

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET  
DE L'UNIVERS  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



## Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Option : Qualité des produits et Sécurité Alimentaire

### Thème

---

**Évaluation, *in vitro*, de la toxicité de deux colorants alimentaires  
par le biais du stress oxydant**

---

**Présenté par :**

Chenichene Amel

Halaci Hanane

Zitouni Souad

**Devant le jury composé de :**

**Président (e) : Mme Braik. A**

**M.A.A**

**Université de Guelma**

**Examineur : Dr Souiki. L**

**M.C.A**

**Université de Guelma**

**Encadreur : Mme Boumaza. A**

**M.A.A**

**Université de Guelma**

**Juin 2014**

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET  
DE L'UNIVERS  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



## Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Option : Qualité des produits et Sécurité Alimentaire

### Thème

---

**Évaluation, *in vitro*, de la toxicité de deux colorants alimentaires  
par le biais du stress oxydant**

---

**Présenté par :**

Chenichene Amel

Halaci Hanane

Zitouni Souad

**Devant le jury composé de :**

**Président (e) : Mme Braik. A**

**M.A.A**

**Université de Guelma**

**Examineur : Dr Souiki. L**

**M.C.A**

**Université de Guelma**

**Encadreur : Mme Boumaza. A**

**M.A.A**

**Université de Guelma**

**Juin 2014**

## *Remerciements*

*Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements à ALLAH, le tout puissant, qui nous a données le courage et la volonté d'achever ce travail.*

*Nos sincères remerciements vont à notre encadreur Boumaza A, Maitre assistant A à la faculté des sciences de la nature et de la vie, et sciences de la terre et l'univers, université 08 mai 1945 – Guelma, pour sa patience, ses précieux conseils, sa grande disponibilité pour l'aboutissement de ce travail.*

*Nous remercions vivement Mme Braik A, Maitre assistant A à la faculté des sciences de la nature et de la vie, et sciences de la terre et l'univers, université 08 mai 1945 – Guelma, d'avoir accepté d'assurer la présidence du jury de notre mémoire de master.*

*Nous exprimons nos profonds remerciements à Dr Souikj L, maître de conférences A à la faculté des sciences de la nature et de la vie, et sciences de la terre et l'univers, université 08 mai 1945 – Guelma, pour avoir accepté d'examiner et juger ce modeste travail. Qu'elle trouve ici nos sentiments de gratitude et de déférence.*

*Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont également à l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.*

*Nous remercions nos collègues et nos amies pour les sympathiques moments qu'on a passés Ensemble.*

## *DÉDICACE*

*A mes parents*

*Qui tout au long de mon existence m'ont couvert d'amour et d'affection et pour leur sacrifices et efforts pour faire de moi ce que je suis.*

*A mes sœurs et frères, et à toute la famille*

*A mes Amis(s) :*

*Souad, Hanane, Meriem,*

*Mona, Rima, Loubna,*

*Mounira, Amel*

*A tous ceux*

*Que j'aime*

*AMEL*

## *DÉDICACE*

*Je dédie ce travail à mes parents, qu'ils trouvent ici ma plus profonde gratitude et tout mon amour pour leur soutien tout au long de mes études.*

*A mes sœurs et frères et à toute la famille.*

*A tous mes amies et collègues.*

*A tous ceux qui me sont chers.*

*Hanane*

## DÉDICACE

*Je dédie ce modeste travail à ma très chère mère, source de tendresse et de sécurité, qui m'aime beaucoup et je la remercie pour tous ses sacrifices a fin que je réussis, elle représente ma joie pendant toute ma vie*

*A Mon cher père mon exemple de force, de patience et de défi que j'aime et que je respecte beaucoup.*

*A Mes très chère frères et sœurs :Abdrazzek, Nourddinne, Adel, Youcef, Ramzi , Warda, Besma*

*A tous ceux que j'ai oublié de citer mais Qui existent au fond de mon cœur et de ma pensée*

*Souad*



# SOMMAIRE

*Liste des abréviations*

*Liste des figures*

*Liste des tableaux*

*Introduction* ..... 01

*Revue bibliographique*

## **Les additifs alimentaires dans l'alimentation humaine**

1. Définition.....	03
2. Caractères généraux.....	03
2.1. Intérêt des additifs alimentaires.....	03
3. Origine des additifs alimentaire.....	05
3.1. Les additifs alimentaires naturels.....	05
3.2. Les additifs alimentaires obtenus par modification de produits naturels.....	05
3.3. Les additifs alimentaires de synthèse.....	05
3.3.1. Les additifs alimentaires identiques aux naturels.....	05
3.3.2. Les additifs alimentaires artificiels.....	05
4. Classification des additifs alimentaires.....	06
4.1. Signification du code E.....	06
4.2. Fonction et catégories des additifs alimentaires.....	06
4.2.1. Les additifs maintenant la fraîcheur et prévenant la dégradation des aliments.....	07
4.2.1.1. Conservateurs.....	07
4.2.1.2. Antioxydants.....	07
4.2.1.3. Séquestrant.....	08
4.2.1.4. Gaz d'emballages.....	08
4.2.2. Les additifs affectant les caractéristiques physico-chimiques des aliments.....	08
4.2.2.1. Affermissants.....	08
4.2.2.2. Humectant.....	08
4.2.2.3. Épaississants.....	08
4.2.2.4. Gélifiants.....	09
4.2.2.5. Antiagglomérants.....	09
4.2.2.6. Agent de charges.....	09
4.2.2.7. Stabilisants.....	09
4.2.2.8. Agents moussants et antimoussants.....	09
4.2.2.9. Agent d'enrobage.....	09
4.2.2.10. Correcteur d'acidité.....	10
4.2.2.11. Poudres à lever.....	10
4.2.2.12. Émulsifiant.....	10
4.2.2.13. Amidon modifié.....	10
4.2.2.14. Enzymes alimentaires.....	10
4.2.2.15. Sels de fonte.....	11
4.2.2.16. Agent de traitement de la farine.....	11
4.2.2.17. Gaz propulseurs.....	11
4.2.3. Les additifs amplifiant les qualités sensorielles des aliments.....	11
4.2.3.1. Colorants.....	11

4.2.3.2. Exhausteurs de goût.....	12
4.2.3.3. Édulcorants.....	12
4.2.3.4. Acidifiants.....	12
4.2.3.5. Arômes.....	13

## **Evaluation du risque toxicologique des additifs alimentaires**

1. Les notions de « danger » et de « risque ».....	15
2. Le risque alimentaire.....	15
2.1. Définition et caractéristique.....	15
3. L'analyse du risque alimentaire.....	16
3.1. L'évaluation du risque ou appréciation du risque.....	16
3.2. La gestion du risque.....	17
3.3. La communication relative au risque.....	18
4. L'évaluation du risque alimentaire.....	18
4.1. L'identification du danger.....	18
4.2. Caractérisation du danger.....	18
4.3. Evaluation de l'exposition.....	19
4.4. La caractérisation du risque.....	20
5. Le principe des évaluations.....	20
6. Réglementation des additifs alimentaires.....	21
7. L'exemple des colorants.....	22
7.1. Nature des colorants.....	23
7.2. Les effets des colorants alimentaires sur la santé.....	23
7.2.1. Des effets néfastes.....	23
7.2.2. Des effets bénéfiques.....	24
7.3. Réglementation.....	24
7.4. La relation entre colorants alimentaires (Tartrazine) et stress oxydant.....	28

## **Le stress oxydant, Oxydants et antioxydants**

1. Le stress oxydant.....	31
1.1. Définition.....	31
1.2. Origine du stress oxydant.....	32
2. Les radicaux libres.....	33
2.1. Définition.....	33
2.2. Nature des radicaux libres.....	34
2.2.1. Espèces réactives dérivées de l'oxygène(ERO).....	34
2.2.1.1. Ion superoxyde ( $O_2^{\circ}$ ).....	34
2.2.1.2. Radical libre hydroxyle ( $OH^{\circ}$ ).....	34
2.2.1.3. Oxygène singulet ( $1 O_2$ ).....	34
2.2.1.4. Le radical peroxyde ( $H_2O_2$ ).....	35
2.2.2. Espèces libre non oxygénées.....	35
3. Cibles des radicaux libres.....	36
3.1. L'acide désoxyribonucléique ou ADN.....	36
3.2. Les protéines.....	36
3.3. Les lipides membranaires.....	37
3.4. Les lipoprotéines.....	38
4. Marqueurs biologiques du stress oxydants.....	38
4.1. Marqueurs de l'oxydation des acides nucléiques.....	38

4.2. Marqueurs de la peroxydation lipidique.....	39
4.3. Marqueurs de l'oxydation des protéines.....	40
5. Systèmes de défenses antioxydants.....	40
5.1. Les antioxydants enzymatiques.....	41
5.1.1. Les superoxy des dismutases (SOD).....	41
5.1.2. Catalase.....	42
5.1.3. Peroxydase.....	42
5.2. Antioxydants non enzymatiques.....	43
5.2.1. Glutathion.....	43
5.2.2. Vitamine C.....	43
5.2.3. Vitamine E.....	44
5.2.4. Caroténoïdes.....	44
5.3. Les oligoéléments.....	44
5.3.1. Le sélénium.....	44
5.3.2. Polyphénols.....	45
5.3.3. Le zinc.....	45
5.3.4. Le cuivre.....	45

## ***Partie expérimentale***

### **Matériels et Méthodes**

1. Colorants alimentaires .....	47
2. Prélèvement du sang et préparation de la suspension des globules rouges (SGR).....	47
3. Traitement des érythrocytes.....	47
3.1. Test d'hémolyse.....	47
3.2. Etude de l'effet sur les paramètres du stress oxydant.....	48
4. Dosage des paramètres du stress oxydant.....	48
4.1. Dosage des substances réactives de l'acide thiobarbiturique (TBARS).....	48
4.2. Dosage de l'activité enzymatique du catalase.....	49
4.3. Dosage du glutathion réduit.....	50
5. Analyse statistique .....	51

### **Résultats et Discussion**

1. Test d'hémolyse.....	53
2. Analyse des paramètres du stress oxydant .....	55

<b><i>Conclusion et perspectives</i></b> .....	61
--	----

<b><i>Références bibliographiques</i></b> .....	63
---	----

<b><i>Annexes</i></b> .....	71
-----------------------------	----

<b><i>Résumés</i></b> .....	81
-----------------------------	----

## List des abréviations

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AGPI** : Acides gras poly-insaturés

**ANS** : Agence Nationale de sécurité

**ARfD** : Dose de Référence Aiguë

**ARN** : Acide ribonucléiques

**CAT** : Catalase

**CH<sub>50</sub>** : Concentration Hémolytique 50%

**CEE** : Communauté Economique Européenne

**CIRC** : Centre International de Recherche sur le Cancer

**Cu, Zn-SOD** : Superoxyde dismutase à cuivre et zinc

**DES** : Dose Sans Effet

**DGCCRF** : Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et De la Répression des fraudes

**DJA** : Dose Journalière Acceptable

**DJT** : Dose Journalière Tolérable

**DO** : Densité optique

**EOA** : Espèces oxygénées activées

**ERO** : Espèces réactive oxygène

**FAO**: Food and Agricultural Organization

**Fe-SOD**: Superoxyde dismutase à fer

**GPx** : Glutathion Peroxydase

**GSH** : Glutathion réduit

**GSSG** : Glutathion oxydé

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène

**H<sub>2</sub>O** : Molécule l'eau

**H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>** : l'eau distillée

**HO°** : Radical hydroxyle

**HOCl** : Oxydants chlorés

**H<sup>+</sup>** : Proton d'Hydrogène

**JECFA** : Joint Expert Committee for Food Additives

**LDL** : Lipoprotéines en basse densité

**Log** : Logarithme népérien

**M** : Molaire

**MDA** : Malonyl di aldéhyde

**Mg** : Milligramme

**Min** : Minute

**ML** : Millilitre

**Mn-SOD** : Superoxyde dismutase à manganèse

**NADH** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit

**NADPH** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide phosphate

**Nm** : Nanomètre

**NO** : Monoxyde d'azote

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**OH°** : Radical libre hydroxyle

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** : Ion superoxyde

**OH°** : Radical libre hydroxyle

**1 O<sub>2</sub><sup>°</sup>** : Oxygène singulet

**ONOOH** : Nitroperoxyde

**ONOO<sup>-</sup>** : Peroxynitrite

**RL** : Radicaux Libres

**ROOH** : Hydroperoxydes lipidiques

**RO°** : Radical alkoxyde

**ROO°** : Radical peroxyde

**SOD** : Superoxyde dismutase

**SGR** : Suspension des globules rouges

**TBA** : Acide Thio barbiturique

**TBARS** : Thiobarbituric acid réactive substances

**TCA** : Acide trichloroacétique

**T- p. m** : Tour par minute.

**PL** : phospholipide

**UV** : Ultra -Violet

## Liste des figures

<b>Figures</b>	<b>Titres</b>	<b>Pages</b>
Fig. 01	Catégories d'additifs alimentaires selon leurs fonctions	04
Fig. 02	Processus d'analyse du risque	16
Fig. 03	Processus de gestion de risque	17
Fig. 04	Stress oxydant	32
Fig. 05	Les différentes origines du stress oxydatif	32
Fig. 06	Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie	35
Fig. 07	Lésion de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules	36
Fig. 08	Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés après attaque radicalaire	37
Fig. 09	Principales étapes de la peroxydation des lipides	38
Fig. 10	Mécanisme d'action de la vitamine C	40
Fig. 11	Structure de l' $\alpha$ -Tocophérol	40
Fig. 12	Evolution de l'hémolyse en fonction de la concentration du colorant A	54
Fig. 13	Evolution de l'hémolyse en fonction de la concentration du colorant B	54
Fig. 14	Effet des colorants A et B sur les TBARS (MDA)	55
Fig. 15	Effet des colorants A sur l'activité enzymatique du catalase	56
Fig. 16	Effet des colorants B sur l'activité enzymatique du catalase	57
Fig. 17	Effet des colorants A et B sur GSH	58

## Liste des tableaux

<b>Tableaux</b>	<b>Titres</b>	<b>Pages</b>
Tab.01	Méthodes d'évaluation de l'exposition.	19
Tab.02	Nature des colorants	23
Tab.03	Regroupement les cartes d'identités des 29 principaux colorants utilisés à l'heure actuelle.	25
Tab.04	Les principales sources des ERO	33
Tab.05	Les antioxydants enzymatiques et leurs caractéristiques	41
Tab.06	Effet hémolytique du colorant A sur la suspension des GR	53
Tab.07	Effet hémolytique du colorant B sur la suspension des GR	53

# *INTRODUCTION*

## Introduction

Les additifs alimentaires sont des substances ajoutées volontairement aux denrées alimentaires pour remplir certaines fonctions technologiques, telles que la coloration, la conservation et l'amélioration des qualités organoleptiques

La couleur est l'une des qualités premières d'un aliment qui donnera envie de le manger, elle est associée aussi bien à une saveur spécifique qu'à l'intensité de cette saveur. Les colorants sont employés comme additif alimentaire pour ajouter ou rétablir la coloration d'un aliment et augmenter dès lors son attrait visuel pour le consommateur

Bien que certains colorants possèdent des propriétés bénéfiques pour la santé et qui sont très souvent méconnues, les effets toxiques des colorants sont divers, très controversés et à ne pas négliger: intolérance, hyperactivité, cancérogenèse... etc. Les recherches sont en cours pour déterminer si les colorants sont si dangereux qu'on peut le croire, et pour le moment, aucune conclusion sérieuse ne peut être formulée. Certaines études réalisées *in vivo* sur des animaux de laboratoire ont mentionné l'association entre la toxicité des colorants alimentaires et le stress oxydant qui semble être impliqué dans différentes affections et pathologies.

Pour les raisons citées ci-dessus, nous nous sommes intéressées à l'étude de la toxicité de certains colorants et leurs effets sur quelques paramètres du stress oxydant en utilisant les érythrocytes comme modèle expérimental *in vitro* et en adoptant le plan de travail suivant :

- Revue bibliographique présentant quelques connaissances requises sur les additifs alimentaires, l'évaluation du risque toxique des additifs alimentaires et le stress oxydant.
- Une étude expérimentale portant sur deux tests évaluant l'effet toxique des colorants choisis et leurs implications dans la genèse d'un stress oxydant au niveau des érythrocytes humains

*REVUE BIBLIOGRAPHIQUE*

*LES ADDITIFS  
ALIMENTAIRES DANS  
L'ALIMENTATION  
HUMAINE*

## Les additifs alimentaires dans l'alimentation humaine

### 1. Définition

Un additif alimentaire est défini comme toute substance qui n'est pas habituellement consommée en tant que denrée alimentaire en soi et non utilisée comme ingrédient caractéristique de l'aliment, 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, du traitement, du conditionnement, de l'emballage, du transport ou du stockage de la dite denrée, entraîne ou peut entraîner (directement ou indirectement) son incorporation ou celle de ses dérivés dans la denrée ou peut affecter d'une autre façon les caractéristiques de la dite denrée. L'expression ne s'applique ni aux contaminants, ni aux substances ajoutées aux denrées alimentaires dans le but d'en maintenir ou améliorer les propriétés nutritives, ou au chlorure de sodium. Quand un additif alimentaire est autorisé au niveau européen, celui-ci bénéficie d'un code qui se compose de la lettre "E" suivie d'un numéro permettant d'identifier la catégorie [CODEX STAN 107-1981].

### 2. Caractères généraux

Le terme «aliment» désigne toute matière qui, par la voie de l'ingestion, sert à l'entretien et au désigne toute matière qui, par la voie de l'ingestion, sert à l'entretien et au développement de l'organisme. Il s'agit le plus souvent de produit naturels, de composition complexe [Alais *et al.*, 2008].

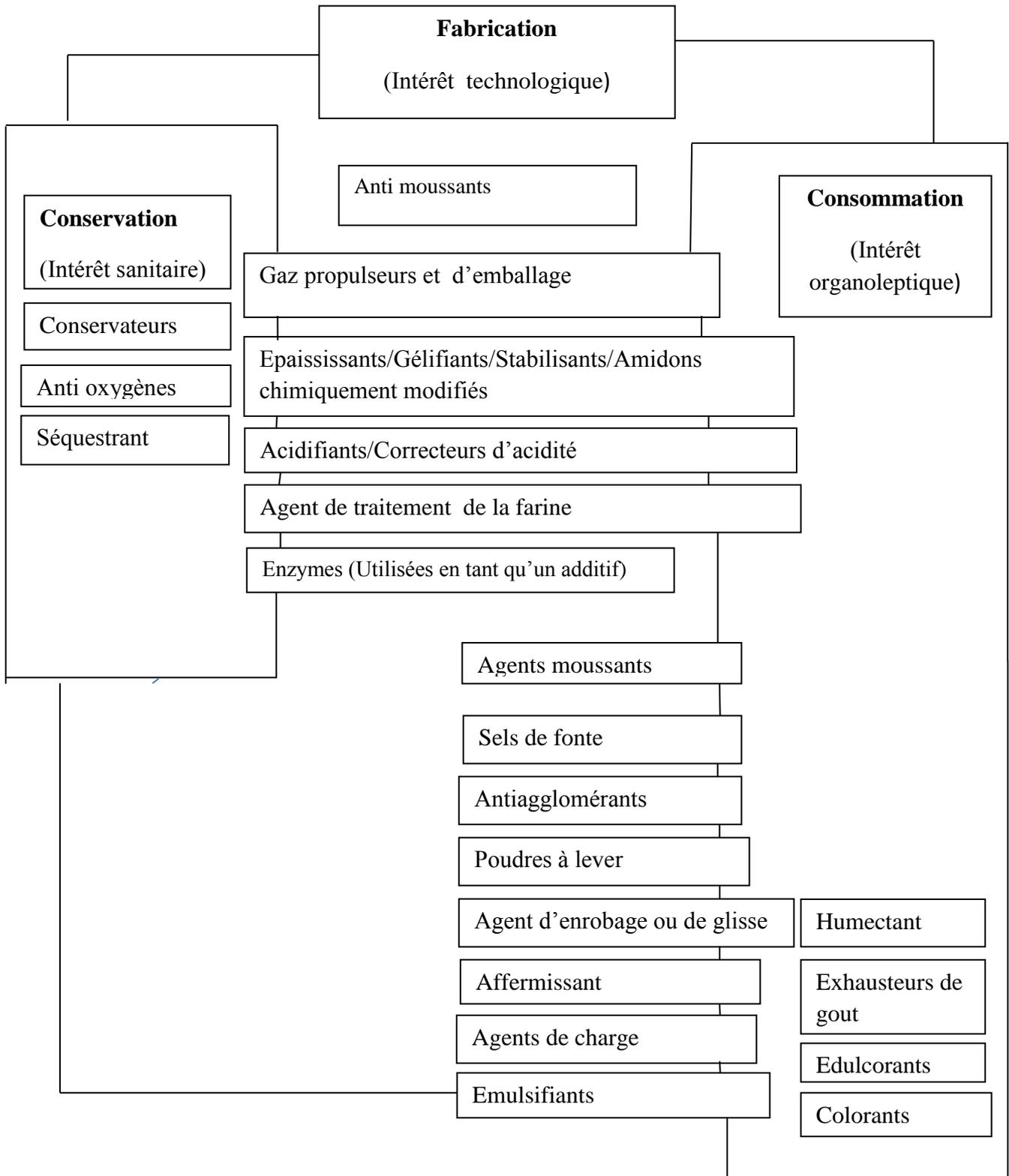
Le terme «additif» fait sur toute référence à un usage particulièrement à faible dose. De plus, l'additif a le plus souvent une formule moléculaire simple, tandis que l'ingrédient ou aliment est un ensemble organique complexe [Himoura *et al.*, 2010].

#### 2.1. Intérêt des additifs alimentaires

Les additifs alimentaires visent à :

- Faciliter les procédés de fabrication : rôle technologique.
- Assurer la conservation des produits en les protégeant d'un certain nombre d'altérations (rancissement, rassisement...) : rôle hygiénique ou sanitaire
- Maintenir ou améliorer les qualités sensorielles des ingrédients et des aliments (consistance, texture, couleur ou goût) : rôle organoleptique [1].

- Préserver, équilibrer, additionner ou substituer : rôle nutritionnel [2].



**Figure 01** : Catégories des additifs alimentaires selon leurs fonctions [Béatrice de Reynal-Jean., Louis Mulon., 2009]

### **3. Origine des additifs alimentaire**

Les additifs alimentaires ont des origines variées. On distingue : Les additifs naturels, les additifs provenant de la modification chimique des produits naturels, les additifs identiques aux naturels et les additifs artificiels. Ces deux derniers sont des additifs de synthèse [3].

#### **3.1. Les additifs alimentaires naturels**

Ce sont des extraits de substances végétales ou animales existantes dans la nature (par exemple, les extraits d'arbres, d'algues, de graines, de fruits, de légumes, etc.). On peut ainsi citer l'exemple de Curcumine (E100), un colorant naturel de couleur jaune-orange extrait de racines de *Curcuma longa* et utilisé pour la coloration de plusieurs aliments comme les glaces, les yaourts et les produits de la confiserie.

#### **3.2. Les additifs alimentaires obtenus par modification de produits naturels**

Ce sont des additifs obtenus par modification chimique d'un extrait naturel d'une substance végétale ou animale dans le but d'améliorer ses propriétés. C'est le cas, par exemple, des émulsifiants produits à partir des huiles végétales, des édulcorants issus des fruits et des acides organiques dérivés d'huiles comestibles [4].

#### **3.3. Les additifs alimentaires de synthèse**

Lorsque l'extraction des substances naturelles est coûteuse, ces dernières peuvent être reconstituées par synthèse chimique. Les additifs ainsi fabriqués sont identiques aux substances naturelles. La synthèse chimique peut également être utilisée pour la fabrication des additifs totalement artificiels [3].

##### **3.3.1. Les additifs alimentaires identiques aux naturels**

Ce sont des substances utilisées pour substituer les additifs alimentaires naturels, mais elles sont obtenues par synthèse chimique. C'est le cas, par exemple, de l'acide ascorbique (vitamine C) et de l'acide citrique qui est utilisé comme acidifiant.

##### **3.3.2. Les additifs alimentaires artificiels**

Ce sont les additifs qui n'ont aucun homologue dans la nature. Ils sont entièrement artificiels, obtenus par synthèse chimique. C'est le cas par exemple de certains anti-oxygènes, colorant ou édulcorants à l'instar de la saccharine. C'est ce groupe d'additifs qui pose plus de soucis quant à la santé du consommateur [4].

## 4. Classification des additifs alimentaires

### 4.1. Signification du code E

Les additifs sont déclarés sur l'étiquetage, parmi les autres ingrédients du produit. La déclaration des ingrédients se fait dans un ordre quantitatif décroissant. Les additifs doivent être indiqués sous le nom de leur catégorie (par exemple: émulsifiant) suivi de leur nom spécifique (lécithines) ou suivi de la lettre E et d'un numéro (E322).

Un code à trois chiffres a été utilisé à l'origine. Le premier chiffre indique la classe de l'additif (conservateur : E 2xx). Le suivant indique le type de composé utilisé (famille de l'acide benzoïque : E21x). Le troisième correspond à la forme chimique de ce composé (benzoate de sodium : E211). De nombreuses modifications ultérieures ont fait que certains additifs peuvent avoir d'avantage de chiffres ou un chiffre incohérent avec la classe à laquelle ils appartiennent.

- Les colorants E1xx.
- Les conservateurs E2xx.
- Les antioxydants E3xx.
- Les agents de texture (émulsifiant, épaississant et gélifiant, stabilisant) ont le code (E3xx ou E4xx).
- Les acidifiants et correcteurs d'acidité E5xx.
- Les exhausteurs de goût E6xx.
- Les édulcorants E9xx, les amidons modifiés E14xx etc. [Béraud *et al.*, 2008].

La lettre «E» Est utilisée pour Europe ou «edible » «consommable» en anglais et le chiffre pour désigner un additif spécifique. Dans les pays extra-européens, les additifs sont toute fois déclarés uniquement par un numéro et sans la lettre «E» [Himoura *et al.*, 2010].

### 4.2. Fonction et catégories des additifs alimentaires

Les additifs sont habituellement classés selon leurs catégories, en fonction de la fonction assurée dans l'aliment (Figure 01) [2]. On décrit : (i) les additifs qui maintiennent la fraîcheur et préviennent la dégradation de l'aliment (*conservateurs, anti-oxygènes, séquestrants et gaz d'emballages*) ; ii) les additifs qui affectent les caractéristiques physiques ou physico-chimiques de l'aliment (*affermissants,*

*humectants, épaississants, gélifiants, antiagglomérants, agent de charge, stabilisants, agents moussants et anti-moussants, agent d'enrobage, correcteurs d'acidité, poudre à lever, émulsifiants, amidon modifié , enzymes alimentaires, sels de fonte, agent de traitement de la farine ) ; iii) les additifs qui amplifient ou améliorent les qualités sensorielles (colorants, exhausteurs de goût, édulcorant ,acidifiants et aromes ) [Gallen et al., 2013].*

#### **4.2.1. Les additifs maintenant la fraîcheur et prévenant la dégradation des aliments**

Ce groupe des additifs est constitué de 4 catégories dont les principaux sont : les conservateurs et les antioxygènes. Les autres sont les séquestrants et les gaz d'emballage.

##### **4.2.1.1. Conservateurs**

Un additif conservateur est défini comme étant une substance non consommée normalement en tant que denrée alimentaire, que l'on incorpore à un aliment en vue d'accroître sa sécurité et sa stabilité microbiologique. Il faut signaler que le terme additif ne s'applique qu'à des substances utilisées à dose faibles, en principe moins de 1% [Bourgeois., 1992].

Il existe deux types de conservateurs, minéraux et organiques. Parmi les agents conservateurs minéraux figurent les chlorures et les phosphates, les nitrates, les nitrites, et les sulfites, et les bicarbonates et le peroxyde d'hydrogène. Les agents conservateurs organiques (acides organiques) ont un effet conservateur primaire (acide acétique, benzoïque, etc.) et un effet secondaire (acide citrique, lactique, ascorbique, etc.) [Oudiot., 1992].

##### **4.2.1.2. Antioxydants**

Les antioxydants ou antioxygènes empêchent l'oxydation des aliments et toutes les modifications organiques qui découlent de cette oxydation (rancissement des graisses, brunissement des fruits et légumes frais) [Gallen et al., 2013]. On les utilise en industrie alimentaire, en industrie pharmaceutique et en cosmétologie. Certains antioxydants sont liposolubles: tocophérols (E 306 à E 309), acide (E 320), butylhydroxytoluène (E 321), a galates (E 310 à E 312). D'autres sont hydrosolubles

pour les fruits : acide ascorbique (E 300 à E 304), acide érythorbique (E 315 à E 316) [Bourrier., 2005].

#### 4.2.1.3. Séquestrants

Ce sont les substances qui forment des complexes chimiques avec les ions métalliques. Ils protègent les aliments contre les réactions d'oxydation initiées par la présence des métaux. L'acide citrique (E330) est un exemple des séquestrants; utilisé dans plusieurs produits comme les jus et les nectars de fruits. Il est aussi un anti-oxygène et un régulateur de l'acidité [4].

#### 4.2.1.4. Gaz d'emballages

Ce sont les gaz autres que l'air, placés dans un contenant avant, pendant ou après l'introduction d'une denrée alimentaire. Ils protègent les aliments contre les altérations dues à la présence de l'oxygène ou de l'air. Le dioxyde de carbone (E290) et l'azote (E941) sont les gaz de conditionnement les plus utilisés [4].

### 4.2.2. Les additifs affectant les caractéristiques physico-chimiques des aliments

Dans ce groupe, on distingue les catégories suivantes :

#### 4.2.2.1. Affermissants

Sont les substances qui permettent de rendre ou de garder les tissus des fruits et des légumes fermes ou croquants, ou qui, en interaction avec des gélifiants, forment ou raffermissent un gel [Anonyme., 2008].

#### 4.2.2.2. Humectants

Sont des substances qui empêchent le dessèchement des denrées alimentaires en compensant les effets d'une faible humidité atmosphérique ou qui favorisent la dissolution d'une poudre en milieu aqueux [Anonyme., 2008].

#### 4.2.2.3. Épaississants

Ce sont des substances utilisées pour produire des solutions visqueuses ou dispersions, pour donner corps, améliorer la cohérence ou de stabiliser des émulsions, notamment en suspension et épaississants, des agents de réglage, des agents gélifiants, agents gonflants, etc. Gencives sont la principale catégorie d'épaississants. Exemple: soja hémicellulose (E426) [Gultekin *et al.*, 2012].

#### 4.2.2.4. Gélifiants

Ce sont les substances qui, ajoutées à une denrée alimentaire, lui confèrent de la consistance par la formation d'un gel [**Directive européenne 89/107/CEE**]. L'alginate de sodium (E401), l'alginate de calcium (E404) et l'agar-agar (E406) sont des exemples de gélifiants [3].

#### 4.2.2.5. Antiagglomérants

Ce sont les substances qui modifient ou limitent l'acidité ou l'alcalinité d'une denrée alimentaire [3].

#### 4.2.2.6. Agent de charges

Ce sont des substances qui accroissent le volume d'une denrée alimentaire sans contribuer significative sa valeur énergétique disponible [**Michael J G et al., 2010**].

#### 4.2.2.7. Stabilisants

Ce sont des substances qui, ajoutées à une denrée alimentaire, permettent de maintenir son état physico-chimique. Les stabilisants comprennent les substances qui permettent de maintenir la dispersion homogène de deux ou plusieurs substances non miscibles, ainsi que les substances qui stabilisent, conservent ou intensifient la couleur d'une denrée alimentaire [**Anonyme., 2008**].

#### 4.2.2.8. Agents moussants et antimoussants

- **Agents moussants**

Additif alimentaire qui permet de former ou de maintenir une dispersion uniforme d'une phase gazeuse dans un aliment solide ou liquide [5].

- **Antimoussants**

Ce sont les substances qui empêchent ou limitent la formation de la mousse. Le diméthylpolysiloxane (E900) utilisé dans plusieurs produits comme les confitures, gelés et marmelades à base de fruits, est un exemple d'anti-moussant [3].

#### 4.2.2.9. Agent d'enrobage

Agents d'enrobage, ou agents de polissage, sont des additifs alimentaires qui fournissent aspect brillant ou revêtement protecteur pour les aliments. Généralement, ils sont à base de cires. Exemples : Shellac (E904), cire de carnauba (E903) et de cire d'abeille [blanc et jaune (E901)] [**Gultekin et al., 2012**].

#### 4.2.2.10. Correcteur d'acidité

Ce sont des Substances qui modifient ou limitent l'acidité ou l'alcalinité d'une denrée alimentaire. L'hydroxyde de sodium (E524) est un exemple de correcteurs d'acidité [Aoufi., 2009].

#### 4.2.2.11. Poudres à lever

Ce sont les substances ou combinaisons de substances qui libèrent des gaz et de ce fait accroissent le volume d'une pâte. Le carbonate de sodium (E500) est un exemple d'agents de levuration [14].

#### 4.2.2.12. Émulsifiant

Ce sont les esters d'acide gras (citrique, acétique, lactique ou tartrique), les esters de sorbitane et des sucro-esters, et les lécithines (E322) présentes dans le jaune d'œufs et le soja. Ils permettent de stabiliser les sauces, on les retrouve dans le pain, le chocolat, les crèmes glacées, margarine et viande transformée. Leur implication en allergologie est mineure face à l'étendue de leur utilisation et leur toxicité peut induire troubles digestifs et inconfort [Gallen *et al.*, 2013].

#### 4.2.2.13. Amidon modifié

Ce sont les substances obtenues au moyen d'un ou plusieurs traitements chimiques d'amidons alimentaires, qui peuvent avoir été soumis à un traitement physique ou enzymatique, et peuvent être fluidifiés par traitement acide ou alcalin ou blanchis [3].

#### 4.2.2.14. Enzymes alimentaires

Il sont des produits obtenus à partir de plantes, d'animaux ou de micro-organismes ou de produits dérivés, y compris des produits obtenus par un procédé de fermentation à l'aide de micro-organismes qui contiennent une ou plusieurs enzymes capables de catalyser une réaction biochimique spécifique et qui sont ajoutés à des denrées alimentaires à des fins technologiques à toute étape de leur fabrication. Parmi les enzymes qui exercent une fonction technologique dans les denrées alimentaires : l'invertase (E1103), lysozyme (E1105) [6].

#### 4.2.2.15. Sels de fonte

Ce sont des substances qui dispersent les protéines contenues dans le fromage, entraînant ainsi une répartition homogène des matières grasses et des autres composants [Aoufi., 2009]. Le Mono phosphate de potassium E340 est un exemple de sel de font [15].

#### 4.2.2.16. Agent de traitement de la farine

Ce sont des substances qui, ajoutées à la farine ou à la pâte, améliorent sa qualité boulangère [Béatrice de Reynal-Jean *et al.*, 2009]. La série des stéarates polyoxyéthyléniques de sorbate (E432 – 436) sont par exemple des agents de traitement de la farine utilisés dans les produits de la boulangerie fine. Ces additifs sont aussi utilisés comme antimoussants, émulsifiants, agents moussants et stabilisants [4].

#### 4.2.2.17. Gaz propulseurs

Ce sont les gaz autres que l'air qui ont pour effet d'expulser une denrée alimentaire d'un contenant. Les gaz propulseurs autorisés pour les produits alimentaires sont l'argon (E938), l'hélium (E939), l'azote (E941), le peroxyde d'azote (E942) et l'oxygène (E948) [3].

### 4.2.3. Les additifs amplifiant les qualités sensorielles des aliments

Ce groupe regroupe les catégories qui affectent les qualités sensoriels des aliments, notamment le goût et/ la couleur. On distingue dans ce groupe, les catégories suivantes :

#### 4.2.3.1. Colorants

Ce sont des substances qui ajoutent ou redonnent de la couleur à des denrées alimentaires, il peut s'agir de constituants naturels de denrées alimentaires ou d'autres substances naturelles qui ne sont pas normalement consommés comme aliments en soi et qui ne sont pas habituellement utilisés comme ingrédients caractéristiques dans l'alimentation. Sont des colorants au sens du présent règlement les préparations obtenues à partir de denrées alimentaires et d'autres matières de base naturelles alimentaires par extraction physique et/ou chimique conduisant à une extraction sélective des pigments par rapport aux constituants nutritifs ou aromatiques [Kehal., 2013].

#### 4.2.3.2. Exhausteurs de goût

Les exhausteurs de goût sont des substances organiques qui, sans avoir une saveur propre prononcée, renforcent le goût ou l'odeur d'une denrée alimentaire. Sous le code E 620, le glutamate (acide glutamique) et ses sels (E621 à E 625) sont utilisés comme exhausteurs de goût et reconnus par le Codex Alimentarius. Issu de la fermentation de substrats d'origine naturelle (mélasses, hydrolysats d'amidon), l'acide glutamique se présente sous la forme de cristaux purs de couleur blanche prêts pour l'utilisation. Il est à noter que certains aliments sont naturellement riches en glutamate : tomate (140 mg), viande de bœufs (33 mg), parmesan (1200 mg) et champignons (140 mg) notamment, avec une prise quotidienne « naturelle » d'environ 1 g et une prise additionnelle de 0,3 à 1 g/j sous forme d'additif [31].

Les divers glutamates sont les suivants : E620 (acide glutamique), E621 (glutamate monosodique), E622 (glutamate monopotassique), E623 (diglutamate de calcium), E624 (glutamate d'ammonium), et E625 (diglutamate de magnésium) [Gallen *et al.*, 2013].

#### 4.2.3.3. Édulcorants

Ils donnent une saveur sucrée, sans favoriser les caries. Ce sont les polyols, sucres naturels ayant subi une transformation à partir d'amidon, de sirop de glucose ou de cellulose : sorbitol (E 420), mannitol (E 421), isomalt (E 953), maltitol (E 965), lactitol (E 966). Les édulcorants intenses ont une saveur sucrée 300 fois plus forte que celle du saccharose : aspartame (E 951), saccharine (E 954). Le mannitol (E 421), extrait de mannanes, est un sucre isomère du sorbitol (E 420) très utilisé comme additif alimentaire et médicamenteux [Hedge *et al.*, 2002].

#### 4.2.3.4. Acidifiants

Ce sont les substances qui augmentent l'acidité d'une denrée alimentaire et/ou lui donnent un goût acide. Ils peuvent aussi être classés dans le groupe des « additifs qui maintiennent la fraîcheur et préviennent la dégradation des aliments » puisqu'ils contribuent à la conservation des aliments par diminution du pH. Pour la même raison, ils peuvent aussi être classés dans le groupe des « additifs qui affectent les caractéristiques physico-chimiques des aliments ». L'acide acétique et ses dérivés (E260 – 263) sont des acidifiants largement utilisés dans les fruits et légumes en conserve [3].

#### **4.2.3.5. Arômes**

Ils sont ajoutés aux aliments pour donner une odeur et/ou un goût, exception faite des goûts acides, salés ou sucrés. Ce sont des arômes naturels ou des arômes de synthèse répartis en six catégories. Leur identification est rarement précisée par le fabricant, tant sur le produit fini qu'après demande médicale en cas de réaction adverse suspectée [25]. Ils sont de plus en plus utilisés dans les aliments et les médicaments, particulièrement chez l'enfant exemple : Vanille et vanilline) [Bourrier., 2005].

*ÉVALUATION DU RISQUE  
TOXICOLOGIQUE DES  
ADDITIFS ALIMENTAIRES*

## Evaluation du risque toxicologique des additifs alimentaires

### 1. Les notions de « danger » et de « risque »

Il est important de distinguer les termes « danger » et « risque » :

- ❖ **Danger** : un agent physique, biologique ou une substance qui a le potentiel de causer un effet néfaste avéré sur la santé.
- ❖ **Risque** : la probabilité d'un préjudice. Le degré de risque repose à la fois sur la probabilité et la gravité du résultat (type de préjudice, nombre de personnes touchées, etc.). Le « risque » est lié à l'exposition au danger, c'est-à-dire à la consommation de la denrée contaminée (quantité et fréquence de consommation) [7].

### 2. Le risque alimentaire

#### 2.1. Définition et caractéristiques

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 intoxications alimentaires et des allergies, ou diffère 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 telle 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 quantifiable, du fait même que nous exigeons qu'il soit nul [Himoura *et al.*, 2010].

### 3. 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 prévisions, 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 destinée 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, etc.).

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. (Figure 02) [Soubra., 2008].

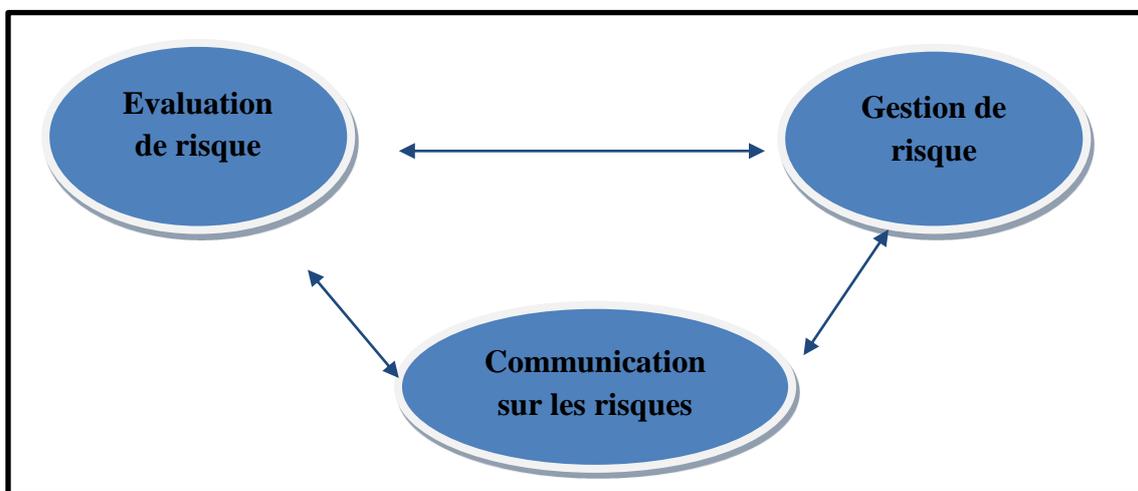


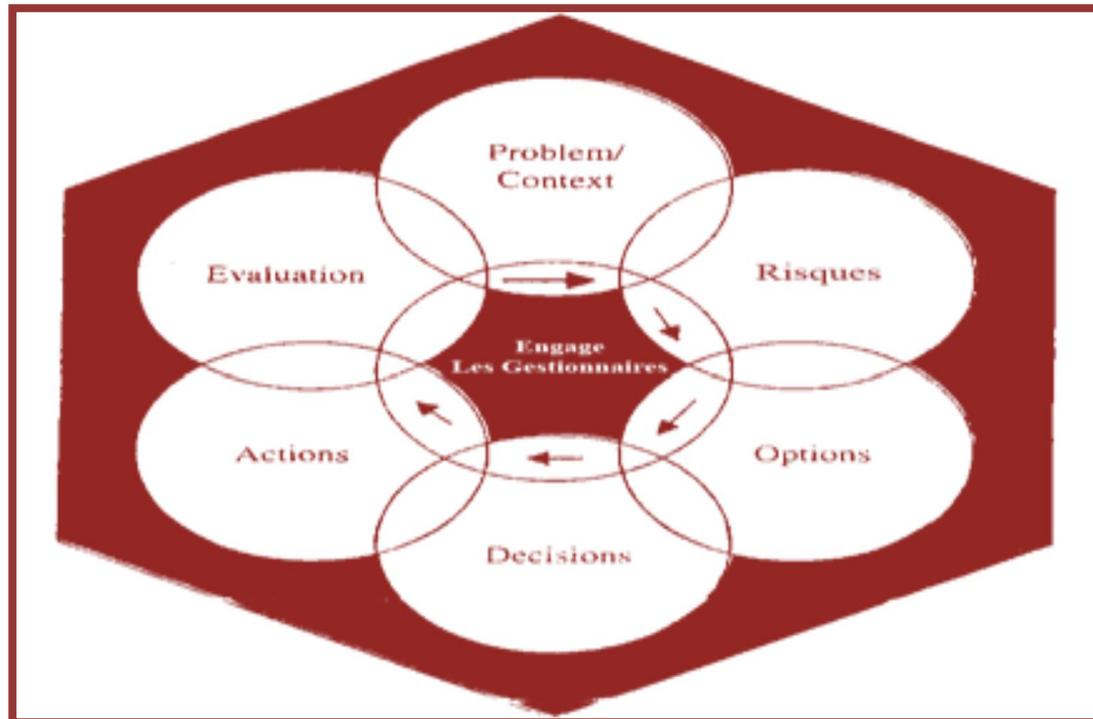
Figure 02 : Processus d'analyse du risque [Soubra., 2008].

#### 3.1. 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.

### 3.2. La gestion du risque

La gestion du risque est le processus, distinct de l'évaluation du risque, d'identification, des élections et de mise en œuvre de mesures permettant de réduire le risque (Figure 03). 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 appropriée. Les mesures de gestion de risque alimentaire relèvent en premier lieu de l'application des 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) [Soubra, 2008].



**Figure: 03** Processus de gestion de risque [Soubra., 2008].

### 3.3. 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.

## 4. L'évaluation du risque alimentaire

L'évaluation du risque comprend quatre étapes allant de la détection au laboratoire d'effets potentiellement toxiques jusqu'à la caractérisation du risque pour le consommateur.

### 4.1. L'identification du danger

C'est la 1<sup>ère</sup> 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) [Cassée *et al.*, 1998].

### 4.2. Caractérisation du danger

Elle permet d'identifier les doses induisant les effets toxiques et surtout les doses sans effet toxique, à partir d'études toxicologiques :

- Étude de toxicité subchronique par voie orale d'une durée de 1/10<sup>ème</sup> de la durée de vie de l'animal, soit 90 jours chez les rongeurs.
- Étude de toxicité chronique par voie orale sur la durée de vie entière de l'animal.
- Étude de cancérogénèse in vitro (génotoxicité) et in vivo.
- Études sur la reproduction, la gestation et la lactation.

Ces études doivent être menées sur un nombre suffisant d'animaux des deux sexes, au poids et à l'origine connus et homogènes. Elles doivent être réalisées sur au moins deux espèces de mammifères, a priori des rongeurs. Ces différentes études obligatoires devraient permettre de mettre en évidence un effet toxique sur tous les organes, un éventuel effet

cancérigène, un risque de malformation des fœtus descendants (vérifié sur deux générations) ou une diminution des possibilités de reproduction.

Il n'existe pas à ce jour des méthodes fiables permettant de mettre en évidence un risque d'allergie par voie orale (ou alimentaire) chez les animaux dont les résultats soient transposables à l'homme. Or, à ce jour, les études toxicologiques chez l'homme ne sont pas autorisées pour des raisons éthiques sauf dans des cas exceptionnels, pour certaines molécules introduites intentionnellement dans l'aliment comme les édulcorants (qui présentent un intérêt chez certaines catégories de patients comme les diabétiques) [8].

### 4.3. 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.

Il existe plusieurs méthodes (Tableau 01) permettant l'évaluation de l'exposition [Kroes *et al.*, 2002].

**Tableau 01 : Méthodes d'évaluation de l'exposition. [Soubra., 2008]**

Méthodes	Application	Description
<b>Estimation “per capita”</b>	Composés synthétiques	Estimation basée sur la production annuelle totale du composé chimique en question divisée par le nombre total de la population exposée
<b>Budget</b>	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”.
<b>Estimation de l'usage</b>	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.

<b>Etude de l'alimentation Totale</b>	Additifs Approuvés et Contaminants	Estimation basée sur l'identification des aliments représentatifs 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.
<b>Etude de l'alimentation Dupliquée</b>	Contaminants	Estimation basée sur le prélèvement directe d'aliments et sur la détermination de leur contamination par analyse directe.
<b>Modèle alimentaire</b>	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.
<b>Bio marqueurs</b>	Contaminants	Estimation basée sur le dosage directe des bio-marqueurs (molécules dérivées de la biodégradation des contaminants) dans les liquides biologiques des volontaires.

#### 4.4. La caractérisation du risque

La caractérisation des risques consiste en (a) une estimation qualitative et/ou (b) quantitative, comprenant les incertitudes qui en découlent, la probabilité de la survenue d'effets néfastes connus ou potentiels sur la santé d'une population donnée et leur gravité fondée sur la détermination, la caractérisation des dangers (évaluations de la dose-réponse) ainsi que l'évaluation de l'exposition [Zoë *et al.*, 2011]

### 5. Le principe des évaluations

Le principe des évaluations est fondé sur le concept de Dose Journalière Acceptable (DJA), de Dose Journalière Tolérable (DJT) et de Dose de Référence Aiguë (ARfD: Acute Reference Dose).

- ❖ **Dose Journalière Acceptable (DJA)** : est la quantité d'une substance chimique soumise à autorisation qu'un individu peut consommer tous les jours de sa vie sans courir de risque pour sa santé. Elle est déterminée à partir de la Dose Sans Effet (DSE) chez l'animal le plus sensible affectée a priori de deux facteurs de sécurité. Le premier

tient compte de la variabilité interspécifique : il est égal à 10. Le second facteur de sécurité tient compte de la variabilité intra spécifique : il est aussi de 10. La DJA sera donc égale à la DSE divisée par 100. Dans le cas où des malformations seraient observées lors des études de tératogénèse, un facteur de sécurité supplémentaire entre 2 et 10 peut également être ajouté.

- ❖ **Dose Journalière Tolérable (DJT) :** est la quantité d'un contaminant naturel alimentaire qu'un individu doit pouvoir ingérer tous les jours de sa vie sans courir de risque pour sa santé. Comme la DJA, la DJT est exprimée en mg (ou µg ou ng)/kg de poids corporel/ jour. Les contaminants naturels bénéficient rarement de dossier toxicologique complet tel que celui exigé pour une molécule soumise à autorisation. Les évaluateurs disposent d'études menées de façon sporadique, par des chercheurs académiques ou institutionnels. Les études ne couvrent pas toujours tous les effets toxiques potentiels et ne sont pas toujours menées suivant les lignes directrices officielles et les Bonnes Pratiques de Laboratoire. En conséquence, les évaluateurs ne peuvent pas toujours identifier de dose sans effet et doivent utiliser alors la plus petite dose avec effet. Un facteur de sécurité supplémentaire compris entre 2 et 10 peut être ajouté. Dans le cas où seule une dose avec effet est disponible, celle-ci sera affectée également d'un facteur de sécurité supplémentaire égal à 10.
- ❖ **Dose de Référence Aiguë (ARfD) :** est la quantité estimée d'une substance présente dans une denrée alimentaire ou une boisson à laquelle on pourrait être exposé sur une période de 24 heures ou moins sans risque pour la santé du consommateur [9].

## 6. Réglementation des additifs alimentaires

### ○ Au niveau international

Il existe le Comité Conjoint d'Experts sur les Additifs alimentaires (JECFA, Joint FAO/OMS Expert Committee on Food Additive) de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

### ○ En Europe

Les additifs alimentaires sont autorisés pour ses États membres, ainsi que pour la Norvège et l'Islande. L'utilisation des additifs est strictement réglementée selon le principe dit "de listes positives". Autrement dit : ce qui n'est pas expressément autorisé est interdit. Une procédure d'évaluation est établie par le groupe scientifique sur les additifs alimentaires

et les sources de nutriments ajoutés aux aliments (ANS). La demande d'autorisation comprend un dossier technique, technologique, toxicologique et analytique.

La directive 89/107/CEE du Conseil prévoit que tous les additifs alimentaires doivent être soumis à une observation permanente et doivent être réévalués chaque fois que nécessaire, à la lumière des changements apportés aux conditions d'emploi et des nouvelles informations scientifiques disponibles.

Les additifs risquant d'être cancérogènes sont évalués par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC). Sur les 29 additifs à risque qui ont été évalués et autorisés, aucun n'appartient au groupe 1 (cancérogène pour l'Homme).

#### ○ **En France**

Les additifs doivent obligatoirement être mentionnés sur l'étiquette des denrées alimentaires : soit en clair (par exemple : "poudre à lever : bicarbonate de sodium") ; soit à l'aide d'un code précédé du nom de la catégorie (par exemple : "colorant E 330").

C'est la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) qui contrôle la présence des additifs dans les produits alimentaires.

La plupart des additifs ne peuvent être utilisés que dans les quantités limitées dans certaines denrées alimentaires. Si aucune limite quantitative n'est prévue pour l'utilisation d'un additif alimentaire, il doit être utilisé selon la bonne pratique de fabrication, c'est-à-dire seulement autant que nécessaire pour réaliser l'effet technologique désiré. De plus, les additifs alimentaires ne peuvent être autorisés que si :

- Il y a une nécessité technologique de l'utiliser,
- Ils n'induisent pas le consommateur en erreur,
- Ils ne présentent aucun risque pour la santé du consommateur [10].

## **7. L'exemple des colorants**

La coloration est un facteur important, parfois même décisif, dans le choix d'un aliment. La couleur est en effet un indice direct de qualité : on identifie la maturité d'un fruit, la qualité d'une charcuterie, à sa couleur. Bien sûr, il y a conditionnement du consommateur, dans la mesure où il y a association entre une couleur définie et un aliment donné.

De manière très réelle, on note une corrélation étroite entre l'adéquation de la couleur et la perception, par le consommateur, des sensations gustatives et olfactives. Les aliments ayant le goût de fraise doivent être roses, ou rouges ; le chocolat est associé au marron ; la menthe au vert, etc. Quel que soit le souci du législateur ou des associations de consommateurs de limiter l'utilisation des colorants alimentaires, on s'aperçoit que le public est toujours, plus ou moins consciemment du reste, demandeur de produits colorés [11].

### 7.1. Nature des colorants

On distingue deux grandes familles de colorants :

- Les colorants naturels (extraits de matières minérales ou organiques).
- Les colorants synthétiques

**Tableau 02** : Nature des colorants [12].

Les colorants naturels	Les colorants synthétiques
-D'origine animale : rouge carmin extrait d'un petit insecte, la cochenille. -D'origine végétale : jaune extrait de la graine d'un arbuste le roucouyer, vert de la chlorophylle, rouge bétamine de la betterave, brun caramel du sucre -D'origine minérale : aluminium, argent et or.	-Ce sont des colorants fabriqués par l'industrie chimique. -Certains sont des répliques exactes des colorants naturels : carotène de synthèse -Les autres sont le résultat d'inventions (azorubine, bleu patenté, jaune orangé).

### 7.2. Les effets des colorants alimentaires sur la santé

#### 7.2.1. Des effets néfastes

Les effets néfastes des colorants sur la santé sont connus, souvent liés à de fortes doses motivant des réglementations rigoureuses ou des interdictions. La prévalence de réactions cliniques aux colorants a été estimée entre 0,026 et 0,040 % de la population générale [12], 0,18 % après test de provocation en double insu aux additifs chez des patients présélectionnés par questionnaires d'allergie alimentaire. Si certaines réactions allergiques sont parfois documentées, il s'agit souvent de réactions d'intolérances liées à divers mécanismes comme :

- Une augmentation de la perméabilité digestive.

- L'inhibition ou déficit de certains enzymes (cyclo-oxygénase).
- L'action sur le système nerveux (périphérique).
- L'interférence avec la neurotransmission, synthèse excessive d'acétylcholine ou Présence d'amines biogènes [Gallen *et al.*, 2013].

### 7.2.2. Des effets bénéfiques

Heureusement pour le consommateur, tous les colorants alimentaires ne sont pas dangereux pour la santé. C'est le cas du Lycopène E160d et du  $\beta$ -carotène E160a. Ces deux colorants appartiennent à une même famille, les caroténoïdes que l'on retrouve dans presque tous les fruits et légumes.

- **Le Lycopène :** est un antioxydant qui, une fois absorbé par l'organisme, aide à protéger et à réparer les cellules endommagées. Les antioxydants ont démontré leur capacité à empêcher l'oxydation de l'ADN, laquelle serait à l'origine des cancers. Selon de récentes études, il préviendrait l'apparition de certains cancers (de la prostate, du poumon, du sein, de l'appareil digestif), de maladies cardio-vasculaires. L'organisme ne produit pas de Lycopène. On le trouve alors dans le pamplemousse, la goyave et le melon d'eau mais c'est la tomate la plus grande source de Lycopène. De surcroît, il a été démontré qu'il est mieux absorbé par le corps et encore plus concentré s'il provient de produits industriels comme le coulis de tomate plutôt que de tomates fraîches.
- **Le  $\beta$ -carotène :** Le rôle du  $\beta$ -carotène est similaire à celui de la vitamine A. D'ailleurs il est aussi appelé 'provitamine A, Il doit en effet être digéré avant d'être transformé en vitamine. Dans les cellules de la paroi intestinale, le  $\beta$ -carotène est transformé en rétinol (proche de la vitamine A) et couvre ainsi les besoins indispensables de l'organisme. Il joue lui aussi un rôle très important dans la prévention des cancers et il est recommandé dans le cas de vieillissement prématuré et de troubles de la vision. Il est présent dans les épinards, la betterave, les carottes, les abricots, les melons...
- **Le lycopène et le  $\beta$ -carotène** ne font paradoxalement pas partie des éléments qualifiés de nutritifs par les autorités de la santé. Prises à fortes doses, elles peuvent être toxiques (surtout le rétinol) et il faudra attendre des études de plus grandes envergures pour définir véritablement leurs bienfaits direct sur la santé [13].

### 7.3. Réglementation

La réglementation touchant les colorants alimentaires selon le principe dit de 'liste positive', ce qui signifie que tout ce qui n'est pas expressément autorisé est interdit. Les colorants alimentaires autorisés en Europe sont dotés d'un numéro de code précédé de la lettre E et composé de trois chiffres dont celui des centaines est le 1. Celui des dizaines correspond à leur couleur : 0 =jaune ; 1 = orange ; 2 = rouge ; 3 = bleu ; 4= vert ; 5= brun et 6 = noir. On peut dire que les colorants alimentaires ne sont dangereux que consommés à forte dose. Seule une minorité est admise sans D.J.A.

Ce tableau regroupe les cartes d'identités des 29 principaux colorants utilisés à l'heure actuelle.

**Tableau 03:** Regroupement les cartes d'identités des 29 principaux colorants utilisés à l'heure actuelle [13].

Code	Nom usuel	Origine	Utilisation	D.J.A	Effet(s) sur la santé
<b>E 100</b>	Curcumine	Extrait du curcuma	Moutarde, potages, produits laitiers	Aucune	A forte dose, stimule les sécrétions biliaires
<b>E 101</b>	Riboflavine	Origine végétale	Produits laitiers, pâtisserie, essarts	Aucune	Bénéfique car c'est la vitamine B2
<b>E 102</b>	Tartrazine	Synthétique	Nombreux aliments et médicaments	7,5	Rend hyperactif, cancérigène, mutagène
<b>E 104</b>	Jaune de quinoléine	Synthétique	Liqueurs, boissons, bonbons	0,75	Cancérigène ; interdit en Australie, U.S.A
<b>E 110</b>	Jaune-orangé S	Synthétique	Nombreux aliments	2,5	Rend hyperactif, cancérigène, tumeurs rénal chez les animaux. Cancérigène ?
<b>E 120</b>	Cochenille, Carmin	Origine animale	Apéritifs, charcuterie, produits laitiers	Aucune	Risque d'intolérance mineure
<b>E 122</b>	Azorubine	Synthétique	Nombreux	2,0	Rend hyperactif,

			aliments		cancérogénicité controversée
<b>E 123</b>	Amarante	Synthétique	Caviar seulement en France (très réglementé), interdite aux Etats-Unis	0,75	Rend hyperactif, cancérogène, dépôts calcaires dans les reins chez les animaux
<b>E 124</b>	Rouge cochenille	Synthétique	Nombreux aliments	0,15	Rend hyperactif, cancérogène
<b>E 127</b>	Erythrosine	Synthétique	Bonbons, fruits au sirop, fruits confits	2,5	Cancer thyroïde chez les animaux, influence sur les fonctions nerveuses
<b>E 131</b>	Bleu patenté V	Synthétique	Glaces, bonbons, liqueurs	2,5	Cancérogénicité non établie, interdit en Australie
<b>E 132</b>	Indigotine	Synthétique	Nombreux aliments	0.5	Innocuité très mal connue
<b>E 140</b>	Chlorophylle	Naturel végétal	Très rare en France	Aucune	Considéré inoffensif
<b>E 141</b>	Cuivre + chlorophylle	Naturel + cuivre	Très rare en France	15,0	Problématique pour certaines maladies
<b>142</b>	Vert acide brillant	Synthétique	Bonbons, desserts, liqueurs	5,0	Serait cancérogène
<b>E 151</b>	Caramel	Naturel végétal (issu du maïs transgénique)	Nombreux aliments	Aucune	Considéré comme inoffensif
<b>E 151</b>	Noir brillant BN	Synthétique	Bonbons, glaces	0,75	Rend hyperactif, diminue activité enzymes

<b>E 153</b>	Charbon végétal médicinal	Naturel végétal	Nombreux aliments, autorisé en France pour le fromage de chèvre biologique	Aucune	Considé­ré comme inoffensif
<b>E 160*</b>	Caroténoïdes	Naturel ou synthétique	Nombreux aliments	Aucune	Bénéfique car c'est la vitamine A
<b>E 161*</b>	Xanthophylles	Naturel végétal	Potages, charcuteries, condiments	Aucune	Considé­ré comme inoffensif
<b>E 162*</b>	Bétanine	Naturel végétal	Nombreux aliments	Aucune	Considé­ré comme inoffensif
<b>E 163*</b>	Anthocyanes	Minérale	Très rare en France	Aucune	Considé­ré comme inoffensif
<b>E 170</b>	Carbonate de calcium	Minérale	Très rare en France, utilisé pour toute l'A.B	Aucune	Considé­ré comme inoffensif
<b>E 171</b>	Dioxyde de titane	Minérale	Très rare en France	Aucune	Cancérogénicité non établie
<b>E 172</b>	Oxydes de fer	Minérale	Rare en France, utilisé pour certains aliments de l'A.B	Aucune	Considé­ré comme inoffensif
<b>E 173</b>	Aluminium	Minérale	Enrobage des confiseries au sucre	Aucune	Suspecter de faire apparaître la maladie d'Alzheimer
<b>E174</b>	Argent	Minérale	Enrobage des confiseries au sucre	Aucune	Empoisonnement des reins

<b>E 175</b>	Or	Minérale	Enrobage des confiseries au sucre	Aucune	Perturbation formule sanguine
<b>E 180</b>	Pigment rubis	Synthétique	Seulement croûtes de fromage comestibles	Aucune	Rend hyperactif, cancérigène ?

### 7.3. La relation entre colorants alimentaires (Tartrazine) et stress oxydant

Les êtres humains utilisent une variété d'additifs de couleur pour un temps où la plupart des couleurs sont d'origine synthétique. De nombreuses industries alimentaires ont commencé à utiliser des colorants alimentaires synthétiques sans connaissance de leur sécurité. Tartrazine (E102) est un colorant monoazoïque, communément utilisé comme colorant dans les produits alimentaires, les médicaments et la fabrication de produits industriels destinés à la consommation humaine. La DJA pour la tartrazine est de 7,5 mg / kg / jour [Walton *et al.*, 1999]. La tartrazine est utilisé principalement pour colorer plusieurs aliments tels que les céréales pour petit déjeuner, pépites de chocolat, des biscuits, des glaces, des jus de fruits, bonbons, confitures, céréales, grignotines, les conserves de poisson et de boissons gazeuses. Les études de toxicité générale, détaillés sur divers colorants alimentaires et produits additifs sont manquantes. Le métabolite de la tartrazine peut générer réactive des espèces oxygénées (ERO), qui à son tour, accélèrent là le stress oxydatif [Bansal., 2005] Une variété de réponses immunologiques ont été attribué à la tartrazine, y compris : la toxicité neurocomportementaux, l'anxiété, les migraines, la dépression clinique, vision floue, démangeaisons, faiblesse générale, des vagues de chaleur, sensation de suffocation, plaques violettes sur la peau et les troubles du sommeil [Park *et al.*, 2009]. Ont conclu que la tartrazine et Carmosine nuisent et modifier des marqueurs biochimiques dans les organes vitaux (foie et rein) non seulement à des doses plus élevées, mais aussi à de faibles doses. Allergie conduisant à des crises d'asthme, des dommages cellulaires, et interaction de l'additif alimentaire tartrazine avec la drogue commune produits tels que l'aspirine. Tartrazine (E102) est encore couramment utilisé comme colorant dans la nourriture, des médicaments et de nombreux produits industriels différents, destinés à la consommation humaine [Mpountoukas *et al.*, 2010]

Ont conclu qu'un lien de causalité existe vraiment entre la tartrazine et l'inflexion des comportements d'hyperactivité, l'anxiété et la dépression comme chez les rats et les points aux effets dangereux sur la santé de la tartrazine Puplic. [Yonglin *et al.*, 2011] ont rapporté que le déclin dans les activités de la catalase, la glutathion peroxydase (GSH -Px), et la superoxyde dismutase (SOD), ainsi qu'une augmentation du niveau de monoaldéhyde (MDA) a été observée dans le cerveau des rats traités tartrazine, et ces modifications ont été associées aux dommages oxydatif cérébral. Les niveaux de tartrazine dans l'étude de dose produit quelques effets indésirables dans les fonctions d'apprentissage et de mémoire chez les rats traités. Les mécanismes pourraient être attribués à la promotion de produits de peroxydation lipidique et les espèces réactives de l'oxygène, empêchant système endogène de défense antioxydant et les dommages aux tissus du cerveau. Preuves épidémiologiques suggèrent que les colorants pourraient posséder le potentiel carcinogène dans certaines circonstances [Axon *et al.*, 2012]

La tartrazine est capable de produire des radicaux libres, qui à son tour causer des dommages au système de compartiment cellulaire de testicule de rat [Amin *et al.*, 2010 ; Visweswaran., 2012]. Il a été une préoccupation croissante au cours des dernières années sur les méthodes d'analyse et potentiel mutagène d'une variété d'additifs alimentaires et de colorants alimentaires, et on croit que ces substances peuvent présenter un danger possible à l'homme en provoquant des mutations de gènes et / ou des aberrations chromosomiques.

La vitamine C (Vit C) peut protéger les molécules indispensables dans le corps, tels que les protéines, les lipides, les glucides et les acides nucléiques [Sanchez- Moreno *et al.*, 2003]. VC peut favoriser l'élimination des dommages oxydatifs à l'ADN de l'ADN et / ou à la piscine de nucléotides, par la régulation d'enzymes de réparation [Arraiga - Alba *et al.*, 2008]. Cet effet inhibiteur de Vit C vers un certain nombre de substances mutagènes / cancérogènes a été montré par de nombreux auteurs chez les humains, les animaux et les plantes [Fahmy *et al.*, 2008., Jennifer *et al.*, 2009]. Vit C est l'un des principaux composés utilisés comme antioxydant. Vit C comme un anti-oxydant très efficace agit comme un agent réducteur qui peut mettre fin à l'oxydation par des radicaux libres conduit étant converti en un stabilisé par résonance radical libre [Ambali *et al.*, 2011, Assia *et al.*, 2012]

*STRESS OXYDANT,  
OXYDANTS ET  
ANTIOXYDANTS*

## Le stress oxydant, Oxydants et antioxydants

### 1. Le stress oxydant

#### 1.1. Définition

Lorsque l'un des systèmes protectifs de l'organisme contre la toxicité des radicaux libres (RL) montre un échec, l'action des radicaux libres devient incontrôlable, ce qui conduit à des dommages au niveau des molécules, des cellules, des organes et potentiellement à la mort de l'organisme [Durackova., 2008].

La conséquence des effets nocifs des RL et des métabolites réactifs est dite « stress oxydant » (Figure 04). Ce terme est défini initialement comme étant « Un déséquilibre profond de la balance entre les prooxydants et les antioxydants en faveur des premiers » [Baskin *et al.*, 1994 ; Barouki., 2006 ; Jenkins *et al.*, 2007]. Cette définition ne signale aucun effet délétère d'un tel changement sur la fonction des tissus et n'indique pas l'origine de ce déséquilibre s'il est dû à une augmentation de la production des oxydants ou à une diminution de la capacité réductrice des tissus [Kehrer., 1993 ; Barouki., 2006]. D'autres chercheurs ont dit que le stress oxydant désigne un état caractérisé par une augmentation de la génération d'espèces réactive oxygène (ERO) en ajoutant que ce terme est synonyme du dommage [Kehrer., 1993]

Selon les points de vue actuels, le stress oxydant peut être défini comme étant « *un déséquilibre entre la production et l'élimination des métabolites réactifs de l'oxygène et du nitrogène en faveur de leur production conduisant à des dommages potentiels* [Durackova., 2008] *et à des dégâts cellulaires irréversibles.* [Pincemail *et al.*, 1999 ; Abuja *et al.*, 2001]» [Layachi., 2013]

#### 1.2. Origine du stress oxydant

La découverte d'espèces chimiques radicalaires présentes normalement dans l'organisme a bouleversé notre compréhension des mécanismes biologiques. Ces radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable, mais la production peut devenir excessive ou résulter de phénomènes toxiques exogènes et l'organisme va devoir se protéger de ces excès par différents systèmes antioxydants. Dans les circonstances quotidiennes normales, des radicaux libres sont produits en permanence en faible quantité comme les médiateurs tissulaires ou les résidus des réactions énergétiques ou de défense, et cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, d'ailleurs adaptatifs par rapport au de radicaux présents [Favier., 2003].

Ces agressions sont à l'origine de l'apparition de ces radicaux libres et donc du (pollution, consommation excessive d'alcool, sport, stress, Intoxication aux métaux lourds (mercure, plomb, cadmium), Irradiation (UV, rayons X...), Phénomènes d'ischémies/reperfusions (thromboses, exercice), Carences nutritionnelles (vitamines, oligo-éléments), Anomalies génétiques (mauvais codage pour une protéine enzymatique antioxydant) [16]

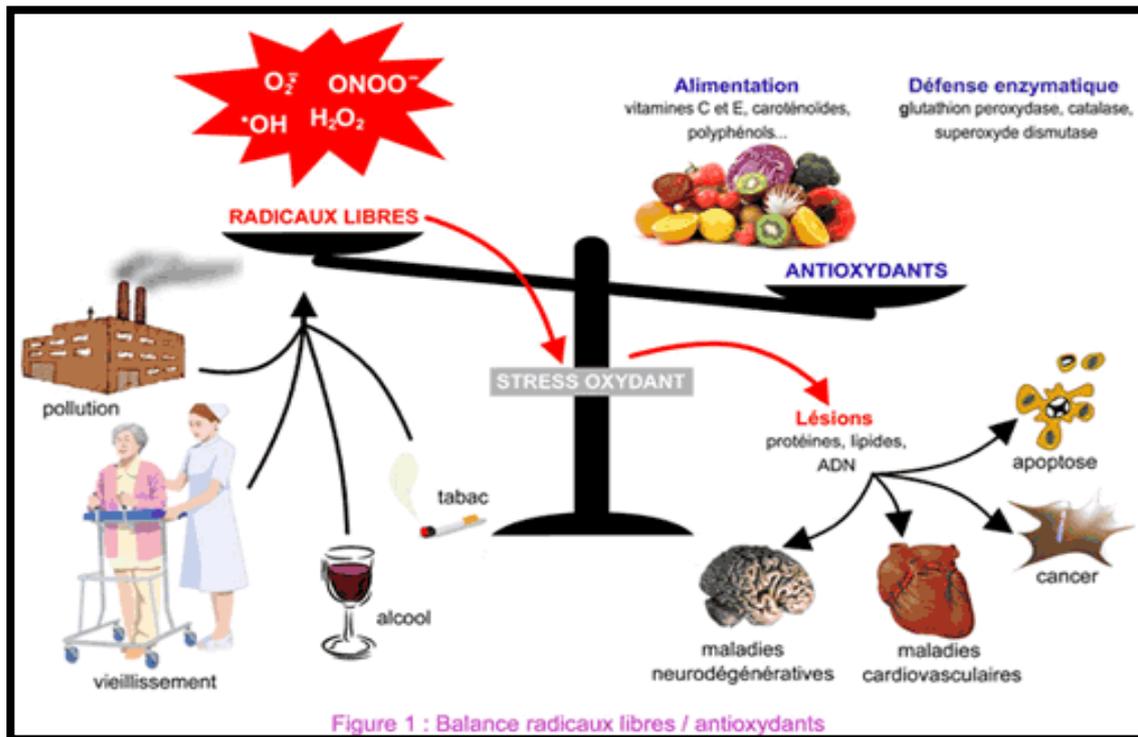


Figure 04 : Stress oxydant [Durackova., 2008]

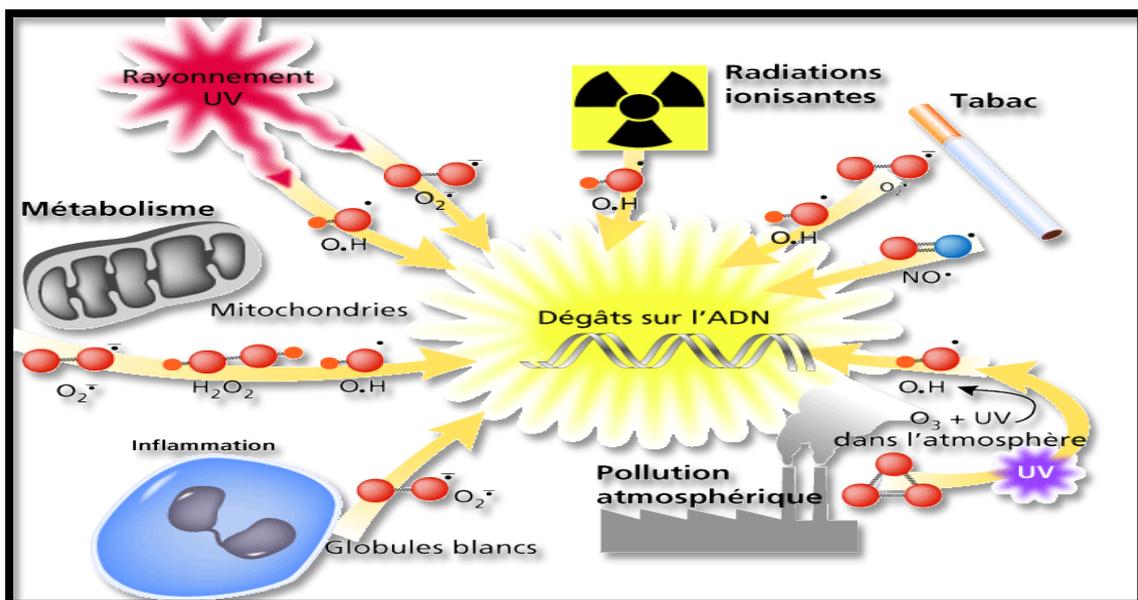


Figure 05: Les différentes origines du stress oxydatif [Ohare., 2007].

## 2. Les radicaux libres

### 2.1. Définition

Un radical est une molécule ou un fragment moléculaire qui contient un électron (ou plus) non apparié. Il a tendance à attirer les électrons d'autres atomes et molécules pour gagner sa stabilité. Plusieurs éléments peuvent être à l'origine de radicaux libres. Les sources des radicaux libres sont nombreuses (tableau 04). Il existe deux grandes voies de formation de ces derniers :

- La première voie consiste en un transfert d'électrons catalysé par les métaux de transition (Fe, Cu), ils transforment  $H_2O_2$  en radical hydroxyle ( $OH^\circ$ ) encore plus toxique, et accélèrent la peroxydation lipidique.
- La deuxième voie se fait au niveau de la scission homolytique des liaisons covalentes des molécules. Cette voie nécessite de l'énergie qui pourra être fournie par les radiations ionisantes, par la lumière, la chaleur et les ultrasons.

**Tableau 04 :** Les principales sources des ERO [Adjadj., 2009]

#### Sources des ERO

Exogènes	Endogènes
-Cigarette	- Mitochondries
- Radiation ionisantes	- Phagocytoses
- Pollutions diverses	- Xathine oxydase
- Rayonnement UV	- Métaux de transition
- Produits chimiques & médicaments	- Peroxysomes
- Ozone	- Exercice physique
	- Inflammation
	- Choc
	- Ischiémie/reperfusion

## 2.2. Nature des radicaux libres

### 2.2.1. Espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO)

L'oxygène doit sa grande réactivité à sa structure particulière. En effet, il possède deux électrons célibataires non appariés sur sa couche orbitale externe. Cette molécule est essentielle au bon fonctionnement de l'organisme

#### 2.2.1.1. Ion superoxyde ( $O_2^{\circ -}$ )

L'ion superoxyde ( $O_2^{\circ -}$ ) est un dérivé très réactif de l'oxygène, Il est produit au cours du métabolisme mitochondrial à la suite de la réaction suivante :



Relativement stable, il n'est pas très toxique pour l'organisme, mais il est à l'origine de cascades de réactions conduisant à la production de molécules très nocives

#### 2.2.1.2. Radical libre hydroxyle ( $OH^{\circ}$ )

Le Radical libre hydroxyle ( $OH^{\circ}$ ) est très réactif il peut réagir avec de nombreuses molécules comme l'ADN, les glucides, les nucléotides, les protéines et être à l'origine de lésions de nécrose. C'est un dérivé de l'ion superoxyde. Il peut être produit à la suite de diverses réactions. Nous en citerons une réaction à titre d'exemple :

La réaction de Fenton : elle est basée sur la production des radicaux hydroxyles à partir de la décomposition du peroxyde d'hydrogène catalysée par des sels ferreux

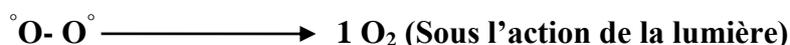


Dans l'oxydation des lipides, la réaction de Fenton peut s'écrire de la manière suivante :



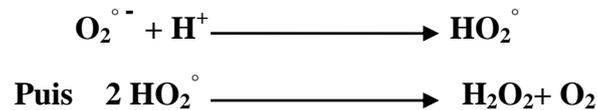
#### 2.2.1.3. Oxygène singulet ( $1 O_2$ )

Lorsque de l'énergie est apportée à l'oxygène. Celui-ci passe à l'état singulet qui représente la forme activée. C'est une forme très énergétique de grande réactivité qui peut oxyder de nombreuses molécules. Il est formé à partir de l'ion superoxyde selon la réaction suivante : [Bauhadjra., 2011].



### 2.2.1.4. Le radical peroxyde ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

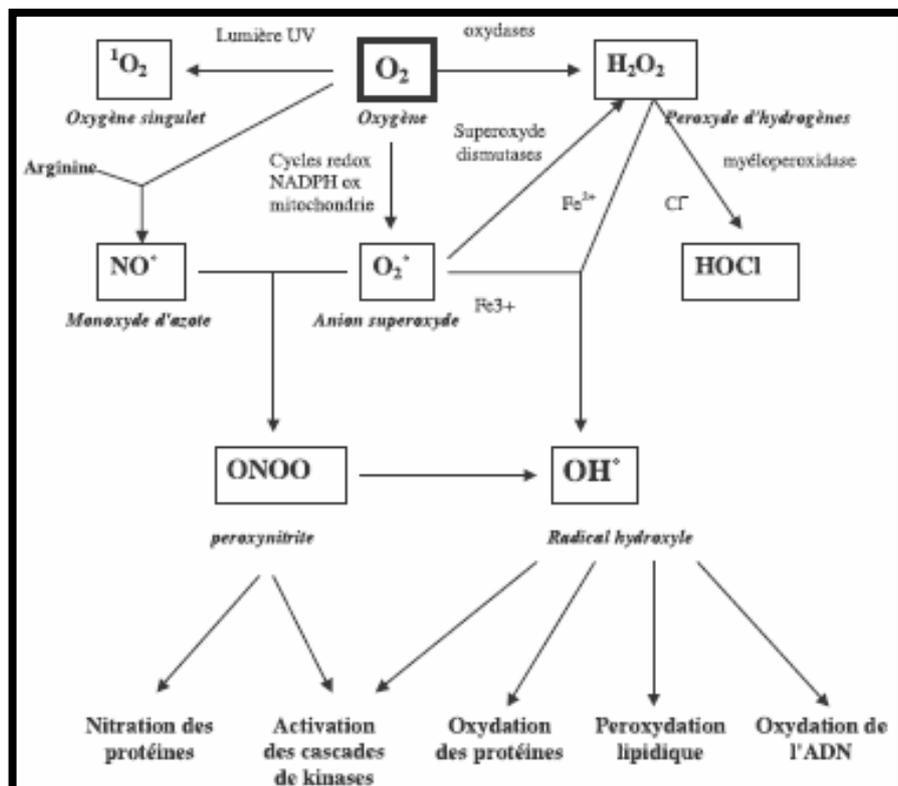
Le radical peroxyde est considéré comme une espèce réactive dérivée de l'oxygène (ERO) même s'il n'a pas une structure radicalaire car il est capable d'initier ou de propager des dommages oxydatifs. Il peut être produit au cours des mécanismes illustrés par les équations suivantes : [Justine Odile., 2005].



### 2.2.2. Espèces libre non oxygénées

Les espèces libres non oxygénées sont les produits des réactions de certaines molécules avec les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO). Ils peuvent à leur tour réagir avec d'autres molécules et être à l'origine de la multiplication des réactions d'oxydation et de la propagation de dommages oxydatifs. Nous citons par exemple, les acides gras peroxydés, résultat de l'action des espèces oxygénées sur les membranes biologiques.

Les fractions protéiques, les acides aminés et les acides nucléiques peuvent aussi réagir avec les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO) générant des molécules réactives et nocives [Bauhadjra., 2011].

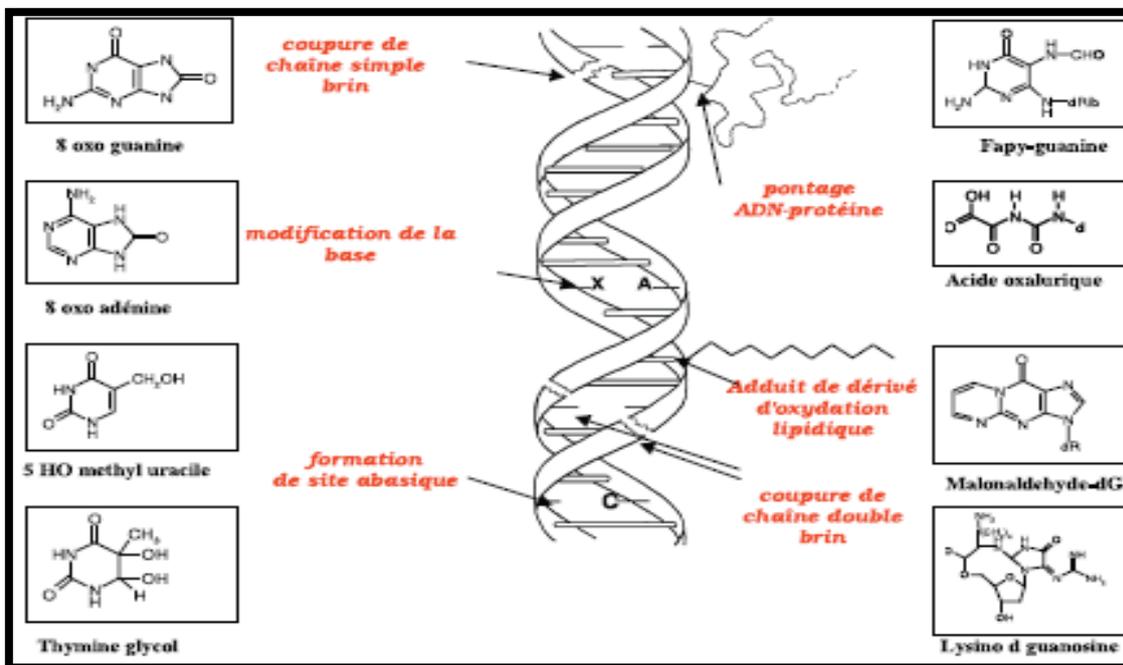


**Figure 06:** Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie [Favier., 2003].

### 3. Cibles des radicaux libres

#### 3.1. L'acide désoxyribonucléique ou ADN

L'ADN est une cible privilégiée pour d'espèces oxygénées activées (EOA). La guanine, par exemple, peut réagir avec  $\text{OH}^\bullet$  pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine, entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du cancer et le vieillissement [Haleng *et al.*, 2007].

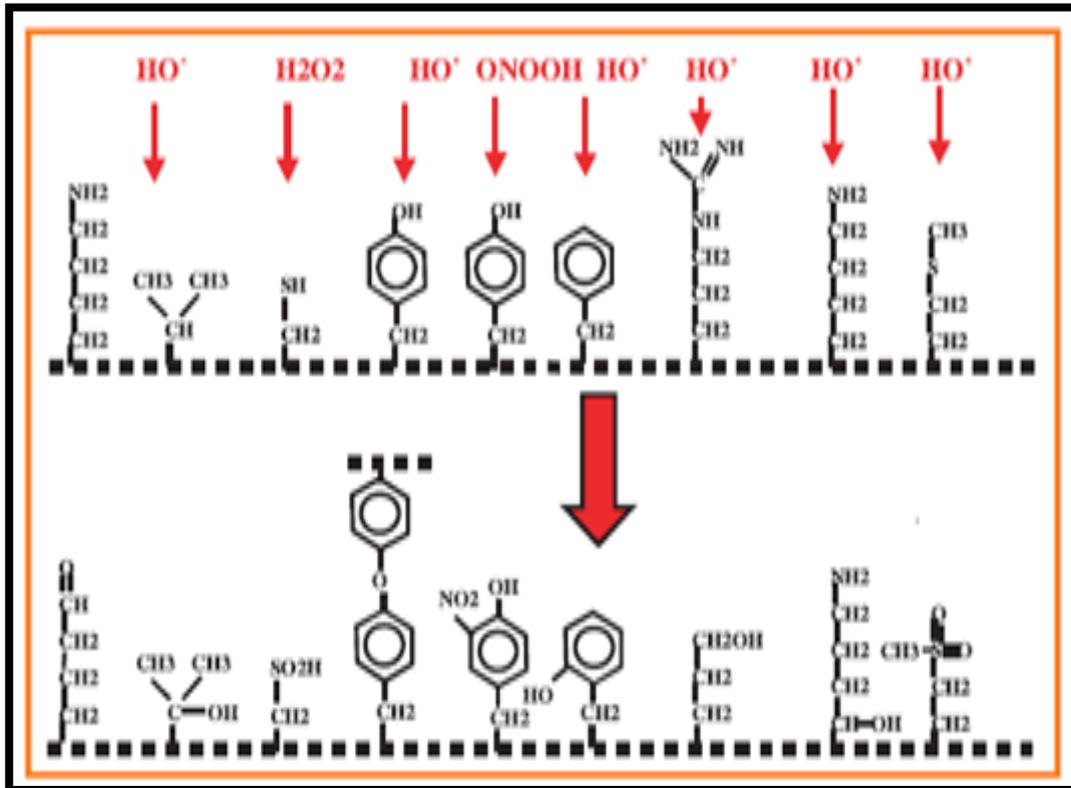


**Figure 07 :** Lésion de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules [Favier., 2003].

#### 3.2. Les protéines

Les acides aminés possèdent des susceptibilités différentes vis-à-vis d'espèces oxygénées activées (EOA). Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. Toute attaque radicalaire d'un acide aminé provoquera l'oxydation de certains résidus avec, pour conséquences, l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes. La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes (non- reconnaissance d'un récepteur par un ligand, perte d'activité enzymatique). Certaines

protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats qui s'accumulent dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire [Haleng *et al.*, 2007].



**Figure08** : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés après attaque radicalaire. [Favier., 2003].

### 3.3. Les lipides membranaires

Le radical hydroxyle est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons des acides gras poly-insaturés (AGPI) : c'est la phase d'initiation. Le radical lipidique réagit avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxyde ( $\text{ROO}^\bullet$ ), suffisamment réactif pour arracher un  $\text{H}^+$  à un AGPI voisin, propageant ainsi la réaction [Atkin *et al.*, 2005]. Il en résulte une altération de la fluidité membranaire qui conduit inévitablement à la mort cellulaire. Les peroxydes générés seront neutralisés par la glutathion peroxydase ou continueront à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes (malondialdéhyde, 4-hydroxynonéal) dont les activités pro-athérogènes sont bien connues [Haleng *et al.*, 2007].

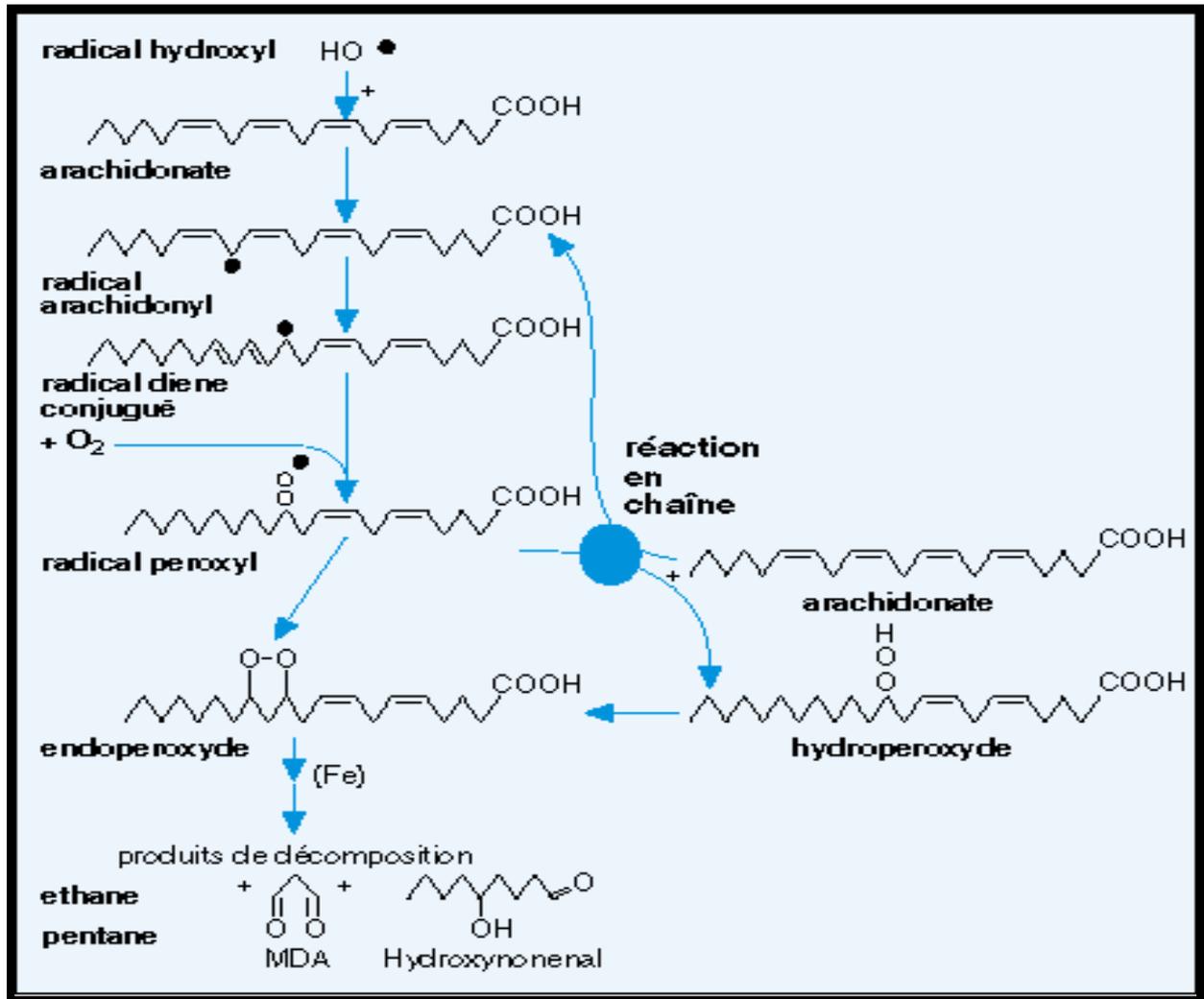


Figure 09 : Principales étapes de la peroxydation des lipides [Favier., 1997].

### 3.4. Les lipoprotéines

L'attaque radicalaire des lipoprotéines circulantes aboutit à la formation de LDL oxydées, qui seront captées par des récepteurs spécifiques des macrophages. L'activité de ces récepteurs n'étant pas régulée par la concentration intracellulaire en cholestérol, les macrophages se transforment petit à petit en cellules spumeuses (rôle important dans les premières étapes de l'athérosclérose) [Nakajima *et al.*, 2006]. En outre, ces LDL oxydées sont immunogènes et les immuns complexes formés peuvent activer la voie classique du complément et générer la sécrétion de cytokines pro inflammatoires par les macrophages [Saad *et al.*, 2006].

## 4. Marqueurs biologiques du stress oxydants

### 4.1. Marqueurs de l'oxydation des acides nucléiques

Les acides ribo- et désoxyribonucléiques (ARN et ADN) constituent des cibles cellulaires importantes pour les attaques radicalaires [Dizdaroglu., 1991 ; Halliwell et Gutteridge., 1999]. Les lésions induites par les radicaux libres au niveau de ces molécules peuvent consister en des modifications de bases, des cassures simple-brin ou double-brin de la chaîne oligonucléotidique, ou des pontages avec des résidus protéiques [Favier., 1997]. Les modifications observées après action du radical hydroxyle sont très nombreuses et peuvent consister en une conversion des bases ou oxydation du désoxyribose entraînant une coupure des brins [Halliwell et Gutteridge., 1999]. Ces dénaturations peuvent avoir de graves conséquences sur la réplication du génome. La recherche des produits d'oxydation peut être réalisée dans des cellules circulantes isolées ou dans des biopsies, mais aussi dans l'urine où se retrouvent les composés oxydés (bases ou nucléosides) après excision par les enzymes de réparation [Favier., 1997]. De nombreux produits de réaction des radicaux libres sur l'ADN ont été identifiés, tels que la 8-hydroxy-guanosine, le thymidine glycol, la 8-hydroxyguanine, la 8-hydroxy-adénine, la 5-hydroxy-méthyl-uracil, le cytosine-glycol [Demple., 1991]. Parmi les composés d'oxydation de l'ADN, deux d'entre eux se sont révélés être des marqueurs intéressants. Il s'agit de la 8-hydroxy-2-désoxyguanosine (8-OH-dG) et du thymidine glycol. [Papa Madièye., 2007].

### 4.2. Marqueurs de la peroxydation lipidique

Les lipides, principalement les acides gras polyinsaturés, peuvent subir une attaque radicalaire, par le radical hydroxyle ( $\text{OH}^\circ$ ), capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxy. Une réaction en chaîne se produit conduisant à la transformation du radical peroxy, au contact d'un autre acide gras, en un nouveau radical diène conjugué [Esterbauer *et al.*, 1992].

Les radicaux diènes conjugués, sous l'action de l'oxygène, se transforment en hydroperoxydes qui peuvent, soit être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase, soit continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes, acides et alcanes volatiles. Les principaux marqueurs de la peroxydation lipidique sont les substances réagissantes aux malonaldéhyde/acide thiobarbiturique, les diènes conjugués, les hydroperoxydes lipidiques et les isoprostanes [Serafini *et al.*, 2000].

Cette attaque des lipides peut concerner aussi bien les phospholipides (PL) membranaires que les lipoprotéines circulantes, avec des conséquences différentes. En effet, l'atteinte des phospholipides (PL) entraîne une modification de la fluidité membranaire, altère les systèmes de transfert d'ions, ainsi que le fonctionnement de nombreux transporteurs, récepteurs et affecte les voies de transduction des signaux [Favier., 2003]. L'attaque des lipoprotéines circulantes, notamment des LDL, aboutit à leur oxydation, puis leur captation par les macrophages pour donner des cellules spumeuses à la base du dépôt lipidique de la plaque d'athérome [Peynet *et al.*, 2005] [Hamadi., 2010].

#### 4.3. Marqueurs de l'oxydation des protéines

La fonction et l'activité des protéines peuvent être affectées par altération de leur structure complexe, en particulier par oxydation. En effet, les protéines peuvent se fragmenter ou se dénaturer avec altération de leurs structures primaires et secondaires. En général, les protéines oxydées sont inactives et sont rendues vulnérables à l'action des protéases. Lors d'un stress oxydatif important, les cellules sont incapables d'éliminer par protéolyse les protéines oxydées accumulées, ce qui conduit aux dégâts protéiques observés dans le diabète.

Les deux principaux marqueurs biologiques de l'oxydation des protéines sont la formation de carbonyles protéinés et de groupes nitrotyrosines. Les carbonyles protéinés sont formés lorsque les espèces réactives de l'oxygène attaquent les résidus d'acides aminés. L'histidine, la proline, l'arginine et la lysine sont particulièrement prédisposées à cette attaque. La formation de nitrotyrosines est due au peroxy-nitrite hautement toxique, produit par la réaction du monoxyde d'azote et du superoxyde. Les carbonyles protéinés et les nitrotyrosines sont tous deux très stables et ne sont généralement pas retrouvés chez les patients, faisant d'eux des marqueurs biologiques utiles et fiables [Levine., 2002].

### 5. Systèmes de défenses antioxydants

Pour se protéger des effets toxiques de l'oxydation l'organisme a développé des systèmes de défenses qui coopèrent ensemble dans la cellule pour réguler la production des ERO. Un antioxydant peut être défini comme étant une substance qui présente à de faibles concentrations par rapport à un substrat, peut significativement retarder ou inhiber l'oxydation de ce substrat. Les défenses antioxydantes de notre organisme sont composées de :

- Protéines à activité enzymatique (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, glutathion réductase, catalase) dont le rôle consiste à dégrader les substrats oxydés. En

offrant un électron, elles stabilisent les radicaux libres et les empêchent d'altérer les composants cellulaires

- Molécules antioxydant de petite taille (glutathion, acide urique, bilirubine vitamine A Cet E, caroténoïdes, ubiquinone)
- Oligo- éléments (sélénium, zinc) et de protéines qui empêchent le fer de déclencher une production d'ERO [Bouzidi-Bekada., 2012].

### 5.1. Les antioxydants enzymatiques

Ces systèmes sont composés d'enzymes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la peroxydase, capables d'éliminer les radicaux libres et d'autres espèces réactives (Tableau 05) [Papa Madièye ., 2007].

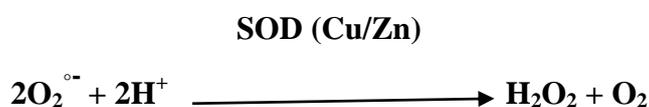
**Tableau 05 : Les antioxydants enzymatiques et leurs caractéristiques [Beaudeau et al., 2005].**

Antioxydants enzymatiques	Caractéristiques et réaction catalysée.
<b>Superoxyde dismutase SOD</b> - Cu, Zn SOD1 - Mn SOD2 - Cu, Zn SOD3	Appartient à la famille des métalloenzymes, possède trois isoenzymes : SOD1, SOD2 intracellulaires et SOD3 extracellulaire, catalyse la dismutation de l'ion superoxyde. $\text{O}_2^{\bullet -} + \text{O}_2^{\bullet -} \longrightarrow 2\text{H} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
<b>La catalase</b>	C'est une enzyme hémique capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. $2 \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
<b>Les glutathion peroxydases</b> -GPx sélénium- indépendant (GST) : -GPx sélénium-dépendant	- La GST catalyse les réactions de détoxification des xénobiotiques. - Présente sous forme de 5 isoenzymes tétramériques, agissant sur les peroxydes d'hydrogène et les hydroperoxydes lipidiques par l'intermédiaire de GSH

### 5.1.1. Les superoxydes dismutases (SOD)

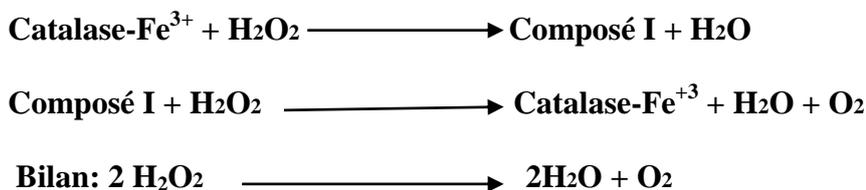
Les superoxydes dismutases sont capables d'éliminer l'anion superoxyde par une réaction de dismutation, formant avec deux superoxydes une molécule d'oxygène et une molécule de peroxyde d'hydrogène [Favier., 2003].

Il existe trois types de SOD qui diffèrent par leur structure et leur localisation cellulaire : la SOD à cuivre et à zinc (Cu, Zn-SOD) essentiellement présente dans le cytoplasme des cellules eucaryotes, la SOD à manganèse (Mn-SOD) chez les procaryotes et dans les mitochondries des eucaryotes, la SOD à fer (Fe-SOD) chez les procaryotes uniquement. Son rôle principal est de présenter une barrière contre la formation des radicaux libres [Delattre *et al.*, 2003].



### 5.1.2. Catalase

La catalase est une enzyme héminique capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Elle est essentiellement présente dans les peroxysomes et dans les hématies. La localisation de la catalase dans les peroxysomes, organites cellulaires qui sont également le lieu de production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, substrat de l'enzyme, fait que la détoxification du peroxyde d'hydrogène est assurée in situ. La réaction catalysée par cette enzyme consiste en une dismutation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [Rousse *et al.*, 2003] :



### 5.1.3. Peroxydase

Les peroxydases sont des enzymes capables de détoxifier le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes (en particulier d'origine lipidique), en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur. La dénomination des peroxydases dépend de la nature de ce substrat réducteur, dont chaque enzyme est spécifique. Ainsi est-il possible de distinguer des glutathion peroxydases, des cytochromes c peroxydases, des NADH peroxydases. Nous nous limiterons ici aux caractéristiques de la glutathion peroxydase (GSH-Px) [Delattre *et al.*, 2003].

### ➤ **Glutathion peroxydase**

La glutathion peroxydase (GPx) agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et O<sub>2</sub>. Lors de cette réaction deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG) [Mates *et al.*, 1999; Powers & Lennon., 1999]. Il existe également une glutathion peroxydase associée à la membrane mitochondriale, la phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPx) qui est spécifiquement impliquée dans la diminution de la peroxydation lipidique [Mates *et al.*, 1999 ; Nomura *et al.*, 2000].

### ➤ **Glutathion réductase**

La glutathion réductase, quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GPx maintienne sa fonction. Ces deux enzymes sont présentes dans le cytosol et dans les mitochondries [Layachi., 2013].

## **5.2. Antioxydants non enzymatiques**

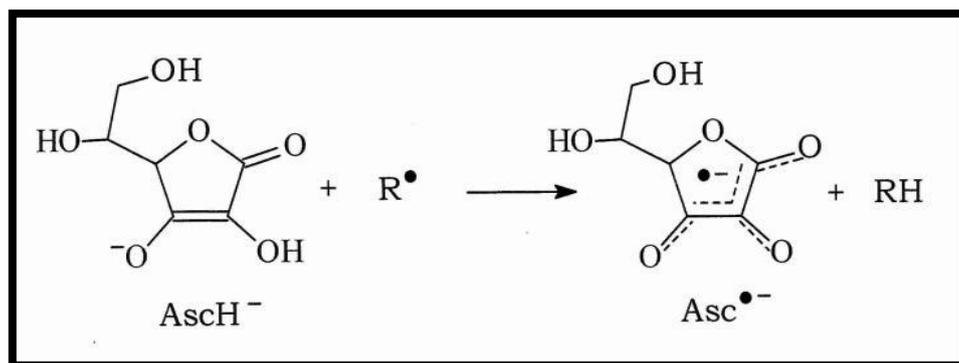
Certaines substances ont la propriété de piéger et de détruire les espèces réactives de l'oxygène. Il s'agit de composés facilement oxydables présents dans le cytoplasme (glutathion, acide ascorbique) ou dans les membranes cellulaires (alpha-tocophérol, caroténoïdes) [Hamadi., 2010].

### **5.2.1. Glutathion**

Le glutathion est un tripeptide, dont les propriétés réductrices et nucléophiles jouent un rôle majeur dans la protection contre les altérations oxydantes des lipides, des protéines et des acides nucléiques. En situation des stress oxydant, son rôle protecteur et détoxifiant réside principalement dans sa fonction de co-substrat des glutathion peroxydases. Mais il fait aussi l'objet d'interactions synergiques avec d'autres composants du système de protection antioxydante tels que le vit C, la vit E et les superoxydes dismutases [Gerard-Monnier and Chaudiere., 1996].

### **5.2.2. Vitamine C (acide ascorbique)**

C'est l'un des principaux antioxydants hydrosolubles présent dans les fluides intra- et extracellulaires. Le vit C peut directement réagir avec des espèces réactives de l'oxygène comme HO° ou O<sub>2</sub>°-. Elle peut recycler l'α-tocophérol pour aider à prévenir l'oxydation des lipides [Vertuani *et al.*, 2004].

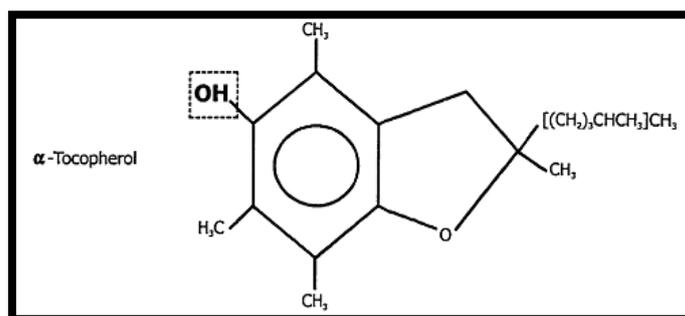


**Figure 10** : Mécanisme d'action de la vitamine C

[Crabtree *et al.*, 1997].

### 5.2.3. Vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol)

Sous le terme vitamine E est regroupée la famille des tocophérols ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ). Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein des acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines, où elle joue un rôle protecteur en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par un stress oxydant. Seuls  $\alpha$  et  $\delta$  tocophérols possèdent les propriétés antioxydantes les plus intéressantes [Vertuani *et al.*, 2004].



**Figure 11** : structure de l' $\alpha$ -Tocophérol [Best., 2002].

### 5.2.4. Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont très nombreux et représentent la principale source alimentaire de rétinol. En plus de leur activité de provitamine A, les caroténoïdes sont capables d'inactiver l'oxygène singulet et les radicaux libres en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules ou ions stables [Krinsky., 1993].

### 5.3. Les oligoéléments

Les oligo-éléments, appelés aussi éléments traces sont des éléments métalliques indispensables à l'organisme, mais en toute petite quantité.

### 5.3.1. Le sélénium

Le sélénium n'est pas un antioxydant en tant que tel, car il ne peut piéger les radicaux libres, mais il joue un rôle primordial comme cofacteur de la GPx. Dans l'alimentation, on retrouvera essentiellement du sélénium organique, lié à un acide aminé, la cystéine. Le sélénium organique est mieux absorbé, il subit une métabolisation hépatique qui conduit à des intermédiaires nécessaires à la synthèse de dérivés physiologiquement actifs comme la GPx. La dose journalière recommandée est de 50-70 µg/jour. Les aliments riches en sélénium sont, notamment, les noix de Brésil, les brocolis, l'ail etc. [Haleng *et al.*, 2007].

### 5.3.2. Polyphénols

Les polyphénols végétaux regroupent une grande variété de composés comprenant entre autres les flavonoïdes, les anthocyanes, les tanins, les coumarines, et les phénols. Ce sont des composés que l'on retrouve dans les plantes. Depuis quelques années les Polyphénols attirent l'attention des chercheurs à cause de leurs propriétés antioxydantes. En effet, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique et de réduire les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes [Delattre., 2005].

### 5.3.3. Le zinc

La prise de zinc conduit à long terme à l'induction de protéines anti-oxydantes comme les métallothioneines. L'importance du zinc dans La prévention des effets toxiques dus aux radicaux libres est primordiale. En effet, le zinc joue un rôle dans l'activité et le maintien de la SOD qui est un piègeur capital des ions superoxydes [Bakin., 1994].

### 5.3.4. Le cuivre

A concentration physiologique, le cuivre est le cofacteur d'enzymes comme la SOD, la cytochrome C oxydase, la dopamine β-hydroxylase. Cependant, en tant que métal de transition, il joue un rôle important dans le déclenchement de réactions de production d'espèces oxygénées activées(EOA),(réactions de Fenton) et peut – lorsque sa concentration est élevée devenir pro-oxydant. Les apports journaliers recommandés sont de l'ordre de 2,5 mg. Il est présent dans le son, l'avoine, le seigle, le foie de veau [Haleng *et al.*, 2007].

# *PARTIE EXPÉRIMENTALE*

# *MATÉRIELS ET MÉTHODES*

## Matériels et Méthodes

### 1. Colorants alimentaires

Pour cette étude, deux colorants alimentaires sont testés : Un colorant A sous forme d'une poudre utilisé dans la préparation des gâteaux, disponible sur marcher, portant le code E131-E102 (voire annexe 2), et un colorant B sous forme liquide dont la composition est inconnue, utilisé dans la coloration des boissons gazeuses. Ce colorant est fournit par une usine productrice de boissons et qui a refusé de donner sa référence.

### 2. Prélèvement du sang et préparation de la suspension des globules rouges (SGR)

Des échantillons de sang ont été obtenus à partir de huit donneurs sains (100% femmes, l'âge compris entre 20 à 40 ans). Les bénévoles étaient non-fumeurs, non-buveurs d'alcool, et ne sont sous aucune médication ou complément alimentaire. Après la signature des consentements, les prélèvements sanguins ont été faits le matin à jeun sur la veine du pli du coude sur tube avec anti-coagulation (héparine). Tous ces tubes sont étiquetés et répertoriés de manière précise. Selon la technique décrite par [Rodrigues et Almeida., 1998] pour récupérer les érythrocytes, le sang est centrifugé à 3000 tours /min pendant 15 min puis la couche leuco-plaquettaire et le plasma ont été éliminés. Les érythrocytes ont été lavés trois fois avec 5 volumes d'eau physiologique froide (NaCl 0.9 %) et centrifugé à chaque lavage a 3000 tours/ min pendant 15 min. Après le dernier lavage, les érythrocytes ont été remises en suspension dans un tampon phosphate salin (PBS 0.1mol/L, pH7.4) à une dilution de 1/20.

### 3. Traitement des érythrocytes

#### 3.1. Test d'hémolyse :

Ce test est réalisé sur la SGR *in vitro* afin de déterminer la concentration induisant 50% d'hémolyse ( $CH_{50}$ ) des érythrocytes. Il nous renseigne sur la toxicité du produit testé et nous permet de choisir les doses qu'on peut utiliser *in vitro*. Différentes concentrations du produit A [0-300mg/ml] et le produit B [0-300µl/ml] sont utilisée pour le traitement des érythrocytes selon le protocole suivant :

- **Contrôle 01:** 1ml de la SGR de chaque échantillon est mélangé avec 1ml de la solution du PBS.
- **Contrôle 02:** 1ml de la SGR de chaque échantillon est mélangé avec 1ml d'eau distillé (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) pour avoir 100% d'hémolyse.

- **Tubes tests :** 1ml de la SGR de chaque échantillon est mélangé avec 1ml du produit testé à différentes concentrations

Les différents tubes sont incubés à 37 C° sous agitation continue pendant trois heures. A la fin de l'incubation, les tubes ont été centrifugés à 3000 tours /min pendant 10 min. L'absorbance à 540 nm du surnageant de chaque types est déterminé par un spectrophotomètre [Rodrigues et Almeida., 1998] . Le pourcentage d'hémolyse est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ Hémolyse} = \text{Absorbance tube test} / \text{Absorbance 100\%} \times 100$$

Les  $CH_{50}$  pour les deux colorants alimentaires A et B sont calculées graphiquement à partir de la représentation des pourcentages d'hémolyses en fonction des différentes concentrations utilisées pour chaque colorant [Torres *et al.* , 2006].

### 3.2. Etude de l'effet sur les paramètres du stress oxydant

Afin d'étudier l'effet des colorants A et B sur quelques paramètres du stress oxydant, la SGR de chaque échantillon est traitée avec trois concentrations différentes correspondant aux  $CH_{50}/2$ ,  $CH_{50}/4$  et  $CH_{50}/8$ . Dans un tube à essai, 1,5 ml du produit testé (A ou B) sont ajoutés à 1,5 ml de la SGR de chaque échantillon. Chaque concentration ( $CH_{50}/2$ ,  $CH_{50}/4$  et  $CH_{50}/8$ ) est testée trois fois. Des tubes témoins sont préparés en incubant 1.5 ml de la SGR avec 1.5 ml du tampon phosphate. Les tubes sont incubés à 37 C° pendant 1 heure sous agitation continue. A la fin de l'incubation, les tubes ont été stockés à -20C° jusqu'à leur utilisation pour l'analyse des paramètres du stress oxydant.

## 4. Dosage des paramètres du stress oxydant

### 4.1. Dosage des substances réactives de l'acide thiobarbiturique (TBARS)

La quantité des TBARS est exprimée en termes d'un équivalent biochimique qui est le «Malonyl di aldéhyde MDA», un des produits terminaux formés lors de la peroxydation des acides gras polyinsaturés (PUFA) méditée par les radicaux libres. La mesure de l' MDA à l'aide du TBA selon la méthode de [Okhawa *et al.*, 1979] permet la quantification de la peroxydation lipidique qui constitue le marqueur majeur du stress oxydant.

### ○ Principe

Le dosage de l'MDA repose sur la formation, en milieu acide et à chaud (95°C), entre une molécule d'MDA et deux molécules d'acide thiobarbiturique d'un pigment coloré absorbant à 530 nm et extractible par les solvants organique comme le butanol.

### ○ Réactifs et solvants

L'acide thiobarbiturique TBA 0.67 %.

L'acide trichloroacétique TCA 20%.

Le n-butanol.

### ○ Procédure

La quantité de l'MDA est évaluée au niveau des érythrocytes selon la méthode de [Okhawa *et al.*, 1979].

A 250µl de la SGR traité, nous avons ajouté 250µl de TCA (20%) et 1ml de TBA (0.67%). Le mélange est chauffé à 95°C pendant 15 minutes, refroidis puis additionné de 2 ml de n-butanol. Après centrifugation de 15 minutes à 3000 tours /minutes, la densité optique est déterminée sur le surnageant au spectrophotomètre à 530 nm. L'MDA est exprimé en nmol/ml d'érythrocytes et calculé à partir d'une gamme préparée sous les mêmes conditions avec une solution de « 1, 1, 3,3-tetraetoxypropane » qui donne le MDA après son hydrolyse

## 4.2. Dosage de l'activité enzymatique du catalase

L'activité enzymatique du catalase est déterminée selon la méthode de [Clairborne., 1985].

### ○ Principe

Le dosage de l'activité enzymatique du catalase est basé sur la diminution de l'absorbance à 240 nm qui est due à la décomposition du superoxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) par la catalase.

### ○ Réactifs et solvants

Tampon phosphate de potassium pH 7.4 (0.1M).

Peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 19mmol/ml.

### ○ Procédure

Dans une cuve en quartz de 3 ml, 50µl de l'homogénat sont mélangés avec 2.95 ml d'une solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 19mmol/ml préparée dans le tampon phosphate de potassium pH 7.4

(0.1M). Le changement de l'absorbance est suivi pendant deux minutes en prenant les valeurs à  $t_0$  et après chaque minute. L'activité enzymatique du catalase est exprimée en constante de vitesse de la réaction d'ordre 1 par ml des érythrocytes

#### ○ Méthode de calcul

L'activité enzymatique du catalase est calculée selon la formule suivante :

$$K = 2.303 / T \times \log (A1/A2)$$

Dont :

**K** : Constante de vitesse de la réaction d'ordre 1.

**T** : Intervalle de temps en minute.

**A1** : Absorbance à  $t_0$

**A2** : Absorbance à  $t_1$

### 4.3. Dosage du glutathion réduit

Le dosage de glutathion réduit est effectué selon la méthode d'Ellman [Ellman G., 1959]

#### ○ Principe

La méthode du dosage de glutathion est basée sur l'évaluation de la réduction du Réactif d'Ellman par les groupes (SH) en formant l'acide 2-nitro-5- mercaptobenzoïque ; ce dernier est caractérisé par une coloration jaune intense, ce qui permet sa quantification spectrophotométrique à 412 nm.

#### ○ Réactifs et solvants

L'acide trichloracétique 10%.

Tampon phosphate de potassium pH8 (0.1M).

Réactif d'Ellman ; 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoïque) 24mg DTNB/6ml de méthanol

#### ○ Procédure

Le dosage du glutathion réduit dans les tissus s'effectue selon les étapes suivantes :

1- 250 $\mu$ l de TCA à 10% sont mélangés avec 250  $\mu$ l d'échantillon. Le mélange est agité de temps en temps pendant 15 minutes.

2- Après 15 minutes, les tubes sont centrifugés 5 minutes à 2000 tpm.

3- D'autres tubes sont préparés pour le mélange réactionnel : 100µl de réactif d'Ellman sont ajoutés à 1.7 ml de tampon, ensuite, 200 µl de surnageant sont additionnés et la lecture se fait après 5minutes à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions. Les concentrations du glutathion réduit sont exprimées en µmol par ml d'érythrocytes. Elles sont déduites à partir d'une gamme étalon de glutathion préparée dans les mêmes conditions que le dosage (voire annexe 3).

### **5. Analyse statistique**

L'étude statistique est réalisée à l'aide du système INSTAT2 MS-DOS en utilisant le test de variance univarié (one-way ANOVA) suivie du test multiple de Duncan. La signification statistique a été supposée à  $p < 0.05$ .

# *RÉSULTATS ET DISCUSSION*

## Résultats et Discussion

### 1. Test d'hémolyse

Les substances toxiques sont susceptibles d'endommager la membrane ou perturber le métabolisme cellulaire. Les principales conséquences de ces actions toxiques sont la lyse ou la mort cellulaire. Comme les érythrocytes font partie des cellules qui seront en contact avec les colorants A et B, le test d'hémolyse est l'un des tests fiables pratiqués pour déterminer leur toxicité *in vitro*.

D'après les résultats obtenus (Tableau 06, Tableau 07), nous avons noté une augmentation significative des taux d'hémolyse au niveau des érythrocytes traité par les différentes concentrations des colorants A et B. Cette augmentation était dose-dépendante pour les deux colorants (Figure 12, Figure 13).

**Tableau 06** : Effet hémolytique du colorant A sur la suspension des GR

No.	Concentration finale (mg/ml)	Pourcentage d'hémolyse (%)
1	0,0 (Contrôle)	0,08 ± 0,01
2	100	12,48 ± 2,60*
3	150	18,72 ± 2,22*
4	200	24,96 ± 3,87*
5	250	31,26 ± 1,83*
6	300	37,45 ± 3,65*

n= 8, les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD.

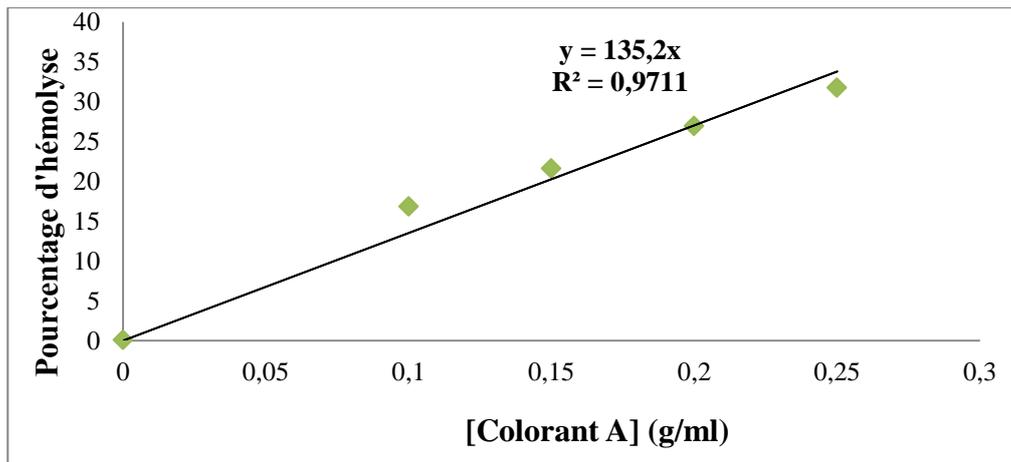
(\*) significatives avec  $0.05 < p < 0.001$

**Tableau 07** : Effet hémolytique du colorant B sur la suspension des GR

No	Concentration finale (µl/ml)	Pourcentage d'hémolyse (%)
1	0,0 (Contrôle)	0,06 ± 0,00
2	100	19,69 ± 4,68*
3	150	26,58 ± 3,66*
4	200	34,25 ± 5,84*
5	250	49,83 ± 3,18*
6	300	56,48 ± 4,56*

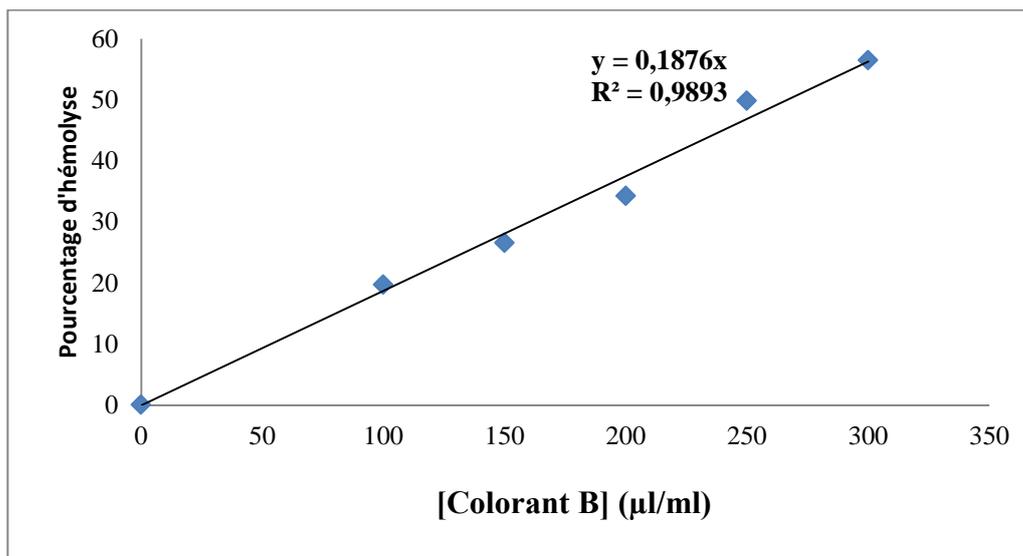
n= 8, les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD.

(\*) significatives avec  $0.05 < p < 0.001$



**Figure 12 :** Evolution de l'hémolyse en fonction de la concentration du colorant A

$$CH_{50} = 369.82 \text{ mg/ml}$$



**Figure 13 :** Evolution de l'hémolyse en fonction de la concentration du colorant B

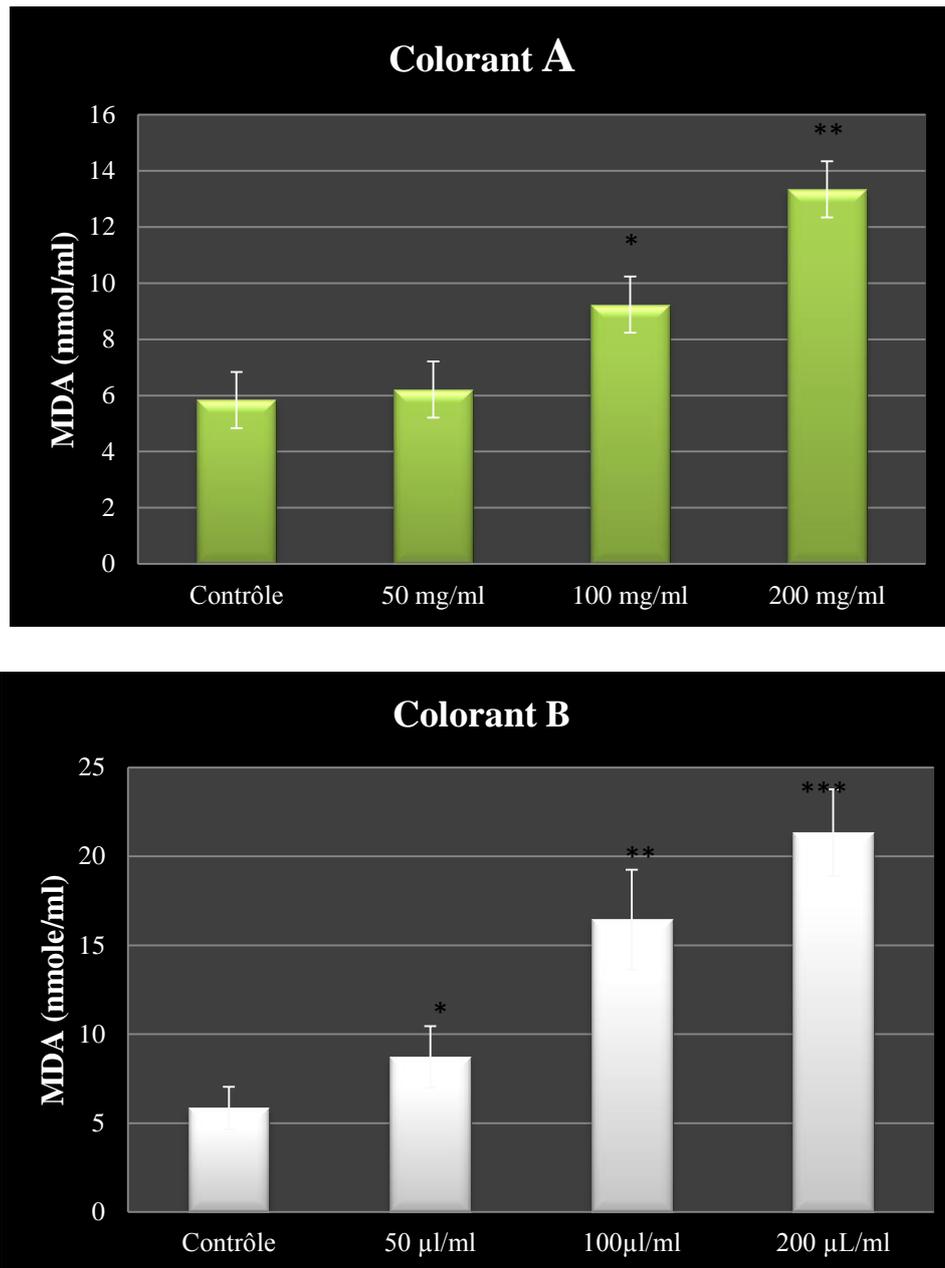
$$CH_{50} = 267.38 \text{ µl/ml}$$

Le traitement graphique des données d'hémolyse pour les deux colorants A et B en fonction de leurs différentes concentrations a permis de tracer une droite déterminant ainsi une relation linéaire et a partir de laquelle les  $CH_{50}$  sont déterminées : **369.82 mg/ml** et **267.38 µl/ml** respectivement pour A et B.

## 2. L'analyse des paramètres du stress oxydant

- Substances réactives de l'acide thiobarbiturique (TBARS)

Le traitement *in vitro* de la SGR avec des concentrations variables du colorant A (50, 100, 200 mg/ml) et B (50, 100, 200  $\mu$ l/ml) pendant 1 h à 37 ° C ont montré l'augmentation plus ou moins significative de la quantité d'MDA érythrocytaire par rapport au contrôle de manière dépendante à la concentration du colorant testé. (Figure 14)



**Figure 14:** Effet des colorants A et B sur les TBARS (MDA)

Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SD (n=8)

\* les valeurs sont significatives à partir de  $p < 0.05$

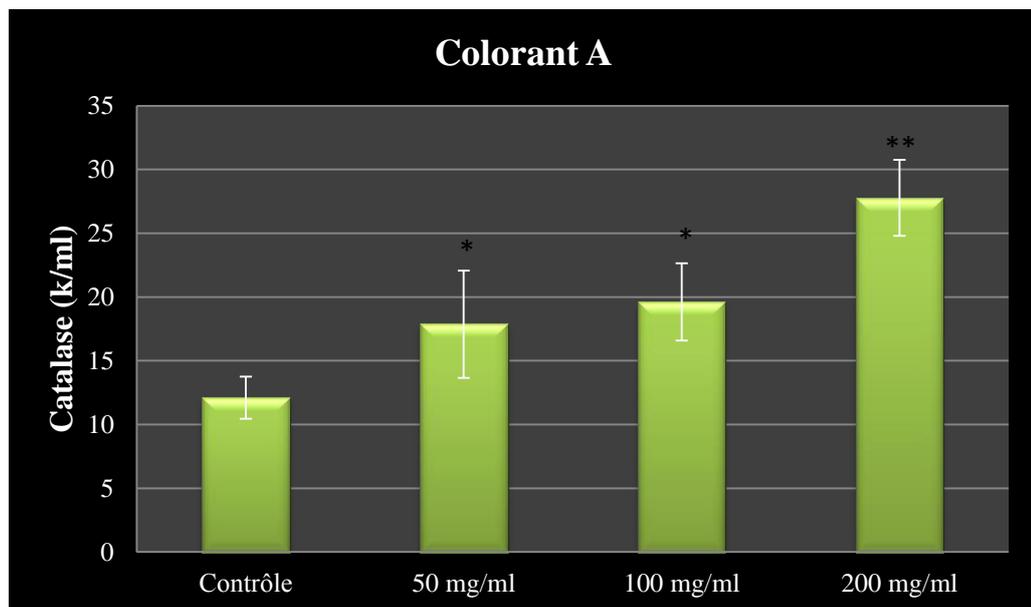
Pour le colorant A, le niveau maximum d'MDA est observé avec la concentration 200 mg/ml (+128.4%) suivie des concentrations 100mg/ml avec +58.21%, alors qu'elle était non significative pour la concentration 50 mg/ml (+6.33%).

Pour le colorant B, le taux de l'MDA a significativement augmenté avec les trois concentrations testées dont on a noté une augmentation de +365.17%, +281.45% et +49.31% avec les concentrations 200µl/ml, 100 µl/ml et 50µl/ml respectivement.

L'augmentation du taux des TBARS peuvent être dues à l'augmentation des radicaux libres en raison de l'état de stress généré par l'exposition des érythrocytes aux produits toxique [Prasanthi *et al.*, 2005; Duchnowicz *et al.*, 2005].

- **Dosage de l'activité enzymatique du catalase**

Une augmentation significative de l'activité du catalase est notée au niveau de la SGR traité avec le colorant A (Figure 15). Les pourcentages d'augmentation enregistrés : +47.66%, + 62.03% et +129,52% sont attribués aux concentrations 50,100 et 200mg/ml respectivement par rapport au contrôle.



**Figure 15:** Effet des colorants A sur l'activité enzymatique du catalase

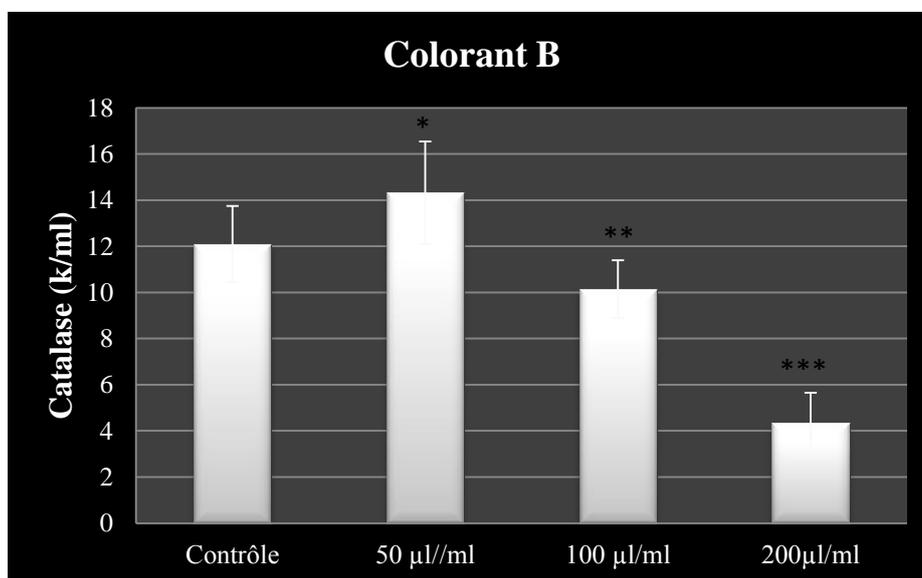
Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SD (n=8)

\* les valeurs sont significatives a partir de  $p < 0.05$

L'augmentation de l'activité du catalase peut être considérée comme effet compensatoire en réponse contre le stress oxydant résultant de l'accumulation de l' $H_2O_2$  endogène [Messarah M *et al.*, 2007; Ouali K *et al.*, 2007]. Une étude de l'effet de la tartrazine (l'une des substances constitutives du colorant A) sur les paramètres du stress oxydant chez les rats a

montré une augmentation significative de l'activité du catalase associée à l'augmentation de l'MDA et de fortes déplétions en GSH au niveau du foie, des reins et du cerveau. [William Hefner et Carl K. Winter., 2000]. Donc on peut supposer que le stress oxydant résultant au niveau des érythrocytes suite au traitement par le colorant A est dû au tartrazine.

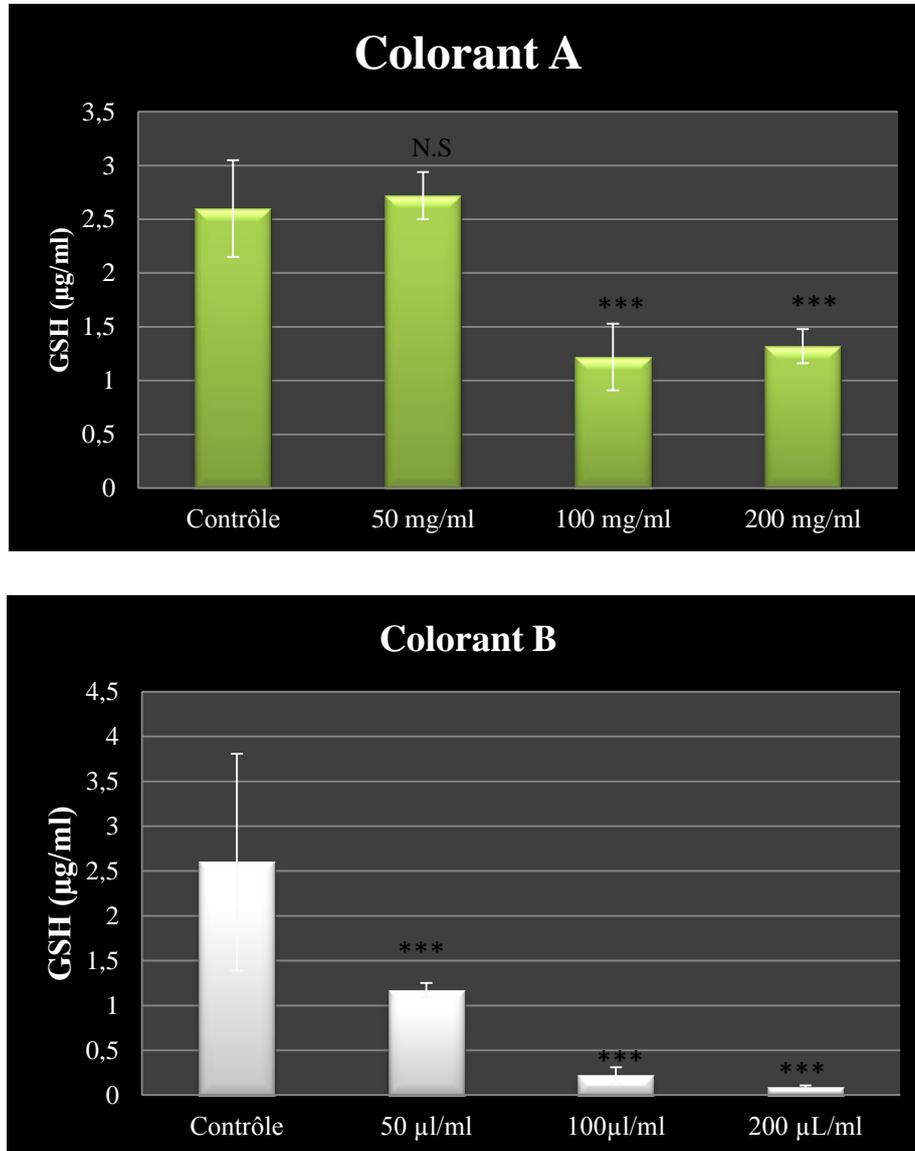
Concernant le colorant B, une augmentation significative (+18.34%) a été notée avec la concentration de 50  $\mu\text{l/ml}$  (figure 16). Cela peut être expliqué comme étant un effet compensatoire en réponse contre le stress oxydant résultant de l'accumulation de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  [Messarah M *et al.*, 2007; Ouali K *et al.*, 2007]. Cependant, l'activité du catalase a significativement diminué avec la concentration 100 $\mu\text{l/ml}$  (-16.19%) et 200 $\mu\text{l/ml}$  (-64.18%) (Figure 16), ce qui n'était pas attendu. Cette diminution peut être attribuée aux substances constitutives inconnues du colorant B. Manonmani et ses collaborateurs (2005) ont enregistré une diminution significative de l'activité du catalase en présence de substances glyquées. Ils l'ont expliquée comme étant le résultat de la glycation non enzymatique du catalase ce qui provoque son altération, donc la perte de son activité. Dans notre cas, on peut supposer qu'à partir d'un certain seuil de concentration, le colorant B peut provoquer une glycation non enzymatique du catalase dans le cas où il contient des substances glyquées à l'instar des colorants alimentaires utilisés dans la fabrication des boissons. [Ventura-Camargo B.C., 2013]



**Figure 16:** Effet du colorant B sur l'activité enzymatique du catalase  
Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SD (n=8)  
\* les valeurs sont significatives à partir de  $p < 0.05$

- Dosage du glutathion réduit

Les résultats du traitement de la SGR par les colorants A et B à différentes concentrations *in vitro* ont révélé une forte déplétion en GSH érythrocytaire et de manière dose-dépendante pour les deux colorants (Figure 17).



**Figure 17:** Effet des colorants A et B sur GSH  
 Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SD (n=8)  
 \* les valeurs sont significatives à partir de  $p < 0.05$

Pour le colorant A, la déplétion en GSH est enregistrée à partir de la concentration de 100 mg/ml puis 200mg/ml avec un taux de diminution de -55,07% et - 49,23% respectivement. Concernant le colorant B, la déplétion en GSH était plus forte que celle enregistrée avec le colorant A. les taux de diminution de GSH enregistrés avec le colorant B sont -54,99%, -91,53% et -99.23 % à 50, 100 et 200 µl/ml respectivement. la diminution du

GSH peut être due à son oxydation par les radicaux libres en GSSG oxydé. [Messarah M *et al.*, 2007].

D'une manière générale, les résultats obtenus ont révélé une augmentation significative des TBARS avec le colorant A et B ce qui indique l'augmentation de la peroxydation lipidique et le degré des dommages au niveau d'érythrocyte [Hamden K., 2008] [Adriana *et al.*, 2011]. L'augmentation ou la diminution significative de l'activité du catalase et la déplétion significative du GSH signale bien un état de stress oxydant [Messarah M *et al.*, 2007]. Donc ces données supportent l'idée que les colorant A et B induisent le stress oxydant au niveau des érythrocytes humains.

# *CONCLUSION*

## Conclusion et perspectives

Les colorants alimentaires sont connus comme additifs utilisés dans différentes préparations alimentaires, mais leur utilisation abusive peut les rendre un facteur de risque pour la santé humaine. Dans la littérature, différentes pathologies et anomalies génétiques sont supposées dues aux additifs alimentaires en générale. Le stress oxydant peut jouer dans ce cas un lien entre les additifs et les pathologies qu'ils provoquent.

Dans notre étude, les érythrocytes sont utilisés comme modèle pour étudier les effets toxiques et oxydatifs des colorants choisis, et cela pour plusieurs raisons : ils sont continuellement exposés à des tensions élevées d'oxygène, ils ne sont pas en mesure de remplacer les éléments endommagés, les lipides de membrane sont composés en partie de chaînes latérales d'acides gras poly-insaturés qui sont vulnérables à la peroxydation, et ils ont des systèmes enzymatiques anti-oxydantes.

Le traitement des érythrocytes par deux différents colorants alimentaires A et B à différentes concentrations à provoquer des effets toxiques par le biais des radicaux libres. Ces résultats ont été révélés par l'augmentation du taux des TBARS, marqueur de peroxydation lipidique, la perturbation de l'activité de catalase qui est un enzyme antioxydant et la déplétion du glutathion réduit utilisé pour la protection contre les radicaux libres.

On peut conclure que les colorants étudiés dont l'un est utilisé pour la préparation des gâteaux (Colorant A), bien que disponible sur le marché, est interdit et l'autre utilisé dans la préparation des boissons (Colorant B), de composition inconnue, ont un effet toxique sur les érythrocytes. D'après les résultats obtenus, on peut supposer un mécanisme de toxicité de ces deux colorants qui se résume dans l'effet générateur de radicaux libres, donc du stress oxydant.

En perspective, plus d'additifs alimentaires doivent être étudiés et contrôlés en utilisant d'autres tests biologiques plus fiables afin de s'assurer de leur qualité et sécurité et pour mettre fin à l'usage incontrôlé et anarchique des additifs alimentaires qui ne sont pas autorisés à l'échelle mondiale..

*RÉFÉRENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES*

## Références bibliographiques

### Documents

**Aadjadj M. (2009).** Propriétés antioxydantes et activité inhibitrice de la xanthine oxydase des extraits de la plant medicinale *Ajuga iva* (L.) Schreber. Thèse de Magister Université Mentouri, Constantine. P : 17-26.

**Adriana S., Charlene M., Marta M F. Duarte., Jossiele L., ThaisLópes., and Vania L. Loro. (2011).** Oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in human erythrocytes exposed to clomazone (in vitro). *Interdiscip Toxicol.* 4(3): 149–153.

**Alais C., LindenG., Miclo L. (2008).** <Les additifs>. *Biochimie alimentaire*, 6ème édition. P : 241-251.

**Ambali SF., Shittu M., Ayo JO., Esievo KAN., Ojo SA. (2011).** Vitamin C alleviates chronic chlorpyrifos induced alterations in serum lipids and oxidative parameters in male wistar rats. *Am. J. Pharmacol. Toxicol.* 6(4):109-118.

**Aoufi L. (2009).** L'étiquetage et la traçabilité des denrées alimentaires. Mémoire destage. Université Mentouri, Constantine. P: 16-17.

**Arriaga-Alba M., Rivera-Sanchez R., Ruiz-Pérez JN. (2008).** Comparative study of the antimutagenic properties of vitamins C and E against mutation induced by norfloxacin. *BMC Pharmacology.*

**Atkin MA., Gasper A., Ullegaddi R. (2005).** Oxydative susceptibility of unfractionated serum or plasma : response to antioxidants *in vitro* and to antioxidants supplementation. *Clin Chem*, 51, 138-2144

**Avimadj M. (2008).** Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress. *Mitochondrial medicine.* Gvozdjakova A (ed) pp 19-43.

**Amin KA., Abdel Hameid H., Abdelsttar AH. (2010).** Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food Chem.Toxicol.* 48(10):2994-2999.

**Axon A., May FE., Gaughan LE., Williams FM., Blain PG., Wright MC. (2012).** Tartrazine and sunset yellow are xenoestrogens in a new screening assay to identify modulators of human oestrogen receptor transcriptional activity. *Toxicology* 298(1-3):40-51.

**Bansal AK. (2005).** Modulation of N-nitrosodiethylamineinducedoxidative stress by vitamin E in rat erythrocytes. *Hum. Exp. Toxicol.* 2:297-302.

**Barouki R. (2006).** Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/sciences* n°3, vol.22, 266-72.

**Baskin S.I, Salem H. (1994).** Oxidant, Antioxidant and Free Radicals. Academic press Inc. 363 pp 25-62.

**Bauhadjra K. (2011).** Etude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge. Thèse de magister. Université Mouloud mammeri, Tizi-Ouzou. P40 ,41.

**Beaudeau J.L et Dominique B.R. (2005).** Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Edition médicales. *Internationales*. P : 550.

**Béatrice de Reynal-Jean., Louis Mulon., (2009).** Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires. Lavoisier, paris. P: 39.

**Béraud J., Dorsainvil E., Tandeau A. (2008).** Additif alimentaires et auxiliaires technologique » microbiologie hygiène : base microbiologiques, sous la dir.de Cristian carip, p351 - 359.

**Best B. (2002).** General antioxidant actions...Thachemistry and biochemistry of free radicals-and antioxidant enzymes. 11.

**Bourrier T. (2005).** Intolérances et allergies aux colorants et additifs. J Allergy Clin immunol, p. 68–79.

**Bourgeois C.M. (1992).** Additifs conservateurs (antibactériens, antifongiques). In Multon J.L. Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires.2ème Ed. Technique et documentation-Lavoisier, Paris, pp. 169- 190.

**Bouzidi-Bekada N. (2012).** Effet d'une supplémentation en oméga 3 sur la dyslipidémie, le statut redox et quelques marqueurs de l'inflammation chez des patients atteints d'insuffisance rénale chronique. Thèse de Doctorat, Université d'Oran. P:15.

**Bruna de Campos Ventura-Camargo1., Maria Aparecida Marin-Morales. (2013).** Azo Dyes: Characterization and Toxicity– A Review.Textiles and Light Industrial Science and Technology (TLIST) Volume 2 Issue 2, p (85-103)

**Cassee F.R., GrotenJ.P., VanBladeren P.J. (1998).** Toxicological evaluation and risk assessment of chemical mixtures. Critical Reviews in Toxicology, vol.28, p.73-101.

**Commission Codex alimentarius. (1981).** Norme générale pour l'étiquetage des additifs alimentaires vendus en tant que tels. Codex Standard 107-1981, 4 P.

**Crabtree D.V., Adler A.J. (1997).** Is B - carotene an antioxidant .medicalhypotheses 48: 183- 187.

**Delattre J. (2005).** Radicaux libres et stress oxydant ed : TECDOC. Londres-paris –new york. p : 620

**Delattre j., Durand G et jardilliers J.C. (2003).** Biochimie pathologique : Aspects moléculaires et cellulaires de la clinique. Flammarion, paris, p.

**Demple B. (1991).** Regulation of bacterial oxidative stress genes. Annu Rev Genet. 25: 315-337.

**Dizdaroglu M. (1991).** Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Biol Med* **10** (3-4) : 225-242.

**Durackova Z., Djrolo F., Hougbe H., Avode G., Attoulou V., Addra B., Kodjoh N., Kehrer J.P. (1993).** Free radcals as mediators of tissue injury and disease. Critical review in toxicology **23** (1): 21-48.

**Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Jurgens G. (1992).** The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* **13** (4) : 341-390.

**Favier A. (1997).** Le stress oxydant: intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann Biol Clin* **55** (1) : 9-16.

**Favier A. (2003).** Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans lacompréhension des maladies et potentiel thérapeutique. Laboratoire Lésions des acides nucléiques, Centre d'Étude Nucléaire de Grenoble, Paris.

**Fahmy MA., Hassan NHA., Farghaly AA., Hassan EES. (2008).** Studies on the genotoxic effect of beryllium chloride and the possible protective role of selenium/vitamins A, C and E. *Mutat. Res.* **652**:102-111.

**Gallen C., J Pla. (2013).** Allergie et intolérance aux additifs alimentaires. *Revue française d'allergologie* **53** (2013) S9-S18.

**Gerard-Monnier D., Chaudiere J. (1996).** Metabolism and antioxidant function of glutathione. *PatholBiol.* Vol **44**: 77-85.

**Gultekin F., Kumbul Doguc D. (2012).** Allergic and Immunologic Reactions to Food Additives. *Clinic Rev Allerg Immunol.* DOI 10.1007/s12016-012-8300-8

**Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C., Chapelle J.P. (2007).** Le stress oxydant Service de Biologie clinique, CHU Sart Tilman, 4000 Liège, Belgique. P: 629.

**Halliwell B., Gutteridge JMC. (1999).** Free Radicals in Biology and Medicine. In Halliwell B., Gutteridge JMC, eds : 1-543.

**Hamadi N. (2010).** Effet du resveratrol sur les défenses antioxydantes chez les rats rendus diabétiques par l'injection de la streptozotocine. Thèse de Magister. Université Mentouri, Constantine. P : 16-20-21.

**Julie EB., Joann EM. (2009).** Vitamins C and E and Beta Carotene Supplementation and Cancer Risk. A Randomized Controlled Trial. *J. Natl Cancer Inst.* **101**(1):14-23.

**Justine Odile. (2005).** Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse de Doctorat. Université Paul-Sabatier de Toulouse. P : 14.

**Kehal F. (2013).** Utilisation de l'huile essentielle de *Citrus limon* agent conservateur et aromatique dans la crème fraîche. Thèse de Magister. Université Constantine1. P : 16.

**Krinsky N.I. (1993).** Actions of carotenoids in biological systems. *Annu. Rev. Nutr.* **13**, 561-87.

**Verger P., Kroes R., Muller D., Lambe Visconti A.(2002).** Assessment diet... Food and Chemical Toxicology, vol.40, p. 327-385.

**Layachi N. (2013).**L'effet combiné des vitamines C (Acide ascorbique) et E ( $\alpha$ - tocophérol) sur la toxicité du cadmium chez les rats. Thèse de Doctorat. Université Badji Mokhtar, Annaba. P: 16-26.

**Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz A.G., Ahn B.W., Shaltiel S., Mc Cord JM. (2000).** The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med.* Vol 108: 652-659.

**Mates J.M., Perez-Gomez C., Nunez de Castro I. (1999).** Antioxydant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* 32:595-603

**Messarah M., Boulakoud M.S.,Boumendjel A., El FekiA. (2007).** The impact ofthyroid activity variations on some oxidizing- stress parameters in rats *Animal biology and pathology / Biologie et pathologie animals.* C. R. Biologies 330 107–112

**Michael J Gibney.,Aine Hearty., Ailene Connolly. (2010).** Guidance on Food Additives. University College, Dublin. P : 8.

**Mpountoukas P., Pantazaki A., Kostareli E., Christodoulou P., Kareli D., Poliliou S., Mourelatos C., Lambropoulou V., Lialiaris T. (2010).** Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. *Food Chem. Toxicol.* 48(10):2934-2944.

**Nakajima K., Nakano T., Tanaka. (2006).** The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis : The comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma. *Clin Chim Acta,* 367, 36-47.

**Nomura K., Imai H., Koumura T., Kobayashi T., Nakagawa Y. (2000).** Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from

**Ohare C.A. (2007).** La famille des radicaux libres. *Journal de la nutrition* 1-2

**Ouali k., Trea F., Toumi M.L., Bairi M., Siaud P and Guellati M. (2007).** Oxidative stress in STZ induced experimental diabetes in rats is associated with changes of antioxidant status of heart tissue. *Science & Techuollogie C-N25/18-23*

**Oudiot C. (1992).** Rôle et intérêt des additifs alimentaires en technologie alimentaire. In Multon J.L. *Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires.*2ème Ed. Technique et documentation-Lavoisier, Paris, pp. 34-45

**Papa Madieye G. (2007).** Phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-Erythrocytaire sur le globule rouge. Thèse de Doctorat, Université Louis pasteur-strasbourg I, Institut Gilbert laustriat, Faculté de pharmacie, Allemagne. P : 21-41.

**Peynet., J.Beaudeau., J.L.Legrand, A. (2005).** Stress oxydant et athérosclérose. In : Delattre J, Beaudoux JL, Bonnefont-Rousselot D. Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. *Immuno-analyse et Biologie spécialisée*. Vol 21: 312-135.

**Pinemail J., Meurisse M.,Limet R.,DefraigneJ.O. (1999).** L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaisseaux. Coeur .Poumons* 4(5) : 359-370.

**Powers, S.K., Lennon., S.L. (1999).** Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc. Nutr. Soc.* **58**: 1025-1033.

**Park M., Park HR., Kim SJ., Kim MS., Kong KH., Kim HS., Gong EJ., Kim ME., Kim H.S., Lee BM., Lee J. (2009).** Risk assessment for the combinational effects of food color additives: neural progenitor cells and hippocampal neurogenesis. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 72(21-22):1412-1423.

**Rousse M., Luccion F. (2003).** Les antioxydants. Laboratoire de biochimie et sémiologie cliniques, faculté de pharmacie de Marseille, France, Vol=2, N°=4.

**Régulation (EC) N°1333/2008 of the European Parliament and of the Council** on food additives Official Journal of the European Union ;L 186, 30.6.1989, p. 27.

**Saad A., Virella G., Chassereau C. (2006).** XLDL immune complexes activate complement and induce cytokine production by MonoMac 6 cells and human macrophages. *J Lipid Res*, 47, 1975-1983.

**Sanchez-Moreno C., Paniague M., Madrid A., Martin A (2003).** Protective effect of vitamin C against the ethanol mediated toxic effects on human brain glial cells. *J. Nutr. Biochem.* 14:606-613.

**Serafini M.,LaranjinhaJ.A.,AlmeidaL.M.,Maiani G. (2000).** Inhibition of human LDL lipid peroxidation by phenol-rich and their impact on plasma total antioxidant capacity in humans. *J Nutr Biochem.* Vol 11:585-590.

**Soubra L. (2008).** Évaluations scientifiques des risques toxiques liés à certaines substances chimiques (Additifs alimentaires) et contaminants (Mycotoxines). Thèse pour obtenir le grade de Docteur, Paris, l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech). P : 21, 22,40.

**Vertuani S., Angusti A., Manfredini S. (2004).** The antioxidants and pro-oxidants network: an overview. *Curr Pharm Des.* Vol 10: 1677-1694.

**Visweswaran B., Krishnamoorthy G. (2012).** Oxidative Stress by Tartrazine in the Testis of Wistar Rats. *IOSR J. Pharm. Biol. Sci.* 2(3):44-49

**Walton K., Walker R., Van DS., Jjm S., Castell JV. (1999).** The application of in vitro in the derivation of the acceptable daily intake of food additives. *Food Chem. Toxicol.* 37:1175-1197.

**William Helferich and Carl K. (2000).** Food toxicology. Ed: ISBN 0-8493-2760-1. CRC Press, Boca Raton London New York Washington, D.C. p 222.

**Yonglin G., Chunmei L., Jingyu S., Huaxian Y., Xiulin A., Haizhu J. (2011).** Effect of food azo dye tartrazine on learning and memory functions in mice and rats, and the possible mechanisms involved. *J. Food Sci.* 76(67):T125-T129.

**Zoë G., Olga Pet Elizabeth V. (2011).** Démarches d'évaluation des risques relatifs aux contaminants alimentaires cancérigènes. Vol. 1, No. 1, 19-39.

**Internet : Sites web**

- [1][http://www.synpa.org/accueil/espace\\_reglementation/alimentation\\_humaine/additifs\\_alimentaires/additifs\\_alimentaires\\_\\_presentation/role\\_de\\_ladditif](http://www.synpa.org/accueil/espace_reglementation/alimentation_humaine/additifs_alimentaires/additifs_alimentaires__presentation/role_de_ladditif). Consulté le : 2/12/2013
- [2][sites.ostralo.net/additifs\\_alimentaires/index.htm](http://sites.ostralo.net/additifs_alimentaires/index.htm). Consulté le : 22/12/2013
- [3]M. El Atyqy. 2010, Les additifs alimentaires [En ligne]  
<http://www.azaquar.com/doc/additifs-alimentaires>. Consulté le 09/01/2014
- [4]<http://toxikoa.wordpress.com/2011/06/13/les-additifs-alimentaires/>. Consulté le : 18/12/2013
- [5][http://www.codexalimentarius.net/gsfonline/reference/techfuncs.html?lang\\_fr](http://www.codexalimentarius.net/gsfonline/reference/techfuncs.html?lang_fr). Consulté le : 06/01/2014
- [6][http://www.lediet.fr/new\\_dico\\_paragrahe.html?idl=&&id2=50](http://www.lediet.fr/new_dico_paragrahe.html?idl=&&id2=50). Consulté le 25/01/2014
- [7][http://pip.coleacp.org/files/documents/COLEACP\\_Manuel\\_3\\_FR\\_0.pdf](http://pip.coleacp.org/files/documents/COLEACP_Manuel_3_FR_0.pdf). Consulté le : 01/04/2014)
- [8][www.institutdanone.org/objectif-nutrition/le-risque-chimique-en-sécurité-sanitaire-des-aliment/dossier-le-risque-chimique-en-securite-sanitaire-des-aliments/](http://www.institutdanone.org/objectif-nutrition/le-risque-chimique-en-sécurité-sanitaire-des-aliment/dossier-le-risque-chimique-en-securite-sanitaire-des-aliments/). Consulté le : 02/04/2014
- [9][www.institutdanone.org/objectif-nutrition/le-risque-chimique-en-sécurité-sanitaire-des-aliment/dossier-le-risque-chimique-en-securite-sanitaire-des-aliments/](http://www.institutdanone.org/objectif-nutrition/le-risque-chimique-en-sécurité-sanitaire-des-aliment/dossier-le-risque-chimique-en-securite-sanitaire-des-aliments/). Consulté le : 02/04/2014
- [10][www.notre-planete.info](http://www.notre-planete.info) > Écologie > Alimentation et santé. Consulté le : 21/04/2014
- [11][ww.utc.fr/~cochet/BT10JPB/additifs3.pdf](http://ww.utc.fr/~cochet/BT10JPB/additifs3.pdf). Consulté le : 21/04/2014
- [12][cfa84patis.free.fr/additifs-alimentaires.pdf](http://cfa84patis.free.fr/additifs-alimentaires.pdf). Consulté le : 25/02/2014
- [13][colorants.aliments.free.fr/Production.html](http://colorants.aliments.free.fr/Production.html). Consulté le : 25/03/2014
- [14][www.angelfire.com/journal/sunnah/Sciences/poudres.html](http://www.angelfire.com/journal/sunnah/Sciences/poudres.html). Consulté le : 12/03/2014
- [15][http://sante-guerir.notrefamille.com/v2/services-sante/article-sante.asp?id\\_guerir=11628](http://sante-guerir.notrefamille.com/v2/services-sante/article-sante.asp?id_guerir=11628)>. Consulté le : 2/3/2014
- [16][www.sante-parapharmacie.com/.../stress-oxydatif-omegakrill-antioxy](http://www.sante-parapharmacie.com/.../stress-oxydatif-omegakrill-antioxy). Consulté le : 22/04/2014
- [17][blogperso.univ-rennes1.fr/.../Cours\\_L3\\_nutraceutique\\_-\\_additifs\\_alimen...](http://blogperso.univ-rennes1.fr/.../Cours_L3_nutraceutique_-_additifs_alimen...) Consulté le : 25/4/2014
- [18][protocolsonline.com/.../phosphate-buffered-saline-pb..](http://protocolsonline.com/.../phosphate-buffered-saline-pb..) Consulté le : 25/3/2014
- [19]<http://www.dsest.umontreal.ca/documents/20Chap14.pdf>. Consulté le : 25/3/2014
- [20]<http://www.bon-coin-sante.com/blog-sante-sans-prise-de-tete/alimentation-nutrition/liste-des-additifs-alimentaires-dangereux-pour-la-sante/>. Consulté le : 25/3/2014

# *ANNEXES*

## Annexe 1

### Formulaire de consentement

Je soussigné(e), (nom, prénom) ....., demeurant à ....., déclare que M<sup>elle</sup> ....., étudiante de Master II à l'université 08 mai 1945 - Guelma, m'a proposé de participer à une étude organisée dans le cadre de la préparation de projet de fin d'études

Cette étude a pour objectif l'évaluation des effets de certains additifs alimentaires par la mise en œuvre de test de toxicité *in vitro* en utilisant les érythrocytes humains.

Il m'a été précisé que je suis libre d'accepter ou de refuser.

J'ai bien reçu et bien compris les informations contenues dans ce document.

Cette étude comporte, de manière confidentielle, avec un numéro d'identification protégeant mon anonymat :

- ✓ un questionnaire médical et nutritionnel;
- ✓ deux prises de sang veineux (deux fois un tube de 4 ml) permettant la réalisation du test de toxicité *in vitro*

### **J'ACCEPTE DE PARTICIPER A CETTE ETUDE DANS LES CONDITIONS PRECISEES CI-DESSUS**

Mon consentement ne décharge pas les organisateurs de la recherche de leurs responsabilités. Je conserve tous mes droits garantis par la loi. Si je le désire, je serai libre à tout moment d'arrêter ma participation. J'en informerai alors la personne chargée de l'étude.

Les données qui me concernent resteront strictement confidentielles. Je n'autorise leur consultation que par des personnes qui collaborent à la recherche désignées par les organisateurs.

Fait à ....., le.....

Signature du volontaire précédée  
de la mention "Lu et approuvé"

Signature de L'étudiante

## Annexe 2

### Les colorants utilisés

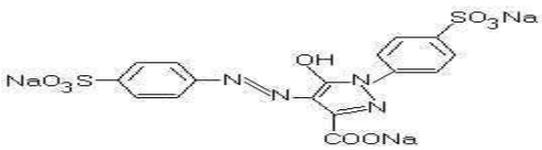
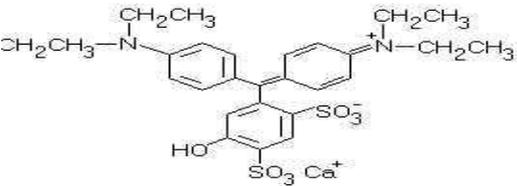
\***Colorant A : E 102- E 131** : Colorant alimentaire en poudre hydrosoluble ultra-concentré *vert pistache*, pour teinter vos préparations dans la masse (gâteau, pâtes, pastillages, crèmes, etc.).

A consommer avant le : 12/2014

Date de fabrication le : 05/2012

- **E 102 ou tartrazine** : colorant jaune appartenant à la famille des composés diazoïques, sous la forme d'un sel tri sodique. Utilisé pour les glaces, crèmes glacées, confiserie et croutes de fromages
  - **E 131 ou bleu patenté V** : colorant bleu utilisé en Europe soit seul soit en combinaison dans certaines denrées alimentaires. Son utilisation est interdite en Australie, aux Etats-Unis et en Norvège car il peut provoquer des allergies. Utilisé avec la tartrazine (E 102) pour faire la couleur verte des sirops de menthe [17]
- \* **Colorant B** : Colorant blanc pour les boissons gazeuses (Usine à Guelma)

**Tableau 08:** La structure moléculaire et origine de colorant E102-E131 [17]

Nom	Origine	Structure chimique
Tartazine	Artificiel	
Bleu patenté V	Artificiel	

### **Préparation des solutions mères des colorants utilisés**

#### **○ Colorant A**

-Peser 50g de colorant poudre (E102-E131) dans le verre de montre

-Mettre cette quantité dans le bécher, ensuite ajouter une quantité de l'eau distillée en rinçant le verre de montre

-Agiter jusqu'à dissoudre complètement le colorant, puis compléter le volume par l'eau distillée à 50ml

#### **○ Colorant B**

-Prélever 50ml de colorant liquide (boisson gazeuse) à l'aide d'une pipette jaugée

-Placer dans une éprouvette, et compléter avec l'eau distillé jusqu'au 100 ml

-Agiter pour rendre homogène

## Annexe 3

### Préparation de produit et réactifs utilisés

#### Tampon phosphate saline (PBS)

- Pour préparer 1000 ml de PBS 1x :
- Commencez avec 800 ml d'eau distillée:
- Ajouter 8 g de NaCl (137m M)
- Ajouter 0,2 g de KCl (2,7mM)
- Ajouter 1,44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,44m M)
- Ajouter 0,24 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,24m M)
- Ajuster le pH à 7,4 avec HCl ou NaOH
- Ajouter de l'eau distillée jusqu'à un volume total de 1000ml (1 litre)
- Mettre la solution dans un flacon, puis Stocker à température ambiante [18]

#### Eau physiologies (NaCl 0,9%)

- Peser 9g de NaCl dans le verre de montre
- Mettre cette quantité dans le bécher
- Ajouter 200ml eau distillé en rinçant le verre de montre
- Agiter jusqu'à dissoudre complètement le NaCl
- Verser le contenu du bécher dans la burette de 1000ml puis compléter le volume par eau distillée à 1000ml
- Mélanger puis stoker dans des flacons transparents

#### Hydroxyde de sodium (NaOH)

- Peser 0,2g de NaOH dans le verre de montre
- Mettre cette quantité dans le bécher
- Ajouter 100ml d'eau distillée

#### Réactif thioartibitricacid (TBA)

- Peser 0,67g de TBA dans le verre de montre
- Mettre cette quantité dans le bécher
- Ajouter à 100ml de NaOH
- Agiter jusqu'à dissoudre complètement de TBA

**L'acide trichloroacétique (TCA 20%)**

- Peser 20g de TCA dans le verre de montre
- Mettre cette quantité dans le bécher
- Ajouter à 100 ml d'eau distillée
- Agiter jusqu'à dissoudre complètement de TBA

**L'acide trichloroacétique (TCA 10%)**

- Diluer TCA20% à 10%
- Donc : 10ml TCA20% +10ml H<sub>2</sub>O d'eau distillée

**Réactif d'Ellman (DTNB)**

- Peser 60mg de DTNB dans le verre de montre
- Mettre cette quantité dans le bécher
- Ajouter 15ml de méthanol
- Agiter jusqu'à dissoudre complètement de DTNB

**Hydrogène peroxyde(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

- Prélever 200µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à l'aide d'une micropipette
- Placer dans une fiole jaugée de 100ml et compléter le volume avec le PBS
- Agiter pour rendre homogène

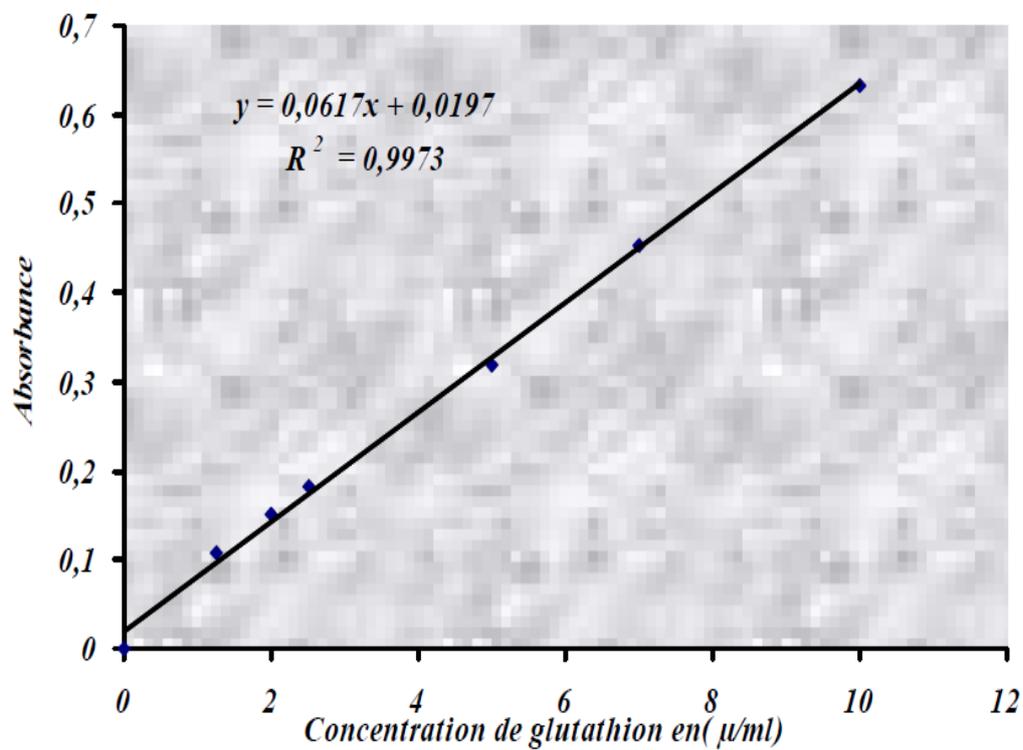
**Préparation de la gamme étalon du GSH**

- Une série de 5 concentrations standards de glutathion est préparée à partir d'une solution mère à 10mM.
- Pour la préparation de cette solution, on pèse 3.15 mg de glutathion réduit pour 10ml d'eau distillée.

Le système de dilution de ces standards est donné dans le tableau 09

**Tableau 09 : La gamme du glutathion réduit standard**

Numéro	Concentration du glutathion réduit	Volume du glutathion standard	Volume de diluant (eau distillé)
4	10 Mm	50 µl	0 µl
3	5 Mm	50 µl	25 µl
2	2.5 mM	25 µl	25 µl
1	1.25 mM	12.5 µl	100 µl
0	0 mM	0 µl	50 µl



**Figure 18:** Courbe d'étalonnage de Glutathion réduit GSH.

## Annexe 4

Tableau 10 : Les principales catégories d'additifs utilisés dans l'Union européenne [19]

Codes	Catégorie	Fonction dans l'aliment
<b>E100 à E180</b>	Colorants	Intensifier ou donner une couleur.
<b>E200 à E285</b>	Conservateurs	Allonger la durée de conservation en inhibant le développement des bactéries ou des moisissures.
<b>E300 à E321</b>	Antioxydants (antioxygène)	Limiter les phénomènes d'oxydation (rancissement des graisses ou brunissement des fruits et légumes coupés, par exemple).
<b>E325 à E380</b>	Acidifiants/ Correcteurs d'acidité	Agir sur le degré d'acidité.
<b>E400 à E495</b>	Agents de texture (épaississants, stabilisants, émulsifiants, gélifiants, texturants)	Donner une consistance particulière.
<b>E500 à E585</b>	Catégorie « fourre-tout » comprenant des poudres à lever, l'acide chlorhydrique, l'acide sulfurique, des phosphates, des	Remplir des rôles variés.

---

correcteurs d'acidité		
<b>E620 à E650</b>	Exhausteurs de goût	Renforcer ou améliorer le goût d'un aliment par une action sur l'intensité de notre perception gustative.
<b>E900 à E914</b>	Agents d'enrobage	Donner un aspect externe particulier (aspect brillant ou couche protectrice).
<b>E938 à E949</b>	Gaz d'emballage/ gaz propulseurs	Allonger la durée de conservation des aliments.
<b>E950 à E968</b>	Édulcorants	Conférer une saveur sucrée.
<b>E1100 à E1105</b>	Enzymes alimentaires	Faciliter la fabrication de certains produits alimentaires.
<b>E1404 à E1451</b>	Amidons modifiés	Épaissir une préparation.

---

## Annexe 5

Figure19: Les additifs alimentaires industriels dangereux [20]

<b>Liste des additifs alimentaires industriels dangereux</b>	
<b>Très Dangereux</b>	E123 E510 E513 E527
<b>Dangereux</b>	E102 E110 E120 E124 E127 E129 E155 E180
	E201 E220 E222 E223 E224 E228 E233 E242
	E400 E401 E402 E403 E404 E405 E501 E502
	E503 E620 E636 E637
<b>Cancérogènes</b>	E131 E142 E153 E210 E212 E213 E214 E215
	E216 E219 E230 E240 E249 E280 E281 E282
	E283 E310 E954
<b>Troubles gastriques</b>	E338 E339 E340 E341 E343 E450 E461 E462
	E463 E465 E466
<b>Maladies cutanées</b>	E151 E160 E231 E232 E239 E311 E312 E320
	E907 E951 E1105
<b>Troubles intestinaux</b>	E154 E626 E627 E628 E629 E630 E631 E632
	E633 E634 E635
<b>Tension artérielle</b>	E154 E250 E252
<b>Dangereux pour enfants</b>	E270
<b>Interdits</b>	E103 E105 E111 E121 E123 E125 E126 E130
	E152 E211 E952
<b>Soupçonneux</b>	E104 E122 E141 E171 E173 E241 E477

# *RÉSUMÉ*

## Résumé

Aujourd'hui, les colorants alimentaires font partie intégrante de notre société de consommation. Leur utilisation à grande échelle dans l'aliment représente une menace pour les populations humaines exposées. Il a été prouvé que l'exposition à certains colorants alimentaires provoque des dommages au système immunitaire, au cerveau et autres affections par le biais des radicaux libres.

Dans notre étude, l'effet toxique et oxydant de deux colorants alimentaires utilisés dans la préparation des gâteaux (Colorant A) et les boissons (Colorant B) sont étudiés *in vitro* en utilisant les érythrocytes comme modèle expérimental. Pour ce but, deux tests sont réalisés : à différentes concentrations du colorant A et B. Ce test permet de montrer le degré de toxicité des colorants étudiés et de déterminer leurs  $CH_{50}$ . Le deuxième est le test de l'effet oxydatif des colorants choisis où trois concentrations sont testées par colorant. 50, 100 et 200 mg/ml pour le colorant A et 50, 100 et 200  $\mu$ l/ml pour le colorant B. Les paramètres du stress oxydant pris en considération sont : l'MDA, le GSH et l'activité enzymatique du catalase.

Les résultats obtenus ont montré une relation linéaire entre le pourcentage d'hémolyse et la concentration en colorant A ou B d'où les  $CH_{50}$  correspondantes sont déduites : 369.82 mg/ml pour A et 267.38  $\mu$ l/ml pour B. Concernant l'effet oxydatif, les résultats obtenus ont montré une augmentation de l'MDA : +6.33%, +58.21% et +128.4% pour le colorant (A) à 50, 100 et 200 mg/ml respectivement. Pour le colorant B, les concentrations 50, 100 et 200  $\mu$ l/ml ont donné +49.31%, +281.45% et +365.17% respectivement. Une déplétion du GSH est aussi enregistrée : Colorant A à 100 et 200 mg/ml a provoqué une diminution de -55,07% et -49,23% respectivement. Le colorant B, les concentrations 50, 100 et 200  $\mu$ l/ml ont donné -54,99%, -91,53% et -99.23 % respectivement. L'activité enzymatique du catalase a significativement augmenté avec le colorant A : +47.66%, + 62.03% et +129,52%. Cependant, pour le colorant B, une augmentation de +18.34% a été enregistrée juste à 50 $\mu$ l/ml, puis une diminution de -16.19% et -64.18% ont été enregistrées à 100 et 200 $\mu$ l/ml respectivement.

Cette étude nous permet de suggérer que les colorants étudiés ont été en mesure de modifier l'équilibre de l'oxydation et la stabilité de la membrane des érythrocytes humains.

**Mots clés:** Colorants alimentaires, stress oxydant, érythrocytes humains

## Abstract

Today, food dyes are part of the consumer society. Their widespread use in the food poses a threat to the exposed human populations. It has been proven that exposure to certain food dyes cause damage to the immune system, brain and other diseases through free radicals generation.

In our study, the oxidizing and toxic effect of two food dyes used in the preparation of cakes (dye A) and drinks (dye B) were studied *in vitro* using erythrocytes as an experimental model. For this purpose, two tests are performed: the hemolysis test with different concentrations of dye A and B. This test can show the degree of toxicity of the studied dyes and determine their  $CH_{50}$ . The second test is the oxidative effect of the selected dyes which are tested using three concentrations of each : 50, 100 and 200 mg / ml for the dye A and 50, 100 and 200  $\mu$ l / ml for the dye B. The considered oxidative stress parameters are: MDA, GSH and the enzymatic activity of catalase.

The results obtained showed a linear relation ship between the percentage of hemolys is and the dye concentration of A or B from which the corresponding  $CH_{50}$  are deduced : 369.82 mg/mL and 267.38 $\mu$ l/ml for A and B respectively. Regarding the oxidative effect, the results obtained showed an increase of MDA: +6.33%, and +128.4% +58.21% for the dye (A) at 50, 100 and 200 mg / ml respectively. For the dye B, concentrations 50, 100 and 200  $\mu$ l / ml gave +49.31%, +281.45% and +365.17% % respectively. Depletion of GSH is also recorded with A dye at 100 and 200 mg / ml resulted in a decrease of -55.07% and - 49.23% respectively. The dye B, concentrations 50, 100 and 200  $\mu$ l / ml gave -54.99% -91.53% and -99.23% respectively. The enzymatic activity of catalase was significantly increased with the dye A: +47.66% + 62.03% to 129.52%. However, for the dye B, the increase was registered just at 50 $\mu$ l/ml +18.34%, then it decreased with -16.19% and -64.18% at 200 $\mu$ l/ml and 100 respectively.

This study allows us to suggest that the studied dyes were able to alter the balance of the oxidative stress and the stability of the human erythrocyte membrane.

Keywords: Food Dyes, oxidative stress, human erythrocytes

## ملخص

اليوم، الأصباغ الغذائية هي جزء من المجتمع الاستهلاكي لدينا. استعمالها على نطاق واسع في الغذاء يشكل خطراً على البشر. وقد ثبت أن التعرض لبعض الأصباغ الغذائية تسبب ضرراً على الجهاز المناعي والدماغ وغيرها من الأمراض من خلال الجذور الحرة. في دراستنا، تمت دراسة التأثير السمي للأكسدة لاثنتين من الأصباغ الغذائية المستخدمة في إعداد الكعك (صبغ A) والمشروبات (صبغ B) ودرس في المختبر باستخدام خلايا الدم الحمراء بمثابة نموذج تجريبي. لهذا الغرض، يتم تنفيذ اختبارين: اختبار انحلال الدم بتركيزات مختلفة من الصبغة A و B يمكن لهذا الاختبار أن يظهر درجة سمية الأصباغ دراستها وتحديد CH<sub>50</sub> لهم. الاختبار الثاني هو تأثير الأكسدة من الأصباغ المحددة التي يتم اختبارها من قبل ثلاثة تراكيز. 50 و 100 و 200 ملغ / مل لصبغة A و 50 و 100 و 200 ميكرو لتر / مل لصبغة B.

معلومات الأكسدة التي تؤخذ بعين الاعتبار هي: MDA، GSH، ونشاط انزيم الكتلاز ،

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها وجود علاقة خطية بين النسبة المئوية للانحلال الدم وتركيز الصبغة A أو B والتي يتم استنتاجها من CH<sub>50</sub> المقابلة: 369.82 ملغ / مل بالنسبة إلى A و 267.38 ميكرو لتر / مل بالنسبة إلى B. وفيما يتعلق تأثير الأكسدة. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها بزيادة MDA بنسبة قدرها +6.33 %، و +128.4 % +58.21 % للصبغة (A) في 50، 100 و 200 ملغ / مل على التوالي. لصبغة B، تراكيز 50، 100 و 200 ميكرو لتر / مل أعطى +49.31 %، +281.45 و +365.17 % على التوالي. يتم تسجيل استنزاف الجلوتاثيون أيضاً: أدت لصبغ في 100 و 200 ملغ / مل في بإنخفاض قدره -55.07 % و -49.23 % على التوالي. الصبغة B تراكيز 50، 100 و 200 ميكرو لتر / مل أعطى -54.99 % -91.53 % -99.23 % على التوالي. تم زيادة النشاط الأنزيمي من الكتلاز بشكل كبير مع الصبغة A : +47.66 % +62.03 % ليصل إلى 129.52 %، و من أجل صبغة B، تم تسجيل زيادة +18.34 % فقط و 50 ميكرو لتر / مل ، ثم انخفضت وسجلت -16.19 % -64.18 % في 200 ميكرو لتر / مل و 100 على التوالي.

هذه الدراسة تشير إلى أن الأصباغ التي درست كانوا قادرين على تغيير توازن الأكسدة والاستقرار في غشاء كريات الدم الحمراء البشري. الكلمات الرئيسية: ملونات الأغذية، الأكسدة، الكريات الحمراء الإنسان

Noms: Chenichene, Halaci, Zitouni  
Prénoms : Amel, Hanane, Souad

Date de soutenance: 22/06/2014

Thème : Évaluation, *in vitro*, de la toxicité de deux colorants alimentaires par le biais du stress oxydant

## Résumé

Aujourd'hui, les colorants alimentaires font partie intégrante de notre société de consommation. Leur utilisation à grande échelle dans l'aliment représente une menace pour les populations humaines exposées. Il a été prouvé que l'exposition à certains colorants alimentaires provoque des dommages au système immunitaire, au cerveau et autres affections par le biais des radicaux libres.

Dans notre étude, l'effet toxique et oxydant de deux colorants alimentaires utilisés dans la préparation des gâteaux (Colorant A) et les boissons (colorant B) sont étudiés *in vitro* en utilisant les érythrocytes comme modèle expérimental. Pour ce but, deux tests sont réalisés : le test d'hémolyse à différentes concentrations du colorant A et B. Ce test permet de montrer le degré de toxicité des colorants étudiés et de déterminer leurs  $CH_{50}$ . Le deuxième est le test de l'effet oxydatif des colorants choisis où trois concentrations sont testées par colorant. 50, 100 et 200 mg/ml pour le colorant A et 50, 100 et 200  $\mu$ l/ml pour le colorant B. Les paramètres du stress oxydant pris en considération sont : l'MDA, le GSH et l'activité enzymatique du catalase.

Les résultats obtenus ont montré une relation linéaire entre le pourcentage d'hémolyse et la concentration en colorant A ou B d'où les  $CH_{50}$  correspondantes sont déduites : 369.82 mg/ml pour A et 267.38  $\mu$ l/ml pour B. Concernant l'effet oxydatif, les résultats obtenus ont montré une augmentation de l'MDA : +6.33%, +58.21% et +128.4% pour le colorant (A) à 50, 100 et 200 mg/ml respectivement. Pour le colorant B, les concentrations 50, 100 et 200  $\mu$ l/ml ont donné +49.31%, +281.45% et +365.17% respectivement. Une déplétion du GSH est aussi enregistrée : Colorant A à 100 et 200 mg/ml a provoqué une diminution de -55,07% et - 49,23% respectivement. Le colorant B, les concentrations 50, 100 et 200  $\mu$ l/ml ont donné -54,99%, -91,53% et -99.23 % respectivement. L'activité enzymatique du catalase a significativement augmenté avec le colorant A : +47.66%, + 62.03% et +129,52%. Cependant, pour le colorant B, une augmentation de +18.34% a été enregistrée juste à 50 $\mu$ l/ml, puis une diminution de -16.19% et -64.18% ont été enregistrées à 100 et 200 $\mu$ l/ml respectivement.

Cette étude nous permet de suggérer que les colorants étudiés ont été en mesure de modifier l'équilibre de l'oxydation et la stabilité de la membrane des érythrocytes humains

Mots clés: Colorants alimentaires, stress oxydant, érythrocytes humains

Laboratoire de Biologie, Département de Biologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie, et sciences de la terre et l'univers, Université de 8 Mai 1945 Guelma

### Membres du Jury:

Président (e) : Mme Braik. A	M.A.A	Université de Guelma
Examineur : Dr Souiki. L	M.C.A	Université de Guelma
Encadreur : Mme Boumaza. A	M.A.A	Université de Guelma

