites maximales du DGSFA, suite à l'absence des systèmes de contrôle, et comme la loyauté à la marque est élevée dans ces cas (WHO, 1999 (c)), l'hypothèse des forts consommateurs qui consomment toujours des boissons contenant des taux élevés de benzoates doit être prise en considération, puisque ceux-ci vont probablement dépasser la DJA fixée pour les benzoates en consommant d'autres aliments qui sont supposés contenir ces additifs. Par exemple, un consommateur qui consomme 0.5 litre de ces boissons pourra ingérer 8.3 mg de benzoates /kg p.c. /j (166% la DJA) si ceux-ci contiennent les benzoates aux limites spécifiées dans le DGSFA. Il s'avère donc indispensable de déterminer les taux actuels des benzoates dans les aliments afin d'obtenir des données analytiques pouvant confirmer ou réfuter l'hypothèse avancée.

Les résultats de cette étape ont montré que les additifs alimentaires étudiés sont présents dans une large variété d'aliments y compris des aliments non autorisés selon les normes nationales dans 70% des cas pour les benzoates, 15% des cas pour les sulfites, 13% des cas pour le BHA et 3.5% des cas pour le BHT et à des taux dépassant les taux autorisés dans les normes NN dans 70% des cas pour les benzoates, 62% des cas pour les sulfites et 37% des cas pour le BHA. De plus l'étude des étiquettes et des ingrédients des produits alimentaires échantillonnés pour analyse a montré que 50% des jus de fruits, 75% des produits laitiers, 25% des conserves alimentaires et 50% des chips analysés ne contenaient pas les additifs alimentaires étudiés (ou d'additifs alimentaires en général). Cependant la technique d'échantillons composites adaptée à cette étape n'a pas permis de ressortir parmi les aliments analysés ceux qui ne contiennent vraiment pas les additifs alimentaires. Ceci souligne la nécessité d'examiner la situation d'une façon plus détaillée et d'établir des plans de contrôle et de surveillance pour ces additifs alimentaires par les autorités gouvernementales.

Par ailleurs, une synthèse des données analytiques relatives à ces additifs alimentaires obtenus par recensement des données disponibles sur les dernières années auprès de l'IRAL est présentée dans le tableau 45. Ces données ont été obtenues par des méthodes de dosage similaire à celles utilisées dans notre recherche. L'analyse de ces données permet de constater que le nombre de données analytiques est relativement faible pour le BHA et le BHT alors qu'elles étaient absentes pour les sulfites. De plus ces données concernent des aliments bruts dans 11% des cas pour les benzoates, 80% des cas pour le BHA et dans 100% des cas pour le BHT et des aliments tels que consommés dans 89% des cas pour les benzoates et uniquement 20% des cas pour le BHA. La comparaison de ces données à celles obtenues par la présente recherche permet de dégager trois points essentiels:

- Premièrement, que les taux des benzoates et du BHA dans les aliments tels que consommés sont entrain d'augmenter d'une année à l'autre tout en restant inférieurs à ceux obtenus dans la présente recherche; ceci permet de souligner une tendance vers la hausse de l'usage de ces additifs alimentaires par les industriels.

- Deuxièmement, que les taux des benzoates, du BHA et du BHT dans les aliments bruts sont toujours supérieurs à ceux obtenus dans la présente recherche qui a uniquement été portée sur des aliments tels que consommés; ceci peut être expliqué par les phénomènes de pertes ou de dilutions que ces additifs peuvent subir au cours des processus de traitement (préparation domestique par exemple) ou par la proportion d'aliment contenant l'additif dans l'aliment tel que consommé (tels que pourcentage de la matière grasse dans l'aliment) aboutissant à des taux des additifs alimentaires dans les aliments tels que consommés plus faibles que ceux qui sont présents dans la matière brute à partir de laquelle ils ont été préparés.

- Et finalement que les données obtenues pour le BHA et le BHT étaient comparables aux résultats obtenus par la présente recherche. En fait ces données montrent que le BHT n'a jamais été détecté dans les huiles et les graisses alors que le BHA a été constamment détecté dans toutes les huiles et les graisses; ceci suppose l'absence du BHT et la présence du BHA dans les aliments contenant de la matière grasse; hypothèse confirmée par les résultats de notre recherche.

Tableau 45. Synthèse de données analytiques pour les benzoates, BHA, BHT

Années	Nombre de données	Types de produits	Benzoates Taux Moyens (mg /kg), pourcentage de détection dans les aliments analysés et limites (mg /kg)	BHA Taux Moyens (mg /kg) et pourcentage de détection dans les aliments analysés et limites (mg /kg)	BHT Taux Moyens (mg /kg) et pourcentage de détection dans les aliments analysés
1994-1996	6	Sodas	36 (1%) (0-50)	-	-
1996-1998	10	Sodas	40 (0%) (10-80)	-	-
1998-2000	5	Sodas	64 (0%) (10-100)	-	-
2000-2002	10	Sodas	85 (0%) (10-120)	-	-
1994-1996	14	Jus de fruits	120 (80%) (35-180)	-	-
1996-1998	10	Jus de fruits	120 (80%) (65-180)	-	-
1998-2000	10	Jus de fruits	140 (80%) (85-200)	-	-
2000-2002	10	Jus de fruits	165 (100%) (105-200)	-	-
1994-1996	10	Laban	23 (100%) (15-80)	-	-
1996-1998	10	Labneh	60 (100%) (35-100)	-	-
1998-2000	20	Labneh	85 (100%) (35-100)	-	-
1998-2000	10	Fromage blanc	13 (100%) (7-15)	-	-
2000-2002	20	Laban	60 (100%) (35-78)	-	-
2000-2002	20	Labneh	98 (100%) (38-120)	-	-
2000-2002	20	Fromage blanc	52 (100%) (25-75)	-	-
1994-1996	10	Confitures	0 (0%)	-	-
1996-1998	10	Confitures	10 (2%) (7-19)	-	-
1998-2000	10	Confitures	0 (0%)	-	-
1996-1998	12	Conserves, pois chiche	500 (100%) (305-1140)	-	-
1996-1998	8	Conserves fève	900 (100%) (607-1076)	-	-
1996-1998	4	Conserves pois	324 (100%) (320-380)	-	-
1996-1998	2	Conserves thon	1000 (100%) (960-1140)	-	-
1994-1996	20	Matière grasse	-	80 (100%) (60-100)	0 (0%)
1996-1998	20	Matière grasse	-	90 (100%) (60-120)	0 (0%)
1998-2000	20	Matière grasse	-	66 (100%) (60-100)	0 (0%)
2000-2002	20	Matière grasse	-	84 (100%) (50-100)	0 (0%)
2000-2002	10	Céréales petit déjeuner	-	0 (0%)	0 (0%)
2000-2002	10	Chips	-	24 (100%) (6-40)	0 (0%)

Source: communiqué personnel

- : analyse non effectuée.

3.2- Les mycotoxines

Les résultats de cette recherche ont montré que l'OTA, les aflatoxines BG et le DON sont prévalents dans les denrées alimentaires disponibles au Liban à des taux de contamination conformes aux normes nationales et européennes en vigueur. Cependant la présence de certaines denrées alimentaires contaminées par l'OTA, par les aflatoxines et par le DON à des taux dépassant les limites spécifiés dans ces normes met en relief le besoin d'établir des actions réglementaire pour l'OTA et le DON et des plans de contrôle et de surveillance pour ces trois mycotoxines afin de réduire leur présence au niveau de la chaîne alimentaire et par la suite réduire les risques sanitaires liés à celles-ci.

De plus, les rapports du JECFA ainsi que les résultats des études réalisées dans des pays voisins ou des pays du bassin méditerranéen ont également montré que la contamination des denrées alimentaires par ces mycotoxines est relativement ubiquitaire et courante. Cependant les taux de contamination ainsi que le pourcentage et la nature des denrées alimentaires contaminées ont été trouvés différentes de ceux obtenus par la présente recherche. Ceci peut être essentiellement du à la différence de l'année et de la nature des denrées (brutes ou telles que consommées) considérées, à la différence des sources d'approvisionnement entre les pays et finalement à la différence des conditions de stockage pratiqués dans les différents pays.

En fait, le JECFA a rapporté des estimations des taux moyens de la contamination de certaines denrées alimentaires par ces trois mycotoxines au niveau européen. Pour l'OTA, les taux moyens de contamination des céréales, des produits à base de céréales, des fruits secs et des légumineuses étaient estimés respectivement à 0.94 µg/kg, 0.19 µg/kg, 2.2 µg/kg et 0.19 µg/kg (WHO, 2001). Pour les aflatoxines BG, les taux de contamination des céréales et des fruits secs étaient estimés respectivement à 0.1- 7.6 µg/kg et à 0.25 -5.9 µg/kg (WHO, 1998). Finalement pour le DON, ces estimations étaient de 640 µg/kg dans le maïs, 2600 µg/kg dans le riz et 310 µg/kg dans le blé (WHO, 2001).

En turquie, les céréales, les légumineuses et les fruits secs ont été trouvés d'être contaminés par les aflatoxines et l'OTA. Le pourcentage de contamination de ces denrées alimentaires par les aflatoxines était estimé respectivement à 72%, 60% et 64% avec des taux de contamination allant de 0.03- 3.16µg/kg et atteignant des niveaux de 117.9-471.9 µg/kg dans les figues secs fluorescentes. Le pourcentage des céréales et des légumineuses contaminées par l'OTA n'a pas été rapporté. Cependant des taux de contamination pour ces deux types de denrées alimentaires allant de 0.027 à 4.07 µg/kg ont été rapportés. Le pourcentage de contamination des fruits secs par l'OTA était estimé à 15% avec des taux situés entre 0.3-10 µg/kg (Aksoy et al., 2007, Karac et Nas, 2006, Baydar et al., 2005, Senyuva et al., 2005).

En Arabie Saoudite, les céréales et les denrées alimentaires à base de céréales ont été trouvées d'être contaminées par le DON. Le pourcentage de contamination de ces denrées était estimé à 80% et les taux de contamination étaient situés entre <2-4000 µg/kg (Al julaifi et Al falih, 2001).

En Egypte, le maïs et les produits à base de maïs étaient trouvés d'être contaminés par le DON. Le pourcentage de contamination de ces denrées était estimé à 80% et les taux de contamination étaient situés entre 10.1 et 28.8 µg/kg. De plus 50% des céréales pour petit déjeuner ont été trouvées contaminés par les aflatoxines à des taux de contamination allant de

6 à 10 µg/kg et que 2.9% de ces céréales étaient contaminées à des taux supérieurs à 35 µg/kg (El Sayed et al., 2003).

Finalement en maroque, les fruits secs, les riz et les jus de fruits ont été trouvés d'être contaminés par l'OTA. Le pourcentage de contamination était estimé à 50 % pour les fruits secs avec des taux allant de 0.03 à 4.95 µg/kg et à 50% pour le riz avec des taux de contamination allant de 0.02 à 32.4 µg/kg et finalement à 1% pour les jus de fruits avec un taux moyen de 1.16 µg/kg (Zinedine et al., 2007, Filali et al., 2001).

4- Evaluation des risques liés à certains additifs alimentaires et à certaines mycotoxines

4.1- Considération méthodologique

Comme l'évaluation des risques aux substances chimiques est fortement influencée par le modèle d'exposition utilisé, les aspects méthodologiques sont pris en considérations et discutés. En fait plusieurs paramètres peuvent influencer les résultats de l'exposition alimentaire à une substance chimique (Rees et Tennants, 1994). Ceux-ci incluent la méthodologie de l'enquête de consommation, le choix du poids corporel des individus, la prise en compte ou non des sous déclarants, la prise en compte d'un facteur de correction de composition des aliments et la nature des données de contamination utilisée (données de contamination sur aliments bruts ou transformés). Tous ces paramètres génèrent un certain degré d'incertitude aboutissant à une situation où l'évaluation de l'exposition nécessite souvent d'être raffinée *à posteriori*. Il est important de noter cinq remarques à cet égard.

La première est que l'approche déterministe adoptée pour l'évaluation de l'exposition permet une estimation réaliste du niveau moyen et des forts quantiles de l'exposition. De plus cette méthodologie est considérée comme étant un bon outil pour l'identification des groupes ou des tranches d'âge plus fortement exposés, pour l'identification des principaux groupes d'aliments contributeurs à l'exposition, et pour la surveillance de l'alimentation et l'identification des tendances utiles pour guider et orienter les programmes de surveillance et de contrôle. Elle permet également de faciliter les comparaisons avec d'autres études internationales qui utilisent une approche méthodologique similaire.

La seconde est que la méthodologie (questionnaire de rappel de 24 heures) de l'enquête de consommation est bien connue de sous estimer le nombre de consommateurs d'une part et de surestimer la consommation alimentaire d'autre part (Sabaté, 1994). Par ailleurs le questionnaire de fréquence permet d'identifier, parmi les aliments majeurs contributeurs aux expositions aux produits chimiques, ceux qui sont consommés régulièrement à long terme.

La troisième est que l'usage des données de contamination des produits alimentaires transformés et des produits alimentaires «tels que consommés» ainsi que l'usage d'un facteur de correction dérivé des recettes alimentaires afin de pouvoir utiliser les données de contamination qui existent uniquement pour les aliments bruts est approprié et essentiel puisque ça permet d'éviter une sous estimation ou une surestimation de l'exposition suite aux phénomènes de dilution ou de concentration des toxiques qui peuvent résulter des processus technologiques appliqués aux aliments (Leblanc et al., 2002).

La quatrième est que l'usage du poids corporel réel des individus est essentiel pour éviter une sous estimation des expositions résultant de l'usage d'un poids corporel approximative.

La dernière est bien que la moyenne est un faible indicateur de la distribution surtout lorsqu'elle est asymétrique d'une façon bien marquée (ce qui est toujours le cas de données de contamination), l'utilisation de la consommation moyenne de contamination dans les calculs des expositions représente une estimation réaliste et appropriée de l'exposition à long terme puisque ces expositions sont comparés à des doses toxicologiques de références (DJA, DHTP, DJTP) établies sur toute la vie par les instances scientifiques européennes et internationales.

Toutes ces remarques aboutissent à la conclusion que l'approche utilisée représente une identification réaliste des préoccupations possibles en terme de risques alimentaires liés à ces substances même si elle inclus un nombre raisonnable de facteurs d'incertitudes.

4.2- Interprétation des résultats

Il est important de noter, quant à l'interprétation générale des résultats, que les toxicologues s'accordent en général sur le fait que pour des toxiques à effets chroniques, une exposition supérieure aux valeurs toxicologiques de références à un instant t et pendant des courtes périodes de la vie d'un individu n'induit pas un risque significatif pour la santé des personnes (ILSI, 1996).

4.2.1- Evaluation de l'exposition lié aux additifs alimentaires

Les résultats de cette étape montre que pour les forts consommateurs de la population étudiée, les DJA des benzoates, des sulfites, du BHA et du BHT peuvent être dépassées. Pour les sulfites et le BHT, les pourcentages des sujets ayant une exposition alimentaire dépassant les DJA fixés pour ces additifs sont respectivement 18% et 12% pour le groupe des enfants et respectivement de 14% et de 9% pour le groupe des adolescents. Pour les benzoates et le BHA, le nombre de sujets ayant une exposition alimentaire dépassant les DJA fixés pour ces additifs est trop faible pour permettre une analyse avec une confiance raisonnable. Pour les sulfites, les principaux contributeurs de l'exposition alimentaire sont les fruits secs qui sont traditionnellement et régulièrement consommés à des quantités pouvant atteindre 120 g au 95^{ème} percentile. En fait, dans notre étude 12% des enfants et des adolescents consomment les fruits secs au moins une fois par jour. De plus des teneurs élevés en sulfites (proche ou au dessus des TMA tels qu'ils sont indiqués dans le DGSFA et la NN) ont été trouvées dans ceux ci. Comme les fruits secs sont consommés tels qu'ils sont (sans aucun traitement ultérieur), l'exposition aux sulfites à partir de ceux ci demeure non négligeable et l'ingestion de 120 g de fruits secs contenant les sulfites aux TMA ou à des taux supérieurs va aboutir à des expositions dépassant la DJA chez les enfants et chez les adultes. Cette observation que des catégories de faible consommation au niveau moyen finissent par être des contributeurs majeurs à l'exposition des forts percentiles suggèrent que des techniques tels que le nombre de portion nécessaire pour atteindre la DJA pourrait être un important complément pour appliquer aux catégories (aux aliments) lors de l'établissement des TMA à ceux ci. De plus, dans les échantillons analysés, des dépassements des TMA de la NN ont été observés pour les candies, et les biscuits et que même des dépassements des TMA du DGSFA ont été observés pour les crackers. Ces aliments doivent être alors considérés comme une autre source potentielle d'exposition alimentaire aux sulfites même si leur contribution à la DJA n'était pas significative dans notre étude. Finalement les teneurs en sulfites ont été trouvés d'être nettement inférieurs aux TMA du DGSFA et du NN dans les légumes secs. En effet, les

sulfites sont, en un sens, des additifs uniques, du fait que les taux d'utilisation ne reflète pas les teneurs restant dans l'aliment lors de sa consommation. Ceci est dû aux pertes par volatilisation, au cours des processus de traitement et de stockage des aliments traités. Par exemple, les légumes secs, qui peuvent contenir des sulfites à des taux allant jusqu'à 2500 mg/kg d'aliment (DGSFA), sont généralement réhydratés et cuisinés, résultant en de très faibles teneurs résiduelles en sulfites présents dans les aliments au moment de leur consommation et par la suite cette catégorie d'aliment ne peut constituer une source potentielle d'exposition alimentaire aux sulfites.

Pour le BHT, les gommes à mâcher, première source potentielle d'exposition au BHT, mérite une discussion particulière, du fait que celles-ci sont mâchées et non pas ingérées. Dans le présent travail dans le but de couvrir le scénario le plus défavorable, tout le BHT présent dans les gommes à mâcher ont été pris en compte dans l'estimation de l'exposition alimentaire au BHT. En effet, il est généralement reconnu que les additifs contenu dans ces produits ne sont pas complètement ingérés, mais que le pourcentage d'extraction varie en fonction des études (Verhagen et Kleinjans, 1991). Aucune extraction significative n'a été mesurée ni par L.A Dreyfus ni par Benzon –Denmarkin (Leclercq et al., 2000(a)). Dans une étude d'extraction du BHA et du BHT de la base de gomme, conduite par General Foods France, les résultats d'extraction allaient d'une absence d'extraction, une extraction détectée à 1% jusque 10-20%, ceci en fonction du type de la base (Catherine et al., 1983). Une étude de libération conduite par Dandy en 1981 a rapporté un taux d'extraction de 10-20%, ce taux également dépendait du type de la base (Leclercq et al., 2000(a)). Sur la base d'une révision de la littérature, l'association des fabricants du BHT Européens a conclu que 80-90% du BHT contenu dans les gommes à mâcher ne sont pas ingérés (Nunn, 1991). Dans une seule étude des taux élevés du BHT (50%) ont été trouvés d'être extraits de la gomme après l'avoir mâché pendant 30 minutes (Walker, 1985). Donc, vu les faibles taux d'extraction du BHT à partir des gommes à mâcher qui ont été rapportés dans la plupart des études, on peut conclure que si les pourcentages d'extraction ont été pris en compte, l'exposition alimentaire au BHT des enfants et des adolescents aurait dû être probablement plus faible. Il s'avère donc nécessaire d'affiner les données de consommation en fonction des taux d'extractions du BHT à partir des gommes à mâcher afin d'évaluer avec plus de précision le risque potentiel de cet additif pour la santé du consommateur. Une autre composante principale de l'exposition alimentaire au BHT est par l'intermédiaire des candies où le BHT a été trouvés à des taux de 50 mg/kg malgré que le BHT n'est pas autorisé à être utilisé dans ces aliments. Ceci laisse supposer la présence de BHT dans d'autres aliments non autorisés et non pris en considération dans le présent travail.

Pour les benzoates, l'exposition alimentaire aux benzoates a dépassé la DJA dans seulement 3% (6 enfants) des cas. Les sodas et les jus de fruits ont paru être les majeurs contributeurs de l'exposition alimentaire aux benzoates. En effet, ces produits sont largement (respectivement 620 et 480 ml/j pour les forts consommateurs (P95)) et fréquemment consommés par les enfants et les adolescents (respectivement 60% et 38%), ainsi toute modification des taux d'utilisation des benzoates dans ces produits par les industriels suite à l'adoption de nouvelles techniques (nouveau type d'emballage par exemple) aura une conséquence directe et appréciable sur l'exposition alimentaire totale aux benzoates pour ces groupes de la population. Un contrôle des taux d'utilisation des benzoates dans ces produits s'avère donc être indispensable pour assurer la protection de la santé des consommateurs (surtout celle des forts consommateurs).

Malgré que la faible possibilité de dépassement de la DJA pour le BHA (2 enfants uniquement avaient des expositions qui dépassaient la DJA), des taux élevés du BHA

(proches ou supérieurs des TMA du DGSFA et du DEU) ont été trouvés dans les biscuits et les crackers qui ont paru être les contributeurs majeurs de l'exposition alimentaire au BHA. De plus, comme ces aliments sont largement (97g pour les forts consommateurs) et fréquemment consommés par une large proportion des enfants et des adolescents (60% sont des consommateurs réguliers de ces aliments), un contrôle des taux d'utilisation du BHA dans ces produits s'avère être indispensable pour assurer la protection de la santé des consommateurs.

a- Comparaison avec d'autres pays

La situation paraît plutôt être similaire à un certain nombre de pays différents qui ont procédé à une analyse de l'exposition alimentaire aux benzoates, sulfites, BHA et BHT (HMSO, 1993; Ishiwata et al., 1997; Ishiwata et al., 1998 (a); Ishiwata et al., 1998 (b); Kirkpatrick and Lauer, 1986; Leclerq et al., 2000 (a); Leclerq et al., 2000 (b); Lowik et al., 1998; Saba et al., 1992; Vandokkum et al., 1982; Verger et al., 1998; Vincenzi, 1990; WHO, 1995; WHO, 2000(d), WHO, 1999(c)). En effet, les estimations nationales pour ces additifs pour les consommateurs au niveau moyen et au 95^{ème} percentile de la distribution de l'exposition, basées sur des modèles de diète alimentaire, de budget des ménages ou des records alimentaires individuelles, étaient au dessus de la DJA lorsqu'elles étaient calculées en utilisant les limites maximales et les variétés d'aliments autorisées telles que spécifiées dans le DGSFA (WHO, 2000(d)). Ceci reflète le fait que les TMA du DGSFA représente les limites maximales soumis par n'importe quel état membre ou par les organisations internationales non gouvernementales, et que la variété d'aliments dans lesquelles l'usage des additifs alimentaires est autorisé, est plus large que celle qui basée sur la réglementation nationale ou régionale. Ces estimations allaient de 100% à 400% de la DJA pour les benzoates, de 105% de la DJA à 200% de la DJA pour les sulfites, de 100% de la DJA à 260% de la DJA pour le BHA et de 300% à 1950% de la DJA pour le BHT (WHO, 2000(d)). Par ailleurs, l'exposition des consommateurs au 95^{ème} percentile a atteint 750% de la DJA pour les benzoates, 4200% de la DJA pour les sulfites, 1800% de la DJA pour le BHA et 12000% de la DJA pour le BHT (WHO, 2000 (d)). Il est important de réitérer néanmoins, que les niveaux élevés de ces expositions nationales étaient obtenus à partir des méthodologies utilisant des données de consommation non raffinées. Cependant les données disponibles, à partir de ces études, étaient insuffisantes pour estimer le nombre de consommateurs qui pourraient dépasser la DJA, ou de déterminer l'importance ou la durée des expositions au dessus de la DJA (WHO, 2000(d)). De plus comme le comportement alimentaire diffère entre les populations, les aliments contributeurs majeurs à l'exposition alimentaire de ces additifs ont été trouvés d'être variables.

Par ailleurs, des évaluations plus détaillées de l'exposition à ces additifs basées sur des données de consommation ou de contamination raffinées, ont donné des résultats comparables aux résultats obtenus dans le présent travail, même si un nombre limité de pays a utilisé l'approche TDS dans ces estimations. En effet, les résultats d'une étude conduite dans les pays bas ont suggéré que la probabilité de dépassement des DJA établies pour les benzoates, sulfites, BHA et BHT par les adolescents est faible (Vandokkum et al., 1982). Les expositions aux benzoates, sulfites, BHA et BHT étaient estimées respectivement à 10%, 7%, <1% et 0% de la DJA à la moyenne de la distribution et à 25%, 30%, 1% et 0% de la DJA au 95^{ème} percentile de l'exposition. Ces résultats étaient principalement liés aux faibles taux des résidus de ces additifs retrouvés dans une variété limitée des aliments analysés. Dans une étude plus récente, conduite dans le même pays, Verhagen et Kleinjans (1990) ont conclu que la DJA du BHT peut être dépassée (110% de la DJA), particulièrement pour les enfants (Verhagen et

Kleinjans, 1990 (b)). Des conclusions similaires ont été rapportées par des études comparables conduites en France (101% de la DJA du SCF) (Anonymous, 1990), au Canada (266% de la DJA du JECFA) (Kirikpatrick and lauer, 1986), en Australie (108% de la DJA du JECFA) (WHO, 1995) et en Italie (1400% de la DJA du SCF) (Leclerq et al., 2000(a)). Dans toutes ces études les principaux contributeurs à l'exposition du BHT étaient les aliments de la catégorie « pain et céréales » et les chewing gums. Dans une étude française, parmi 10 additifs alimentaires pour lesquels un risque théorique de dépassement de la DJA a été mise en évidence, uniquement pour les sulfites, le risque de dépassement de la DJA (110% de la DJA) n'a pas pu être exclu lorsque des données raffinées de consommations alimentaires et de contamination ont été utilisées (Verger et al., 1998). Des résultats similaires ont été rapportés par une étude italienne qui était basée sur une détermination analytique des aliments contenant des sulfites et leur combinaison avec des repas standards pour les adultes et pour les enfants (Leclerq et al., 2000(b)). Les expositions aux sulfites étaient estimées à 110% de la DJA. Le vin et les fruits secs ont été rapportés d'être les principaux contributeurs à l'exposition des sulfites par ces études. Finalement, plusieurs études basées sur les taux analytiques moyens et les consommations alimentaires moyennes de la population ou celles des forts consommateurs, ont été conduites au Japon et en Corée. Ces études ont montré que les expositions alimentaires aux benzoates, aux sulfites, au BHA et au BHT n'ont pas dépassé leur DJA respective. Au Japon les expositions étaient estimées à 4% de la DJA pour les benzoates (Toyoda et al., 1983; Ischiwata et al, 1997), à 4.7% de la DJA pour les sulfites (Ischiwata et al, 1998 (b)), à 0.7% de la DJA pour le BHA (Ischiwata et al, 1998 (a)) et à 0.3% de la DJA pour le BHT (Ischiwata et al, 1998(a)). En Corée, les expositions moyennes et celles des forts consommateurs étaient estimées à 0.2-0.5% et 3.9-39% de la DJA pour les benzoates (Yoon et al., 2003), à <1% de la DJA pour le BHA (Suh et al., 2005) et à 0.3% de la DJA pour le BHT. Les faibles expositions observées dans ces études étaient principalement dues aux faibles taux de ces additifs retrouvés dans les aliments analysés d'une part et d'autre part, aux faibles pourcentages d'aliments dans lesquels ces additifs ont été détectés. De plus les aliments principaux contributeurs aux expositions de ces additifs ont été trouvés similaires entre les deux pays (soya sauce (benzoates), poissons secs (BHA) et mannaman paste (BHT)) mais différents de ceux rapportés dans notre recherche vue la différence du comportement alimentaire entre les populations étudiées.

4.2.2- Evaluation des risques liés aux mycotoxines

Les résultats de cette étape montre que pour les forts consommateurs des groupes de population étudiés, les VTR de l'ochratoxine A, des aflatoxines BG, et du déoxynivalénol peuvent être dépassées. Pour les aflatoxines BG, le nombre de sujets dépassant la DHJT est de 187 (117 enfants et 70 adolescents). Pour l'OTA et le DON le nombre de sujets ayant une exposition alimentaire dépassant les VTR établies pour ces mycotoxines est trop faible (uniquement 1 enfant pour l'OTA et 4 enfants et 1 adolescent pour le DON) pour permettre une analyse avec une confiance raisonnable.

Pour l'OTA, les principaux contributeurs à l'exposition totale sont les pains et les manakeesh (petit déjeuner libanais traditionnel) qui sont consommés avec des quantités élevées au niveau du 95^{ème} percentile de la consommation alimentaire (220 g/jour). En effet comme ces aliments sont régulièrement consommés par une forte proportion de la population libanaise (100% pour les pains et 25% pour les manakeesh), il y a un besoin pour établir les limites maximales de l'OTA dans ces aliments ainsi que des programmes de surveillance et de contrôle afin de protéger la santé des consommateurs. De plus les limites européennes établies pour l'OTA ont été dépassées dans les biscuits. Ces aliments doivent être considérés comme une autre source

potentielle d'exposition à l'OTA même si leur contribution à l'exposition totale n'a pas été significative dans notre recherche.

Pour les aflatoxines, la DJTP établie a été excédée par une large proportion des groupes de population étudiés. Ceci peut être la conséquence des taux de contamination élevés (au dessus des limites de détection) de ces contaminants trouvés dans les céréales et les produits à base de céréales. En fait les autorités libanaises ont adopté en 2004 les mêmes limites établies pour les aflatoxines dans la Communauté Européenne pour des raisons politiques, économiques et commerciales. Ces limites n'apparaissent pas être appropriées pour protéger la santé du consommateur libanais. En effet la présence des aflatoxines BG à des taux inférieurs aux limites nationales et européennes a résulté en un dépassement des DJTP par un facteur allant de 1.1 à 7. Ceci peut être expliqué par la différence des comportements de consommation alimentaire entre la population libanaise et les populations européennes. Il est bien reconnu qu'un aliment fortement consommé dans une région donnée et qui est hautement susceptible d'être contaminé par les mycotoxines va nécessiter une limite différente de celle qui est nécessaire pour protéger une population d'une région où la consommation de cet aliment est plus faible. Cette dernière observation attire l'attention vers la nécessité de reconsidérer les limites établies pour ces aliments (céréales et produits à base de céréales). L'établissement de ces limites doit prendre en considérations les comportements de consommation alimentaire et doit être basé sur les évaluations des risques. De plus les niveaux de contamination observés dans les fruits secs ont dépassé les limites nationales et européennes et peuvent être considérés comme étant des aliments à risque pour les consommateurs réguliers de ce type d'aliments même s'ils n'ont pas été trouvés d'être les principaux contributeurs de l'exposition aux aflatoxines BG dans notre recherche.

Bien que la possibilité de dépassement de la DJTP du DON est faible, des taux de contaminations élevés ont été observés dans les pains qui ont été trouvés comme étant les principaux contributeurs de l'exposition au DON. Les Manakeesh, les biscuits et les gâteaux ont été également trouvés d'être de contributeurs importants de l'exposition alimentaire au DON. En fait les manakeesh, les biscuits et les gâteaux sont régulièrement consommés par respectivement par 25%, 60% et 20% des sujets. L'établissement des limites pour le DON couplé à une routine surveillance des céréales et des aliments à base de céréales qui sont régulièrement consommés par les enfants et les adolescents paraît être approprié pour la protection de la santé des consommateurs.

Par ailleurs les résultats de cette recherche ont permis de compléter les résultats d'une étude préliminaire qui a porté sur la prévalence de l'OTA dans le plasma sanguin de la population libanaise adulte et dans quelques denrées alimentaires en confirmant l'hypothèse avancée par les auteurs sur le mode alimentaire de l'exposition à l'OTA de la population libanaise et en identifiant les aliments contributeurs majeurs de ces expositions (Assaf et al., 2004).

Finalement les expositions aux aflatoxines et au DON obtenues par la présente recherche sont inférieures aux estimation de l'exposition à ces deux mycotoxines effectuées par le JECFA pour les pays du moyen orient et qui étaient respectivement de 1.3- 60 ng /kg p.c/jour pour les aflatoxines (WHO, 1998) et de 2400 ng /kg p.c/jour pour le DON (WHO, 2001). Ceci est du au fait que dans ces estimations des données de consommation non raffinées ainsi que des données de contamination des aliments bruts émanant des pays autres que ceux du moyen orient ont été utilisées alors que dans la présente recherche des données de consommation individuelles et des données de contamination des aliments tels que consommés disponibles sur le marché libanais ont été utilisées.

5- Conclusion et recommandations générales

Le présent travail présente une évaluation des risques liés d'une part à certains contaminants microbiologiques (staphylocoques, coliformes....) présents dans une sélection de denrées alimentaires confectionnées au Liban et, d'autre part, à certains additifs alimentaires (benzoates, sulfites, BHA et BHT) et mycotoxines (l'ochratoxine A, aflatoxines BG, déoxynivalénol), pour des sous groupes de la population libanaise considérés à priori d'être à risque: les enfants et les adolescents.

L'évaluation des risques microbiologiques liés à la consommation des aliments confectionnés au Liban a montré que la situation paraît être rassurante pour la population libanaise de point de vue risques microbiologiques liés aux bactéries qui sont susceptibles d'être présentes dans une sélection d'aliments transformés fabriqués localement. Cependant cette évaluation n'a pas pu mettre en évidence le moyen par lequel la maîtrise de ce type de danger est assurée. Ceci met en relief la nécessité d'examiner la situation d'une façon plus détaillée afin de conclure sur l'efficacité des systèmes de prévention et de contrôle implémentés à cet égard.

Les résultats de l'évaluation des risques chimiques ont montré que la situation semble être rassurante de point de vue expositions aux benzoates, sulfites, BHA, BHT, OTA et DON. Cependant il semble nécessaire que soit portée une attention particulière à l'exposition aux aflatoxines et à celle de certains groupe de populations tels que les enfants et les gros consommateurs pour lesquels le risque d'être exposés à un niveau supérieur aux valeurs toxicologiques de références vis-à-vis des additifs alimentaires et des mycotoxines n'est pas nul. De plus les résultats ont montré les mycotoxines sont présents, d'une façon générale dans les aliments consommés par les sous groupes de la population libanaise étudiés, à des taux conformes aux normes nationales et européennes en vigueur. Cependant des cas de dépassement des TMA des additifs alimentaires (benzoates, sulfites, BHA et BHT) ainsi que des limites maximales de certaines mycotoxines (OTA, aflatoxines BG) dans certains aliments analysés ont été observés. Ceci souligne la nécessité de l'établissement des plans de contrôle et de surveillance pour ces substances dans les différentes denrées alimentaires afin de protéger la santé des consommateurs. De plus les résultats de cette évaluation ont permis de souligner la présence de certains des additifs étudiés (benzoates, sulfites et BHT) dans des aliments non autorisés à en contenir selon les NN et le DGSFA. Ce dernier résultat met en relief la possibilité d'une sous estimation des résultats obtenus dans cette recherche en relation aux aliments qui pourraient contenir réellement ces additifs alimentaires et qui n'ont pas été pris en considération dans notre évaluation. Finalement cette évaluation a permis d'identifier les principaux contributeurs des expositions aux benzoates, aux sulfites, au BHA, au BHT et aux mycotoxines étudiées. Ceux-ci ont été trouvés d'être respectivement les sodas et les jus de fruits, les fruits secs, les biscuits, les chewing gum et les produits céréaliers.

Par ailleurs, il est important de garder dans l'esprit que cette recherche est représentative de la méthodologie mise en place et «du bruit de fond» de l'exposition d'origine alimentaire. En conséquence, elle ne tient pas compte des situations de surexposition particulières liées à des pratiques comportementales ou liées à des accidents particuliers.

Pour conclure, il est recommandé pour:

- **Les dangers microbiologiques des aliments:**

- d'examiner la situation d'une façon plus détaillée (recherche de l'usage des additifs alimentaires dans les aliments conformes par exemple) et plus étendue (touchant d'autres secteurs tels que la restauration collective) pour juger de la sécurité microbiologique des aliments,
- d'établir des plans de surveillance des industries et des conditions d'hygiène pratiquées au sein des industries.

- **Les additifs alimentaires:**

- d'établir des plans de contrôle et de surveillance pour ces additifs afin de détecter leur présence dans des aliments non autorisés ou à des taux non autorisés surtout dans les aliments qui sont largement consommés par les enfants,
- de réviser les TMA des ces additifs alimentaires dans les différents aliments pour qu'ils soient plus adaptés à la population libanaise (surtout pour les sulfites, le BHA et le BHT),
- de limiter les nouvelles utilisations,
- de supprimer leur emploi dans les denrées pour lesquelles l'utilisation ne s'impose pas ou peuvent être remplacés,
- d'abaisser les taux d'utilisation de ces additifs quand cela est technologiquement possible (notamment des sulfites dans les fruits secs),
- d'augmenter la lisibilité de l'étiquetage, ceci est surtout utile pour les personnes souffrant d'intolérances/d'allergies vis-à-vis de ces additifs.
- de faire un suivi du niveau de consommation de ces additifs car la mise en œuvre de nouvelles méthodes d'emballage ne permettant pas une stérilisation à haute température ou une protection efficace contre l'oxydation, nécessite l'emploi de doses beaucoup plus élevées pour assurer une bonne conservation.

- **Les mycotoxines:**

- de prendre des actions réglementaires relatives aux limites maximales de l'OTA et du DON dans les céréales et des produits à base de céréales,
- de réviser les limites maximales de contaminations établies pour les aflatoxines,
- d'établir les limites maximales en prenant en compte les comportements alimentaires de la population libanaise et en se basant sur l'évaluation scientifique des risques,
- de mettre en œuvre des mesures préventives tel qu'un établissement des plans de contrôle et de surveillance pour les céréales ou telle qu'une amélioration des conditions de stockage des céréales et des fruits secs. Ceci pourra permettre une réduction de la présence de ce type de danger tout au long de la chaîne alimentaire et par la suite améliorer la protection des consommateurs,
- de mettre à jour régulièrement ce type de travail afin d'observer les tendances de l'évolution des risques liés à ces substances suite aux modifications des comportements alimentaires et/ou des niveaux de contamination des denrées alimentaires par ces substances.

Références bibliographiques

- A series of articles. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1997, 26, p7-95.
- Abe S. Tsutsui Y., Tasumoto Y. Studies on the toxicity of oxaprozin. 1. acute toxicity of oxaprozin, its metabolites and contaminants. *Iyakuhin Kenkyu*, 1984, vol.15, p. 359-370
- ACS. Lipid oxydation in foods. ACS symposium, 1992, series n°5004.
- Addison P.B.et Hassel C.A. Safety issues with antioxidants in foods. *Food Safety Assessment*, 1992, ACS symposium n° 484.
- Adamson I.Y.R., Bowden D.H., Cote M.G. et Witshi H. Lung injury induced by butylated hydroxytoluene: cytodynamic and biochemical studies in mice. *Lab. Invest.*, 1977, vol.36, p.26-32.
- AFNOR. Normes internationales de microbiologie. *Directives générales pour la recherche et le dénombrement des microorganismes dans les aliments*, 1999, vol.8B.
- AFSSA/INRA. Etude de la mortalité et de la morbidité des maladies d'origine alimentaire. AFSSA/INRA rapport interne, 2001.
- Aguilar F, Hussain Sp, Cerutti P. Aflatoxin B1 induces the transversion of G - >T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, vol.90: p.8586-8590.
- AIJN. Code of practice for evaluation of fruit and vegetable juices. *Association of the industry of juices and nectars from fruits of the European Union*. Brussels: 2001.
- Alder S. et Zbinden G. Neurobehavioural tests in single – and repeated – dose toxicity studies in small rodents. *Archives of Toxicology*, 1983, vol.54, p.1-23.
- Aleo MD, Wyatt RD, Schnellmann RG. Mitochondrial dysfunction is an early event in ochratoxin A but not oosporein toxicity to rat renal proximal tubules. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1991, vol.107: p.73-80.
- Aksoy U, Eltem R, Meyvaci KB. Five-year survey of OTA in processed sultanas from Turkey. *Food Addit Contam*, 2007, 24(3): 292-6.
- Al-julaifi MZ, Al-Falih AM. Detection of tricothecenes in animal feeds and foodstuffs during the years 1997 to 2000 in Saudi Arabia. *J Food Prot*, 2001, 64(10): 1603-6.
- Allen, J.R. Long-term antioxidant exposure effects on female primates. *Archive of Enviromental Health*, 1976, vol.31, p.47-50.
- Allen F. Méthodes physicochimiques générales. *Introduction à l'analyse nutritionnelle des denrées alimentaires*, 1998, p.100-150.
- Anderson JA., Allergic reactions to food. *Critical reviews in food science and nutrition*. 1996, 36: S19-S38
- Anonymous. Rapport sur l'évaluation de la consommation de certains additifs. *Direction Générale de la Concurrence de la Consommation et de la Répression des Fraudes*, Paris: DGCCRP, 1990.
- AOAC. Official methods of analysis. *AOAC international*, 14ème ed. VA: Arlington, 1990, p.1137-1160.
- AOAC. Official methods of analysis. *AOAC international*, 15ème ed. VA: Arlington, 1992, p.1142-1145.
- Arai Y., Muto H., Sano Y., Ito K. Food and food additifs hypersensitivity in adult asthmatics. III. Adverse reaction to sulfites in adult asthmatics. *Allergy*. 1998, Vol. 47, p. 1163-1167.
- Aruoma O.I. Assessment of potential prooxidant and antioxidant action. *Journal of the American oil chemistry Society*. 1996, vol.42, p.140-147.

Assaf Hm Betbeder AM, Creppy EE. OTA levels in human plasma and foods in Lebanon. *Human Exp Toxicol*, 2004, 23(10): 495-501.

Aubert Ph., Nyeuen-Huu, J.J., Boulanger B. Validation des procédures analytiques quantitatives, harmonisation des démarches. Paris: STP pharmapratique, 2003 vol.13, n°3.

Auton T.R.. Calculation of benchmark doses from teratology data. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1994, vol.19, p.152-167.

Baba NH., food consumption pattern in Lebanon. *Rivista di anthropologia*; 1998 Suppl 76: 193-204.

Baddoura J. Etude microbiologique de certains aliments confectonnés au liban. Mémoire de maîtrise en science agronomique, UL, 2000.100pp.

Barnes D.G., Daston G.P., Evans J.S., Jarabek A.M., Kavlock R.J., Kimmel C.A., Park C., and Spitzer H.L. Benchmark dose workshop: criteria for use of a benchmark dose to estimate a reference dose. *Regulatory Toxicology and Phamacology*, 1995, vol.21, p.296-306.

Baudrimont I, Murn M, Betbeder AM, Guilcher J, Creppy EE. Effect of piroxicam on the nephrotoxicity induced by ochratoxin A in rats. *Toxicology*, 1995, vol.95: p.147-154.

Beaton G. Approaches to analysis of dietary data: relationship between planned analysis and choice of methodology. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1994, vol.59 (supplement), p253S-259S.

Baydar T, Engin AB, Girgin G et al. aflatoxin and ochratoxin in various types of commonly consumed retail ground samples in Ankara, Turkey. *Ann Agric Environ Med*, 2005, 12(2):193-7.

Bedford PGC., Clarke EGC. Experimental benzoic acid poisoning in the cat. *Veterinary Record*, 1972, vol.90, p53-58.

Bendele AM, Neal SB, Oberly TJ, et al. Evaluation of ochratoxin A for mutagenicity in a battery of bacterial and mammalian cell assays. *Food Chem Toxicol*, 1985, vol.23: p.911-918.

Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviewers*. 2003;16:497-516.

Bennett MC., Petrus DR. Quantitative determination of sorbic acid and sodium benzoate in citrus juice. *Journal of Food Science*. 1977, vol. 42 p.1220-1221.

B.F.Goodrich Kalama Inc. Benzoic acid. *Product information bulletin*. WA: Kalama, 1999.

Bindslev-Jensen C. ABC of allergies: Food allergy. *British Medical Journal*. 1998, vol.316, p.1299-1302.

Bio-Fax. Benzoic acid, Northbrook, IL, Industrial Bio-Test Laboratories, Inc., 1977.

Biopharm R. Foodstuffs determination of sulphites: enzymatic method, 1998.

Biro G., Ovesen L., Cruz A. Selection of a methodology to assess food intake. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2002, vol.56 (supplement), p.25S-32S.

Block S. Historical review in: disinfecting, sterilizing and preservation, 3rd ed, 1983, p.868-888.

Blunden G, Roch OG, Rogers DJ, Coker RD, Bradburn N, Hohn Ae. Mycotoxins in food. *Med Lab Sci*, 1991, vol.48:p.271-282.

Boieng H., et Pfifer-Zah H. The developpement of portion sizes for a food frequency questionnaire. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1994, vol.59 (supplement), p.283S.

Bomhard E.M., Bremmer J.N. et Herbold, B.A. Review of mutagenicity/genotoxicity of butylated hydroxytoluene. *Mutat. Research*, 1992, vol.277, p.187-200.

Bondy GS, Pestka JJ. Immunomodulation by fungal toxins. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 2000, vol.3:p.109-143.

Boorman GA, Hong HL, Dieter Mp, et al. Myelotoxicity and macrophage alteration in mice exposed in ochratoxin A. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1984; vol.72: p.304-312.

Brasch J., Henseler T., Frosch P. Patch test reactions to a preliminary preservative series. *Dermatosen*. 1993, vol.41, p.71-76.

- Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*, 1991, vol.350: p.429-431.
- Bruce R.D. An up-and-down procedure for acute toxicity testing. *Fundamental Application of Toxicology*, 1985, p.151-157.
- Budavari S., O'Neil MJ., Smith A., Heckelman PE., Kinneary JF., eds. *The Merck index- an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*, 12th ed, NJ: Whitehouse Station, 1996, Merck & Co., Inc.p.183.
- Budget des ménages, étude statistique au Liban, 1999, vol.13.
- Buzzard M. et Sievert Y. Research priorities and recommendations for dietary assessment methodology. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1994, vol. 59 (supplement), p.275S-280S.
- Canet C. La normalisation et le contrôle des aliments: microbiologies des conserves alimentaires. In: *Recherche de germes pathogènes dans les aliments*, FAO, 1999, p.131-139.
- Cariquiry A.L., Jensen H.H., Fuller W.A. Methods for estimating usual intake distributions. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1994, vol.59 (supplement), p.295S.
- Cassee F.R., Groten J.P. Van Bladeren P.J. Toxicological evaluation and risk assessment of chemical mixtures. *Critical Reviews in Toxicology*, 1998, vol.28, p.73-101.
- Catherine E., Liber E., Pascal G. and Rebaudieres P. Evaluation des quantités d'antioxygènes BHA et BHT ingérés par des consommateurs de gommes à mâcher. *Annales des falsifications et de l'expertise chimique*, 1983, vol.76, p.319-329.
- Cateau M. Principes et buts de l'analyse microbiologiques des aliments. In: *Recherche de germes pathogènes dans les aliments*, FAO, 1999, p.5-10.
- CEFIC, 1989. Robens Institute. Dose ranging experiment on the role of hepatocellular injury in the chronic toxicity of BHT. Final report 7/88/TX, Robens Institute of Health and Safety, University of Surrey, Guildford, Surrey, United Kingdom. Unpublished report. Submitted to WHO by European BHT Manufacturers Association (EBMA). CEFIC, Bruxelles, Belgium.
- Chamulitrat W. Activation of the superoxide-generation NADPH oxidase of intestinal lymphocytes produces highly reactive free radicals from sulfite. *Free Radical Biology & Medicine*, 1999, Vol. 27, p.411-421.
- Chan KT, Hsieh DP, Lung ML. In vitro aflatoxin B1-induced p53 mutations. *Cancer Lett*, 2003, vol.199: p1-7.
- Charoenpornsook K, Fitzpatrick JL, Smith JE. The effects of four mycotoxins on the mitogen stimulated proliferation of bovine peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Mycopathologia*, 1998, vol.143: p.105-111.
- Charzwska J. Use of monitoring system to assess the diets of adolescents at different stages of economy. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1994, vol.59 (supplement), p.295S.
- Chipley JR. Sodium benzoate and benzoic acid. In: Branen AL, Davidson PM, ed. *Antimicrobials in foods*. NY: M. Decker, 1983, p.11-35.
- Chong X, Rahimtula AD. Alterations in ATP-dependent calcium uptake by rat renal cortex microsomes following ochratoxin A administration in vivo or addition in vitro. *Biochem Pharmacol*, 1992, vol.44: p.1401-1409.
- Chou ML., Lu MH, Pegram RA., et al. effect of caloric restriction on aflatoxin B1- induced DNA synthesis, AFB1-DNA binding and cell proliferation in Fischer 344 rats. *Mech. Ageing Dev.*, 1993, 70: 23-33.
- Clapp, N.K., Tyndall, R.L. et Cumming, R. Hyperplasia of hepatic bile ducts in mice following long-term administration of butylated hydroxytoluene. *Food Cosmetology and toxicology*, 1973, vol.11, p.847.
- Clemmensen O., Hjorth N. Perioral. Contact urticaria from sorbic and benzoic acid in salad dressings. *Contact Dermatitis*, 1982, vol.8, p.1-6.

Codex Alimentarius Commission on food additives and contaminants. Proposed draft CCFA policy for exposure assessment of food additives and contaminants in foods or food groups for adoption step 8 to the CAC through CCGP, 36^{ème} session, CDR3, annexe II.

Codex Alimentarius Commission. Report of the 29th session of the CODEX Committee on food additives and contaminants. The Hague, the Netherlands, 17-21 March 1997 (ALINORM 97/12).

Codex Alimentarius Commission. Report of the 30th session of the CODEX Committee on food additives and contaminants. The Hague, the Netherlands, 9-13 March 1998 (ALINORM 98/12). adoption step 8 to the CAC through CCGP, 2004 (36th session, CDR3,).

Codex Alimentarius Commission (a), 1999, 1A, section 5, additives alimentaires.

Codex Alimentarius Commission (b), Codex Food Categorization System, 1999 Annexe G.

Commission of the European Communities. Presentation of an Application for Assessment of a Food Additive Prior to its Authorisation. Cat. No. CB-57-89-370-EN-C (ISBN92-826-0135-8), 1989.

Commission of the European Communities. Report of the Scientific Committee for Food on antioxidants. *Reports of the Scientific Committee for Food*, Twenty-second series, EUR 12535 EN. Office for official publications of the European communities, Luxembourg, 1989.

Conacher H.B., Iverson F., Lau, P.Y. Levels of BHA and BHT in human and animal adipose tissue: interspecies extrapolation. *Food and Chemical Toxicology*, 1986, vol.24, p.1159-1162.

Constantin D., Bini A., Meletti E., Moldeus P., Monti D., Tomasi A. Age-related differences in the metabolism of sulphite to sulphate and in the identification of sulphur trioxide radical in human polymorphonuclear leukocytes. *Mechanisms Of Aging And Development*. 1996, Vol. 88, p. 95-109.

Coppen P.P. Rancidity in foods, Elsevier applied science, 1989.

Counts J.L. and Goodman J.I. Principles underlying dose selection for, and extrapolation from, the carcinogen bioassay: dose influences mechanism. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 1995, 21, p.418-421.

Cottrell S., Andrews C.M., Clayton D., and Powell C.J. The dose-dependent effect of BHT (butylated hydroxytoluene) on vitamin K-dependent blood coagulation in rats. *Food Chemistry and Toxicology*, 1994, vol.32, p.589-594.

Crawford P., Obarzanek E., Barton B. Validation of dietary methodology with 9-10 year old girls. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1994, vol.59 (supplement), p.294S.

Creppy EE, Stormer FC, Roschenthaler R, Dirheimer G. Effects of two metabolites of ochratoxin A, (4R)-4hydroxyochratoxin A and ochratoxin alpha, on immune response in mice. *Infect Immun*, 1983, vol.39: p.1015-1018.

Creppy EE, Kane A, Dirheimer G, Lafarge-Frayssinet C, Mousset S, Frayssinet C. [DNA damage in the spleen, liver and kidneys of mice treated with ochratoxin A]. *C R Seances Soc Biol Fil*, 1985; vol.179: p.688-695.

Conseil Supérieur d'Hygiène publique de France (CHSPF), 1999, les mycotoxines dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque, eds TEC et DOC.

Cusumano V, Rossano F, Merendino RA, et al. Immunobiological activities of mould products: functional impairment of human monocytes exposed to aflatoxin B1. *Res Microbiol*, 1996, vol.147: p.385-391.

Daher V. Analyse microbiologique de certains aliments confectonnés au liban. Mémoire de maîtrise en science agronomique, USEK, 1994. 120pp.

Dagher J. Etude des contaminations microbiologiques du lait et des produits laitiers: origines et conséquences sanitaire. Mémoire de DEA en science agronomique, AUF, 2002. 150pp.

Davidson M., (1991), food additives.

Davidson M., (1993), antimicrobial in foods, 2nd edition.

Davis P.S, Coward A., White A. Total energy expenditure and energy intake in the preschool child: a comparison. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1994, vol.59 (supplement), p.293S.

Dawson DA, Schultz TW, Hunter RS. Development toxicity of carboxylic acids to *Xenopus* embryos: A quantitative structure-activity relationship and computer-automated structure evaluation. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 1996, vol.16, p.109-124.

Degen GH, Gerber MM, Obrecht-Pflumio S, Dirheimer G. Induction of micronuclei with ochratoxin A in ovine seminal vesicle cell cultures. *Arch Toxicol*, 1997, vol.71: p.365-371.

Denil M., cavalier M.R., Lannoye P. *Guide des additifs alimentaires* / ed. par le groupe des verts au parlement européen. Bruxelles: CEFE, 2001, 110p.

Denissenko MF, Koudriakova TB, Smith L, O'Connor TR, Riggs AD, Pfeifer GP. The p53 codon 249 mutational hotspot in hepatocellular carcinoma is not related to selective formation of persistence of aflatoxin B1 adducts. *Oncogene*, 1998, vol.17: p.3007-3014.

Dent N.J. The inspection of drug metabolism and pharmacokinetic studies. *Quality Assurance*, 1992, vol.1, p.230-236.

Diop Y, Ndiaye B, Diouf A, et al. Contamination by aflatoxins of local peanut oils prepared in Senegal. *Ann Pharm Fr*. 2000, vol.58: p.470-474.

Discussion. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1995, vol.21, p.81-86.

Dorrenhaus A, Follmann W. Effects of ochratoxin A on DNA repair in cultures of rat hepatocytes and porcine urinary bladder epithelial cells. *Arch Toxicol*, 1997, vol.71: p.709-713.

Dourson M.L., Felter S.P., and Robinson D. Evolution of science-based uncertainty factors in noncancer risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*.1996, vol.24, p.108-120.

Doussin J.P. Food analysis and control. In: The food safety handbook/ ed. Kees van der heijden et al. TX: Marcel Dekker inc., 1999, p.395-400.

Dulak L., Chiang G., et Gunnison A.F. A sulphite oxidase deficient rat model: reproductive toxicology of sulphite in the female. *Food and Chemical Toxicology*, 1984, vol.22, p.123-127.

Dybing E., Doe J., Groten J., Walker R., Renwick A., Younis M. Hazard characterization of food additifs in food and diet: dose response, mechanisms and extrapolation issues. *Food and Chemical Toxicology*, 2002, vol.40, p.237-282.

Eaton DL., Groopman JD. The toxicology of aflatoxins: Human health Veterinary, and agricultural significance. Academic Press, 1994, san Diego, CA.

Eck L.H., Kleges R.C., Hanson C.L. Reporting retrospective dietary intake by food frequency questionnaire in a pediatric population. *Journal of the American Dietician Association*, 1991, vol.91, p.606-608.

Eck L.H.et Klesges M.S. Precision and accuracy of short term frequency questionnaires compared with diet recalls and diet records. *European journal of clinical nutrition*, 1994, vol.59 (supplement), p.284S.

Edlefsen M. et Brewer M.S. Antioxidants. *Food and nutrition. The National Food Safety Database*, 1995.

EFSA, Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxinA in food. *The EFSA Journal*; 2006, 365:1-56.

El Adlouni C, Pinelli E, Azemar B, Zaoui D, Beaune P, Pfohl-Leszkowicz A. Phenobarbital increases DNA adduct and metabolites formed by ochratoxin A: role of CYP 2C9 and microsomal glutathione-S- transferase. *Environ Mol Mutagen*, 2000, vol.35: p.123-131.

El sayed AM, Soher EA, Sahab AF. Occurrence of certain mycotoxins in corn and corn based productsand thermostability of fumonisine B1 during processing. *Nahrung*, 2003, 47(4): 222-5.

European Communities, (1995), European Parliament and Council Directive No.95/2/EC of 20 february 1995 on additifs other than colors and sweeteners for use in food stuffs. Official Journal, No.L61, 18.3.95, p.1-40.

European Communities, Proposition of the European commission (DG-SANCO) of maximal levels for DON varying from 500 to 2000 ppb in cereals and cereal based products destined for human consumption (2000).

European Communities, Regulation (EC) n°466/2001 of the commission on 8 march 2001 for fixing of maximal contamination levels for contaminants in foodstuffs (JOCE du 16/03/2001).

Euinsenbrand G., Poolzobel B., Baker V., Balls M., Kliner J. Methods of in vitro Toxicology. *Food and Chemical Toxicology*, 2002, vol.40, p.193-236.

EUFIC, the basics on food additifs, 2004.

Faggiano F., PisaniP., Cravanzol D. Validation of a method for the estimation of food portion size. *Epidemiology*, 1992, vol.3, p.379-382.

FAO. Food balance sheets and food consumers' surveys: a comparison of methodologies and results. *Supply utilisation accounts and food balance sheets*. FAO,1999.

FAO/WHO, (1974), WHO food additifs series No 5.

FAO/WHO Expert committee on food additifs. Summary and conclusions. Fifty-first meeting. Geneva, 9-18 June 1998 (IPCS/98.14).

FAO/OMS/PNUE. Troisieme conference internationale mixte FAO/OMS/PUNE sur les mycotoxines. 1999.

Fazio T. et Warner C.R. A review of sulphites in foods: analytical methodology and report finding. *Food Additifs and Contaminants*, 1991, vol.7, p.186-197.

Farris R.P., Nicklas T., Bruner R.L. Development to a further examine and understand variability in dietary intake. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1994, vol.59 (supplement), p.305S.

Feindberg M. Analyse interlaboratoire, étalonnage et limite de détection. *l'assurance qualité dans les laboratoires agroalimentaires et pharmaceutiques*, 2000, 200p.

Feron V.J. et Groten J.P. Toxicological evaluation of chemical mixtures. *Food and Chemical Toxicology*, 2002, vol.40, p.825-839.

Filali A, Ouammi L, Betbedder AM. OTA in beverages from Morocco: a preliminary survey. *Food Addit Contam*, 2001: 18(6): 565-8.

Finley J.W. Technological necessity of antioxidants in the food industry, *Food and Chemical Toxicology*, 1986, vol.24, p.999-1006.

Flak P. et Pilsbacher F. *Additifs and preservatives*, Elsevier Science, 1999.

Follmann W, Lucas S. Effects of the mycotoxin ochratoxin A in a bacterial and a mammalian in vitro mutagenicity test system. *Arch Toxicol*, 2003, vol.77: p.298-304.

Food and Drug Administration. *Toxicological Principles for the Safety Assessment of Direct Food Additifs and Colour Additifs Used in Food in Food*. 1982, (Redbook I), Food and Drug Administration, Washington, D.C.

Frankel E.N. Antioxydants in lipid foods and their impact on food quality. In: *Food Chemistry*, 1996.

Frantz S. W., Beatty P.W., English J.C., Hundley S.G., and Wilson A.G.E. The use of pharmacokinetics as an interpretive and predictive tool in chemical toxicity and risk assessment: a position paper on the appropriate use of pharmacokinetics in chemical toxicology. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 1994, vol.19, p.317-337.

Friedman L.J., Greenwald C.G. Food additifs. In: Kroschwitz J., Howe-Grant M., eds. *Kirk-Othmer: Encyclopedia of chemical technology*. 1994, New York, NY: Wiley and Sons, Vol.11, p.805-833.

- Fujii T., Omori T., Tagucji T., Ogata M. Urinary excretion of hippuric acid after administration of sodium benzoate (biological monitoring 1). *Journal of the Food Hygiene Society of Japan*, 1991, vol.32, p.177-182.
- Fujitami T. Short-term effect of sodium benzoate in F344 rats and B6C3F₁ mice. *Toxicology letters*, 1993, vol.69, p.171-179.
- Fukushima S., Ogiso T., Kurata Y. (a) Dose-dependent effects of butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene and ethoxyquin for promotion of bladder carcinogenesis in N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-initiated, unilaterally ureter-ligated rats. *Cancer Letter*, 1987, vol.34, p.83-90.
- Fukushima S., Sakata T., Tagawa Y. (b). Different modifying response of butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, and other antioxidants in N,N-dibutyl nitrosamine esophagus and forestomach carcinogenesis of rats. *Cancer Research*, 1987, vol.4, p.2113-2116.
- Furia T.E. Handbook of Food Additives. 2ème édition TX: CRC, 1980.
- Garcia H., Garcia S., Alvarez J. M. Incidence of adverse reactions to additives. Our experience over 10 years. *Allergologia et Immunopathologia*, 1994, vol. 22, p.233-242.
- Gardner J.R. Principles of antimicrobial activity. In: *disinfection, sterilization and preservation*, 1977, 3ème ed., p 656.
- Gaylor D.W. et Gold L.S. Quick estimate of the regulatory virtually safe dose based on the maximum tolerated dose for rodent bioassays, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1995, vol. 22, p.57-63.
- Gekle M, Oberleithner H, Silbernagl S. Ochratoxin A impairs postproximal nephron function in vivo and block plasma membrane anion conductance in madin-Darby canine kidney cells in vitro. *Pflugers Arch*, 1993, vol.245: p.401-408.
- GEMS/Food-WHO. Reliable evaluation of low-level contaminant of food. Workshop in the frame of GEMS/Food-EURO. Kulmbach, Germany, 26-27, May 1995.
- Geyer H., Scheunert, I. et Korte, F. Bioconcentration potential of organic environmental chemicals in humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1986, vol. 6, p.313-347.
- Gibney M.J., and Lamb J. Estimation of food additive intake: methodology overview. *Food additives and Contaminants*, 1996, vol.13, p.405-410.
- Gibson W.B. and Strong F.M. Accumulation of ingested sulphite – and sulphate – sulphur and utilization of sulphited proteins by rats. *Food and Cosmetics Toxicology*, 1974, Vol. 12, p. 625-640.
- Gillman IG, Clark TN, Manderville RA. Oxidation of ochratoxin A by an Fe-porphyrin system: model for enzymatic activation and DNA cleavage. *Chem Res Toxicol*, 1999, vol.12: p.1066-1076.
- Goldberg et al., (1991). Critical evaluation of energy intake data using fundamental principles of energy physiology. 1. derivation of cut-off values to identify underreporting. *Eur. J.Clin. Nutr*; vol.45 :p. 569-581.
- Goldy G., Milani T., Kim M. Development and validation of a semi quantitative food frequency questionnaire for young adult in the southwestern united states, *Nutrition Research*, 2004, vol.24, p.29-43.
- Goodman Gilman A., Rall TW., Nies AS., Taylor P., eds. *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, 1990, 8th ed., New York, NY: Pergamon Press, p.1179.
- Grosse Y, Baudrimont I, Castegnaro M, et al (a). Formation of ochratoxin A metabolites and DNA-adducts in monkey kidney cells. *Chem Biol Interact*, 1995, vol.95: p.175-187.
- Grosse Y, Castegnaro M, Mace K, et al (b). Cytochrome P-450 isoforms implicated in ochratoxin a genotoxicity determined by DNA adduct formation. *Clinical Chemistry*, 1995, vol.41: p.1927-1929.

Gunnison A.F., Dulak L., Chiang G. A sulphite oxidase deficient rat model: subchronic toxicology. *Food and Chemical Toxicology*, 1980, vol.19, p.221-232.

Gunnison A.F., Dulak L., Chiang G. A sulphite oxidase deficient rat model: metabolic characterisation. *Food and Cosmetics Toxicology*, 1981, vol.19, p.209-220.

Hageman G.J., Verhagen H. et Kleinjans, J.C. Butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene and tert-butylhydroquinone are not mutagenic in the Salmonella/microsome assay using new tester strains. *Mutagenicity Research*, 1988, vol.208, p.207-211.

Hagiwara A., Hirose M., Miyata, Y. Modulation of N-butyl-N-(4hydroxybutyl) nitrosamine-induced rat urinary bladder carcinogenesis by post-treatment with combinations of three phenolic antioxidants. *Journal of Toxicology and Pathology*, 1989, vol.2, p.33-39.

Hanssen M. *E comme additifs*. France: Flammarion, 1987.

Hardin B.D., Schuler R.L., Burg J.R., Booth G.M., Hazelden K.P., MacKenzie K.M., Piccirillo V.J., Smith K.N. Evaluation of 60 chemicals in a preliminary developmental toxicity test. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*. 1987, vol.7, p.29-48 [cited in WHO, 1996].

Hartman A.M., Block G., Williams J. Reproducibility of a self administered diet history questionnaire over different seasons. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1994, vol.59 (supplement), p.285S.

Haraldsdottir J., Tjonneland A. et Overvad K. Validity of individual portion size estimates in a food frequency questionnaire. *Internal Journal of Epidemiology*, 1994, vol.23, p.787-796.

Helsing E. Dietary assessment issues of concern to policy makers: statement from the world health organisation. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1994, vol.59 (supplement), p.271S-272S.

Hennig A, Fink-Gremmels J, Leistner L. Mutagenicity and effects of ochratoxin A on the frequency of sister chromatid exchange after metabolic activation. *IARC Sci Publ*, 1991, vol.115: p.255-260.

Henschler D., Bolt H.M., Jonker D. Experimental designs and risk assessment in combination toxicology: Panel discussion. *Food and Chemical Toxicology*, 1996, vol.34, p.1183-1185.

Heseker H. et Kubler W. Characterization and validation of food patterns. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1994, vol.59 (supplement), p.304S.

Hernandez-Avilla M., Master C., Hunter D. Influence of additional portion size data on the validity of a semiquantitative food frequency questionnaire. *Internal Journal of Epidemiology*, 1988, vol.128, p.891.

Hinton DM, Myers MJ, Raybourne RA, et al. Immunotoxicity of aflatoxin B1 in rats: effect on lymphocytes and the inflammatory response in a chronic intermittent dosing study. *Toxicol Sci*, 2003; vol.73: p.362-377.

Hirai K., Yamauchi, M., Witschi, H. Disintegration of lung peroxisomes during differentiation of type II cells to type I cells in butylated hydroxytoluene-administered mice. *Experimental and Molecular Pathology*, 1983, vol.39, p.129-138.

Hirose M., Shibata M., Hagiwara A. Chronic toxicity of butylated hydroxytoluene in Wistar rats. *Food and Cosmetics Toxicology*, 1981, vol.19, p.147-151.

Hirose M., Masuda A., Kurata Y. Histologic and autoradiographic studies on the forestomach hamsters treated with 2- tert-butylated hydroxyanisole, 3- tert-butylated hydroxyanisole, crude butylated hydroxyanisole, or butylated hydroxytoluene. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1986, vol.76, p.143-147.

Hirose M., Masuda A., Imaida K. Induction of forestomach lesions in rats by oral administrations of naturally occurring antioxidants for 4 weeks. *Jpn. Journal of Cancer Research*, 1987, vol.78, p.317-321.

Hirose M., Yada H., Hakoi K. Modification of carcinogenesis by alpha-tocopherol, t-butylhydro-quinone, propyl gallate and butylated hydroxytoluene in a rat multi-organ carcinogenesis model. *Carcinogenesis*, 1993, vol.14, p.2359-2364.

HMSO. Dietary intake of food additives in the U.K: initial surveillance. The thirty seventh report of the Steering Group on Chemical Aspects of Food Surveillance. *Food surveillance paper n° 37*, 1993.

Hoffmann I., Kohl M., Goeneveld M. Development and validation of a new instrument to measure the food intake. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1994, vol.59 (supplement), p.284S.

Hoffman K., Boeing H., Dufour A. Estimating the distribution of usual dietary intake by short time measurements. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1994, vol.59 (supplement), p.53S-62S.

Howat P.M et Mohan R. Can training technique affect the reliability, validity and accuracy of dietary assessment? *European Journal of Clinical Nutrition*, 1994, vol.59 (supplement), p.285S.

Hughes BJ, Hsieh GC, Jarvis BB, Sharma RP. Effects of macrocyclic trichothecene mycotoxins on the murine immune system. *Arch Environ Contam Toxicol*, 1989, vol.18: p.388-395.

Hui J.Y., Beery J.T., Higley N.A. Comparative subchronic oral toxicity of sulphite and acetaldehyde hydroxysulphonate in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 1989, vol.27, p.349-359.

Hussein HS, Brasel JM. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 2001, vol.167: p.101-134.

Hussain SP, Harris CC. p53 mutation spectrum and load: the generation of hypotheses linking the exposure of endogenous or exogenous carcinogens to human cancer. *Mutat Res*, 1999, vol.428: p.23-32.

IARC (a), Monographs on evaluation of carcinogenic risks to humans. Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. WHO, Lyon Vol.56, p 245-395, 1993.

IARC (b), Monographs on evaluation of carcinogenic risks to humans. Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. WHO, Lyon Vol.56, p 397-433, 1993.

IARC (c), Monographs on evaluation of carcinogenic risks to humans. Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. WHO, Lyon Vol.56, p 489-521, 1993.

ILSI Europe Workshop on Food Additive Intake. Scientific Assessment of the Regulatory Requirements in Europe. *Food Additives and Contaminant*, 1996, vol.13, p.383-475.

ILSI Europe Workshop on Food Additive Intake. Significance of excursions of intake above the Acceptable Daily Intake, 1998.

Imaida K., Fukushima S., Inoue Modifying effects of concomitant treatment with butylated hydroxyanisole or butylated hydroxytoluene on N,N-dibutyl nitrosamine, induced liver, forestomach and urinary bladder carcinogenesis in F344 male rats. *Cancer Letter*, 1988, vol.43, p.167-172.

Inai K., Kobuke T., Nambu S. Hepatocellular tumorigenicity of butylated hydroxytoluene administered orally to B6C3F₁ mice. *Jpn. Journal of Cancer Research*, 1988, vol.79, p.49-58.

INRA. Total Diet Study of some contaminants and minerals for the French population. INRA, 2004, 68p.

IRAL, (1998), Quality control of foods, *annual report*, p.35-85.

ISBN. Principles for the selection of doses in chronic rodent bioassays (J.A.Foran, ed.). International Life Sciences Institute, ILSI Press/ILSI Risk Science Institute. 1997, ISBN 0-944398-71-5.

International programme on chemical safety (IPCS). *International Chemical Safety Card – Benzoic acid*. 1993, Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (ICSC 0103).

International programme on chemical safety (IPCS)/Gems/food Euro workshop on reliable evaluation of low level contaminant of food, Kulmbach Federal Republic of Germany, may 1995.

Ishidate M.J., Sofuni T., et Yoshikawa K. Primary mutagenicity screening food additives currently used in Japan. *Food and chemical toxicology*, 1984, vol.22, p.623-636.

Ishidate M.J., Harnois M.C., et Sofuni T. A comparative analysis of data on the clastogenicity of 951 chemical substances tested in mammalian cell cultures. *Mutation Research*, 1988, vol.195, p.151-213

Ishiwata H., Nishijima M., Fukasawa Y., Ito Y. and Yamada T. Evaluation of preservatives content in foods and the daily intake deduced from the results of official inspection in Japan in fiscal year 1994. *Journal of the food Hygiene Society of Japan*, 1997, vol. 38, p.145-154.

Ishiwata H., Nishijima M., Fukasawa Y., Ito Y. and Yamada T. (a). Evaluation of the content of BHA, BHT, propylene glycol, and sodium saccharin in foods and estimation of daily intake based on the results of official inspection in Japan in fiscal year 1994. *Journal of the food Hygiene Society of Japan*, 1998, vol. 39, p.89-100.

Ishiwata H., Nishijima M., Fukasawa Y., Ito Y. and Yamada T. (b). Evaluation of the content of nitrates, nitrites and sulfur dioxide in foods and estimation of daily intake based on the results of official inspection in Japan in fiscal year 1994. *Journal of the food Hygiene Society of Japan*, 1998, vol.39, p.89-100.

Ito N., Hagiwara A., Shibata M., Ogiso T., and Fukushima S. Induction of squamous cell carcinoma in the forestomach of F344 rats treated with butylated hydroxyanisole. *Gann*, 1982, vol.73, p.332-334.

JECFA, (1995), evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Technical Report Series; 44 (859): 35-36.

JECFA, (1999), evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Technical Report Series; 49(884): 69-77.

JECFA, (2001), safety evaluation of certain mycotoxins in food. WHO Food Additive Series; 47.

Johnson, A. R., O'Halloran, M. W. & Hewgill, F. R. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 1988, vol.35, p.496.

Journal officiel de la république française, 1980. Critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire certaines denrées alimentaires. NC 784-789.

Karaca H et Nas S. Aflatoxins, patulin and ergosterol contents of dried figs in Turkey. *Food Addit Contam*, 2006, 23(5): 502-8.

Kawano S., Nakao T et Hiraga K. (1981). Strain differences in butylated hydroxytoluene-induced deaths in male mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1981, vol.61, p.475-479.

Kiang L. Statistical issues related to semiquantitative food frequency questionnaires. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1994, vol.59 (supplement), p.262S-265S.

Kirkpatrick D.C et Lauer B.H. Intake of phenolic antioxidants from foods in Canada. *Food and Chemical Toxicology*, 1986, vol.24, p.1035 -1037.

Klassen C. et Watkins J. *Essentials of toxicology*. USA: McGraw-Hill, 2003.

Kluwe W.M.. The complementary roles of in vitro and in vivo tests in genetic toxicology assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1995, vol.22, p.268-272.

Krasovskii G.N. Extrapolation of experimental data from animals to man. *Enviromental Health Perspectives*, 1976, vol.13, p.51-58.

Kroes R., Muller D., Lambe J., Verger P., Visconti A. Assessment of intake from the diet. *Food and Chemical Toxicology*, 2002, vol.40, p.327-385.

Kroes R., Munro I., and Poulsen E. Workshop on the scientific evaluation of the safety factor for the acceptable daily intake (ADI): editorial summary. *Food Additif and Contaminants*, 1991, vol.8, p.151-162.

Krogh P. Role of ochratoxin in disease causation *Food Chem Toxicol*, 1992, vol.30: p.213-224.

Kubota K., Ishizaki T. Dose-dependent pharmacokinetics of benzoic acid following oral administration of sodium benzoate to humans. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 1991, vol.41, p.363-368.

Kubota K., Horai Y., et Ishizaki T. Determination of benzoic acid and hippuric acid in human plasma and urine by HPLC. *Journal of Chromatography*, 1988, vol.425, p.67-75.

Kuiper-Goodman T. Approches to the risk assessment of mycotoxins. In *Pennington center nutrition series Vol.1, Mycotoxins, Cancer and health*. G Bray and D.Ryan, eds. 1991, P.65-86.

Kuiper-Goodman T, Scoot PM. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomed Environ Sci*, 1989, vol.2: p.179-248.

Lahti A., Hannuksela M. Is benzoic acid really harmful in cases of atopy and urticaria? *Lancet*, 1981, vol.2, p.1055.

Lawrie C.A., and Rees N.M.A. The approach adopted in the UK for the estimation of the intake of food additifs. *Food Additifs and Contaminants*, 1996, vol.16, p.99-109.

Lebanese food standards regulation (LIBNOR) n°620/2003 for fixing maximal authorized levels of preservatives in some of the foodstuffs.

Lebanese food standards regulation (LIBNOR) n°622/2003 for fixing maximal authorized levels of aflatoxins in some of the foodstuffs.

Lebanese food standards regulation (LIBNOR) n°322/2004 for fixing maximal authorized levels of antioxydants in some of the foodstuffs.

Leblanc JC., Malmauret L., Verger P. Simulation of exposure to deoxynivalenol of French consumers of organic and conventional foodstuffs, 2002. *Regl Toxicol and Pharmacol*; 36: 149-154.

Leclercq C., Arcella D. and Turrini A. (a). Estimates of the theoretical maximum daily intake of erythorbic acid, gallates, BHA and BHT in Italy: a stepwise approach. *Food and Chemical Toxicology*, 2000, vol.38, p. 1075-1084.

Leclercq C., Molinaro M.G., Piccinelli R., Baldini M., Arcella D., and Stacchini P. (b). Dietary intake exposure to sulphites in Italy –analytical determination of sulphite-containing foods and their combination into standard meals for adults and children. *Food additifs and Contaminants*, 2000, vol.17, p. 979-989.

Lester M.R. Sulfite sensitivity: significance in human health. *Journal Of The American College Of Nutrition*, 1995, Vol. 14, p 229-232.

Lindenschmidt R.C., Tryka A.F, Goad M.E., et Witshi, H.P. The effects of dietary BHT on liver and colon tumor development in mice. *Toxicology*, 1986, vol.38, p.151-160.

Little J.A, Beaton G.H., Cousins M. Sources of variance in 24 hour dietary recall data, *American Journal of Clinical Nutrition*, 1979 vol.32, p.2546-2549.

Lowik M.R.H., Hulshof K.F.A.M., Brussaard J.H. and Kistemaker C. Assessment of the intake of selected additifs with a screening approach. *TNO – report*, 1998, tV97.645.

Lorke D. A new approach to practical acute toxicity testing. *Archive of Toxicology*, 1983, vol.54, p.275-287.

Lu F.C. Acceptable daily intake: inception, evolution and application. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 1988, vol.8, p.45-60.

Luster MI, Germolec DR, Burleson GR, et al. Selective immunosuppression in mic of natural killer cell activity by ochratoxin A. *Cancer Res*, 1987, vol.47: p.2259-2263.

Macdiarmit J et Blundell J. Who, what and why underreporting. *Nutrition research review*, 1998, vol.11, p.231-253.

Maga J., Anthonny T.U. *Food additif toxicology*, 1995.

Mahjoub R., Kourda S., et Boudabous A. Etudes microbiologiques du lait et des produits laitiers. In: *Recherche de germes pathogènes dans les aliments*, FAO, 1999, p.141-149.

Maki T., Suzuki Y. Benzoic acid and derivatives. In: *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*, 1985, Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbh, vol.A3, p.555-568.

Malaveille C, Brun G, Bartsch H. Structure-activity studies in E. coli strains on ochratoxin A (OTA) and its analogues implicate a genotoxic free radical and a cytotoxic thiol derivative ads reactive metabolites. *Mutat Res*, 1994, vol.307: p.141-147.

Marechi J.P., Francois-Collange M., et Suschetet m. Estimation of sulphite in food in France, *Food Additifs and Contaminants*, 1992, vol.9, p.541-549.

Matsuo M., Mihara K., Okunuo M. Comparative metabolism of 3,5-di- tert-butyl-4-hydroxytoluene (BHT) in mice and rats. *Food and Chemical Toxicology*, 1984, vol.22, p.345-354.

Mc Connell E.E. Historical review of the rodent bioassay and future directions. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 1995, vol.21, p.38-43.

McLean M, Dutton M. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: and update. *Pharmacol Ther*, 1995, vol.65: p.163-193.

Mekey FA, Hardie LJ, Evans SW, Wild CP. Deoxynivalenol-induced immunomodulation of human lymphocyte proliferation and cytokine production. *Food Chem Toxicol*, 2001, vol.39: p.827-836.

Meisner H, Meisner P. Ochratoxin A, an in vivo inhibitor of renal phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Arch Biochem Biophys*, 1981, vol.208: p.146-153.

Metka J., Seveenhuisen G.P. Three day frequency questionnaire for use in measuring individual intake. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1994, vol.59 (supplement), p.284S.

Meyer O., et Hansen E. Behavioural and developmental effects of butylated hydroxytoluene dosed to rats in utero and in the lactation period. *Toxicology*, 1980, vol.16, p.247-258.

Meyer O.A., Kristiansen E. et Wurtzen G. Effects of dietary protein and butylated hydroxytoluene on the kidneys of rats. *Laboratory Animals*, 1989, vol.23, p.175-179.

Microbiologie alimentaire, 4ème édition, centre regional de documentation pédagogique, Bordeaux, 2002, 250p.

Ministère de l'éducation nationale. Vie économique, 1996, p.30-39.

Moon Y, Pestka JJ. Cyclooxygenase-2 mediates interleukin-6 upregulation by vomitoxin (deoxynivaleno) in vitro and in vivo. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2003, vol.187: p.80-88.

Muller G, Kielstein P, Rosner H, Berndt A, Rosner H. Studies of the influence of ochratoxin A on immune and defense reactions in the mouse model. *Mycosis*, 1995, vol.38: p.85-91.

Nakamura SI., Oda Y., Shimada T., Oki I., Sugimoto K. SOS- inducing activity of chemical carcinogens and mutagens in Salmonella typhimurim TA 1535/pSK1002 : examination with 151 chemicals. *Mutation research*, 1987, vol.192, p.239-246.

Neal GE, Eaton DL, Judah DJ, Verma A. Metabolism and toxicity of aflatoxins M1 and B1 in human derived in vitro systems. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1998, vol.151: p.152-158.

Nelson M, Atinson M et Darbyshire S. Food photography I: the perception of food portion size from photographs. *British Journal of Nutrition*, 1994, vol.72, p.649-663.

- Nelson M. et Bingham S. Assessment of food consumption and nutrient intake. In: *Design Concepts in Nutritional Epidemiology*, 2nd edition, Oxford: oxford university press, 1997, p.123-169.
- Notermans H.W.S. Assessment of microbiology food safety. The food safety handbook/ ed. Kees van der heijden et al. TX: Marcel Dekker inc., 1999, p.333-340.
- Nunn C.J. Some comments on the dietary intake of butylated hydroxytoluene. *Food and Chemical Toxicology*, 1991, vol.29, p.73-74.
- Obrecht –Pflumio S, Chassat T, Dirheimer G, Marzin D. Genotoxicity of ochratoxin A by Salmonella mutagenicity test after bioactivation by mouse kidney microsomes. *Mutat Res*, 1999, vol.446: p.95-102.
- Obrecht-Pflumio S, Grosse Y, Pfohl-Leszkowicz A, Dirheimer G. protection by indomethacin and aspirin against genotoxicity of ochratoxin A, particularly in the urinary bladder and kidney. *Arch Toxicol*, 1996, vol.70: p.244-248.
- Olsen P., Meyer O., Bille N., and Wurtzen G. Carcinogenicity of butylated hydroxytoluene (BHT) in Wistar rats exposed in utero. *Food Chemistry and Toxicology*, 1986, vol.24, p.1-12.
- Omar RF, Hasinoff BB, Mejilla F, Rahimtula AD. Mechanism of ochratoxin A stimulated lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol*, 1993, vol.231: p.1777-187.
- OIE. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. 4 ème édition 2000, p635.
- Onodera H., Ogiu T., Matsuoka C., Furuta K, Takeuchi M., Oono Y., Kubota T., Miyahara M., Maekawa A., Odashima S. [Studies on effects of sodium benzoate on fetuses and offspring of Wistar rats.] *Eisei Shikensho Hokoku*, 1978, vol.96, p.47-55(in Japanese) [cited in WHO, 1996].
- Oswald IP, Comera C. Immunotoxicity of mycotoxins. *Rev Med Vet*. 1988;149:585-590.
- Ough C.S. Sulfur dioxide and sulphites. In: *Antimicrobials in foods*, ed. Davidson P.M., NY: Dekker, 1993, p.137-190.
- Parish M. et Davidson M. Methods for testing the efficacy of food antimicrobial. *Journal of Food Technology*, 1989, vol.43, p.148.
- Parish M. et Davidson M. Factors that affect antimicrobial activity. *Journal of Food Technology*, 1993, p.598-613.
- Park DL Surveillance programmes for managing risks from naturally occurring toxicants. *Food Addit Contam*, 1995, vol.12(3): p.361-71.
- Pascal G. Safety assessment of food additives and flavouring substances. The food safety handbook/ ed. Kees van der heijden et al. TX: Marcel Dekker inc., 1999, p.239-255.
- Pellet P.L. et Shadarevian S. *Food composition tables for use in the middle east*, 1983 American university of Beirut.
- Pestka JJ, Bondy GS. Alteration of immune function following dietary mycotoxin exposure. *Can J Physiol Pharmacol*, 1990, vol.68: p.1009-1016.
- Pfohl-Leszkowicz A, Chakor K, Crppy EE, Dirheimer G. DNA adduct formation in mice treated with ochratoxin A. *IARC Sci Publ*, 1991; vol.7: p.245-253.
- Pier AC. Immunologic changes associated with mycotoxicoses. 13. Immunomodulation in aflatoxicosis. In: Thurston JLRaJR, ed. *Diagnosis of mycotoxicosis*. Boston: Martinus Nijhoff; 1986:143-148.
- Pieters M.N., Kramer H.J., Slob W. Evaluation of uncertainty factor for subchronic to chronic extrapolation: statistical analysis of toxicity data. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1998, vol.27, p.108-111.
- Pilsbacher et Dekker. Food analysis by HPLC, 1992 p.433-436. ed. Leo ML Nollet.
- Pitt JJ(a). Toxigenic fungi: which are important? *Med Mycol*. 2000, vol.38: p.17-22.
- Pitt JJ(b). Toxigenic fungi and mycotoxins. *Br Med Bull*, 2000, vol.56: p.184-192.
- Pitt JJ. Basilico JC, Abarca ML, Lopez C. Mycotoxins and toxigenic fungi. *Med Mycol*, 2000, vol.38: p.41-46.

Poapolathep A, Nagata T, Suzuki H, Kumagai S, Doi K. Development of early apoptosis and changes in lymphocyte subsets in lymphoid organs of mice orally inoculated with nivalenol. *Exp Mol Pathol*, 2003, vol.75: p.74-79.

Pokorny J. Antioxidants in food preservation. The food safety handbook/ ed. Kees van der heijden et al. TX: Marcel Dekker inc., 1999, 432-445.

Pokorny J., yanishlieva N., et Gordom M., Antioxidants in foods, practical applications, 2002, p.345-354.

Powell C.J., Connelly J.C., Jones S.M. Hepatic responses to the administration of high doses of BHT to the rat: their relevance to hepatocarcinogenicity. *Food and Chemical Toxicology*, 1986, vol. 24, p.1131-1143.

Prelusky DB., (1994), residues in food products of animal origin. *Mycotoxins in foods*; 10: 405-415.

Price S.C. The role of hepatocellular injury in the chronic toxicity of BHT: two generation Wistar albino rat study. Robens Institute for WHO, 1995, Collaborating Center for the Protection of Drinking Water Quality and Human health, Guilford, Surrey, United Kingdom.

Prior MG, Sisodia CS. The effects of ochratoxin A on the immune response of Swiss mice. *Can J comp Med*, 1982, vol.46: p.91-96.

Priva M.J., Simon V.F., et Mortelmans K.E. Bacterial mutagenicity testing of 49 food ingredients gives very few positive results. *Mutation Research*, 1991, vol.260, p. 321-329.

Purchase I.F.H.et Auton T.R. Thresholds in chemical carcinogenesis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1995, vol.22, p.199-205.

Rahimtula AD, Chong X. Alterations in calcium homeostasis as a possible cause of ochratoxin A nephrotoxicity. *IARC Sci Publ*, 1991, vol.275: p.207-214.

Rees N et Tennant D. Estimations of food chemical intake. In: *National toxicology*. New York:Raven Press Ltd, 1994, p. 199-221.

Rainbow L, Mazwell SM, Hendrickse RG. Ultrastructural changes in murine lymphocytes induced by aflatoxin B1. *Mycopathologia*, 1994, vol.125: p.33-39.

Renner H.W. et Wever J. attempts to induce cytogenetic effects with sulphite in sulphite oxidase deficient chinese hamsters and mice. *Food and Chemical Toxicology*, 1982, vol.21, p.123-127.

Renwick A.G. Safety factors and establishment of acceptable daily intakes. *Food Additif Contamination*, 1991, vol.8, p.135-150.

Renwick A.G. (a) Toxicokinetics. *General and Applied Toxicology*. Basingstoke: Macmillan Press, 1993, p.121-151.

Renwick A.G. (b) Data-derived safety factors for the evaluation of food additifs and environmental contaminants. *Food Additifs and Contaminants*, 1993, vol.10, p.275-305.

Renwick A.G. Toxicokinetics-pharmacokinetics in toxicology. *Principles and Methods of Toxicology*, 3rd ed, New York: Raven Press, 1994, p.101-147.

Renwick A.G. The use of an additional safety or uncertainty factor for nature of toxicity in the estimation of acceptable daily intake and tolerable daily intake values. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 1995, vol.22, p.250-261.

Renwick A.G. Toxicokinetics in infants and children in relation to the ADI and TDI. *Food Additifs and Contaminants*. 1998, vol.15(suppl.), p.17-35.

Renwick A. G. Exposure estimation, toxicological requirements and risk assessments. The food safety handbook/ ed. Kees van der heijden et al. TX: Marcel Dekker inc., 1999, p.59-94.

Renwick A. G., Risk characterisation. *Food and Chemical Toxicology*, 2003, vol.40, p.1211-1271

Renwick A.G. and Walker R. An analysis of the risk of exceeding the acceptable or tolerable daily intake. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 1993, vol.18, p.463-480.

Reus K.E., Houben G.F., Stam M., Dubois A.E. Food additives as a cause of medical symptoms: relationship shown between sulfites and anaphylaxis; results of a literature review. *Nederlands Tijdschrift Voor Geneeskunde*, 2000, Vol.144, p.1836-1839.

Ribera D., Jonker D., Narbonne J.F. Absence of adverse effects of sodium metabisulphite in manufactured biscuits: results of subacute and subchronic feeding studies in rats. *Food Additives and Contaminants*, 2001, vol.18, p.103-114.

Richer N., Marion M. et Denizieu F. Inhibition of binding of 2-acetylaminofluorene to DNA by butylated hydroxytoluene and butylated hydroxyanisole in vitro. *Cancer Letters*, 1989, vol.47, p. 211-216.

Rickert D.E. Toxicokinetics: routes of elimination. In: *Comprehensive toxicology*, vol1, General principles, Elsevier Science, Oxford, p.149-156.

Rio B., Lautraite S., Parent-Massin D. In vitro toxicity of trichothecenes on human erythroblastic progenitors. *Hum Exp Toxicol*, 1997, vol.16: p.673-679.

Rozier J. contrôle et surveillance microbiologique. In: *Recherche de germes pathogènes dans les aliments*, FAO, 1999, p.15-21.

Rubbery E.D., Barlow S.M. , and Steadman J.H. Criteria for setting quantitative estimates of acceptable intakes of chemicals in food in the U.K. *Food Additives and Contaminants*, 1990, vol.7, p.287-302.

Rulis A.M. Safety assurance margins for food additives currently in use. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1987, vol.22, p.57-63.

Saba A., Turrini A. and Cialfa E. Estimates of intakes: methodology and results of some studies carried out in Italy. *Food Additives and Contaminants*, 1992, vol.9, p. 527-534.

Sabaté J. Development and use of a 24 hour recall method to assess dietary in schoolchildren. *European Journal of Clinical Nutrition*, 1994, vol.59 (supplement), p.295S.

Safi W. *Quality control of foods of animal origin*, annual report, 1993, FAO, Lebanon.

Saheb W. Et Witshi H. Lung growth in mice after a single dose of butylated hydroxytoluene. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1975, vol.33, p.309-319.

Schwartz GG. Hypotheses: does ochratoxin A cause testicular cancer? *Cancer Causes Control*, 2002, vol.13: p.91-100.

Scientific Committee for Food, 1980. *Report of the Scientific Committee for Food on Guidelines for the Safety Assessment of Food Additives*, , CEC, Luxembourg: Reports of the SCF, Tenth Series.

Scientific Committee for Food. *Report of the Scientific Committee for Food on Antioxidants*, 1989, CEC, Luxembourg: Reports of the SCF, Twenty-second series.

Scientific Committee for food, (1994). European Commission DGXXIV unit B3. Thirty-fifth report. Opinion on aflatoxins BG.

Scientific Committee for Food, (1998). European Commission DGXXIV unit B3. Opinion on ochratoxin A.

Scientific Committee for food, (2002). Opinion of the scientific committee on food on fusarium toxins, part 6: group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol.

Scott G., antioxidants in vitro and in vivo, chemistry in Britain, 1985.

Schothorst M (a). Microbiological and hygienic aspects of food safety. The food safety handbook/ ed. Kees van der heijden et al. TX: Marcel Dekker inc., 1999, p.654-674.

Schothorst M (b). General aspects of microbiological food safety: sources of contamination, processes and health risks. The food safety handbook/ ed. Kees van der heijden et al. TX: Marcel Dekker inc., 1999, 600-620.

Senyuva Hz, Gilbert J, Ozcan S, Ulken U. Survey for co-occurrence of OTA and aflatoxins B1 in dried figs in Turkey by using a single laboratory-validated alkaline extraction method for OTA. *J Food Prot*, 2005, 68(7):1512-5.

Shamassian J. germes de contamination des produits laitiers. Mémoire de maîtrise en science agronomique, USJ, 1998. 100pp.

Shifrin VI, Anderson P. Trichothecene mycotoxins trigger a ribotoxic stress response that activates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase and induces apoptosis. *J Biol Chem*, 1999, vol.274:p.13985-13992.

Shirai T., Hagiwara A., Kurata Y., Shibata M. Lack of carcinogenicity of butylated hydroxytoluene on long-term administration to B6C3F1 mice. *Food and Chemical Toxicology*, 1982, vol.20, p.861-865.

Shirai T., Fukushima S., Ohshima M. Effects of BHA, BHT and NaCl on gastric carcinogenesis initiated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in F-344 rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1984, vol.72, p.1189-1198.

Shirai T., Fukushima S., Kawabe M. Selective induction of rat urinary bladder tumors by simultaneous administration of 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) and butylated hydroxyanisole or butylated hydroxytoluene is associated with increased DMAB-DNA adduct formation. *Carcinogenesis*, 1991, vol.12, p.1335-1339.

Singh GS, Chauhan HV, Jha GJ, Singh KK. Immunosuppression due to chronic ochratoxicosis in broiler chicks. *J Comp Pathol*, 1990, vol.103: p.399-410.

Slob W. Thresholds in toxicology and risk assessment. *International Journal of Toxicology*, 1998, vol.18, p.259-268.

Slob W. et Pieters M.N. A probabilistic approach for deriving acceptable human intake limits and human health risks from toxicological studies: General framework. *Risk analysis*, 1998, vol.18, p.787-798.

Smith J. Technology of reduce additif in foods. The food safety handbook/ ed. Kees van der heijden et al. TX: Marcel Dekker inc., 1999, 600p.

Sodemoto Y., Inoto M. Report of carcinogenesis bioassay of sodium benzoate in rats: absence of carcinogenicity of sodium benzoate in rats. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, 1980, vol.4 p.87-95.

Sondergard D. et Olsen P. The effect of butylated hydroxytoluene (BHT) on the rat thyroid. *Toxicology Letters*, 1982, vol.10, p.239-244.

S.R.I. Stanford Research Institute (1977). Report 24 submitted to U.S. Food and Drug Administration.

Steinmetz KL., Green CE., Bakke JP., et al. unscheduled DNA synthesis in primary cultures of rat, mouse, hamster, monkey and human hepatocytes. *Mutation Research* 1988, 206: 91-102.

Steyn PS. Mycotoxins of human health concern. Human ochratoxicosis and its pathologies Eds EE Creppy, M Castegnaro, G Dirheimer Colloque INSERM/Hohn Libbey Eurotext Ltd, 1993, vol.231: p.3-31.

Steyn PS. Mycotoxins, general view, chemistry and structure. *Toxicol Lett*, 1998, vol.82-83: p.843-851.

Stokes J.D. et Scudder C.L. The effect of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene on behavioral development of mice. *Development. Psychobiological*, 1974, vol.7, p.343-350.

Stormer FC, Lea T. Effects of ochratoxin A upon early and late events in human T-cell proliferation. *Toxicology*, 1995, vol.95: p.45-50.

Subar A.F. differences in reported food frequency by season of questionnaire: the 1987 National Health Interview survey (NHIS) *European journal of clinical nutrition*, 1994, vol.59 (supplement), p.303S.

Suh HJ, Chung MS, Cho YH et al. Estimated daily intakes of BHA and BHT antioxidants in Korea. *Food Addit Contam*, 2005, 22(12): 1176-88.

Swenberg J.A. Bioassay design and MTD setting: old methods and new approaches. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1995, vol.21, p.44-51.

Takahashi O. Feeding of butylated hydroxytoluene to rats caused a rapid decrease in blood coagulation factors II (prothrombin), VII, IX and X. *Archive of Toxicology*, 1986, vol.58 p.177-181.

Takahashi, O. Decrease in blood coagulation factors II (prothrombin), VII, IX and X in the rat after a single oral dose of butylated hydroxytoluene. *Food and Chemical Toxicology*, 1987 vol.25, p.219-224.

Takahashi O. Gastric retention and delayed absorption of a large dose of butylated hydroxytoluene in the rat. *Xenobiotica*, 1990, vol.20, p.1319-1329.

Takahashi O. Some properties of rat platelet aggregation and effects of butylated hydroxytoluene, warfarin and aspirin. *Food and Chemical Toxicology*, 1991, vol.29, p.173-183.

Takahashi O.. Haemorrhages due to defective blood coagulation do not occur in mice and guinea-pigs fed butylated hydroxytoluene, but nephrotoxicity is found in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 1992, vol.32, p.89-97.

Takahashi O. and Hiraga K. (a) Dose-response study of haemorrhagic death by dietary butylated hydroxytoluene (BHT) in male rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1978, vol.43, p.399-406.

Takahashi O. and Hiraga K. (b) Effects of low levels of butylated hydroxytoluene in the prothrombin index in male rats. *Food and Cosmetics Toxicology*, 1978, vol.16, p.475-477.

Takahashi O., et Hiraga, K. Preventive effects of phylloquinone on hemorrhagic death induced by butylated hydroxytoluene in male rats. *Journal of Nutrition*, 1979 vol.109, p.453-457.

Takahashi O., et Hiraga, K. (a). Inhibition of phylloquinon epoxide-dependent carboxylation of microsomal proteins from rat liver by 2,6-di- tert-butyl-4-methylene-2,5-cyclohexadienone. *Food and Cosmetics Toxicology*, 1981, vol.19, p.701-706.

Takahashi O., et Hiraga, K. (b). Hemorrhagic toxicosis in rats given butylated hydroxytoluene, *Acta Pharmacology and Toxicology*, 1981, vol.49, p.14-20.

Takahashi O., et Hiraga, K. Effects of dietary butylated hydroxytoluene on functional and biochemical properties of platelets and plasma preceding the occurrence of hemorrhage in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 1984, vol.22, p.97-103.

Takahashi O., Hayashida S., et Hiraga K. Species differences in the hemorrhagic response to butylated hydroxytoluene. *Food Cosmetology and Toxicology*, 1980, vol.18, p.229-235.

Takahashi M., Furakawa F., Toyoda K. Effects of four antioxidants on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine initiated gastric tumor development in rats. *Cancer Letter*, 1986, vol.30, p.161-168.

Tamborini P., Sigg H., and Zbinden G. Acute toxicity testing in the nonlethal dose range: a new approach. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1980, vol.12, p.69-87.

Thomas A., Shorin V. and M. Safety aspects of food drinks, the food safety handbook. The food safety handbook/ ed. Kees van der heijden et al. TX: Marcel Dekker inc., 1999, 600p.

Thompson FE. Et bryers T. Dietary assessment resource manuel. *Journal of Nutrition* 1994, vol.124, p.2245s-317s.

Thuvander A, Breitholtz-Emanuelsson A, Brabencova D, Gadhasson I. Prenatal exposure of Balb/c mice to ochratoxin A: effect on the immune system in the offspring. *Food Chem Toxicol*, 1996, vol.34: p.547-554.

Tomenson J.A. and Brown L.P. Epidemiology in relation to toxicology. *General and Applied Toxicology*. Basingstoke: Macmillan Press, 1993, p.1189-1206.

Tomiyama S, Saka S., Yamada F. Factors influencing the antioxidant activities of phenol by an ab initio study *General and Applied Toxicology*. Basingstoke: Macmillan Press, 1993, p.1153-1196.

Toth B. Lack of tumorigenicity of sodium benzoate in mice. *Fundamental and applied toxicology*. 1984, vol.4, p.494-496.

Toyoda M., Ito Y., Isshiki K., Onishi K., Kato T., Kamikura M., Shiroishi Y., Harada Y., Hukasawa Y., Yokoyama T., Yoneda M., Iwaida M. Daily intake of preservatives, benzoic acid, dehydrobenzoic acid in Japan. *Journal of the Japanese Society of Nutrition and Food Science*, 1983a, vol.96, p.467-480.

Truhaut T. The concept of acceptable daily intake: an historical overview. *Food additifs and contaminants*, 1991, vol.8, p.151-162.

Tyler TA., Liquid chromatographic determination of sodium saccharin, caffeine, aspartame, and sodium benzoate in cola beverages. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 1984, vol.67, p.745-747.

Vally H. et Thompson P.J. Role of sulphite in wine induced asthma: single dose and cumulative dose studies. *Thorax*, 2001, vol.56, p.763-769.

Vandokkum, R.H.Devos, Frances.A, Hulshof K., Dukel F. and Wijsmann J. Food additifs and food components in total diets in the Netherlands. *British journal of Nutrition*, 1982, vol.48, p.223.

Verger P., Chambolle M., Babayou P., Le Breton S., and Volatier J.-L. Estimation of the distribution of the maximum theoretical intake for ten additifs in France. *Food additifs and Contaminants*, 1998, vol. 15, p. 759-766.

Verhagen H., Becker H., Comuth H.G. Disposition of single oral doses of butylated hydroxytoluene in man and in rat. *Food and Chemical Toxicology*, 1989, vol. 27, p765-772.

Verhagen H., Becker H., Comuth H.G (a). Effect of oral doses of butylated hydroxyanisole in rat. *Food and Chemical Toxicology*, 1990, vol. 32, p748-762.

Verhagen H. and Kleinjans J.C.S (b). Estimate of maximal daily intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene in the diet. *Food and Chemical Toxicology*, 1990, vol.28, p.215-220.

Verhagen H. and Kleinjans J.C.S. Rejoinder to: some comments on the dietary intake of butylated hydroxytoluene. *Food and Chemical Toxicology*, 1991, vol. 29, p.74-75.

Verrett MJ., Scott WF., Reynaldo EF., Alterman EK., Thomas CA. Toxicity and teratogenicity of food additive chemicals in the developing chicken embryo. *Toxicology and applied pharmacology*, 1980, vol.56, p.265-273.

Vincenzi M. Food additive intake in Italy: an application of different methodologies to estimate the intake of sulphites with the diet. *Food and Chemical Toxicology*, 1990, vol.28, p.115-120.

Volatier J.R. Enquête individuelle et nationale sur les consommations alimentaires, 2000, ed. TEC et DOC lavoisier.

Volatier J.L., Turrini A. et Welten D. Some statistical aspects of food intake assessment. *European journal of clinical nutrition*, 2002, vol.56 (supplement), p.S46-S52.

Vorhees C.V., Butcher R.E., Brunner R.L., Sobotka T.J. Developmental neurobehavioral toxicity of butylated hydroxytoluene in rats. *Food and Cosmetics Toxicology*, 1981, vol.19, p.153-162.

Walker R. On the dietary intake of butylated hydroxytoluene. *Food and Chemical Toxicology*, 1985, vol. 29, p.74-75.

Walsh C.T. Toxicokinetics: oral exposure and absorption of toxicants. In: *Comprehensive toxicology*, vol. 1, 1997, General principles. Elsevier Sciences, New York, p.51-61.

Walton K., Dorne J., Renwick A. G. Default factors for interspecies differences in the major route of xenobiotic elimination. *Human and Ecological Risk Assessment*, 2001, vol.7, p.181-201.

Wang JS, Groopman JD. DNA damage by mycotoxins. *Mutat Res*, 1999, vol.424: p.167-851.

Wever J. Appearance of sulphite and S-sulphonates in the plasma of rats after intraduodenal sulphite application. *Food and Chemical Toxicology*, 1985, vol.23, p.895-898.

Wever J. Influence of sulphite on the release of glycolytic metabolites in the perfused rat liver. *Food and Chemical Toxicology*, 1986, Vol. 24, p. 201-205.

WHO. Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents. *Food additives series n°5*. Geneva: WHO, 1974.

WHO. Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents. *Food additives series n°10*. Geneva: WHO, 1976.

WHO. Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents. *Food additives series n°21*. Geneva: WHO, 1980.

WHO. Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents. *Food additives series n°24*. Geneva: WHO, 1984.

WHO. Principles of toxicokinetic studies. *Environmental Health Criteria*, Geneva: WHO, 1986.

WHO. (a) Principles for safety evaluations of food additives and contaminants, *EPICS n°70*, Geneva: WHO, 1987.

WHO. (b) Evaluations of certain food additives and contaminants (Thirtieth report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). Geneva: WHO, 1987.

WHO. Recommendations pour l'étude des quantités de contaminants chimiques apportés par l'alimentation, Geneva: WHO, 1988.

WHO. Evaluations of certain food additives and contaminants (Thirty-third report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). World Health Organization *Technical Report Series n°776*. Geneva: WHO, 1989.

WHO. Evaluation of certain food additives and contaminants, 43th report of the joint FAO/WHO Expert Committee on food additives. *WHO technical report series n°806*, Geneva: WHO, 1991.

WHO. Toxicological Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. Prepared by the 37th meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on the Food Additives, *Food additives series n°28*. Geneva: WHO, 1992.

WHO. Assessing human health risks of chemical: derivation of guidance values for health based exposure limits. *Environmental health criteria n°170*. Geneva: WHO, 1994.

WHO. Evaluations of certain food additives and contaminants (Forty-fourth report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). World Health Organization, *Technical Report Series no 859*, Geneva, 1995.

WHO (a). Toxicological Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. Prepared by the 44th meeting of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *Food additives series n°35*. Geneva: WHO, 1996.

WHO (b). Toxicological Evaluation of Certain Food Additives.. Prepared by the 46th meeting of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *Food additives series n°37*. Geneva: WHO, 1996.

WHO (a). Food consumption and exposure assessment of chemicals. *Report of FAO/WHO consultation*. Geneva: WHO, 1997.

WHO (b). Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. Forty-sixth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. World Health Organization *Technical Report Series n°868*. Geneva: WHO, 1997.

WHO (a). Safety evaluation of certain food additives and contaminants, *Food Additives Series n° 40*, Geneva: WHO, 1998.

WHO (a). IWTDS, International Total Diet Workshop, 1st IWTDS, 1999 Kansas City, KS, USA.

WHO (b). Principles for the assessment of risks to human health from exposure to chemicals, IPCS 210 Geneva: WHO, 1999.

WHO (c). Safety evaluation of certain food additives (Fifty first report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). *Food additives series n°42*. Geneva: WHO, 1999.

WHO (a). Benzoic acid and sodium benzoate. CICAD, *Concise International Chemical Assessment Document 26*. Geneva: WHO, 2000.

WHO (b). Evaluation of certain food additives. (fifty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). World Health Organization, *Technical Report Series n°891*, Geneva: WHO, 2000.

WHO (c). Evaluations of certain food additives and contaminants (fifty-third report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). World Health Organization, *Technical Report Series n°891*, Geneva: WHO, 2000.

WHO (d). Evaluations of certain food additives and contaminants (Forty-sixth report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). *Technical Report Series n°891*, Geneva: WHO, 2000.

WHO (a). Safety evaluation of certain food additives and contaminants, *Food Additives Series n° 48*, Geneva: WHO, 2002.

WHO (b). IWTDS, International Total Diet Workshop, 2nd IWTDS, 2002, Brisbane, Australia.

WHO. GEMS/Food, regional diets regional per capita consumption of raw and semi processed agricultural commodities, Geneva: WHO, 2003.

WHO. IWTDS, International Total Diet Workshop, 3rd IWTDS, 2004, Paris, France.

Whysner J., Wang C.X., Zang E., Iatropoulos M.J., Williams G.M. Dose response of promotion by butylated hydroxyanisole in chemically initiated tumors of the rat forestomach. *Food and Chemical Toxicology*, 1994, vol.32, p.215-222

Williams G.M., Shimada, T., Mcqueen, C., Tong, C., and Ved Brat, S. Lack of genotoxicity of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT). *The Toxicologist*, 1984, vol.4, p.104.

Williams G.M., Wang C.X. & Iatropoulos M.J. (a). Toxicity studies of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. Chronic feeding studies. *Food and Chemical Toxicology*, 1990, vol.28, p.799-806.

Williams G.M., Mcqueen C.A. et Tong C.C. (b). Toxicity studies of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. Genetic and cellular effects. *Food and Chemical Toxicology*, 1990, vol.28, p.793-798.

Williams G.M., Tanaka T., Marahyama H. Modulation by butylated hydroxytoluene of liver and bladder carcinogenesis induced by chronic low-level exposure to 2-acetylaminofluorene. *Cancer Research*, 1991, vol.51, p.6224-6230.

Wilks M.E. and Woollen B.H. Human volunteer studies with non-pharmaceutical chemicals: metabolism and pharmacokinetic studies. *Human Experimental Toxicology*, 1994, vol.13, p.383-392.

Witshi H.P. Separation of early diffuse alveolar cell proliferation from enhanced tumour development in mouse lung. *Cancer Research*, 1986, vol.46, p.2675-2679.

Witshi, H.P. Enhancement of tumor formation in mouse lung by dietary butylated hydroxytoluene. *Toxicology*, 1991, vol.21, p.95-104.

Witshi H.P. & Lock S. Enhancement of adenoma formation in mouse lung by butylated hydroxytoluene. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1981, vol.50, p.391-400.

Witshi H.P. et Kehrer J.P. Adenoma development in mouse lung following treatment with possible promoting agents. *Journal of American College of Toxicology*, 1982, vol.1, p.171.

Witshi H.P. et Morse C.C. Cell kinetics in mouse lung following administration of carcinogens and butylated hydroxytoluene. *Toxicology Applied Pharmacology*, 1985, vol.78, p.464-472.

Witshi H.P., Hakkinen P.J. et Kehrer, J.P. Modification of lung tumor development in A/J mice, *Toxicology*, 1981, vol.21, p.37-45.

Yoon HJ, Cho YH, Park J et al. assessment of estimated daily intakes of benzoates for average and high consumers in Korea. *Food addit Contam*, 2003, 20(2): 127-35.

Young E., Patel S., Stoneham M., Rona R., and Wilkinson J.D. The prevalence of reactions to food additives in a survey population. *Journal Royal College Physicians, London*, 1987, vol.21, p.241-247.

Yougman LD et Campbell TC. Inhibition of aflatoxin B-induced gamma glutamyl transpeptidase positive (GGT+) hepatic preneoplastic foci and tumors by low protein diets: evidence that altered GGT+ indicate neoplastic potential. *Carcinogen*, 1992, vol.13(9): 1607-1613.

Zaker P. Etude microbiologique du lait et des produits laitiers confectionnés au liban. Mémoire de maîtrise en science agronomique, UL, 1993. 120pp.

Zeiger E., Anderson B., Haworth B. Salmonella mutagenicity tests:IV. Results from the testing of 300 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 1988, vol.11, 158p.

Zhou HR, Lau AS, Pestka JJ. Role of double-stranded RNA-activated protein kinase R (PKR) in deoxynivalenol-induced ribotoxic stress response. *Toxicol Sci*, 2003, vol.74:p.335-334.

Zinedine A, Soriano JM, Juan C et al. Incidence of OTA in rice and dried fruits from rabat and sale area, Morocco. *Food addit Contam*, 2007, 24(3): 285-91.

Annexes

Annexe 1. Questionnaires de l'étude de consommation

Annexe 2. Quelques photos des portions développées pour l'étude de consommation

Annexe 3. Degré de dilution effectué pour les différents types d'aliments en fonction de l'analyse microbiologique réalisée.

Analyse microbiologique	Sodas	Jus de fruits	Conserves(1)	Produits laitiers (2)	Biscuits	Chips
Dénombrement de la flore totale	10^{-5}	10^{-5}	10^{-3}	-	-	-
Dénombrement de Clostridium perfringens	-	-	10^{-1}	-	-	-
Dénombrement des Clostridium Sulfitoréducteur	-	-	10^{-1}	-	-	-
Dénombrement de la flore fongique	10^{-5}	10^{-5}	10^{-3} (3)	-	-	-
Dénombrement des coliformes fécaux	-	-	-	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}
Dénombrement des coliformes totaux	-	-	-	10^{-5}	10^{-2}	10^{-2}
Dénombrement de Staphylococcus Aureus	-	-		10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}

Annexe 4. Résultats détaillés de l'étude microbiologique de quelques aliments analysés.

Tableau a: Nombre de microorganismes /ml dans les sodas, cas du Dénombrement de la flore total (moyenne de deux lots/ saison)

Numéro d'échantillon	Nombre de microorganismes/ml /, saison 1	Nombre de microorganismes/ml /, saison 2
1	200	340
2	800	230
3	760	543
4	560	670
5	670	543
6	437	320
7	345	236
8	987	456
9	560	423
10	940	420

Tableau b: Nombre de microorganismes /ml dans les sodas, cas du Dénombrement de la flore fongique (moyenne de deux lots/ saison)

Numéro d'échantillon	Nombre de microorganismes/ml /, saison 1	Nombre de microorganismes/ml /, saison 2
1	96	45
2	105	55
3	86	39
4	67	45
5	77	43
6	80	40
7	56	35
8	67	39
9	88	38
10	98	67

Tableau c: Nombre de microorganismes /ml dans les jus de fruits, cas du Dénombrement de la flore total (moyenne de deux lots/ saison).

Numéro d'échantillon	Nombre de microorganismes/ml /, saison 1	Nombre de microorganismes/ml /, saison 2
1	789	453
2	567	234
3	976	453
4	675	234
5	786	543
6	998	234
7	567	453
8	876	234
9	786	453
10	765	345
11	888	234
12	887	453
13	786	234
14	786	543
15	679	453
16	796	543
17	967	543
18	679	345
19	528	234
20	598	234
21	786	598
22	729	234
23	567	560
24	876	543
25	987	345
26	678	234
27	678	560
28	765	560
29	785	560
30	987	234
31	987	543
32	789	453
33	576	560
34	576	543
35	678	543
36	678	560
37	897	435
38	897	345
39	987	543
41	678	234
42	789	453
43	678	234
44	789	234
45	987	345

Tableau d: Nombre de microorganismes /ml dans les jus de fruits, cas du Dénombrement de la flore fongique (moyenne de deux lots/ saison)

Numéro d'échantillon	Nombre de microorganismes/ml /, saison 1	Nombre de microorganismes/ml /, saison 2
1	88	35
2	97	33
3	0	45
4	34	45
5	57	34
6	60	54
7	65	25
8	89	34
9	78	23
10	87	23
11	97	34
12	89	35
13	80	35
14	80	45
15	90	54
16	90	34
17	90	32
18	86	29
19	87	56
20	89	54
21	67	50
22	77	43
23	76	44
24	90	43
25	89	39
26	90	67
27	90	76
28	80	56
29	89	45
30	87	45
31	90	34
32	85	67
33	83	87
34	88	28
35	90	39
36	90	23
37	90	43
38	87	34
39	56	23
41	76	55
42	89	58
43	90	45
44	89	45
45	90	34

Tableau e: Nombre de microorganismes /ml dans les conserves, cas du Dénombrement de la flore fongique (moyenne de deux lots/ saison)

Numéro d'échantillon	Nombre de microorganismes/ml /, saison 1	Nombre de microorganismes/ml /, saison 2
1	35	45
2	87	23
3	97	35
4	89	35
5	80	35
6	80	45
7	90	54
8	90	34
9	90	32
10	86	29
11	87	56
12	89	54
13	67	50
14	77	43
15	76	44
16	90	43
17	-	-
18	-	-
19	-	-
20	-	-
21	-	-
22	-	-
23	-	-
24	-	-
25	-	-
26	-	-
27	-	-
28	-	-
29	-	-
30	-	-

- : analyse non effectuée

Tableau f: Nombre de microorganismes /ml dans les produits laitiers, cas du Dénombrement des coliformes totaux (moyenne de deux lots/saison).

Numéro d'échantillon	Nombre de microorganismes/ml /, saison 1	Nombre de microorganismes/ml /, saison 2
1	200	200
2	220	300
3	0	0
4	220	200
5	0	0
6	200	100
7	0	0
8	10	10
9	<10	<10
10	<10	<10
11	300	230
12	<10	<10
13	<10	<10
14	<10	<10
15	<10	<10
16	0	0
17	0	0
18	0	0
19	0	0
20	0	0
21	100	50
22	100	200
23	0	<10
24	0	0
25	420	<10
26	320	420
27		420
28	<10	<10
29	<10	<10
30	0	0
31	90	134
32	85	67
33	0	0
34	<10	<10
35	<10	<10
36	210	100
37	<10	0
38	<10	<10
39	0	0
40	<10	0
41	89	58
42	<10	<10
43	89	45
45	-	0
46	-	200
47	-	0
48	-	<10
49	-	<10
50	-	0

- : analyse non effectuée

Tableau g: Nombre de microorganismes /ml dans les conserves, biscuits et chips.

Type d'aliment	Dénombrement de la flore total	Dénombrement clostridium sulfito réducteurs	Dénombrement clostridium perfringens	Dénombrement de la flore fongique	Dénombrement des coliformes fécaux	Dénombrement des coliformes totaux
Conserves	Absence	Absence	absence	1	-	-
Produits laitiers (2)	-	-	-	-	absence	3
Biscuits	Absence	-	-	-	absence	absence
Chips	Absence	-	-	-	absence	Absence

- : analyse non effectuée

1: voir résultats dans tableau f

2: incluant laban, labneh, fromage blanc, fromage jaune, ayran et crème glacée

3: voir tableau f

Annexe 5. Résultats détaillés par saison de la détermination analytique des additifs étudiés dans les aliments sélectionnés.

Tableau a: Nombre d'analyse, concentration analytique par saison et en moyenne des benzoates.

Catégorie alimentaire	Types d'aliments	Nombre d'échantillons	Taux Analytiques mg/kg Saison1	Taux analytiques mg/kg Saison2	Taux analytiques moyens mg/kg
Sucreries	Biscuits bar	4	25	21	23
Sucreries	Biscuits pack	4	125	105	115
Pain et céréales	Pains	8	10	10	10
Sucreries	Candies	4	0.15	0.15	0.15
Fruits et jus de fruits	Jus de fruits	8	145	345	245
Pain et céréales	Crackers	2	152	148	150
Lait et produits laitiers	Spécialités fromagère	2	1200	1220	1210
Lait et produits laitiers	Fromage blanc	6	80	220	150
Lait et produits laitiers	Fromage jaune	4	30	90	60
Sucreries	Chewing gum	4	0.15	0.15	0.15
Légumes secs	Pois chiche	6	90	96	93
Légumes secs	Fève	2	560	600	580
Sucreries	Ice cream	3	-	15	15
Sucreries	Confitures	4	0.15	0.15	0.15
Lait et produits laitiers	Laban	6	50	150	100
Lait et produits laitiers	Labneh	4	60	260	160
Plats composés	Lahm bi ajin	2	0.15	0.15	0.15
Légumes secs	Lentilles en conserves	2	135	125	130
Graisses ajoutées	Mayonnaise	2	20	20	20
Légumes	Pois en conserves	2	0.15	0.15	0.15
Plats composés	Pizzas	4	0.15	0.15	0.15
Pain et céréales	Potato chips	8	190	200	195
Boissons	Sodas	10	80	160	120
Pain et céréales	Toasts	8	94	96	95
Poissons	Thon en conserve	4	1250	1270	1260
Total		113			

Tableau b: Nombre d'analyse, concentration analytique par saison et en moyenne des sulfites.

Catégorie alimentaire	Types d'aliments	Nombre d'échantillons	Taux analytiques mg/kg saisons 1	Taux analytiques mg/kg saison 2	Taux analytiques moyens mg/kg
Légumes secs	Haricot	2	8	12	10
Sucreries	Biscuits bar	4	200	220	210
Sucreries	Biscuits pack	4	264	288	276
Pain et céréales	Pains	8	1.5	1.5	1.5
Sucreries	Cakes	10	100	100	100
Sucreries	Candies	4	312	310	311
Fruits et jus de fruit	Jus de fruits	8	28	40	34
Sucreries	Chewing gum	4	68	64	66
Légumes secs	Pois chiche	6	14	10	12
Sucreries	Chocolat	4	1.5	1.5	1.5
Pain et céréales	Crackers	2	190	200	195
Viandes	Burger viande	2	1.5	1.5	1.5
Sucreries	Confitures	4	220	180	200
Fruits secs	Mixed nuts	2	600	600	600
Fruits secs	Bizir	2	500	500	500
Fruits secs	Krikri	2	450	450	450
Fruits secs	Cacahuète	2	600	600	600
Pain et céréales	Potato chips	8	30	40	35
Pain et céréales	Pommes frites	2	1.5	1.5	1.5
Viandes	Saucissons	2	1.5	1.5	1.5
Sucreries	Sucres	4	12	12	12
Pain et céréales	Toasts	8	1.5	1.5	1.5
Total		94			

Tableau c: Nombre d'analyse, concentration analytique par saison et en moyenne du BHA.

Catégorie alimentaire	Types d'aliments	Nombre d'échantillons	Taux Analytiques mg/kg Saison 1	Taux analytiques mg/kg Saison2	Taux analytiques moyens mg/kg
Sucreries	Biscuits bar	4	105	95	100
Sucreries	Biscuits pack	4	95	105	100
Pain et céréales	Pain	8	10	10	10
Graisses ajoutées	Beurre	2	0.5	0.5	0.5
Sucreries	Cakes	10	20	20	20
Sucreries	Candies	4	50	50	50
Pain et céréales	Crackers	2	95	105	100
Sucreries	Chewing gum	4	75	75	75
Sucreries	Chocolat	4	52	48	50
Pain et céréales	Cornflakes	8	14	16	15
Snacks	Croissants	6	17	23	20
Snacks	Doughnuts	4	21	19	20
Sucreries	Ice cream	3	0.5	0.5	0.5
Snacks	Manakeesh	4	0.5	0.5	0.5
Graisses ajoutées	Mayonnaise	2	0.5	0.5	0.5
Fruits secs	Mixed nuts	2	21	19	20
Fruits secs	Bizir	2	18	22	20
Fruits secs	Krikri	2	19	21	20
Fruits secs	Cacahuète	2	17	23	20
Graisses ajoutés	Huile d'olive	2	0.5	0.5	0.5
Pain et céréales	Potato chips	8	45	65	55
Boissons	Sodas	10	6	4	5
Graisses ajoutées	Tahineh	2	0.5	0.5	0.5
Pain et céréales	Toasts	8	9	11	10
Poissons	Thon en conserve	4	0.5	0.5	0.5
Total		107			

Tableau d : Nombre d'analyse, concentration analytique par saison et en moyenne du BHT.

Catégorie alimentaire	Types d'aliments	Nombre d'échantillons	Taux analytique mg/kg saison1	Taux analytiques moyens mg/kg Saison 2	Taux analytiques moyens mg/kg (2)e
Sucreries	Biscuits bar	4	0	0	0
Sucreries	Biscuits pack	4	0	0	0
Pain et céréales	Pain	8	0	0	0
Graisses ajoutées	Beurre	2	0	0	0
Sucreries	Cakes	10	0	0	0
Sucreries	Candies	4	48	52	50
Sucreries	Chewing gum	4	224	216	220
Pain et céréales	Cornflakes	8	0	0	0
Pain et céréales	Crackers	2	0	0	0
Snacks	Croissant	6	0	0	0
Snacks	Doughnuts	4	0	0	0
Sucreries	Ice cream	3	0	0	0
Snacks	Manakeesh	4	0	0	0
Graisses ajoutées	Mayonnaise	2	0	0	0
Fruits secs	Mixed nuts	2	0	0	0
Fruits secs	Bizir	2	0	0	0
Fruits secs	Krikri	2	0	0	0
Fruits secs	Cacahuète	2	0	0	0
Graisses ajoutées	Huile d'olive	2	0	0	0
Pain et céréales	Potato chips	8	0	0	0
Boissons	Sodas	10	0	0	0
Graisses ajoutées	Tahineh	2	0	0	0
Pain et céréales	Toasts	8	0	0	0
Poissons	Thon en conserve	4	0	0	0
Total		107			

Annexe 6. Pourcentage d'importation des différentes céréales à partir de différents pays
(Chambre de commerce et de l'industrie libanaise).

a. Maïs

Pays	Pourcentage d'importation
USA	20%
Ukraine	6%
Russie	1%

b. Blé et farine

Pays	Pourcentage d'importation
Russie	35%
Australie	5%
Kazakhstan	3%
Inde	1%
USA	1%
Angleterre	1%

c. Riz

Pays	Pourcentage d'importation
Egypte	7%
Italie	4%
Thaïlande	2%
Russie	1%
USA	1%
Argentine	1%

Annexe 7. Courbes d'étalonnage obtenues pour les différents additifs analysés.

Annexe 8. Résumé des études de toxicité aiguë et chronique pour les quatre additifs alimentaires.

Tableau A: Toxicité de l'acide benzoïque et de benzoate de sodium après exposition orale à court terme.

Espèce; Nombre d'animaux par dose	Traitement	Durée	Résultats	Références
Acide benzoïque				
Rat; dose groupe: 5-15m; contrôle: NS	0 ou 2250 mg/kg p.c./j.	1-5 jours	gain de poids corporel réduit. chez les rats dosés sur 5 jours désordres du système nerveux central (excitation, ataxie, convulsions); taux de mortalité: 50%; dans certains cas saignement dans le tube digestif; atteinte cervicale chez la majorité des animaux dosés sur 3-5 jours (toujours présente après 35 jours).	Kreis et al. (1967) (WHO, 2000)
Rat; dose groupe: 5-15 m; contrôle: NS	0 ou 825 mg/kg p.c./j	7-35 jours	réduction de gain de poids corporel; pas de signes cliniques d'intoxication.	Kreis et al. (1967) (WHO, 2000)
Rat; dose groupe: 10m; contrôle: NS	0, 65, 324 ou 647 mg/kg p.c./j	28 jours	324 mg/kg p.c.:pas de morts ou signes d'intoxications.	Bio-Fax (1973)
Chat; dose groupe: 4m; contrôle: NS	0 ou 300-420mg/kg p.c./j	3-4 jours	Hyperesthésie; appréhension; dépression débutant 48-92 h; durée du syndrome: ~20-48 h; taux de mortalité: 50%; les morts sont examinés; des modifications dégénératives au niveau du foie, des reins et des poumons; pas de lésions au niveau du cerveau et de la moelle épinière. les chats survivants: élévation du taux d'urée et de l'alanine aminotransférase (S-ALAT) sérique, indiquant une atteinte hépatique et rénale.	Bedford Et Clarke (1972)
Chat; dose groupe: 4m; contrôle: NS	a) 100 ou 200 mg/kg p.c./j b) 130 ou 160 mg/kg p.c./j	a) 15 jours b) 23 jours	pas d'effets adverses rapportés.	Bedford et Clarke (1972)
Benzoate de sodium				
Rat; dose groupe: 5m/f; contrôle: NS	0 ou 16-1090 mg/kg p.c.	30 jours	pas d'effets adverses rapportés.	Smyth et Carpenter (1948) (WHO, 2000)
Rat; dose groupe: 28 NS; contrôle: NS	0 ou 3750 mg/kg p.c	28 jours	mortalité à 100% au bout de trois semaine; réduction de la consommation alimentaire; diarrhée; hémorragie intestinale.	Kieckebush et Lang (1960) (WHO, 1974)
Rat; dose	0 ou 3750 mg/kg p.c./j	≥28 jours	mortalité à 80% au bout de trois semaines; réduction du poids corporel.	Kieckebush et Lang (1960)

groupe: 5 NS; contrôle: NS				(WHO, 1974)
Rat; dose groupe: 6 m/f; contrôle: NS	0, 2200 ou 6700 mg/kg p.c./j	28 jours	2200 mg/kg p.c./j: dépression légère du gain de poids corporel 6700 mg/kg p.c./j: mortalité à 100% au bout de 11 jours; signes d'intoxication incluant une hyperexcitabilité, incontinence urinaire et convulsions.	Fanelli et halliday (1963) (WHO, 1974)
Rat; dose groupe: 6 m/f; contrôle: NS	0, 375, 750, 1500, 3000 ou 6000 mg/kg p.c./j	42 jours	≥ 375 mg/kg p.c./j: hyper sensibilité après dosage. ≥3000 mg/kg p.c./j: mortalité à 100% au bout de 4 semaines; atrophie des nodules lymphatiques et de la rate; pas d'autres modifications morphologiques.	Sodemoto et Enomoto (1980)
Rat; dose groupe: 6m/f; contrôle: NS	0, 1358, 1568 ou 1800 mg/kg p.c./j	10 jours	≥1358 mg/kg p.c./j: réductions des niveaux sériques du cholestérol (f). ≥ 1568 mg/kg p.c./j: augmentation du poids hépatique relative (m); modifications des niveaux sériques (albumine ↑, Protéine totale ↑ (m)). 1800 mg/kg p.c./j : 1/6 mâles sont morts (hyper sensibilité, convulsions); réduction du poids corporel (m/f), du poids absolu de la rate et du thymus (m) et poids absolu/relative du thymus ↓ (f); pas de modification au niveau des reins (m); modifications des niveaux sériques: albumine ↑(f), cholinesterase ↓ (f), gamma-glutamyltranspeptidase (GGT) ↑(m); élargissement des hépatocytes (m).	Fujitani et al. (1993)
Souris; dose groupe: 4 m/f; contrôle: NS	0, 1500, 3000, 6000 ou 12000 mg/kg p.c./j	35 jours	3000 mg/kg p.c./j: convenable pour le traitement à long terme. basé sur quatre paramètres: survie, poids corporel, consommation du produit chimique, et histologie. 6000 mg/kg p.c./j: mortalité à 75% chez m/f; réduction du poids corporel des souris survivants (m/f); 12000 mg/kg p.c./j: mortalité à 100% au bout de trois semaines.	Toth (1984)
Souris; dose groupe: 4-5 m/f; contrôle: NS	0, 3000, 3750 Ou 4500 mg/kg p.c./j	10 jours	≥3750 mg/kg p.c./j: modifications des paramètres sériques (cholinestérase ↑ (m)). 4500 mg/kg p.c./j: hypersensibilité chez tout les animaux; convulsions 1/5 mâle et 2/5 femelles (les deux femelles sont mortes); augmentation du poids hépatique absolu/relative (m/f) et du poids relative des reins (f); modifications des niveaux sériques (cholestérol ↑ (m), phospholipides ↑ (m)); élargissement des hépatocytes, et nécrose cellulaire et vacuolisation des hépatocytes (m), pas de modification au niveau des reins (m/f).	Fujitani et al. (1993)

m= mâle; f=femelle

NS= non spécifié

↑= augmentation

↓= réduction

Tableau B: Toxicité de l'acide benzoïque et de benzoate de sodium après exposition orale à long terme.

Espèce; Nombre d'animaux par dose	Traitement	Durée	Résultats	Références
Acide benzoïque				
Rat; dose groupe: 30m/20f; contrôle: 13m/12f	0 ou 750 mg/kg p.c./j.	18 mois	Réduction de gain de poids corporel associé à une réduction de la consommation alimentaire; augmentation du taux de mortalité (15/50 contre 3/25 (contrôle)).	Marquardt (1960) (WHO, 1974)
Rat; dose groupe: 20m; contrôle: 10m	0 ou 750 mg/kg p.c./j	18 mois	Réduction de gain de poids corporel associé à une réduction de la consommation alimentaire; absence d'information supplémentaire (uniquement des résultats provisionnelles sont fournis).	Marquardt (1960) (WHO, 1974)
Rat; dose groupe: 20m/f; contrôle: NS	0, 250 ou 500 mg/kg p.c./j	Génération 1 et 2: vie totale génération 3: 16 semaines génération 4: jusqu'à reproduction	Pas d'effet sur la croissance et sur le poids des organes 250 mg/kg p.c./j: une prolongation de la survie comparée à celle du contrôle est observée.	Kieckebusch et Lang (1960) (WHO, 1974)
Benzoate de sodium				
Rat; dose groupe: 5m/f; contrôle: NS	0, 640, 1320, 2620 ou 6290 mg/kg p.c./j	90 jours	6290 mg/kg p.c./j: mortalité à 50%; réduction de gain de poids; augmentation du poids relative du foie et des reins; lésions pathologiques non spécifiées au niveau du foie et des reins .	Deuel et al. (1954) (WHO, 1974)
Rat; dose groupe: 50m/52f; contrôle: 25m/43f	m: 0, 700ou 1400 mg/kg p.c./j f: 0, 290ou 580 mg/kg p.c./j	18-24 mois	Le taux de mortalité moyen de tous les animaux au cours des premiers 16 mois: 14.5% (tous les rats qui sont morts ont présenté une pneumonie avec abcès); a peu près 100 rats incluant ceux du contrôle sont morts après 16 mois dus à des pneumonies hémorragiques (infection); pas de signes cliniques adverses et pas de différences significatives du poids moyen et de la mortalité entre les animaux traités et ceux du contrôle; les effets non cancérigène n'ont pas été rapportés.	Sodemoto Et Enomoto (1980)
Rat; dose groupe: 30m/20f; contrôle: 99m	0, 640, 1320, 5960- 6000 mg/kg p.c./j	Vie totale	Pas de différence des taux de survie entre les animaux traités et ceux du contrôle; pas d'évidence pathologique ou statistique d'induction des tumeurs.	Toth (1984)

m= mâle; f=femelle

NS= non spécifié

↑= augmentation

Tableau C: Toxicité des sulfites après exposition orale à court terme et subchronique.

Espèce; Nombre d'animaux par dose	Traitement	Durée	Résultats	Références
Sulfites				
Rat (OD); dose groupe: NS; contrôle: NS	0.035% dioxyde de soufre	8 semaines	Pas d'influence sur la croissance.	Locket (1957) (WHO, 1974)
Rat; dose groupe: 5 NS; contrôle: NS	0.6% sodium métabisulfite	6 semaines	Réduction de la croissance; diarrhée.	Bhagat et Locket (1964) (WHO, 1974)
Rat; dose groupe: 30m/f; contrôle: 30m/f	0.6% dioxyde de soufre	Génération 1: 3 mois Génération 2 et 3: 3 mois	Pas d'effet sur la reproduction, la mortalité et la formule sanguine.	Causeret (1964) (WHO, 1974)
Rat; dose groupe: NS; contrôle: NS	0.125% → 6% Sodium métabisulfite	8 semaines	≥1%: sang dans les selles; modifications histopathologiques de l'estomac. ≥4%: élargissement de la rate; hématopoïèse; diarrhée. ≥6%: ↑ du nombre des cellules blanches sanguines.	Til (1970) (WHO, 1974)
Rat; dose groupe: 10m/f; contrôle: NS	0% → 6% Sodium métabisulfite	10-56 jours	≥4%: hématopoïèse de la rate. ≥1%: réduction de la consommation alimentaire↓; croissance; hyperplasie glandulaire; hémorragie; ulcération, nécrose et inflammation de l'estomac; ↑ du nombre des cellules blanches sanguines. effets réversibles par élimination des sulfites de l'alimentation.	Til et al. (1970) (WHO, 1974)
Rat (OD+ NOD); dose groupe: NS; contrôle: NS	a) 350 mg/kg p.c./jour équivalent de dioxyde de soufre b) 350 mg/kg p.c./jour équivalent de dioxyde de soufre Sodium métabisulfite ou Acétaldéhyde hydroxysulfonate	a) 3 semaines b) 5 semaines	Des lésions gastriques ont été notées chez les deux types de rats; les lésions gastriques sont plus sévères et plus fréquentes chez les rats OD. Des lésions hépatiques sont observées chez les groupes recevant l'acétaldéhyde hydroxysulfonate (effet attribuable à l'aldéhyde libre); augmentation de l'excretion urinaire des sulfites chez les groupes recevant l'acétaldéhyde hydroxysulfonate et chez les rats OD.	Hui et al. (1989)
Rat (OD+ NOD); dose groupe: 10m/f; contrôle: NS	0, 10, 35 et 75% Sodium métabisulfite sous forme lié	a) 28 jours b) 85 jours	Pas d'influence sur la croissance, la consommation alimentaire et la mortalité; pas d'anormalité clinique; pas de modification de la formule sanguine, de la fonction rénale, de la chimie clinique, de l'analyse urinaire, des poids des organes et des observations microscopiques ou grossière des organes; pas d'effet sur la concentration hépatique en vitamine A, B, C; augmentation de la concentration hépatique en vitamine E (après 28 jours à 75%).	Ribera et al. (2001)

m= mâle; f=femelle

NS= non spécifié

OD= déficient en sulfite oxydase, NOD= non déficient en sulfite oxydase.

Tableau D: Toxicité des sulfites après exposition orale à long terme.

Espèce; Nombre d'animaux par dose	Traitement	Durée	Résultats	Références
Sulfites				
Rat; dose groupe: 18-24 NS; contrôle: NS	0.0125% → 2% Sodium métabisulfite	1-2 ans	≤0.05%: pas d'effets secondaires ≥0.1%: inhibition de la croissance liée à la carence en thiamine.	Fitzhugh et al. (1946) (WHO, 1974)
Rat; dose groupe: 13-19 NS; contrôle: 18 NS	0, 0.035% et 0.075% Dioxyde de soufre	2,5 ans et étendu sur génération 1, 2 et 3	Pas d'effet sur: la croissance, la consommation alimentaire, la condition clinique, le taux de mortalité, les indices hématologiques et ceux de la moelle épinière (à l'exception des leucocytes qui sont augmentés (m)) et les poids des organes (à l'exception du poids de la rate qui est augmenté (f)). Pas de modification micro pathologiques d'un grand nombre de tissus. Absence d'effet sur la reproduction sur deux générations à l'exception d'une légère réduction du nombre des petits et des mâles par portée; pas d'effet sur la croissance des petits jusqu'à trois mois.	Locket et Natoff (1960) (WHO, 1974)
Rat; dose groupe: 40m/f; contrôle: 80 NS	0.07% Dioxyde de soufre	20 mois	Pas d'effet sur: la consommation alimentaire, la consommation des liquides, la reproduction, la lactation ou l'incidence des tumeurs.	Cluzan et al. (1964) (WHO, 1974)
Rat; dose groupe: 20-30 NS; contrôle: NS	105 et 450 mg/l dioxyde de soufre	génération 1: m= 6 mois; f= 4 mois + 4 générations génération 2: 1 ans	Pas d'effet sur quatre générations sur: le poids corporel, la reproduction, l'utilisation effective des protéines et leur valeurs sanguines respectives, l'apparence macroscopique et microscopique des organes; le poids des organes, réduction du taux de transpiration tissulaire des biopsies hépatiques <i>in vitro</i> .	Jaulmes (1964) (WHO, 1974)
Rat; dose groupe: 10m/f; contrôle: NS	0.01% et 0.045% Dioxyde de soufre	génération 1: m= 6 mois; f= 4 mois génération 2: 1 ans	Pas d'effet sur: le poids corporel, la reproduction, l'utilisation effective des protéines et leur valeurs sanguines respectives, l'apparence macroscopique et microscopique des organes, le poids des organes et sur le comportement. ↓ du taux de respiration des cellules hépatiques.	Lanteaume et al. (1965) (WHO, 1974)
Rat; dose groupe: 20m/f; contrôle: NS	0.125% → 2% Sulfite acide de sodium	2 ans	Pas d'effet sur la croissance, la consommation alimentaire, le poids corporel, le poids des organes et la fonction rénale, ≥0.125%: réduction du contenu urinaire et hépatique en thiamine. ≥1%: modification pathologique de l'estomac (hyperplasie et/ou inflammation); sang dans les selles. Pas d'effet sur l'incidence des tumeurs.	Til et al. (1972b) (WHO, 1974)

m= mâle; f=femelle

NS= non spécifié

OD= déficient en sulfite oxydase

NOD= non déficient en sulfite oxydase

↓= Réduction

Tableau E: Toxicité du BHA après exposition orale à court terme et subchronique.

Espèce; Nombre d'animaux par dose	Traitement	Durée	Résultats	Références
BHA				
Rat ; dose groupe: 7 NS; contrôle: NS	0, 0.5, 1, 2 et 3%	6 mois	Absence de condition pathologique attribuable au BHA.	Wilder et Kraybill (1948) (WHO, 1974)
Rat; dose groupe: 26; contrôle: NS	3.3-7 mg/kg p.c.	32 semaines	Pas d'effet adverse observé.	Graham et al. (1955) (WHO, 1974)
Rat; dose groupe: NS; contrôle: NS	500-600 mg/kg p.c.	10 semaines	Réduction de la vitesse de croissance; réduction de l'activité des enzymes sanguines: catalase, peroxydase et cholinestérase; Réduction de la quantité des phospholipides comparés au contrôle Absence de modifications histopathologiques au niveau des divers organes et des tissus.	Karplyuk (1962) (WHO, 1974)
Rat; dose groupe: NS; contrôle: NS	0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5%	6 semaines	Augmentation du poids hépatique (0.4 et 0.5%). Augmentation du contenu lipidique absolu du foie. Absence d'effet sur la concentration hépatique du cholestérol total et du cholestérol estérifié. Absence d'effet sur la composition hépatique en acide gras polyinsaturé.	Johnson et Hewgill (1961) (WHO, 1976)

m= mâle; f=femelle
NS= non spécifié

Tableau F: Toxicité du BHA après exposition orale à long terme.

Espèce; Nombre d'animaux par dose	Traitement	Durée	Résultats	Références
BHA				
Rat; dose groupe: 15 NS; contrôle: NS	0, 0.05, 0.5 et 1%	22mois	Pas d'effet sur: le poids corporel, reproduction, mortalité. Pas de modifications histopathologiques observées.	Wilder et Kraybill (1948) (WHO, 1974)
Rat; dose groupe: 17 NS; contrôle: NS	0, 0.05, 0.5, 1et 2%	22 mois	Pas d'effet sur la consommation alimentaire et la croissance; absence de modifications histopathologiques.	Wilder et Kraybill (1948) (WHO, 1976)
Rat; dose groupe: 40 NS; contrôle: NS	NS	2 ans	≥0.5% réduction du poids corporel; augmentation du poids relative hépatique; absence d'effets sur la reproduction, la mortalité, l'histologie de la rate, des reins, du foie, et de la peau ainsi que sur le rapport du poids de cœur, de la rate et des reins sur le poids total de l'organisme.	Brown et al. (1959) (WHO, 1976)
Rat; dose groupe: 20-30 NS; contrôle: NS	0 et 500-600 mg/kg p.c.	1 ans +3 générations successives génération 1et 2: 6 mois	Pas d'effet sur: la reproduction; l'apparence macroscopique et microscopique des organes.	Karplyuk (1964) (WHO, 1976)
Chien; dose groupe: 4 NS; contrôle: NS	0, 5, 50 et 250 mg/kg p.c.	15 mois	Pas d'effet sur: le poids corporel; les paramètres hématologiques Augmentation du rapport sulfate inorganique sur le sulfate total urinaire, Augmentation des glucuronates urinaire. ≥250 mg/kg p.c. dégénération des cellules hépatiques et infiltration granulocytaire diffuse. Absence de modification de la structure lobulaire du foie. Absence de prolifération excessive du tissu connective.	Wilder et al. (1960) (WHO, 1976)

m= mâle; f=femelle

NS= non spécifié

Tableau G: Toxicité du BHT après exposition orale à court terme et subchronique.

Espèce; Nombre d'animaux par dose	Traitement	Durée	Résultats	Références
BHT				
Souris; dose groupe: 5 m/f; contrôle: NS	0, 3100, 6200, 12500, 50000 mg/kg d'aliment	7 semaines	Réduction du poids corporel. ≥25000mg/kg vacuolisation cytoplasmique centrolobulaire des hépatocytes.	NCI (1979) (WHO, 2000)
Souris; dose groupe: 10 m/f; contrôle: 20m/f	0.25 → 4%	10 semaines	Réduction du poids corporel. ≥ 4% atrophie de la rate, du cœur et des reins.	Inai et al. (1988) (WHO, 1976)
Souris; dose groupe: 17-39 (m+f); contrôle: NS	0.05% ou 0.5%	10 mois	Réduction du poids corporel. Augmentation de l'incidence des adénomes hépatocellulaire (m).	Anonyme (WHO, 1976)
Rat; dose groupe: 12 NS; contrôle: NS	0.1%+10%matière grasse 0.1%+20 % matière grasse	7 semaines	0.1%+10 graisse%: pas d'effet adverse. 0.1%+20 graisse%: réduction de la vitesse de la croissance; augmentation du poids hépatique relative et absolu; anophtalmie chez 10% des nouveau-né.	Brown et al. (1959) (WHO, 1974)
Rat; dose groupe: NS; contrôle: NS	250 mg/kg p.c.	68-82 jours	Infiltration hépatique par la matière grasse. Réduction du gain de poids corporel.	Karplyuk (1959) (WHO, 1974)
Rat; dose groupe: 3m/f; contrôle: NS	0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4% ou 0.5%	6 semaines	≥0.2%: augmentation du poids hépatique relative et absolu non associée à des modifications du contenu en lipides ou en acide gras poly insaturés; augmentation du poids de la glande adrénale (m) non associée à des modifications histopathologiques; augmentation du taux de cholestérol sérique proportionnellement au taux du BHT. ≥0.3%: réduction de la vitesse de la croissance.	Johnson et Hewgill (1961) (WHO, 1974)
Rat; dose groupe: NS; contrôle: NS	0, 0.2%, 0.3%, 0.4% ou 0.5%	6 semaines	Augmentation du poids hépatique relative et absolu associée à des modifications du contenu en lipides ou en acide gras poly insaturés; augmentation du poids de la glande adrénale (m) non associée à des modifications histopathologiques; augmentation du taux de cholestérol sérique proportionnellement au taux du BHT. ≥0.3%: réduction de la vitesse de la croissance (m).	Johnson et Hewgill (1961) (WHO, 1974)
Rats; dose groupe: 24m/f; contrôle: NS	0 ou 0.1%	16 semaines	Pas d'effets adverses sur: la croissance; consommation alimentaire; poids corporel; histologie des organes; la mesure biochimique et l'évaluation histochimique du glucose phosphatase et du glucose-6-phosphate déshydrogénase hépatique. Augmentation du poids hépatique relative et celui des adrénales non associée à des modifications histopathologiques.	Gaunt et al. (1965) (WHO, 1976)

Rat; dose groupe: 8 NS; contrôle: NS	a) 0, 0.02 ou 0.2% + 19.9% b) 0, 0.02 ou 0.2% + 16.6% matière grasse) c) 0, 0.02 ou 0.2% + 9.6% (matière grasse)	a) 8 semaines + b) 4 semaines + c) 7 semaines	>0.02%: réduction du contenu hépatique en nitrogène. Recouvrement des protéines hépatiques après jeun (Pas de données disponibles). augmentation du poids de la glande adréna le et de son contenu en acide ascorbique. augmentation du contenu hépatique en lipides.	Sporn et Schobesch (1961) (WHO, 1976)
Rat ; dose groupe: 20m/f; contrôle: NS	1%	10 semaines	Recouvrement du poids relatif du foie et de l'apparence des cellules hépatiques quelques semaines après retour à une diète normale.	Goater et al. (1964) (WHO, 1976)
Rat ; dose groupe: 20m/f; contrôle: NS	0, 0.01%, 0.03%, 0.1% ou 0.3%	10 semaines	Absence d'effet sur le poids corporel et sur le taux de cholestérol sanguin. ≥0.3%: réduction du poids corporel (m).	Frawly et al. (1965) (WHO, 1976)
Rats; dose groupe: 5 m/f; contrôle: NS	0, 3100, 6200, 12500, 50000 mg/kg d'aliment	7 semaines	12500 mg/kg: augmentation légère de l'hématopoïèse. ≥25000mg/kg: réduction du poids corporel. ≥50000mg/kg: mortalité à 100%.	Anonymes (WHO, 1976)
Chiens; dose groupe: 4 NS; contrôle: NS	a) 1.4-4.7g/kg p.c. b) 0.17-0.94 g/kg p.c.	a) 4 semaines b) 12 mois	a) diarrhée b) absence de signes d'intoxications et de modification histopathologiques.	Deichman et al. (1955) (WHO, 1976)
Singes; dose groupe: 3 NS; contrôle: NS	0, 50, 500 mg/kg p.c.	4 semaines	Absence d'effets sur les paramètres sanguines et urinaires, l'histologie des organes et les taux de l'ADN, l'ARN et le cytochrome P450 hépatique. Hépatocytomégalie, élargissement du nucléus des cellules hépatiques, prolifération du réticulum endoplasmique des hépatocytes. Réduction de l'activité de la glucose-6-phosphatase. Augmentation de l'activité de la nitroaniso le deméthylase.	Allen et Engblom (1972) (WHO, 2000)

m= mâle; f=femelle
NS= non spécifié

Tableau H: Toxicité du BHT après exposition orale à long terme.

Espèce; Nombre d'animaux par dose	Traitement	Durée	Résultats	Références
BHT				
Souris; dose groupe: 60 m; contrôle: NS	0, 0.25 et 0.5%	22mois	Réduction de la durée de vie des animaux.	Harman (1968) (WHO, 1976)
Souris; dose groupe: 18 m; contrôle: NS	0.75%	12 mois	Hyperplasie des conduits biliaires.	Clapp et al. (1973) (WHO, 2000)
Souris; dose groupe: 11 NS; contrôle: NS	0.75%	16 mois	Augmentation de l'incidence des tumeurs pulmonaires.	Clapp et al. (1973) (WHO, 2000)
Souris; dose groupe: 24 m/f; contrôle: NS	1000, 2500 et 5000 mg/kg d'aliment	100 semaines	Pas de réduction de la survie des animaux; pas de différence significatif dans l'incidence des tumeurs malignes. Cytomégalie centrolobulaire. Augmentation de l'incidence des tumeurs ovariennes bénignes.	Brooks et al.(1976) (WHO, 2000)
Souris; dose groupe: 12 NS; contrôle: NS	0, 3000 et 6000 mg/kg d'aliment	107 semaines	Réduction du poids corporel dose dépendante augmentation de l'incidence de l'hépatocytomégalie et des lésions non néoplasique du foie (m). Pas d'augmentation de l'incidence des adénomes et des carcinomes (m+f). Augmentation de l'incidence des adénomes et carcinomes alvéolaires/bronchiolaires (f à la faible dose). Réduction de l'incidence des adénomes et des carcinomes au niveau de plusieurs organes (f).	NIC (1979) (WHO, 2000)
Souris; dose groupe:100 m/f; contrôle: NS	0, 200, 1000 et 5000 mg/kg d'aliment	96 semaines	Pas d'effet sur: la consommation alimentaire; l'hématologie; l'analyse urinaire et sérique. ≥1000 et 5000 mg/kg réduction du poids corporel (f). ≥5000 mg/kg réduction du poids corporel (m); augmentation du GOT et de GPT sérique (m). Absence de différence significative de l'incidence de: des adénomes des poumons, carcinomes hépatocellulaire du foie et lymphomes malins.	Shirai et al. (1982)
Souris; dose groupe:50 m/f; contrôle: NS	0.2, 0.5, 0.8% +1% matière grasse	24 mois	Réduction dose dépendante du poids corporel (m+f); amélioration dose dépendante de la survie (m+f). Absence de différence significative sur l'incidence de: des adénomes des poumons, carcinomes hépatocellulaire du foie. Réduction dose dépendante des lymphomes malins et des leucémies (m+f).	Inai et al. (1988)

Rat; dose groupe: 15 m/f; contrôle: NS	0.2%, 0.5%, 0.8% + 1% matière grasse	24 mois	Pas d'effet sur: gain de poids corporel; constituant s sanguins; la micropathologies des principaux organes. ≥0.1%: pas d'effet sur le taux de mortalité. ≥0.5%: pas d'effet sur: la reproduction; l'histologie de la rate, des reins, du foie et de la peau; le poids relatif du cœur, de la rate et des reins. ≥0.8%:réduction du gain de poids corporel; augmentation du poids relatif du cerveau, du foie et d'autres organes.	Deichmann et al. (1961) (WHO, 1976)
Rat; dose groupe: 20 m/f; contrôle: NS	0, 0.005%, 0.062% ou 0.32%	3mois-vie totale	Pas d'effets adverses sur: la croissance; consommation alimentaire; poids corporel; taux de mortalité; incidence des tumeurs. ≥0.32%: Augmentation du poids hépatique relative; augmentation du taux de potassium sérique; modifications histopathologiques du foie et des reins.	Hiraga (1978) (WHO, 2000)
Rats; dose groupe: 50m/f; contrôle: 20 m/f	3000 ou 6000 mg/kg d'aliments + 4% graisse	105 semaines	Pas d'effets adverses sur: taux de mortalité; incidence des tumeurs. Réduction dose dépendante du poids corporel (m+f); Augmentation dose dépendante de l'incidence des adénomes et carcinomes alvéolaires (f>m).	NCI (1979) (WHO, 2000)
Rat; dose groupe: 57 m/f; contrôle: 36 m/f	0.25 ou 1%	104 semaines	Pas d'effets adverses sur la consommation alimentaire et sur la morphologie du foie; augmentation du poids relatif et absolu du foie (f); réduction du poids relatif et absolu de la rate (f). Réduction des triglycérides sériques (m); augmentation du γ GT (m) et du cholestérol total sériques (f); Absence de différence significative sur l'incidence: des nodules hyperplasiques au niveau du foie et des carcinomes pancréatiques (f), des adénomes pituitaires et des adénocarcinome (m+f). ≥1%: augmentation de la mortalité; réduction de gain de poids.	Hirose et al. (1981)
Rat; dose groupe: génération 1: 40/40/60 m/f génération 2: 100/ 80/ 80; contrôle: génération 1: 60 m/f génération 2: 100 m/f	génération 1:0, 25, 100, 500 mg/kg p.c. génération 2: 0, 25, 100, 250 mg/kg p.c.	génération 1:13 semaines puis croisement génération 2: 144 semaines	Augmentation de la survie. Réduction du poids corporel. Réduction du poids corporel des petits à la naissance. Absence d'effets sur la consommation alimentaire; sur l'apparence clinique; sur le comportement; sur les paramètres hématologiques; sur la fonction rénale. Réduction des taux de triglycérides sériques (m+f). Augmentation du taux de cholestérol sérique (f). Augmentation statistiquement significative à 141-144 semaines des carcinomes hépatocellulaires (m) et des adénomes hépatocellulaires (m+f). Augmentation non statistiquement significative des lésions néoplasiques au niveau des thyroïdes, du pancréas, ovaires, utérus, glandes mammaires, thymus et système réticuloendoplasmique. Augmentation dose dépendante des lésions non néoplasiques au niveau du foie: prolifération du conduit biliaire et des kystes (m); élargissement cellulaires (f).	Olsen et al. (1986)
Rat ; dose groupe:	a) 300, 1000,	a) 76 semaines	a) Absence d'effet sur la mortalité.	Williams et

21m/f; contrôle: 36 m/f	3000 ou 6000 mg/kg p.c. b) 12000 mg/kg p.c.	b) 110 semaines	b) réduction de la survie après 84 semaines. Absence d'effet sur: l'incidence des carcinomes hépatocellulaires; l'incidence des tumeurs observables dans des organes spécifiques. ≥3000 mg/kg p.c.: réduction du poids corporel =6000 mg/kg p.c.: augmentation du poids relatif et absolu du foie. ≥12000 mg/kg p.c.: réduction du poids absolu du foie; poids relatif hépatique comparable à celui des contrôles; réduction légère l'incidence et la taille des foci hépatocellulaires à la 110 semaines.	al. (1990)
Rat; dose groupe: génération 1: 6 m/ 48 f; contrôle: 6 m/ 48 f; génération 2: 60 m; contrôle: 60 m	génération 1:0, 25, 100, 500 mg/kg p.c. génération 2: 0, 25, 100, 250 mg/kg p.c	génération 1:3 semaines puis croisement génération 2: 22 mois	génération 1: ≥250 mg/kg p.c.: Réduction du poids corporel (m +f). Absence d'effets sur: la consommation alimentaire; le poids corporel; sur l'apparence clinique; les indices de la reproduction. Augmentation du poids relatif et absolu du foie (f). Elargissement des hépatocytes centrolobulaires et éosinophilies, avec une induction de l'activité des oxydases et réduction de l'indice mitotique (f). Réduction du poids corporel des petits à la naissance. génération 2: ≥100 mg/kg p.c.:augmentation du poids relatif hépatique et non pas du poids absolu du foie; Elargissement des hépatocytes centrolobulaires et éosinophilies; avec une induction de l'activité des oxydases; augmentation du contenu et de la distribution hépatocellulaires du cytochrome p-450 2B; induction de l'activité de la γGT dans les hépatocytes périportal (effet moins noté avec le groupe recevant la dose moyenne); absence de relation sur l'incidence d'un type spécifique de foci; absence d'effet sur l'activité de la G6PD; induction de l'activité de l'époxyde hydrolase, glutathione-S-transférase, pentoxyresorufin O-depentylase (PROD). Absence d'évidence d'une hyperplasie du conduit biliaire et d'infiltration inflammatoire cellulaire dans le tractus portal causées par le traitement; pas d'effet sur le taux de glutathione hépatique; hyperactivité thyroïdienne sans altération du taux de thyroxine sérique (secondaire à l'atteinte hépatique); absence d'effets sur les adrénales; ≥250 mg/kg p.c.: augmentation du nombre de rats ayant des nodules hépatiques.	Price (1994)

m= mâle; f=femelle

NS= non spécifié