

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université 8 Mai 1945 Guelma



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de Terre et de l'Univers
Département de Biologie
Laboratoire de domiciliation Laboratoire de Biologie, Eau et Environnement (LBEE)

THÈSE
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
DOCTORAT EN 3^{ème} CYCLE

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Biochimie Appliquée

Présentée par

CHAMLAL Naima

Intitulée

Etude et évaluation génotoxique des viandes transformées

Soutenue le : 25/01/2022

Devant le Jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

Mme. GRARA Nedjoud	Professeur	Univ. de Guelma	Présidente
Mr. BENOURETH Djamel Eddine	Professeur	Univ. de Guelma	Encadreur
Mme. KHALLEF Messaouda	MCA	Univ. de Guelma	Co-encadreur
Mme. BENDJEDDOU Dalila	Professeur	Univ. de Guelma	Examinatrice
Mr. BRANES Zidane	Professeur	Univ. d'Annaba	Examinateur
Mr. MERAD Tarek	Professeur	Univ. d'Annaba	Examinateur

Année Universitaire : 2020/2021

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail

À mon père, qui a su me communiquer le goût du travail, de l'effort afin d'aller au bout des choses. Qu'il voit dans cet aboutissement l'expression des valeurs qu'il m'a transmises.

À ma mère, qui m'a toujours entouré, m'a accompagné et a toujours cru en mes capacités. Qu'elle trouve ici le fruit de son dévouement, de sa disponibilité et de ses qualités humaines.

À mon mari, qui par son Amour et son dévouement de tous les jours m'a permis de me consacrer exclusivement à ces travaux. Qu'il retrouve dans ce travail le reflet de son propre investissement.

À mon cher fils, Mohammed Iyed, que j'embrasse tendrement et qui a souvent vu sa maman bien trop occupée pour lui consacrer suffisamment de temps.

À mes chers (ères) frères et sœurs, qui m'ont toujours soutenue et m'ont motivé par l'intérêt qu'ils portaient à mon travail.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je me fais un agréable devoir de remercier Dieu qui m'a donné amplement de champ de la puissance, la volonté et la conscience pour élaborer ce travail.

Mes premiers remerciements vont à mon directeur de thèse, Mr. Djamel-Eddine BENOUARÉTH, Professeur à l'Université 8 Mai 1945 Guelma, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je lui suis également reconnaissant pour le temps conséquent qu'il m'a accordé, ses qualités pédagogiques et scientifiques. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma gratitude pour tout cela.

J'adresse de chaleureux remerciements à mon co-encadrant de thèse, Mme. Messaouda KHALLEF, Maitre de conférence A à l'Université 8 Mai 1945 Guelma, pour son attention de tout instant sur mes travaux, pour ses conseils avisés et son écoute qui ont été prépondérants pour la bonne réussite de cette thèse. Son énergie et sa confiance ont été des éléments moteurs pour moi. J'ai pris un grand plaisir à travailler avec elle.

Je suis très honoré à remercier de la présence à mon jury de thèse et je tiens à remercier :

Madame le Pr. GRARA Nedjoud : Vous avez accepté sans hésiter de présider le jury de cette thèse. Veuillez recevoir l'expression de ma sincère reconnaissance et l'assurance de mon profond respect.

Madame le Pr. BENDJEDDOU Dalila, monsieur le Pr. BRANES Zidane et Monsieur le Pr. MERAD Tarek : pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être examinateurs de ma thèse. Je tiens à l'assurer de ma profonde reconnaissance pour l'intérêt qu'ils portent à ce travail.

J'adresse mes très sincères remerciements au Docteur Fabrice NESSLANY, chef du service de Toxicologie génétique à l'institut Pasteur de Lille (France) et son équipe, pour m'avoir fait confiance et accueilli dans son laboratoire au sein d'une équipe enthousiaste et passionnée. Grâce à lui, j'ai pu réaliser mes travaux de doctorat (Test d'Ames et le test du micronoyau) dans d'excellentes conditions !

Je remercie également Mme. Giada FRENZILLI, Professeur au Département de médecine clinique et expérimentale à l'université de Pise (Italie) et son équipe, je lui suis reconnaissante de m'avoir accueilli de façon chaleureuse dans son laboratoire pour réaliser le test des comètes et pour la confiance qu'elle m'a témoignée. Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance pour son aide dans tous les moments où j'en avais besoin.

J'adresse des remerciements particuliers à l'ensemble de l'équipe du Laboratoire de biologie, eau et environnement de l'université de 8 Mai 1945 Guelma qui incarne le mot professionnalisme, toujours disponibles et efficaces.

Je voudrais remercier le chef de département de Microbiologie et Biochimie à l'université de Batna 2 pour m'avoir accueilli dans son laboratoire de Biochimie pour l'utilisation de rotavapeur. Je voudrais également remercier le chef de département d'Ecologie à l'université de Batna 2 pour m'avoir accueilli dans son laboratoire de biotechnologie et développement des plantes pour l'utilisation de la centrifugeuse.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

LISTE DES ANNEXES

INTRODUCTION1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1: VIANDES TRANSFORMEES ET SOURCES DE GENOTOXICITE

I. ALIMENTATION ET CANCER3

II. VIANDES TRANSFORMEES.....5

III. SOURCES DE COMPOSES CHIMIQUES TOXIQUES DANS LES VIANDES TRANSFORMEES5

III.1 Substances volontairement ajoutées aux aliments (additifs alimentaires).....6

III.2 Substances toxiques générés au cours de la transformation7

III.2.1 Amines hétérocycliques aromatiques7

III.2.2 Hydrocarbures aromatiques polycycliques12

III.2.3 Nitrosamines.....14

CHAPITRE 2 : GENERALITES SUR LA GENOTOXICITE

I. GENOTOXICITE ET TOXICOLOGIE GENETIQUE.....16

I.1 Définition16

I.2 Toxicologie génétique16

II. DOMMAGES DE LA MOLECULE D'ADN.....17

II.1 Lésions primaires à l'ADN.....18

II.1.1 Altérations spontanées de l'ADN19

II.1.2 Altérations de l'ADN induites par des facteurs exogènes20

II.1.2.1	Adduits à l'ADN	20
II.1.2.2	Pontages ADN-ADN et ADN-protéine	21
II.1.2.3	Intercalations.....	21
II.1.2.4	Cassures simple- et double-brins	21
II.1.2.5	Sites abasiques	22
II.1.2.6	Lésions oxydatives	23
II.1.2.7	Alkylation des bases	23
II.2	Différentes catégories de mutation de l'ADN.....	23
II.2.1	Mutations géniques	25
II.2.1.1	Substitutions de paires de bases	25
II.2.1.2	Mutations par décalage du cadre de lecture.....	26
II.2.2	Mutations chromosomiques	26
II.2.3	Mutations génomiques	27

CHAPITRE 3: METHODES DE DETECTION DES DOMMAGES DE L'ADN

I.	DETECTION DES LESIONS PRIMAIRES DE L'ADN	30
I.1	Détection des lésions primaires de l'ADN sur cellules procaryotes	30
I.1.1	SOS chromotest	30
I.2	Détection des lésions primaires de l'ADN sur cellules eucaryotes	30
I.2.1	Test des comètes	30
I.2.2	Test de synthèse non programmée d'ADN	33
I.2.3	Post-marquage au phosphore 32.....	33
II.	DETECTION DES MUTATIONS GENIQUES DE L'ADN	35
II.1	Tests de mutations géniques sur cellules procaryotes.....	35
II.1.1	Test d'Ames	35
II.2	Tests de mutations géniques sur cellules eucaryotes.....	36
II.2.1	Test de mutation génique au locus TK	37
II.2.2	Test de mutation génique au locus HPRT.....	38
III.	DETECTION DES MUTATIONS CHROMOSOMIQUES ET GENOMIQUES	38
III.1	Test du micronoyau	38
III.2	Test des aberrations chromosomiques	40

MATERIEL & METHODES

I.	ÉCHANTILLONNAGE.....	42
-----------	-----------------------------	-----------

II.	PREPARATION DE L'ECHANTILLON	44
III.	CALCUL DU RENDEMENT.....	44
IV.	TESTS DE GENOTOXICITE	45
IV.1	Test d'Ames.....	45
IV.1.1	Principe	46
IV.1.2	Souches bactériennes de <i>S. typhimurium</i>	46
IV.1.3	Vérification des caractères génétiques des souches bactériennes	48
IV.1.4	Mise en culture des souches	50
IV.1.5	Détermination de la cytotoxicité des extraits testés.....	50
IV.1.6	Essai de mutagénicité.....	51
IV.1.7	Lecture des résultats et critères d'acceptation de l'essai.....	54
IV.1.8	Critères de décision du pouvoir mutagène	54
IV.1.8.1	Critères basés sur la significativité biologique.....	54
IV.1.8.2	Critères basés sur la significativité statistique.....	55
IV.2	Test d'Ames modifié « <i>treat and wash assay</i> ».....	55
IV.2.1	Principe	55
IV.2.2	Essai de mutagénicité.....	55
IV.3	Test du micronoyau <i>in vitro</i> en microméthode	56
IV.3.1	Principe	57
IV.3.2	Cellules lymphoblastoïdes humaines TK6.....	59
IV.3.3	Mise en culture des cellules.....	59
IV.3.4	Dilution des produits.....	59
IV.3.5	Traitement	61
IV.3.6	Récolte	62
IV.3.6.1	Essai de génotoxicité	62
IV.3.6.2	Essai de cytotoxicité	63
IV.3.7	Coloration.....	64
IV.3.8	Lecture	64
IV.3.9	Critères d'acceptation des résultats.....	65
IV.3.10	Interprétation des résultats	65
IV.4	Test des comètes.....	66
IV.4.1	Principe	66
IV.4.2	Cellules Caco-2.....	66
IV.4.3	Mise en culture des cellules Caco-2	67
IV.4.4	Pré-culture des cellules en plaques	67
IV.4.5	Dilutions des produits	68
IV.4.6	Traitement	68
IV.4.7	Récolte	69

IV.4.8	Essai de cytotoxicité	70
IV.4.9	Essai de comètes	71
IV.4.9.1	Préparation des lames	71
IV.4.9.2	Lyse des membranes cellulaires et nucléaires	72
IV.4.9.3	Dénaturation et électrophorèse	72
IV.4.9.4	Neutralisation et déshydratation	73
IV.4.9.5	Coloration.....	73
IV.4.9.6	Lecture et analyse des lames	73

RESULTATS ET DISCUSSION

I. EXTRACTION ET RENDEMENT EN EXTRAITS SECS76

II. RESULTATS DES TESTS DE GENOTOXICITE77

II.1 Test d'Ames.....77

II.1.1	Résultats de la vérification des caractères génétiques des souches bactériennes ...	77
II.1.2	Critères d'acceptation des résultats.....	78
II.1.3	Cytotoxicité des extraits testés	79
II.1.4	Essai de mutagénicité.....	79
II.1.4.1	Extraits de corned-beef fabriqué en Algérie	86
II.1.4.2	Extraits de corned-beef importé.....	86
II.1.4.3	Extraits de saucisson salami du bœuf.....	86
II.1.4.4	Extraits du K-chir	87
II.1.4.5	Extraits du rôti de poulet fumé.....	87
II.1.4.6	Extraits du rôti de bœuf cuit fumé.....	87
II.1.4.7	Extraits du chawarma de poulet	88
II.1.4.8	Extraits du Jambon de bœuf.....	88

II.2 Test d'Ames modifié « *treat and wash assay* ».....88

II.3 Test du micronoyau *in vitro* en microméthode90

II.3.1	Critères d'acceptation des résultats.....	90
II.3.2	Essai de cytotoxicité	90
II.3.3	Essai de génotoxicité.....	92

II.4 Test des comètes.....96

II.4.1	Essai de cytotoxicité	96
II.4.2	Essai de génotoxicité.....	99
II.4.2.1	Extrait héxanique du corned-beef fabriqué en Algérie	100
II.4.2.2	Extrait héxanique du corned-beef importé	101
II.4.2.3	Extraits du saucisson salami de bœuf.....	101
II.4.2.4	Extrait héxanique du K-chir.....	103
II.4.2.5	Extraits de rôti de poulet fumé.....	103

II.4.2.6 Extraits du rôti de bœuf cuit fumé.....	105
II.4.2.7 Extraits du chawarma de poulet.....	106
II.4.2.8 Extraits du Jambon de bœuf.....	107
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	117
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	119
ANNEXES	
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	

ABBREVIATIONS

ABREVIATIONS

AaC	2-Amino-9H-pyrido[2,3-b]indole
ADN	Acide désoxyribonucléique
AHAs	Amines hétérocycliques aromatiques
AMP	Ampicilline
ANSES	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail
Caco-2	Cancer coli-2
CE	Commission Européenne
CDBs	Cassures double brins
4-CH₂OH-8-MeIQx	2-Amino-4-hydroxymethyl-3,8dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer
CSBs	Cassures simple brin
CV	Cristal violet
4,8-DiMeIQx	2-Amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline
7,8-DiMeIQx	2-Amino-3,7,8-trimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline
7,9-DiMeIQx	2-Amino-1,7,9-trimethylimidazo[4,5-g]quinoxaline
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMIP	2-Amin-1,6-dimethylimidazo[4,5-b]pyridine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EDTA	Ethylènediaminetétraacétate
EFSA	European Food Safety Authority
ERO	Espèce Réactive de l'Oxygène
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry
Glu-P-1	2-Amino-6-methyl-dipyrdo-[1,2-a:3',2'-d]imidazole
Glu-P-2	2-Amino-dipyrdo-[1,2-a :3',2'-d]imidazole
GRP	Guanine-ribosyl-phosphate
HAPs	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HCl	Acide chlorhydrique
His	Histidine
H₂O₂	Péroxyde d'hydrogène

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPRT	Hypoxanthine phosphoribosyl transferase
³H-TdR	Thymidine tritiée
IARC	International Agency for Research on Cancer
IFP	2-Amino-1,6-dimethylfuro[3,2-e]imidazo-[4,5-b]pyridine
INC	Institut National du Cancer
IQ	2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline
IQx	2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoxaline
JEFCA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
KCl	Chlorure de potassium
LMA	Low Melting Agarose
LPS	Lipopolysaccharidique
MeAaC	2-Amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indole
MeIQ	2-Amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline
MeIQx	2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline
MgCl₂	Chlorure de magnésium
MN	Micronoyau
MTT	3-(4,5-diméthylthiazole-2-yl) -2,5-diphényltétrazolium
NA	Normal Agarose
NaCl	Chlorure de sodium
NADP	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
Na₂ EDTA	Ethylènediaminetétraacétate disodique
NANVs	Nitrosamines non volatiles
NaOH	Hydroxyde de sodium
NAs	Nitrosamines
NAVs	Nitrosamines volatiles
NDBA	N-nitrosodibutylamine
NDEA	N-nitrosodiethylamine
NDMA	N-nitrosodiméthylamine
NHPRO	N-nitrosohydroxyproline
NMTCA	Acide N-nitroso-2-méthyl-thiazolidine-4-carboxylique
NPIP	N-nitrosopipéridine
NPRO	N-nitrosoproline

NPYR	N-nitrosopyrrolidine
NSAR	N-nitrososarcosine
NTCA	Acide N-nitroso-thiazolidine-4-carboxylique
NTHZ	N-nitrosothiazolidine
O₂^{•-}	Anion superoxyde
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Economiques
OH[°]	Radical hydroxyle
PBS	Phosphate Buffered Saline
PD	Pré-dilution
PhIP	2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
S9	Fraction post mitochondriale centrifugée à 9 000 g
SF	Solution-fille
SM	Solution-mère
SCGE	Single Cell Gel Electrophoresis
Site AP	Site apurinique/apyrimidique
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
%SR	Pourcentage de Survie Relative
TET	Tétracycline
TFT	Trifluorothymidine
TFTMP	Trifluorothymidine monophosphate
TG	6-thioguanine
TK	Thymidine kinase
TMIP	2-Amin-1,6-trimethylimidazo[4,5-b]pyridine
TMP	Thymidine triphosphate
TOPO I et II	Topoisomérasés I et II
4,7,8-TriMeIQx	2-Amino-3,4,7,8-tetramethylimidazo[4,5-f]quinoxaline
Trp-P-1	3-Amino-1,4-diméthyl-5H-pyrido[4,3-b]indole
Trp-P-2	3-Amino-1-méthyl-5H-pyrido[4,3-b]indole
TSA	Tryptic Soy Agar
UDS	Unscheduled DNA Synthesis
UV	Ultraviolets

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Nomenclature et classification des principales AHAs.	9
Tableau 2 : Emballages et ingrédients de produits carnés transformés industriellement étudiés.	42
Tableau 3 : Souches bactériennes utilisées dans le test d'Ames et leurs caractéristiques.	47
Tableau 4 : Composition du S9 mix pour le test d'Ames.	53
Tableau 5 : Témoins positifs de référence utilisés dans le test d'Ames.	53
Tableau 6 : Témoins positifs de référence utilisés dans le test d'Ames modifié.	56
Tableau 7 : Composition du S9 mix pour le test des micronoyaux in vitro.	60
Tableau 8 : Couleur et rendement des extraits de produits de viandes transformées.....	76
Tableau 9 : Résultats du test d'Ames pour les extraits méthanoliques des produits de viandes transformées.....	80
Tableau 10 : Résultats du test d'Ames pour les extraits hexaniques des produits de viandes transformées.....	83
Tableau 11 : Résultats du test d'Ames modifié pour les extraits présentant une signification biologique dans le test d'Ames standard.	89
Tableau 12 : Résultats du test MTT pour les extraits méthanoliques des produits de viandes transformées.....	91
Tableau 13 : Résultats du test MTT pour les extraits hexaniques des produits de viandes transformées.....	92
Tableau 14 : Pourcentages de viabilité des cellules Caco-2 après traitement avec les extraits hexaniques de produits carnés transformés.....	97
Tableau 15 : Pourcentages de viabilité des cellules Caco-2 après traitement avec les extraits méthanoliques de produits carnés transformés.	98

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Origine génétique et environnementale des cancers	4
Figure 2 : Sources d'exposition humaine aux mutagènes	6
Figure 3 : Structures des AHAs polaires et non polaires.....	10
Figure 4 : Formation des AHAs polaires et non-polaires	10
Figure 5 : Formation des AHAs dans le bœuf en fonction de la température.	11
Figure 6 : Formation des AHAs à 165 °C dans du bœuf grillé en fonction du temps de cuisson	11
Figure 7 : Structures chimiques des 15 principaux HAPs reconnus cancérigènes.	13
Figure 8 : Structures de certaines NAVs et NANVs couramment trouvés dans les produits carnés.	15
Figure 9 : Diversité des altérations de l'ADN en termes de lésions et de mutations.	18
Figure 10 : Représentation schématique des lésions primaires induites par les agents génotoxiques	19
Figure 11 : Principales origines des cassures à l'ADN.....	22
Figure 12 : Principaux dommages de l'ADN, mécanismes de réparation mis en jeu et conséquences.....	24
Figure 13 : Différentes aberrations chromosomiques de structure	27
Figure 14 : Tests de génotoxicité déclinés en tests détectant les lésions primaires, les mutations géniques, chromosomiques et génomiques.....	29
Figure 15 : Principales étapes du test des comètes.....	32
Figure 16 : Classification des comètes en 5 stades selon l'intensité de la migration utilisée en quantification manuelle du niveau de dommages à l'ADN.....	32
Figure 17 : Principe de la méthode de post-marquage au phosphore 32 de l'ADN.....	34
Figure 18 : Mécanisme de formation de micronoyaux et marquage centromérique.....	39
Figure 19 : Protocole de la préparation des extraits secs de viande transformée.....	45
Figure 20 : Photos de différentes pousses de fond bactérienne pouvant observer au cours du test de mutagénicité	50
Figure 21 : Représentation schématique du protocole du test d'Ames standard.....	51
Figure 22 : Schéma résumant les différentes étapes du test des micronoyaux	57
Figure 23 : Principe du test des micronoyaux.....	58
Figure 24 : Schéma général de traitement pour le test du micronoyau in vitro en microméthode	62

Figure 25 : Schéma général de traitement pour le test des comètes.....	69
Figure 26 : Protocole schématisé de l'essai de comète	71
Figure 27 : « Un sandwich » de trois couches d'agarose.	71
Figure 28 : Ecran de travail du logiciel d'analyse d'images Komet 5-Kinetic Imaging.....	75
Figure 29 : Une comète sélectionnée et analysée par le logiciel Komet 5-Kinetic Imaging....	75
Figure 30 : Effet des UV sur les souches d'Ames (TA102 et TA1537) et les souches témoins	77
Figure 31 : Effet du cristal violet, de l'ampicilline et de la tétracycline sur les souches d'Ames (TA102 et TA1537) et la souche témoin LT2 his G 46 R..	78
Figure 32 : Photo d'une pousse de fond non toxique.	79
Figure 33 : Résultats du test de micronoyau pour les extraits méthanoliques des produits de viandes transformées.	93
Figure 34 : Résultats du test de micronoyaux pour les extraits hexaniques des produits de viandes transformées	94
Figure 35 : Résultats du test de micronoyaux pour les témoins positifs	95
Figure 36 : Cellules lymphoblastoïdes humaines TK6 avec ou sans micronoyau (grossissement X 200).....	95
Figure 37 : Images de cellules Caco-2 traitées en utilisant le test des comètes visualisées au microscope à fluorescence (grossissement X 200).....	100
Figure 38 : Dommages à l'ADN des cellules Caco-2 exposés pendant 4 et 24 heures à l'extrait hexanique du corned-beef fabriqué en Algérie.	100
Figure 39 : Dommages à l'ADN des cellules Caco-2 exposés pendant 4 et 24 heures à l'extrait hexanique du corned-beef importé.....	101
Figure 40 : Dommages à l'ADN des cellules Caco-2 exposés pendant 4 et 24 heures aux extraits du saucisson salami de bœuf.....	101
Figure 41 : Dommages à l'ADN des cellules Caco-2 exposés pendant 4 et 24 heures à l'extrait hexanique du K-chir.	103
Figure 42 : Dommages à l'ADN des cellules Caco-2 exposés pendant 4 et 24 heures aux extraits du rôti de poulet.....	103
Figure 43 : Dommages à l'ADN des cellules Caco-2 exposés pendant 4 et 24 heures aux extraits du rôti de bœuf cuit fumé.....	105
Figure 44 : Dommages à l'ADN des cellules Caco-2 exposés pendant 4 et 24 heures aux extraits du chawarma de poulet	106

Figure 45 : Dommages à l'ADN des cellules Caco-2 exposés pendant 4 et 24 heures aux extraits du Jambon de bœuf.....107

LISTE DES ANNEXES

Annexe I : Préparation des milieux de culture et des réactifs utilisés dans les tests de génotoxicité.

Annexe II : Témoin négatif (DMSO) historiques du test d'Ames.

Annexe III : Témoin négatif (éthanol pure) historiques du test d'Ames.

Annexe IV : Témoins positifs historiques du test d'Ames.

Annexe V : Témoins historiques du test des micronoyaux in vitro (en microméthode) sur cellules lymphoblastoïdes humaines TK6.

Annexe VI : Pourcentages d'ADN dans la queue de la comète obtenus lors du test de comètes avec les extraits hénaniques.

Annexe VII : Pourcentages d'ADN dans la queue de la comète obtenus lors du test de comètes avec les extraits méthanoliques.

INTRODUCTION

La viande est un aliment précieux et une source importante de protéines de haute valeur biologique, d'acides aminés essentiels, de vitamines et de fer (**Domingo & Nadal, 2016**). Cependant, il est bien établi que sa transformation et sa conservation, par des méthodes chimiques et/ou physiques, ont le potentiel de générer des agents mutagènes et génotoxiques (**Ruan et al., 2014**). Il est devenu évident que ces composés ont un degré élevé de corrélation avec la cancérogénicité (**Mccann et al., 1975**). Plusieurs études épidémiologiques ont également montré qu'il existe une relation causale entre la consommation de viande, notamment sous forme transformée, et l'apparition de plusieurs types de cancers notamment le cancer de côlon et de rectum, de l'estomac, de l'œsophage et de la vessie (**Cross et al., 2007; Deoula et al., 2019; Lippi et al., 2016**). En effet, le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a récemment classé la viande transformée comme cancérogène pour l'homme (Groupe 1) (**International Agency for Research on Cancer [IARC], 2018**). Malheureusement, les mécanismes spécifiques sous-jacents à ces effets sont encore inconnus, bien que différentes hypothèses mécanistes aient été proposées (**Domingo & Nadal, 2016**).

Il y a eu de nombreuses études concernant les effets mutagènes des viandes cuites préparées par différentes méthodes tels que le grillage, la friture ou l'ébullition (**Bjeldanes et al., 1983; Commoner et al., 1978; Nagao et al., 1977; Omoruyi et al., 2014; Pariza et al., 1979**). Cependant, très peu d'attention a été portée sur le potentiel mutagène et génotoxique des aliments transformés industriellement, en particulier les viandes transformées. **Krone & Iwaoka (1984)** ont signalé pour la première fois l'activité mutagène de certaines viandes en conserve comme le corned-beef, le bouillon de bœuf et le rôti de bœuf. Une autre étude menée en Finlande par **Omoruyi & Pohjanvirta (2014)** a également montré que certaines viandes transformées industriellement, telles que le bœuf fumé à froid, le poulet fumé et la dinde grillée, ont induit une activité mutagène vis-à-vis de la souche TA100 de *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*). Par conséquent, les viandes transformées industriellement semblent être une source importante probable de mutagènes.

En Algérie, la faible production et les prix élevés des viandes conduisent une grande majorité des consommateurs à s'orienter vers la consommation de produits carnés transformés industriellement, ce qui peut constituer un risque pour la santé humaine (**Chikhi & Bencharif, 2016**). La forte consommation de ces produits, disponibles en différents saveurs et à faible coût par rapport aux viandes crues, souligne l'importance d'étudier leur activité mutagène et génotoxique. Le danger lié à ces aliments peut apparaître lors de la formation de substances

nouvelles au sein de la matrice alimentaire. En effet, au cours du processus de transformation technologique et/ou de préparations industrielles des denrées alimentaires, des réactions chimiques peuvent se produire et provoquer la formation de composés dont certains peuvent être indésirables. Ces substances sont qualifiées de composés néoformés ; elles peuvent se former par exemple au cours de traitements thermiques (cuisson et stérilisation) ou au cours de différentes étapes de conservation (**Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail [ANSES], 2015**). Parmi ces composés, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) et les amines hétérocycliques aromatiques (AHAs) qui sont produits respectivement à des températures de cuisson élevées et douces. Certains AHAs sont produits par la réaction de Maillard à des températures de cuisson normales ($< 300^{\circ}\text{C}$), d'autres AHAs et HAPs se forment à des températures beaucoup plus élevées ($> 300^{\circ}\text{C}$) à la suite de la pyrolyse (**Sanz-Serrano et al., 2019**). Il faut aussi tenir compte de la présence des additifs alimentaires tels que les colorants, les agents aromatisants et les conservateurs qui pourraient être également la cause potentielle de la génotoxicité (**Nepalia et al., 2018**).

Même si des substances génotoxiques peuvent apparaître lors de la cuisson domestique, les consommateurs peuvent réduire leur formation en utilisant des méthodes de cuisson à basse température comme la cuisson à la vapeur, l'ébullition ou le chauffage aux micro-ondes. Cependant, cette opportunité n'est pas disponible pour les consommateurs de produits carnés transformés industriellement (**Krone & Iawoka, 1987**). Ainsi, si ces produits finaux présentent une activité génotoxique, ils peuvent provoquer des effets délétères pour les consommateurs.

Afin de protéger les consommateurs, la surveillance du potentiel génotoxique de ces produits est aujourd'hui une priorité. Dans ce contexte, la présente étude visait à évaluer les effets mutagènes et génotoxiques potentiels d'extraits polaires et non polaires de certains produits carnés transformés industriellement actuellement disponibles sur le marché algérien en utilisant le test d'Ames sur quatre souches de *S. typhimurium* (en présence et en absence d'activation métabolique), le test du micronoyau *in vitro* sur les cellules lymphoblastoïdes humaines TK6 (en présence et en absence d'activation métabolique) et test des comètes sur les cellules intestinales humaines (Caco-2) (seulement en absence d'activation métabolique).

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Alimentation et cancer

Aujourd'hui, le cancer représente l'une des principales causes de mortalité dans le monde (**Bellamri, 2016**). Selon GLOBOCAN 2020, base de données en ligne font partie du CIRC fournissent des statistiques mondiales sur le cancer, le nombre de nouveaux cas de cancers en 2020 au niveau mondial est estimé à 19.3 millions comparé à 18.1 millions en 2018 et à 14.1 millions en 2012. Le nombre de décès liés au cancer survenus en 2020 au niveau mondial est estimé à 10 millions comparé à 9.6 millions en 2018 et à 8.2 millions en 2012 (**Bray et al., 2018; Sung et al., 2021; Torre et al., 2015**).

Il est bien établi que le cancer peut avoir deux origines : une origine génétique et une origine environnementale (**Anand et al., 2008**).

L'origine génétique est bien illustrée par le caractère héréditaire de certains cancers ainsi que leur agrégation chez certaines familles (**Bellamri, 2016**). En effet, certains sujets sont porteurs à la naissance d'une ou de plusieurs anomalies génétiques, c'est-à-dire de gènes mutés, appelés gènes de prédisposition au cancer. Leur présence chez un individu connote une augmentation du risque de développer un cancer par rapport au risque moyen observé dans la population générale (**ANSES, 2011; Heu Biabi Bodiandjel, 2018**).

Le premier rapport sur l'implication de l'environnement dans le développement du cancer remonte à 1761, lorsque Jonah Hill a découvert l'association entre le tabac et le cancer des fosses nasales (**Hill, 1761**), suivi par Percival Pott qui a observé le développement de cancer du scrotum chez les ramoneurs (**Pott, 1775**). Des siècles plus tard, les études épidémiologiques continuent de prouver cette relation.

Aujourd'hui, l'origine environnementale est prépondérante avec plus de 90% des cancers attribués aux facteurs environnementaux contre 5 à 10% pour les cancers d'origine génétique (**Anand et al., 2008; ANSES, 2011**). Parmi les facteurs environnementaux, l'alimentation est associée à hauteur de 30- 35% des cancers comme illustré dans la figure 1 (**Anand et al., 2008**).

Le rôle de l'alimentation dans le développement de certains cancers a fait l'objet de nombreuses études. Ces études ont été récemment synthétisées dans un rapport de l'Institut National du Cancer. Ce rapport montre qu'il existe des liens convaincants entre huit facteurs et le développement de certains cancers. Ainsi, la consommation d'alcool, l'excès de sel, les compléments alimentaires, l'obésité et la consommation de viande rouge et de charcuterie

(produits carnés transformés), sont identifiés comme facteurs aggravants (**Institut National du Cancer [INC], 2015**).

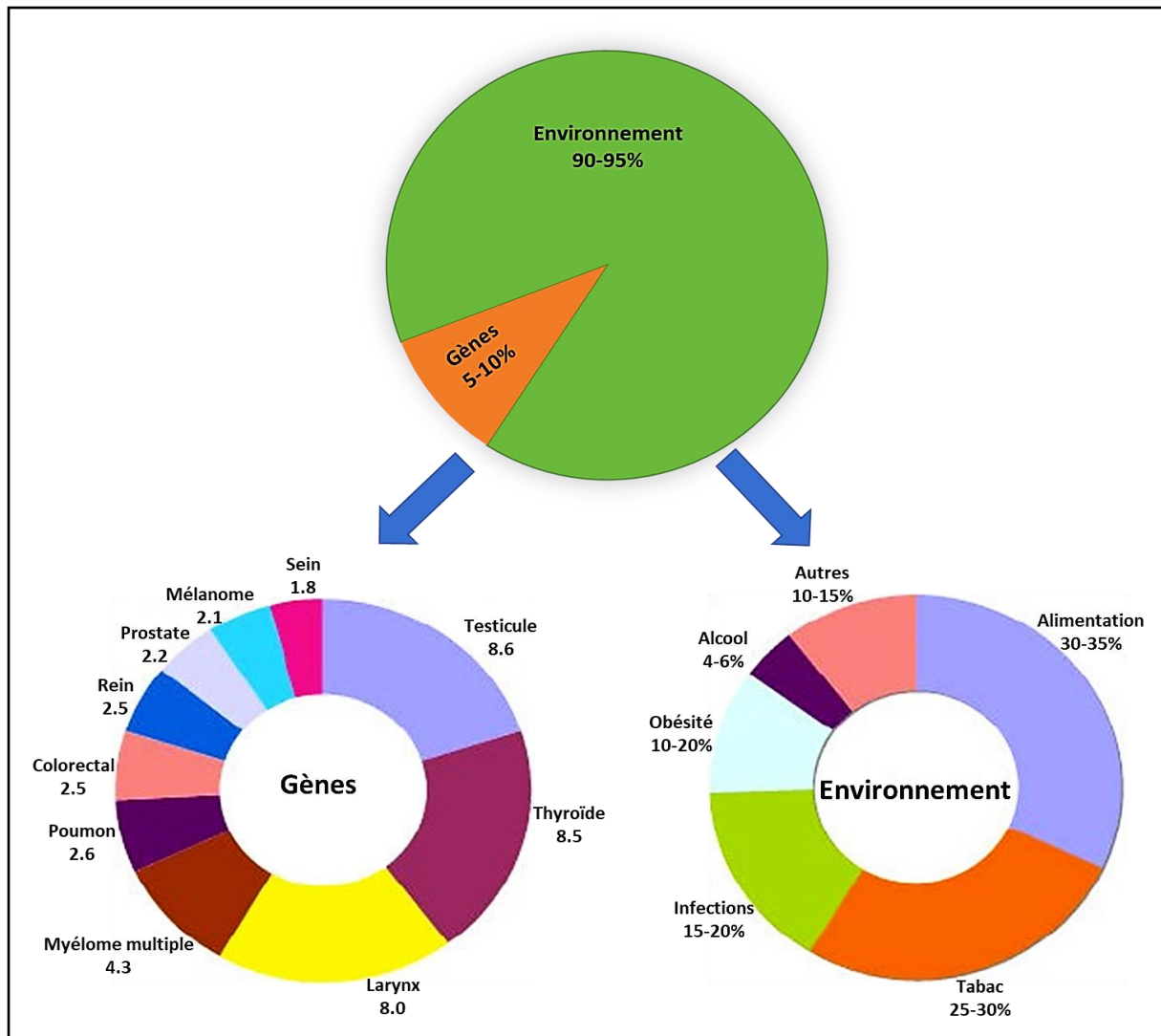


Figure 1 : Origine génétique et environnementale des cancers (Anand et al., 2008).

Sous l'impulsion du CIRC, un groupe de 22 experts venant de dix pays différents s'est réuni en octobre 2015 pour examiner le lien entre la consommation de viande rouge et de charcuterie et le cancer colorectal. La monographie qui s'appuie sur 800 études du monde entier confirme la corrélation jusque-là pressentie entre la consommation de viande transformée (supérieure à 50g par jour) et de viande rouge (500g par semaine) et le cancer colorectal. Cette expertise collective a entraîné une nouvelle classification de ces aliments. Ainsi la viande rouge est désormais classée comme un cancérigène probable pour l'Homme et la viande transformée en cancérigène sûre pour l'Homme (**Bouvard et al., 2015**).

II. Viandes transformées

Les viandes transformées (ou produits carnés transformés) font référence aux viandes qui ont subi un processus visant à rehausser la saveur ou à augmenter la durée de conservation et ont été mélangés à des ingrédients tels que le sel ou le sel de saumure (**Battaglia Richi et al., 2015**). Il existe une grande variété de produits carnés transformés et il n'est pas facile de les trier par catégories, mais les méthodes impliquées dans la fabrication de ces aliments sont la salaison (ajout de sel et d'autres additifs), le séchage, le fumage et la cuisson (**Santarelli et al., 2008**).

À titre d'exemples de viandes transformées, on trouvera le corned-beef, le salami, le Jambon, les saucisses, les pâtés, les viandes en conserve, les préparations et les sauces à base de viande. La plupart des viandes transformées contiennent du bœuf, mais elles peuvent également contenir de la volaille ou des abats (**IARC, 2018**).

Les produits carnés transformés représentent une part importante de notre apport énergétique quotidien. Ces produits se déclinent sous de nombreuses présentations et contiennent des nutriments d'une valeur indiscutable et difficilement remplaçables (**Hallé, 2002**). Cependant, les processus de transformation technologique induisent des réactions chimiques pouvant provoquer la formation de composés dont certains peuvent être toxiques. Ces substances sont qualifiées de composés néoformés ; elles peuvent se former au cours de traitements thermiques ou au cours de différentes étapes de conservation (**ANSES, 2015**). Ces néoformations qui dépendent entre autres de la composition de la matière première et des conditions de procédé de transformation peuvent impacter la qualité sanitaire des aliments. Bien que les composés néoformés soient généralement retrouvés à l'état de trace dans les aliments, leur consommation régulière tout au long de la vie pourrait contribuer à terme au développement de certaines pathologies (diabète, troubles neurologiques, cancers...) (**Meurillon & Engel, 2019**).

III. Sources de composés chimiques toxiques dans les viandes transformées

Les produits chimiques toxiques signalés dans les viandes transformées sont présents et/ou formés de différentes manières (Figure 2). Ces sources peuvent être divisées en ajouts délibérés et contaminations non intentionnelles (**Omoruyi, 2015**).

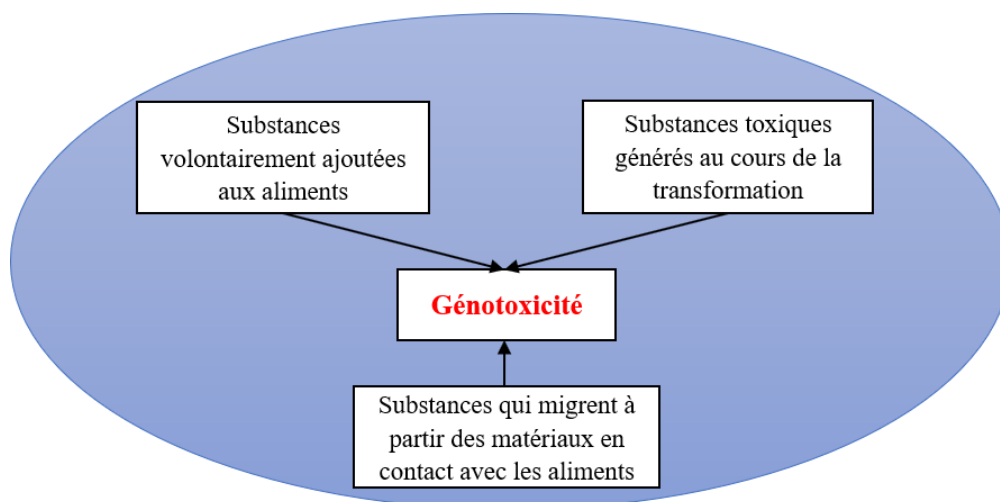


Figure 2 : Sources d'exposition humaine aux mutagènes (Omoruyi, 2015).

III.1 Substances volontairement ajoutées aux aliments (additifs alimentaires)

Les additifs alimentaires sont des substances ajoutées intentionnellement aux denrées alimentaires pour améliorer ou modifier le goût, la couleur et la texture, ou pour prolonger la durée de conservation (Kılıçle & Önen, 2018). Citons, parmi les additifs alimentaires : les colorants, qui font paraître les aliments plus attrayants ; les antioxydants : (comme la vitamine C) inhibent les altérations provoquées par l'oxydation ; les anti-moussants : réduisent ou empêchent la formation de mousse ; les émulsifiants : permettent le mélange homogène de deux phases non miscibles comme l'eau et l'huile ; les épaississants : augmentent la viscosité ; les conservateurs : inhibent la croissance des microorganismes (Dosay-Akbulut, 2020).

Au fil des ans, la sécurité de ces additifs alimentaires a été remise en question, soit en raison de leurs propriétés toxiques ou de leur capacité à interagir avec des macromolécules biologiques riches en électrons, entraînant des effets néfastes sur la santé, notamment la génotoxicité et la cancérogénicité (Di Sotto et al., 2014).

Des controverses existent sur la sécurité toxicologique et sur l'utilisation des additifs alimentaires dans différents pays. Certains pays homologuent un additif alors que d'autres en interdisent l'utilisation (Panisset et al., 2003). Par exemple, les additifs alimentaires tels que l'amarante et le charbon végétal ont été interdits aux États-Unis, tandis que ces substances sont toujours utilisées dans l'Union européenne, en Australie et en Nouvelle-Zélande (European Food Safety Authority [EFSA], 2010, 2012). De même, les colorants azoïques interdits au sein de l'Union européenne pour leurs effets hyperactifs, sont encore largement utilisés aux États-Unis. Une controverse similaire existe également sur la toxicité des additifs alimentaires.

La génotoxicité de certains additifs alimentaires, tels que l'amarante, cocchine nouvelle, érythrosine et tartrazine, a été rapportée à faibles doses (Sasaki et al., 2002; Shimada et al., 2010; Tsuda et al., 2001). Alors que d'autres études plus récentes montrent que ces additifs ne sont pas une source d'inquiétude (Di Sotto et al., 2014; EFSA, 2010, 2012; Poul et al., 2009).

III.2 Substances toxiques générés au cours de la transformation

Toutes les viandes qui figurent sur la table du consommateur ont subi une quelconque transformation. La cuisson est assurément la méthode la plus élémentaire pour transformer la texture et la saveur des viandes. Pour conserver les denrées périssables, la ménagère a eu recours depuis l'antiquité au salage, au fumage et à la fabrication des conserves. Le panier de la ménagère moderne est composé en grande partie de produits transformés industriellement qui doivent leur qualité constante à l'utilisation des additifs alimentaires (Hallé, 2002; Panisset et al., 2003).

Si la transformation des viandes présente de nombreux avantages, elle peut aussi entraîner la formation des composés nocifs : les AHAs, les HAPs et les Nitrosamines (NAs) (Panisset et al., 2003).

III.2.1 Amines hétérocycliques aromatiques

Les AHAs sont une famille de composés qui se forment au cours des processus de cuisson plus ou moins poussée des viandes (poulet, bœuf, dinde, agneau...) et des poissons (Knize et al., 1997; Nagao et al., 1977; Sanz Alaejos et al., 2008).

Plus de 25 AHAs ont été isolées et identifiées comme potentiellement mutagènes non seulement pour les bactéries, mais aussi pour certains systèmes cellulaires de mammifères et peuvent produire des aberrations chromosomiques et des échanges de chromatides sœurs dans les cellules en culture (Sanz Alaejos et al., 2008). Plusieurs d'entre elles se sont révélées également cancérigènes pour les rongeurs (souris et rats) et les primates dans des études de longue durée (Adamson et al., 1990, 1994; Ohgaki et al., 1991; Wakabayashi et al., 1992) et génotoxique sur les hépatocytes de rats, de souris et de hamsters en utilisant le test de réparation de l'ADN (test de la synthèse non programmé d'ADN) (Yoshimi et al., 1988). Le CIRC a classé MeIQ, MeIQx, PhIP, AαC, MeAαC, Trp-P-1, Trp-P-2 et Glu-P-1 dont les noms complets sont explicités dans le tableau 1 comme cancérigènes possible (groupe 2B) et IQ comme probablement cancérigène (groupe 2A) pour l'homme. Ces résultats sont basés sur la

preuve suffisante de la carcinogénicité de ces composés et sur les données de génotoxicité obtenues lors des études à long terme (**IARC, 1993**).

Les AHAs contiennent de 2 à 5 cycles aromatiques (généralement 3), avec 1 atome d'azote ou plus dans ce noyau, et habituellement un groupement aminé non cyclique (**Sanz Alaejos & Afonso, 2011**). Comme de nombreux produits chimiques, elles ne sont cancérigènes qu'après biotransformation, notamment au niveau du foie, organe qui possède le système enzymatique le plus performant (**Cross & Sinha, 2004; Langouët, 2018**).

Les AHAs sont regroupées en deux classes : les AHAs polaires et les AHAs non-polaires (Tableau 1 et Figure 3). Les polaires regroupent les quinolines, les quinoxalines et les pyridines. Les non-polaires constituent les pyridoindoles, les pyridoimidazols, les harmans et les norharmans (**Bellamri, 2016**). Les premières sont formées à des températures classiques de cuisson, allant de 150 à 250 °C via la réaction de Maillard (Figure 4). En effet, les groupements amines des acides aminés interagissent avec les groupements carbonyles des hexoses, conduisant à la formation de plusieurs intermédiaires tels que les pyridines et pyrazines hétérocycliques. Ces dernières vont interagir avec un acétaldéhyde et la créatinine, produit de dégradation naturelle de la créatine contenue dans le muscle, pour former des AHAs à noyau quinoline ou quinoxaline. Quand cette même réaction a lieu avec la phénylalanine, cela conduit à la formation de 2-Amino-1-méthyl-6-phénylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) (**Bellamri, 2016; Lecerf, 2012; Sanz Alaejos & Afonso, 2011; Skog et al., 1998**). Les secondes apparaissent au-delà de 250° C par un mécanisme encore mal connu se déroulant lors de la pyrolyse des acides aminés ou des protéines (Figure 4) (**Bellamri, 2016; Lecerf, 2012**).

La formation des AHAs est influencée par plusieurs paramètres tels que la température, la durée de cuisson, le mode de cuisson et la concentration en précurseurs (acides aminés, créatinine et les oses) (**Cross & Sinha, 2004; Skog et al., 1998; Turesky et al., 2007a**).

➤ **La température :** La température de cuisson agit non seulement sur le type d'AHAs formées (polaires et apolaires) comme décrit ci-dessus mais aussi sur la concentration d'AHAs. Par exemple, lors de la cuisson du bœuf à 190°C, certaines AHAs comme AαC et MeAαC sont très faiblement formées avec une concentration inférieure à 0,03 ng/g de viande. A ces mêmes températures, les AHAs polaires telles que 7-MeIQx, MeIQx et PhIP sont en revanche très abondantes, leurs concentrations pouvant atteindre 10 ng/g de viande (Figure 5) (**Bellamri, 2016; Turesky et al., 2007b**).

Tableau 1 : Nomenclature et classification des principales AHAs.

Famille	Classe	Nom
Polaire	Quinoline	IQ (2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline) MeIQ (2-Amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline)
	Quinoxaline	IQx (2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoxaline) MeIQx (2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline) 4,8-DiMeIQx (2-Amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline) 7,8-DiMeIQx (2-Amino-3,7,8-trimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline) 4,7,8-TriMeIQx (2-Amino-3,4,7,8-tetramethylimidazo[4,5-f]quinoxaline) 4-CH ₂ OH-8-MeIQx (2-Amino-4-hydroxymethyl-3,8 dimethylimidazo[4,5 f]quinoxaline) 7,9-DiMeIQx(2-Amino-1,7,9-trimethylimidazo[4,5g]quinoxaline)
	Pyridines	PhIP (2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b] pyridine) DMIP (2-Amin-1,6-dimethylimidazo[4,5-b] pyridine) TMIP (2-Amin-1,6-trimethylimidazo[4,5-b] pyridine) IFP (2-Amino-1,6-dimethylfuro[3,2-e] imidazo-[4,5-b] pyridine)
Non-polaire	Pyridoimidazole	Glu-P-1 (2-Amino-6-methyl-dipirido-[1,2-a:3',2'-d]imidazole) Glu-P-2 (2-Amino-dipirido-[1,2-a :3',2'-d]imidazole)
	Pyridoindole	Trp-P-1(3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b] indole) Trp-P-2 (3-Amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b] indole) AaC (2-Amino-9H-pyrido[2,3-b] indole) MeAaC (2-Amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b] indole)
	β-carboline	Norharman (β-carboline) Harman (9-Methyl-b β-carboline)

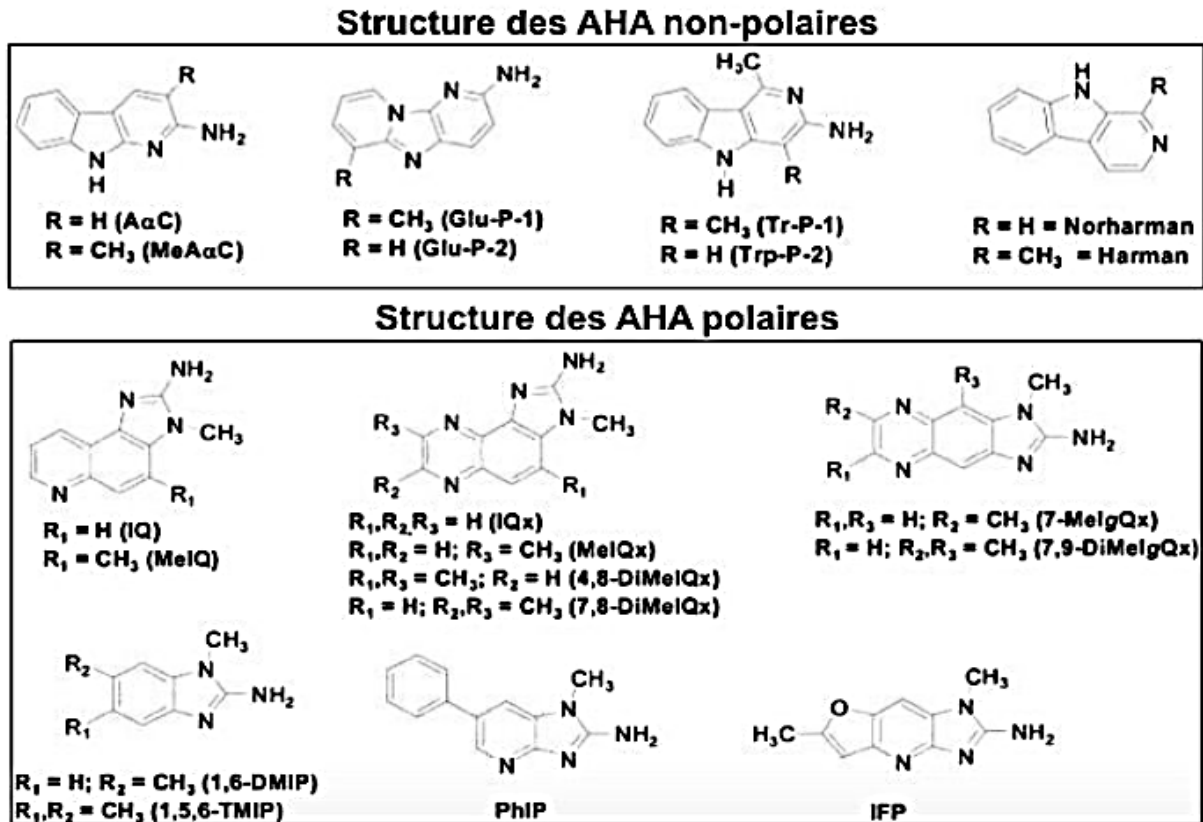


Figure 3 : Structures des AHAs polaires et non polaires (Bellamri, 2016; Sanz Alaejos & Afonso, 2011).

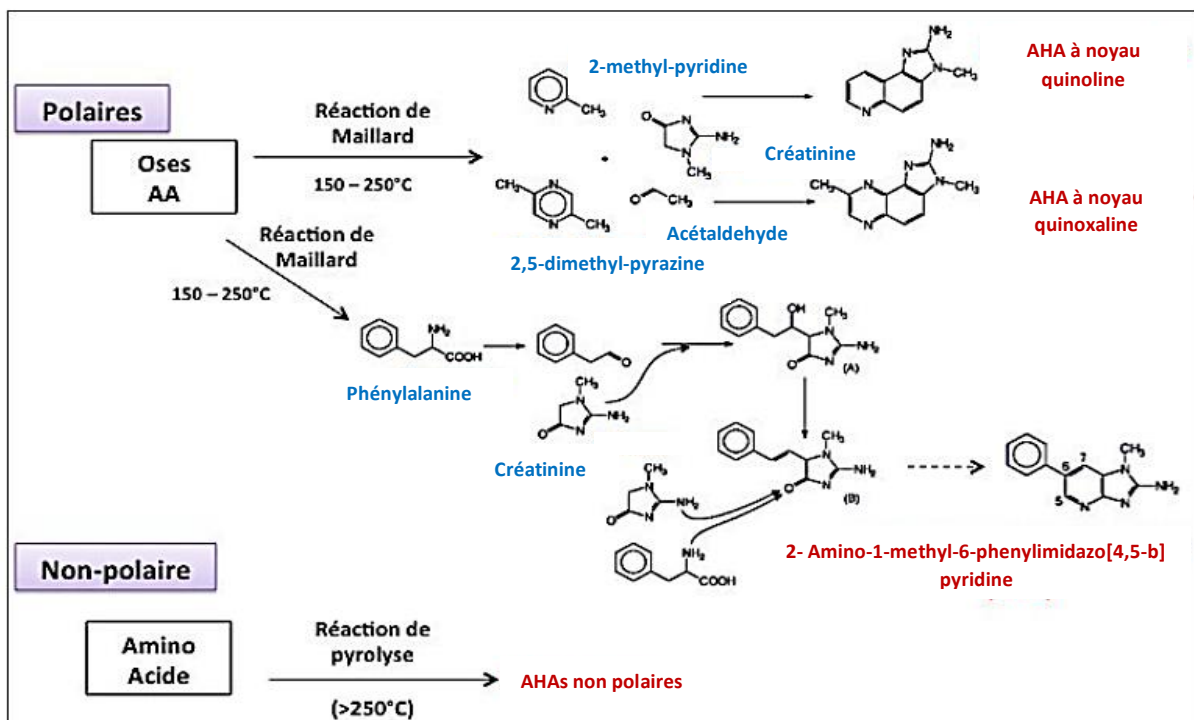


Figure 4 : Formation des AHAs polaires et non-polaires (Bellamri, 2016).

- **La durée de cuisson :** L'étude de la cinétique de formation des AHAs en fonction du temps démontre qu'elles sont très rapidement formées, dès les premières minutes et qu'elles augmentent en fonction du temps de cuisson (Figure 6) (Bellamri, 2016).
- **Le mode de cuisson :** Les méthodes de cuisson tels que la friture, le rôissage, le barbecue et la grillade génèrent des quantités importantes d'AHAs en raison des températures élevées atteintes (Oz & Yuzer, 2016). Cependant, ils sont générés lentement lors de la cuisson par le braisage et la cuisson bouillie (Lecerf, 2012).

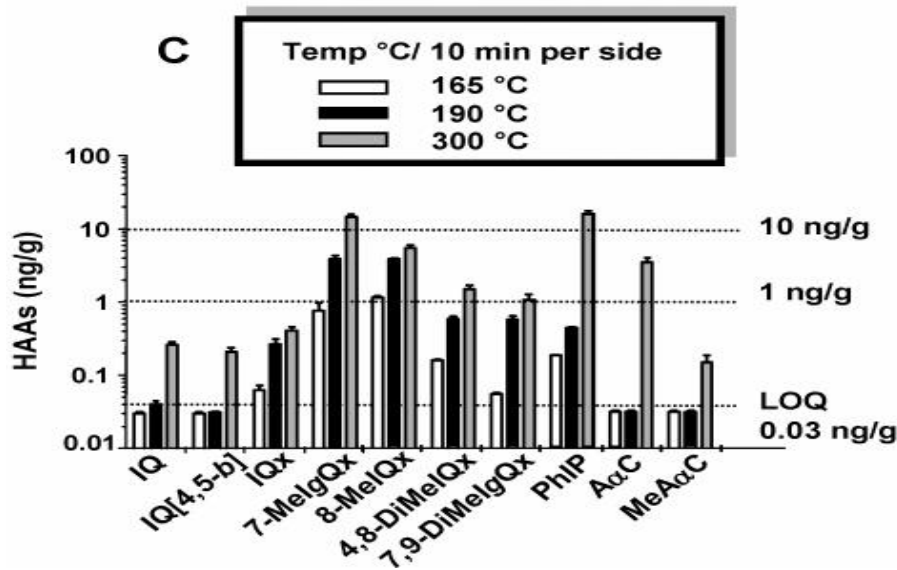


Figure 5 : Formation des AHAs dans le bœuf en fonction de la température (Turesky et al., 2007b).

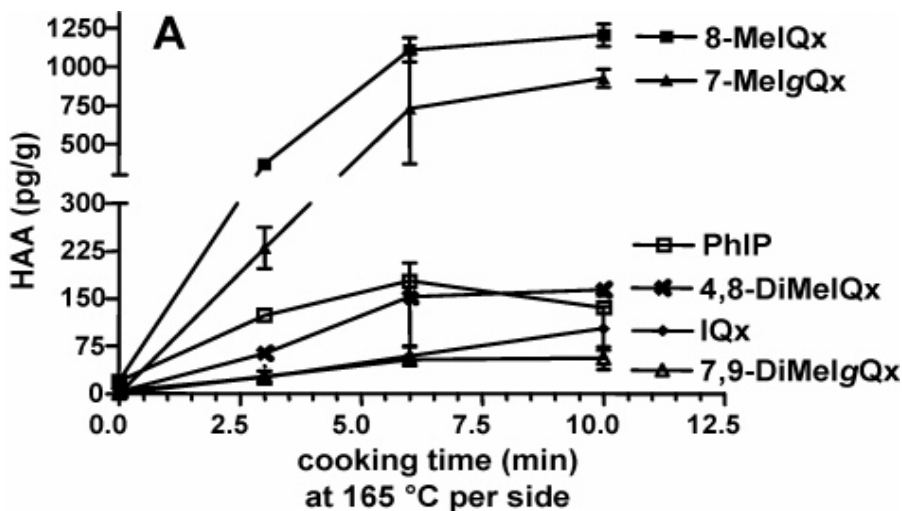


Figure 6 : Formation des AHAs à 165 °C dans du bœuf grillé en fonction du temps de cuisson (Turesky et al., 2007b).

➤ **La concentration en précurseurs** : Il est démontré que l'abondance des AHAs formées était positivement corrélée à la concentration en précurseurs. Et comme ces derniers sont plus ou moins abondants selon le muscle et selon l'animal d'où provient la viande, la quantité d'AHAs formée sera donc différente selon le type de viande (**Gibis & Weiss, 2015**).

III.2.2 Hydrocarbures aromatiques polycycliques

Les HAPs sont des molécules organiques hautement hydrophobes constitués d'atomes de carbone et d'hydrogène dont la structure comprend deux ou plusieurs cycles benzéniques fusionnés et ils sont générés lors de la combustion incomplète de la matière organique (**Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives [JEFCA], 2005; Singh et al., 2016**). Les HAPs ayant moins de 4 cycles benzéniques sont généralement pas ou peu cancérigènes, ce qui n'est pas le cas lorsqu'on est en présence de molécules présentant 4 à 6 cycles (**Vignet, 2015**).

Cette famille chimique compte plus d'une centaine de composés dont 15 présentés dans la figure 7 sont identifiés par le comité scientifique de l'alimentation comme génotoxiques et cancérigènes (**European commission [EC], 2005**). En effet, dans les cellules de mammifères, les HAPs subissent une activation métabolique en époxydes diols qui se lient de manière covalente aux macromolécules cellulaires, y compris l'ADN, provoquant ainsi des erreurs dans la réplication de l'ADN et des mutations qui initient le processus cancérigène (**Reinik et al., 2007; Singh et al., 2016**).

Les HAPs se forment pendant le traitement par le séchage et le fumage ou la cuisson (grillage, rôtissage, friture, barbecue, etc.) des viandes et des poissons (**Alomirah et al., 2011; DjinoVIC et al., 2008; Farhadian et al., 2010; Šimko, 2002; Wretling et al., 2010**). Des concentrations élevées sont signalées dans les aliments grillés et cuits au barbecue (**JEFCA, 2005**).

Plusieurs chercheurs ont étudié la présence des HAPs dans les aliments. **Lijinsky & Shubik (1964)** ont été les premiers qui ont signalé la présence de benzo(a)pyrène et d'autres HAPs dans le bœuf grillé au charbon de bois. **Lawrence & Weber (1984)** ont isolé et identifié 18 HAPs à partir des produits commerciaux de poissons, de crustacés et de viandes par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC, *high performance liquid chromatography*) avec une confirmation par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS, *Gas chromatography-mass spectrometry*) et ils ont trouvé que 11 des 18 HAPs étaient des cancérogènes. **Yabiku et al. (1993)** ont étudié les niveaux de

benzo(a)pyrène et d'autres HAPs dans l'arôme de fumée liquide et les aliments fumés et ils ont trouvé que les concentrations de benzo(a)pyrène variaient de 0,1 à 336,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dans l'arôme de fumée liquide et de 0,1 à 5,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dans les aliments fumés. **Larsson et al. (1983)** ont étudié les niveaux de 22 HAPs dans la viande grillée et les produits carnés et leurs résultats ont révélé que les niveaux d'HAPs dépendent fortement de la méthode de cuisson et du type de source de chaleur utilisée. Ils ont trouvé que le grillage de saucisses de Francfort dans les flammes d'un feu de bois a entraîné des niveaux de HAPs extrêmement élevés jusqu'à 212 $\mu\text{g}/\text{kg}$ benzo(a)pyrène. **Kazerouni et al. (2001)** ont obtenu des résultats similaires lorsqu'ils ont analysé des échantillons de viande cuite par différentes techniques. Les niveaux les plus élevés de B(a)P ont été trouvés dans les steaks et le poulet grillés et cuits au barbecue.

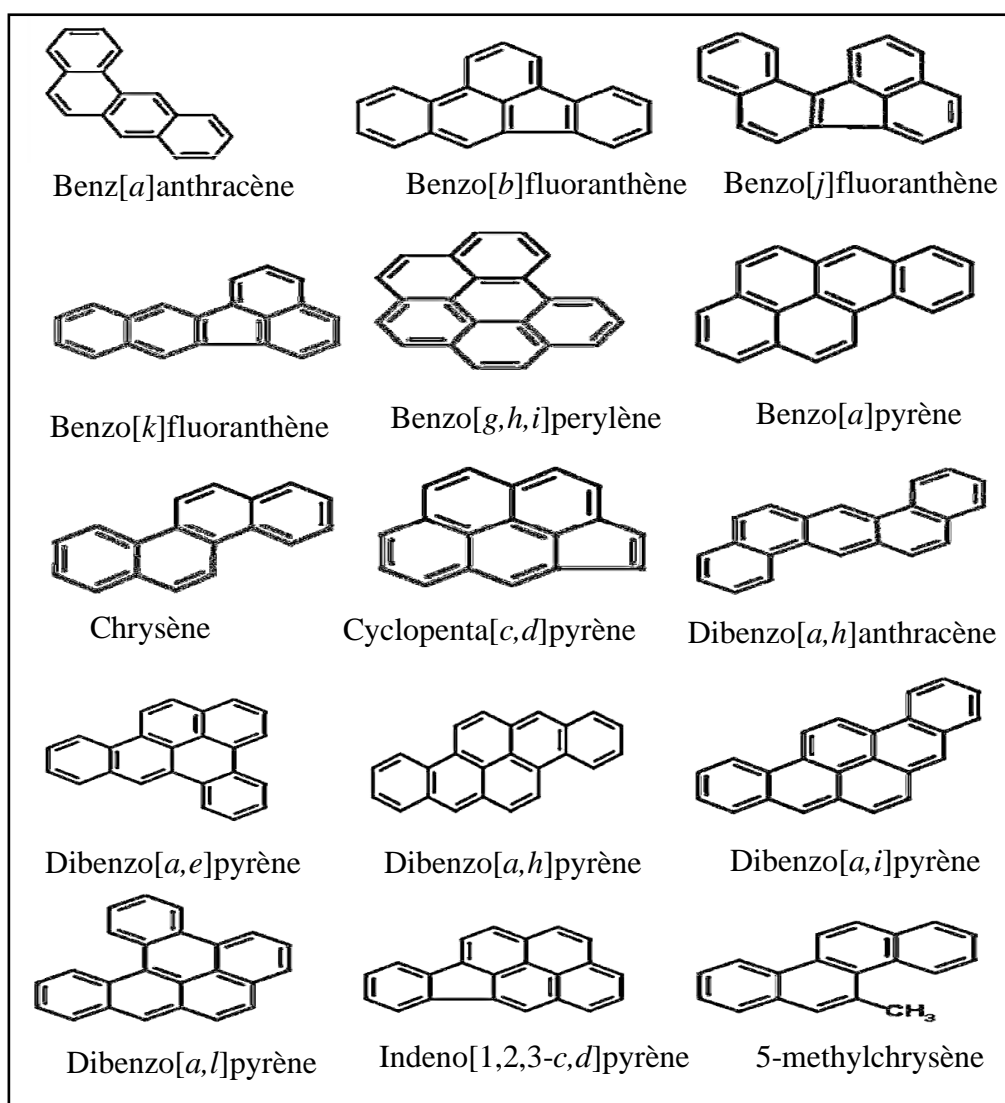


Figure 7 : Structures chimiques des 15 principaux HAPs reconnus cancérigènes (**Crespo, 2009; Omoruyi, 2015**).

III.2.3 Nitrosamines

Des nitrites (généralement nitrite de sodium) sont ajoutés en tant qu'additif alimentaire dans les charcuteries pour leur rôle dans le développement du goût, dans la formation de la couleur et surtout dans la sécurité sanitaire (**Lijinsky, 1999**). D'un point de vue microbiologique, ces composés inhibent la croissance et la germination des spores de *Clostridium botulinum*, bactérie responsable du botulisme (**Herrmann et al., 2015**). L'ajout de ces composés dans le procédé de fabrication des viandes transformées est donc indispensable. Cependant, la présence de nitrites peut favoriser la réaction de nitrosation, réaction biochimique à l'origine de la formation des NAs (**Sarniguet, 2016**).

Les NAs présentent la particularité de pouvoir être générés (i) de manière exogène dans l'aliment lui-même, via l'action des nitrites sur les amines secondaires pendant la préparation et/ou pendant la conservation des produits, ou (ii) de manière endogène lors de la phase gastrique de la digestion (**Kim et al., 2013**). Dans les produits carnés, la concentration des NAs dépend de l'abondance des précurseurs (nitrites, amines secondaires), des paramètres physicochimiques (températures élevées et bas pH) et/ou de la présence d'inhibiteurs et de catalyseurs (comme le fer ou le cuivre) de nitrosation (**Meurillon & Engel, 2019; Yurchenko & Mölder, 2007**).

Les NAs sont divisées en deux groupes : les NAs volatiles (NAVs), qui comportent par exemple la N-nitrosodiméthylamine (NDMA), la N-nitrosodibutylamine (NDBA), la N-nitrosopyrrolidine (NPYR), la N-nitrosopipéridine (NPIP) et la N-nitrosodiéthylamine (NDEA), et les NAs non volatiles (NANVs), qui contiennent par exemple N-nitrosohydroxyproline (NHPRO), N-nitrosoproline (NPRO), N-nitrososarcosine (NSAR), acide N-nitroso-thiazolidine-4-carboxylique (NTCA), acide N-nitroso-2-méthyl-thiazolidine-4-carboxylique (NMTCA) (**Crews, 2014 ; Herrmann, 2014**). Les structures de certaines importantes NAVs et NANVs sont présentées dans la figure 8. La majorité des NAVs sont connus pour être cancérigènes, la NDMA et la NPYR étant les plus étudiées et sont souvent désignées comme les cancérogènes les plus puissants (**Herrmann et al., 2015**). Tandis que, la plupart des NANVs sont supposés être non-cancérigènes ou cancérigènes moins puissants. Mais leur présence dans les produits carnés transformés peut toujours être importante lors de l'évaluation des risques pour la santé humaine associés à l'utilisation de nitrite. Cela peut être le cas si des NANVs faiblement cancérigènes sont fréquemment présents et en grande quantité et/ou si des NANVs non-cancérogènes peuvent être des précurseurs des nitrosamines

cancérogènes. Il est suggéré que la décarboxylation de NAVs comme par exemple la NSAR et la NPRO peuvent être à l'origine de l'augmentation induite par la chaleur des niveaux de NAVs, *i.e.* NDMA et NPYR, respectivement (**Herrmann et al., 2015**).

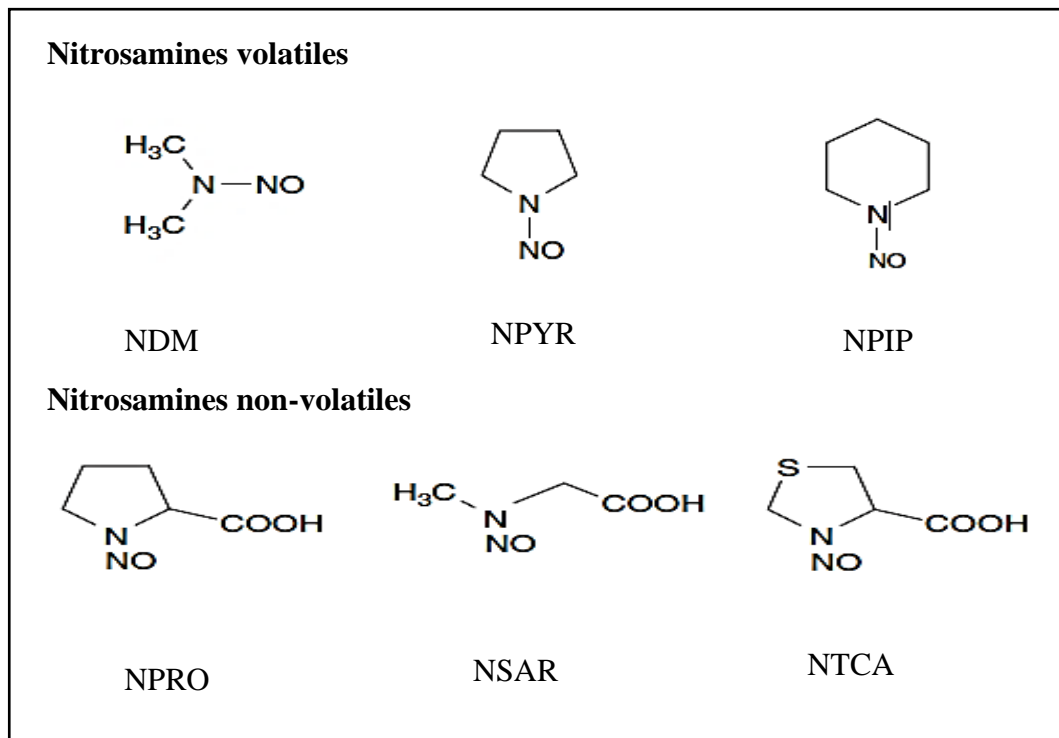


Figure 8 : Structures de certaines NAVs et NANVs couramment trouvés dans les produits carnés (**Crews, 2014**).

I. Génotoxicité et toxicologie génétique

I.1 Définition

La génotoxicité, appelée également toxicité génétique, représente la capacité de certains agents physiques ou chimiques (dits génotoxiques) à provoquer des dommages à l'ADN qui peuvent conduire à des mutations génétiques si ces lésions ne sont pas réparées (**Dégremont & Cachot, 2009**). Le terme de génotoxicité a été utilisé pour la première fois par Hermann Druckrey à une conférence internationale sur les cancérigènes environnementaux : « *Pour décrire la résultante d'une interaction chimique avec le matériel génétique, le terme de génotoxicité est proposé comme l'expression générale des effets toxiques, létaux et héréditaires du matériel génétique dans les cellules germinales ou somatiques* » (**Schins, 2002**).

La définition du terme "agent génotoxique" selon Druckrey (qui a inventé le terme "génotoxique") est la suivante :

« *Tout agent, en vertu de ses propriétés physiques ou chimiques, qui induit ou produit des changements héréditaires dans les parties de l'appareil génétique exerçant un contrôle homéostasique au niveau des cellules somatiques et qui détermine donc leur transformation en cellules malignes* » (**Druckrey, 1973**).

Il existe deux types d'agents génotoxiques : les génotoxiques directs qui sont capables de modifier directement la structure de l'ADN générant par exemple des cassures de brins, des adduits ou des lésions des bases, et ceux que l'on appelle les génotoxiques indirects qui induisent des effets toxiques en agissant, non pas avec l'ADN, mais avec la machinerie cellulaire qui maintient l'intégrité du génome tels que les protéines de fuseau mitotique, les enzymes impliquées dans la réparation ou la réplication de l'ADN, les protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, etc (**Botta, 2006; Mateuca et al., 2006**).

Il est à noter que la génotoxicité est souvent confondue avec la mutagénicité. Tous les agents mutagènes sont des génotoxiques mais pas tous les génotoxiques sont des mutagènes (**Saks et al., 2017**).

I.2 Toxicologie génétique

La toxicologie génétique (ou génotoxicologie) est une discipline scientifique qui met en évidence tout risque toxique au niveau du matériel génétique. Plus précisément, c'est une

science qui évalue les interactions toxiques de l'environnement avec l'ADN dans le but de prévenir et de traiter les manifestations toxiques (**Iamarcovai, 2008; Pham, 2011**).

Au cours de l'évolution de cette discipline, les génotoxicologues ont développé plus de 200 tests *in vitro* et *in vivo* détectant des agents qui altèrent l'ADN mais seuls quelques-uns ont été validés. (**Nesslany, 2007**).

Le domaine de la toxicologie génétique s'est révélé être essentiel puisque la détermination des agents génotoxiques est devenue nécessaire dans le cadre de la prévention des risques cancérigènes et de la toxicité vis-à-vis de la reproduction (**Orsière et al., 2005**). Lors des étapes précoces des essais, une relation apparente entre la cancérogenèse et la génotoxicité fut établie via le développement empirique d'une base de données indiquant que les cancérigènes étaient mutagènes dans le test d'Ames (**McCann et al., 1975**).

II. Dommages de la molécule d'ADN

Il est bien établi que l'ADN représente le support universel de l'hérédité contenant l'information génétique de la plupart des êtres vivants. Cette macromolécule doit donc être extraordinairement stable afin de maintenir le haut degré de fidélité lors de la transmission des caractères héréditaires. Cependant, la structure primaire de l'ADN est une structure dynamique sujette à de constants changements (par exemple, la transposition de gènes, l'altération de bases ou de nucléotides). Ces modifications surviennent soit spontanément, soit comme conséquence d'une exposition à des agents génotoxiques (**Kirsch-Volders et al., 2013; Michel, 2012; Orsière et al., 2005**).

En raison de la variété de structures et de modes d'action des agents génotoxiques présents dans l'environnement, Il existe une très grande diversité dans les lésions de l'ADN (Figure 9). Il est en effet classique de distinguer **les lésions primaires** à l'ADN qui correspondent aux adduits de l'ADN, aux pontages et aux cassures de brins, **les mutations géniques** telles que les additions, les délétions ou substitutions de bases induites par les composés mutagènes et **les mutations chromosomiques** : qualitatives (modifications des chromosomes dans leur structure par des cassures double brin) et quantitatives (erreurs de répartition de chromosomes lors de la division cellulaire ; ces erreurs résultent de l'altérations des kinétochores, des centrosomes, de la tubuline ou de la lamina) (**Dégremont & Cachot, 2009; Orsière et al., 2005**).

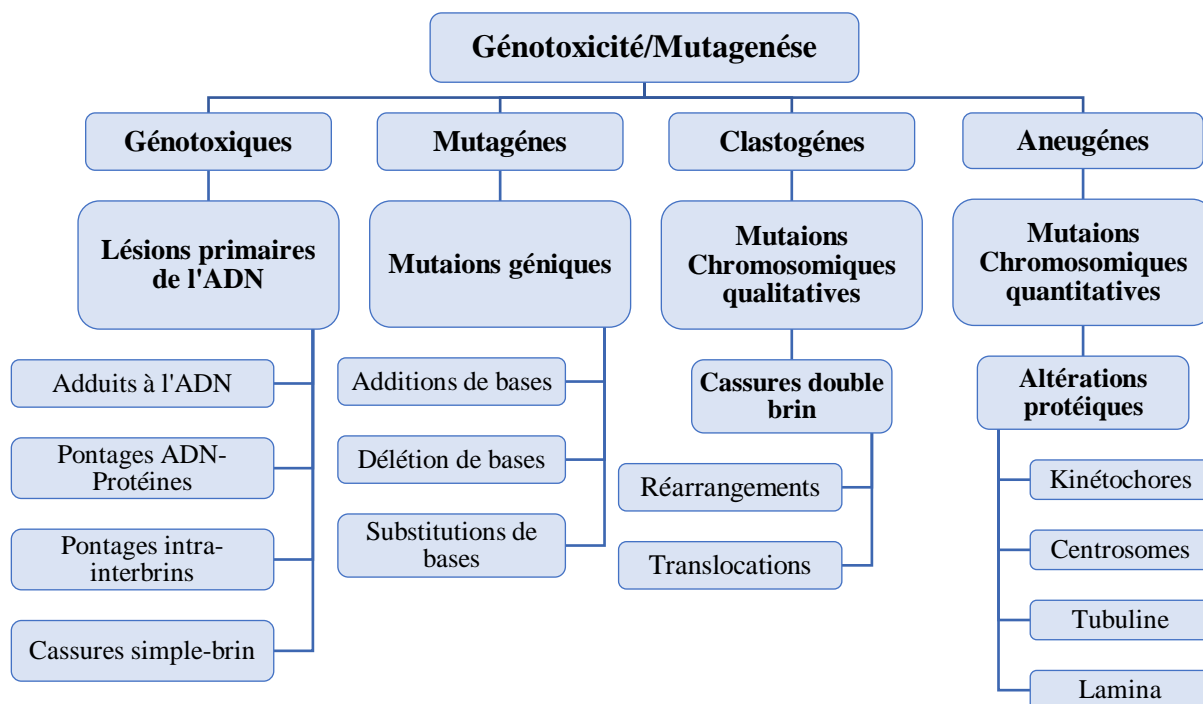


Figure 9 : Diversité des altérations de l'ADN en termes de lésions et de mutations (Orsière et al., 2005).

II.1 Lésions primaires à l'ADN

Les lésions primaires à l'ADN représentent le premier stade consécutif à l'action d'un agent génotoxique. Ces dommages ont pour origine des changements de bases spontanées endogènes (dépurination, désamination, erreurs lors du processus de réplication de l'ADN), ou sont induits par des agents chimiques ou physiques présents dans notre environnement (Orsière et al., 2005). Les altérations initiales possibles de l'ADN provoquées par les facteurs exogènes sont multiples et diverses (Figure 10) :

De nombreux composés électrophiles peuvent en effet exercer leur action en se liant par covalence à l'ADN et forment ainsi des composés d'addition, appelés également adduits. Les modifications des bases par l'action des agents alkylants peuvent entraîner leur élimination et la formation de sites apuriques ou apyrimidiques (sites abasiques, connus également sous le nom des sites AP).

D'autres agents sont à l'origine des cassures simple brin (CSBs) et doubles brins (CDBs) de l'ADN. Certains composés conduisent à l'établissement de liaisons covalentes aboutissant à des alkylations de bases, à des pontages ADN-ADN intra- ou inter-brin et à des pontages ADN-

protéine. Enfin, à côté de ces réactions covalentes, des complexes d'intercalation peuvent être formés par certains composés (Orsière et al., 2005).

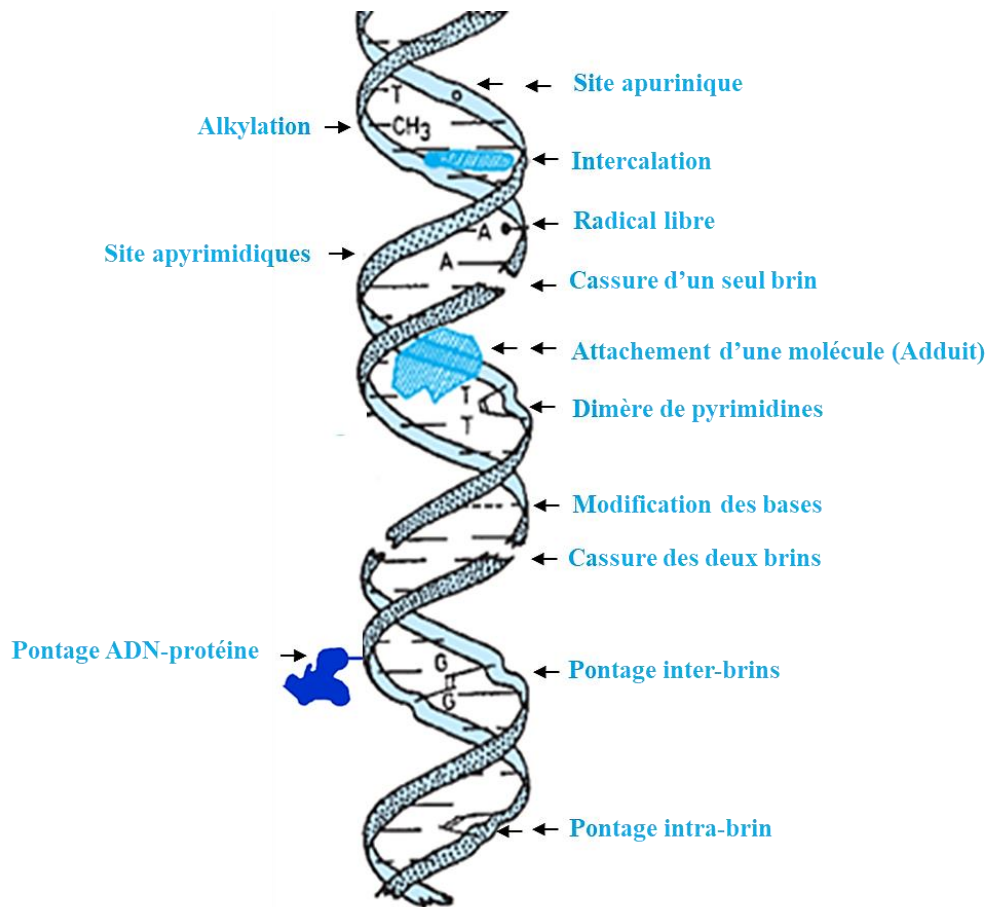


Figure 10 : Représentation schématique des lésions primaires induites par les agents génotoxiques (Preston & Hoffmann, 2001).

II.1.1 Altérations spontanées de l'ADN

Au cours de la vie cellulaire, la molécule d'ADN peut subir des processus de dégradation spontanée. En effet, la double hélice peut être altérée en raison de l'instabilité en conditions physiologiques de certaines liaisons, de la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) au niveau des mitochondries et du réticulum endoplasmique, mais aussi en raison des erreurs générées par les polymérases lors de la réplication (Lemière, 2004; Preston & Hoffmann, 2001).

Des réactions d'hydrolyse *in situ* comme la désamination, la dépurination et la dépyrimidination (beaucoup plus rare) peuvent avoir lieu. L'hydrolyse des liaisons N-glycosidiques liant les bases aux désoxyriboses, par l'ADN glycosylases, conduit à formation

des sites AP. Ces sites sont rapidement convertis en cassures monobrins au moyen des AP endonucléases, et peuvent être à l'origine de distorsions négligeables de la double hélice de l'ADN (Nesslany, 2007). De plus, les bases contenant des amines exocycliques (adénine, cytosine, guanine) peuvent se désaminer à température et pH physiologiques (l'exemple le plus connu est celui de la formation d'uracile après désamination de la cytosine), ce qui conduit à des mutations après réplication (Bellon, 2003).

Il y a par ailleurs les lésions oxydatives de l'ADN qui sont générées lors de l'attaque des bases de l'ADN par les ERO produites lors du métabolisme cellulaire normal en présence d'oxygène. Les principales ERO, responsables directement ou indirectement à la dégradation de l'ADN, sont l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (OH°) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Bellon, 2003). Parmi les produits de l'oxydation des bases de l'ADN, les produits de la guanine (tels que la 8-oxo-7,8-dihydroguanine et la 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine) qui sont les plus abondants dans la cellule du fait que la guanine est la plus réactive à l'oxydation par les ERO (Grillot, 2012). Certaines oxydations de base n'empêchent pas la réplication, mais elles peuvent cependant induire des erreurs lors de la réplication (Lebraud, 2019).

II.1.2 Altérations de l'ADN induites par des facteurs exogènes

Les altérations de l'ADN provoqués par des facteurs exogènes sont très diverses :

II.1.2.1 Adduits à l'ADN

Les adduits (pour **addition** et **produits**) à l'ADN résultent de l'établissement d'une liaison covalente entre un composé chimique électrophile (déficient d'un ou plusieurs électrons) et un site nucléophile (riche en électrons) de l'ADN. Parmi les sites électrophiles, les atomes d'azote, d'oxygène, et de carbone des bases pyrimidiques et puriques. Il existe 18 sites potentiels impliqués dans la formation d'adduits (La & Swenberg, 1996). Certains agents, tels que les HAPs et les AHAs sont capables de réaliser ce type de lésion (Dégremont & Cachot, 2009).

Les adduits à l'ADN entraînent une déformation de la structure spatiale de l'ADN à leurs voisinage, perturbant ainsi sa reconnaissance par l'ADN polymérase au cours du processus de réplication (Dégremont & Cachot, 2009). Ces adduits peuvent être éliminés par les processus de réparation de l'ADN ou à la suite de la mort de la cellule ; cependant, lors d'une exposition à des doses chroniques de cancérogènes, les adduits sont présents dans les

tissus de façon continue (**Lutz, 1990**). La persistance de ce type de lésions induit la mutagenèse et le développement tumoral (**Dégremont & Cachot, 2009**).

II.1.2.2 Pontages ADN-ADN et ADN-protéine

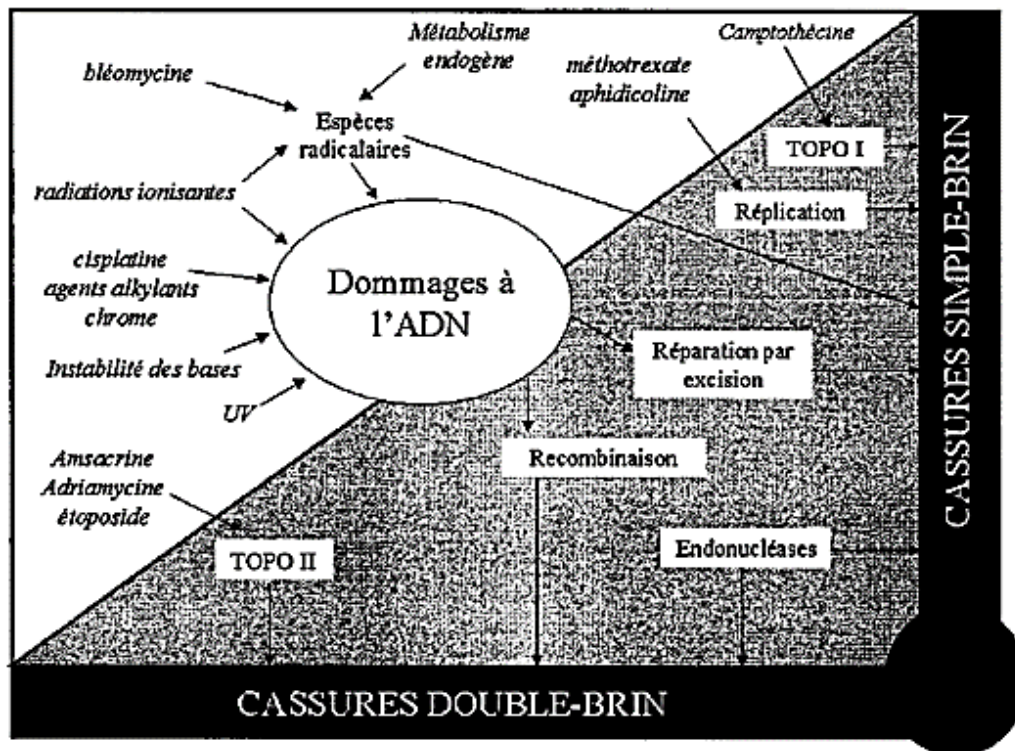
Sous l'effet des agents chimiques ou des rayonnements ionisants, des pontages ou liaisons peuvent se produire entre les deux brins d'ADN (pontage inter-brins) ou à l'intérieur d'un même brin (pontage intra-brin) ou entre l'ADN et des protéines environnantes (**Amiard, 2013; Kienzler, 2013**). Ces pontages se forment lorsque deux radicaux sont générés à la fois sur l'ADN et au niveau des acides aminés constitutifs des protéines proches de l'ADN (**Darolles, 2010**). Comme pour les CDBs, ce type de lésion a pour conséquences le blocage strict de la réplication et la transcription (**Barnes et al., 2018**).

II.1.2.3 Intercalations

Certains composés chimiques, tels que la proflavine, le bromure d'éthidium et l'acridine, peuvent s'insérer dans la double hélice de l'ADN ; dans l'espace compris entre deux paires de bases. L'intercalation induit un changement de la structure locale du brin de l'ADN, avec comme conséquence le blocage de la réplication ou un décalage du cadre de lecture du code génétique lors de la transcription par la délétion ou l'insertion de paires de bases (**Kienzler, 2013; Nessler, 2007**).

II.1.2.4 Cassures simple- et double-brins

Les CSBs et CDBs de l'ADN peuvent être directement induites par l'agent génotoxique (physique ou chimique). Elles peuvent également être consécutives au stress oxydatif induit par l'agent, à l'intercalation d'un xénobiotique, aux adduits, aux dimères de pyrimidines, à l'activation de certaines enzymes (telles que les topoisomérases, les nucléases et les hydrolases lysosomales), ou encore la conséquence de l'intervention des mécanismes de réparation de ces dommages (**Berthelot-Ricou et al., 2013; Eastman & Barry, 1992; Lemièrre, 2004**). Différentes origines des cassures sont représentées sur la figure 11 (**Eastman & Barry, 1992**). Ces cassures de l'ADN peuvent avoir un effet délétère sur la cellule.



La partie en blanc illustre des facteurs et des agents, exogènes et endogènes à l'origine des lésions à l'ADN.

La partie sur fond grisé décrit les processus cellulaires influencés par ces lésions et la formation des coupures à l'ADN.

TOPO I et II : topoisomérases I et II.

Figure 11 : Principales origines des cassures à l'ADN (Eastman & Barry, 1992; Lemièrre, 2004).

Les CSBs sont relativement vite réparées (en moins d'une heure), le plus souvent par l'action de l'ADN ligase, étant donné que le brin opposé de la double hélice maintient les deux extrémités du brin cassé proches. Elles auraient donc peu d'impact en matière de létalité des cellules (Amiard, 2013; Collins et al., 1997; Eastman & Barry, 1992). Alors que, les CDBs forment une catégorie de lésions parmi les plus délétères pour la cellule car elles peuvent conduire à une sévère perte de l'information génétique, à cause de la modification physique du chromosome qui en résulte. Ce type de lésion est considéré comme étant difficilement réparable. Une non-réparation ou une réparation fautive d'une CDB conduira à une aberration chromosomique ou à une mortalité cellulaire (Eastman & Barry, 1992; Khanna & Jackson, 2001; Zennouche, 2005).

II.1.2.5 Sites abasiques

Les sites AP peuvent être formés par les agents alkylants. En effet, ces derniers vont affaiblir la liaison N-glycosidique conduisant à la formation des sites AP (Zennouche, 2005).

La réparation de ce type de lésion peut conduire à l'insertion erronée de bases et favoriser ainsi les mutations (**Preston & Hoffmann, 2001**). Les sites AP sont très labiles et conduisent le plus souvent à des CSBs dont la persistance peut entraîner des lésions irréversibles conduisant à la mort cellulaire (**Kienzler, 2013**).

II.1.2.6 Lésions oxydatives

De nombreux contaminants chimiques, tels que le benzo(a)pyrène et le cadmium, sont décrits comme étant génotoxiques *via* la production d'ERO. La réaction de ces derniers avec l'ADN peut conduire à l'oxydation des bases. La présence des bases oxydées dans l'ADN peut provoquer des erreurs de réparation et participe ainsi à la mutagénèse, à la cancérogénèse, et aux processus de vieillissement cellulaire (**Kienzler, 2013**).

II.1.2.7 Alkylation des bases

L'alkylation de bases est dû au transfert des groupements méthyl ou éthyl par des agents alkylants sur les centres nucléophiles des bases nucléiques (en position N3 de l'adénine, N7 de la guanine, O6 de la guanine, etc...) (**Nesslany, 2007**). Ce type de dommage peut entraîner des ruptures de liaisons hydrogène et des mésappariements pouvant former des pontages intra- ou inter-brins rendant impossible la réplication et la transcription de l'ADN. L'arrêt de la mitose a pour issue la mort cellulaire (**Wyatt & Pittman, 2006**).

II.2 Différentes catégories de mutation de l'ADN

Les lésions primaires à l'ADN décrites ci-dessus sont généralement prises en charge par des systèmes de réparation qui vont conduire à l'élimination du dommage et à la restitution fidèle de l'information génétique (réparation fidèle). L'efficacité de ces systèmes dépend du moment de l'induction de la lésion au cours du cycle cellulaire (non-réparation en fin de cycle) et de la fréquence des lésions par unité de temps (**Kirsch-Volders et al., 2013**). La figure 12 résume les différents types de dommages de l'ADN, les différents mécanismes de réparation mis en jeu ainsi que les conséquences pour la cellule (**Hoeijmakers, 2001**).

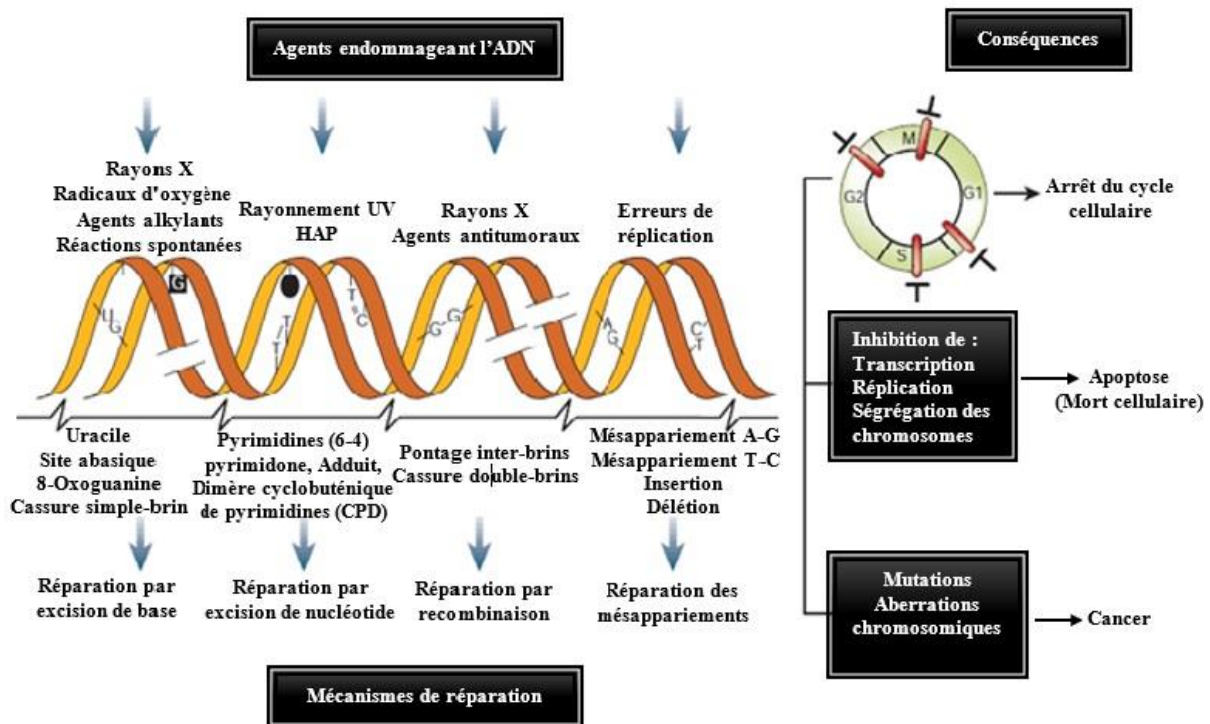


Figure 12 : Principaux dommages de l'ADN, mécanismes de réparation mis en jeu et conséquences (Hoeijmakers, 2001).

Lorsque ces systèmes conservatifs sont déficients ou saturés ou que des lésions sont présentes dans certaines phases du cycle cellulaire (comme la phase S de réplication du génome), des systèmes dits fautifs interviennent dans un second temps. Ces systèmes permettent une réparation d'urgence qui autorise alors la reprise de la réplication de l'ADN malgré la présence de dommages, mais ne garantit pas le maintien de l'intégrité de cet ADN (Dégremont & Cachot, 2009; Nessler, 2007). En cas d'échec ou de dysfonctionnement de ces systèmes, les modifications de l'ADN peuvent être à l'origine d'arrêts prolongés dans le cycle cellulaire, d'inhibition de la transcription et de la réplication de l'ADN, de problèmes de ségrégation des chromosomes. Peuvent alors apparaître des altérations génétiques anormales telles que des mutations géniques irréversibles et héréditaires ou des aberrations chromosomiques (Barillet, 2007; Orsière et al., 2005). A leur tour, ces altérations pourraient être à l'origine de cancers (dans le cas d'atteinte des cellules somatiques) mais aussi de l'effet reprotoxique (dans le cas d'atteinte des cellules germinales) (Berthelot-Ricou et al., 2013). Ainsi, si les dommages sont trop importants, les cellules peuvent mourir par un processus apoptotique (Kirsch-Volders et al., 2013).

Globalement, les mutations peuvent être classées en deux catégories (**Faucet-Marquis, 2005; Nessler, 2007; Vernet, 2015**) :

- **Les micro-mutations** : Ces mutations sont nommées mutations géniques. Ce sont des changements non visibles, qui surviennent au niveau des nucléotides. Ces changements peuvent s'agir soit : a) de changement qualitatif du génome (substitution de paires de bases), b) de changement quantitatif avec perte ou ajout d'un nucléotide provoquant un décalage du cadre de lecture.
- **Les macro-mutations** : Ces mutations peuvent entraîner des modifications de la structure, correspondant à des mutations chromosomiques (effet clastogène), ou des modifications du nombre de chromosomes, correspondant à des mutations génomiques (effet aneugène). Ces mutations ont des effets visibles détectés par une analyse cytologique des chromosomes.

II.2.1 Mutations géniques

Les mutations géniques correspondent à des modifications dans la séquence d'ADN au niveau d'une seule ou plusieurs paires de nucléotides, situés à l'intérieur ou à l'extérieur d'une séquence codante. Les deux principaux types de lésions de l'ADN menant à des mutations géniques sont les substitutions de paires de bases et les mutations par décalage du cadre de lecture (**Hanna et al., 2005; Nessler, 2007**). Les mutations géniques sont à l'origine de beaucoup de maladies génétiques humaines et de nombreuses études tendent à démontrer que des mutations géniques frappant les oncogènes et les gènes supresseurs de tumeurs dans des cellules somatiques jouent un rôle dans le cancer, tant chez l'homme que dans des systèmes expérimentaux (**Organisation de coopération et de développement économiques [OCDE] n°471, 1997**).

II.2.1.1 Substitutions de paires de bases

Elles résultent d'un changement qualitatif dans la composition en nucléotides d'un codon (**Nessler, 2007**). Les substitutions peuvent être subdivisées en deux catégories : les transitions ; remplacement d'une base purique ou pyrimidique par une autre base de même nature, et les transversions ; remplacement d'une base purique par une base pyrimidique et inversement (**Hanna et al., 2005; Preston & Hoffmann, 2001**). Les conséquences d'une substitution sont fonction de sa nature et de sa localisation. Située à l'intérieur d'un codon, cette mutation peut se révéler neutre c-à-d sans effet sur la nature de l'acide aminé incorporé dans la

protéine « **mutation silencieuse** », ou mener à une modification fonctionnelle de la protéine suite à un remplacement d'un acide aminé par un autre « **mutation faux-sens** », ou encore à un remplacement d'un codon d'un acide aminé par un codon stop « **mutation non-sens** » (**Kirsch-Volders et al., 2013; Nessler, 2007**). A l'extérieur d'une séquence codante, les mutations de bases peuvent conduire à des altérations d'épissage au niveau de l'ARN messager et à la dérégulation de l'expression génique (**Nessler, 2007**).

II.2.1.2 Mutations par décalage du cadre de lecture

Les mutations par décalage de cadre de lecture (mutations *frameshift*) sont dues à l'insertion ou la délétion d'une ou plusieurs paires de bases. Elles ont pour conséquence possible de modifier un gène ou un groupe de gènes, pouvant ensuite modifier l'expression et la régulation de nombreux autres, mais surtout aboutir à des protéines tronquées, non fonctionnelles, par l'apparition d'un codon-stop prématuré (UAA, UAG ou UGA) (**Grillot, 2012; Kirsch-Volders et al., 2013; Plumejeaud, 2016**).

II.2.2 Mutations chromosomiques

Les mutations chromosomiques correspondent à des modifications dans la structure de chromosomes (aberrations chromosomiques de structure). Elles résultent de cassures simultanées de deux brins de l'ADN et d'échanges à l'intérieur du même chromosome ou entre chromosomes (**Plumejeaud, 2016**). Les cassures de chromosomes sont induites par des composés qui sont qualifiés de clastogènes (du grec *klastos* signifiant causer des cassures) (**Kirsch-Volders et al., 2013**), tels que la cyclophosphamide (**Darroudi et al., 1996**) et la mitomycine C (**Rosefort et al., 2004**).

Les aberrations chromosomiques peuvent être des délétions, des duplications, des inversions, des insertions ainsi que des translocations. Ces aberrations sont stables car elles peuvent être transmises lors des divisions cellulaires successives et ainsi persister dans une population cellulaire ou dans un organisme. De plus, des cassures de chromosomes peuvent donner naissance à des fragments acentriques, c'est-à-dire des morceaux de chromosomes sans centromère, des chromosomes dicentriques et des chromosomes en forme d'anneau qui sont instables (car ils provoquent la disparition de 50 % des cellules entre la première et la deuxième interphase) et qui entraînent la mort de la cellule par perte de matériel génétique vital (**Nessler, 2007; Plumejeaud, 2016**). La figure 13 illustre quelques types d'aberrations chromosomiques dues à un effet clastogène.

Les aberrations chromosomiques de structure ont généralement des conséquences beaucoup plus sévères de par leur impact sur plusieurs gènes et elles sont associées de manière causale à l'induction de cancer, à des phénomènes d'infertilité et de stérilité ainsi qu'à une part importante de pertes fœtales (**Plumejeaud, 2016**).

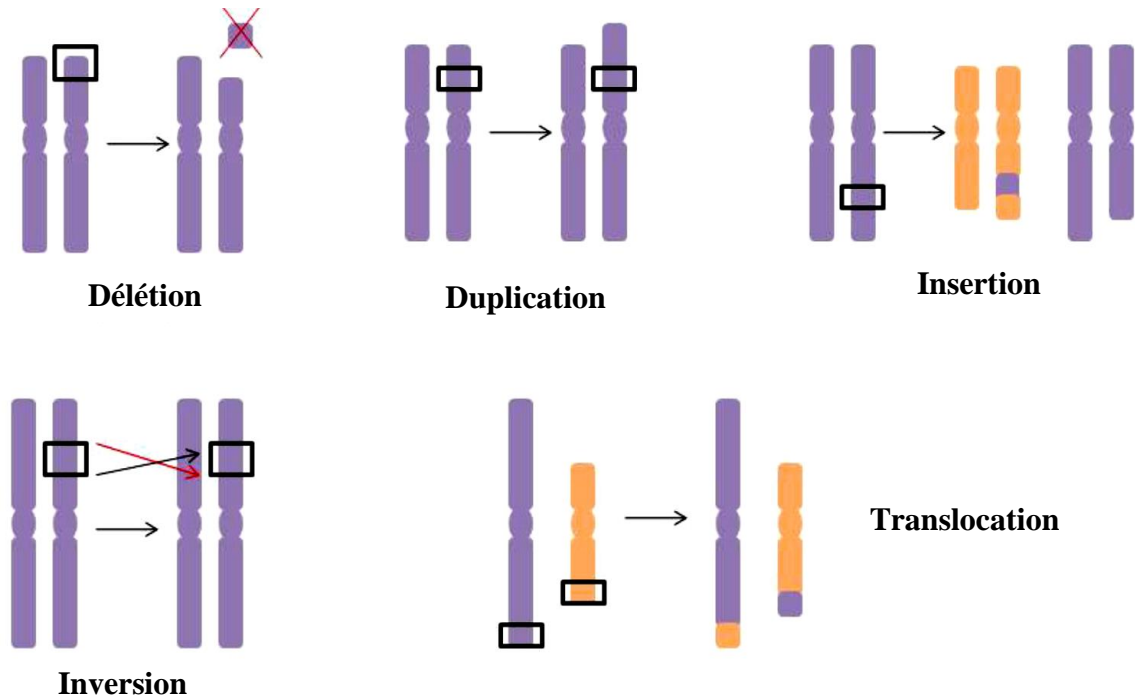


Figure 13 : Différentes aberrations chromosomiques de structure (**Pham, 2011**).

II.2.3 Mutations génomiques

Les mutations génomiques, *i.e.* aneuploïdie et polyploïdie, consistent en des modifications du nombre normal de chromosomes caractérisant chaque espèce (aberrations chromosomiques de nombre) (**Nesslany, 2007**). Elles correspondent à une perte ou à un gain d'un ou de plusieurs chromosomes. Les cellules aneuploïdes ou polyploïdes possèdent donc un nombre de chromosomes différent du nombre normal diploïde ($2n$) qui caractérise l'espèce étudiée. Précisément, l'aneuploïdie correspond au gain ou la perte d'un ou de plusieurs chromosomes ($2n-1$, $2n+2\dots$). La polyploïdie représente une augmentation du nombre de chromosomes qui est un multiple exact de la valeur haploïde (par exemple $3n$, $4n\dots$) (**Kirsch-Volders et al., 2013**).

Les mutations génomiques sont induites par des agents dits aneugènes (dérivé du grec signifiant multiple erroné). Ces agents interagissent, non pas avec la molécule d'ADN, mais avec les structures cellulaires impliquées dans la disjonction et la migration des chromosomes

au cours de la division cellulaire (mitose ou méiose) telles que le fuseau mitotique, les kinétochores ou le complexe synaptonémial (**Plumejeaud, 2016**). La colchicine et la griséofulvine, sont des exemples d'agents aneugènes (**Grillot, 2012; Hashimoto et al., 2010**).

Les mutations génomiques sont néfastes pour un organisme, car elles modifient l'équilibre des fonctions de milliers de gènes (**Grillot, 2012**). L'aneuploïdie dans les cellules germinales contribue significativement aux maladies génétiques humaines comme la trisomie 21 ou syndrome de Down (un gain de chromosome est observé dans la paire n°21) et celle dans les cellules somatiques est associée avec le développement de plusieurs cancers (**Aardema et al., 1998**). Des études cytogénétiques dans des tumeurs ont montré que des variations dans le nombre de chromosomes y sont le plus souvent observées (**Pham, 2011**).

Plusieurs mécanismes conduisent à des aberrations chromosomiques de nombre (**Fenech, 2002; Iarmarcovai et al., 2006; Nessler, 2007; Plumejeaud, 2016**) :

- La non-disjonction ; une mauvaise ségrégation d'un seul ou plusieurs chromosomes du fait d'un défaut de séparation des chromatides sœurs à l'anaphase. Ce phénomène conduit à la formation d'une cellule monosomique et d'une autre cellule trisomique.
- La perte d'un ou de plusieurs chromosomes due à l'absence ou mauvaise fixation du kinétochore (lieu de fixation des microtubules sur les centromères lors de la migration des chromosomes) au niveau du fuseau mitotique en prométaphase, ou encore au retard en anaphase du chromosome.
- La présence d'un nombre anormal de centrosomes (supérieur à 2) conduisait à des mitoses multipolaires responsables d'une ségrégation anormale des chromosomes et donnait naissance à trois (ou plus) cellules filles (**Romé et al., 2010**).
- L'absence de cytotérière après division des noyaux, du fait d'un défaut d'assemblage des microfilaments.
- Un autre mécanisme est connu sous le terme anglo-saxon « mitotic slippage », il est observé lors d'un long blocage des cellules en métaphase. Les cellules sortent brutalement de la mitose sans division nucléaire ni division cellulaire, elles sont alors tétraploïdes.

Depuis le début des années 70, de nombreux tests de génotoxicité ont été développés et utilisés en routine pour détecter de façon précoce des substances susceptibles d'engendrer un processus de cancérogénèse, dont l'étude est contraignante par l'utilisation d'un nombre important d'animaux, par sa durée et par son coût. Cependant, ces tests ne sont pas une alternative aux tests de cancérogénèse classique, car il existe des agents cancérogènes non génotoxiques (Graillet, 2012; Zhou et al., 2006). En raison de la grande variété de lésions susceptibles d'être induites au niveau de l'ADN, il n'existe actuellement aucun test à lui seul capable de détecter tous les types de dommages de l'ADN cités précédemment (Dearfield et al., 2002; Iamarcovai, 2008). D'une manière générale, il faudra en associer plusieurs pour apprécier sur un type cellulaire quelconque à la fois les intensités des lésions primaires de l'ADN et les mutations géniques et chromosomiques (Orsière et al., 2005).

Tout comme les dommages de l'ADN, les tests de génotoxicité peuvent également être classés en tests détectant les lésions primaires de l'ADN, tests détectant les mutations géniques et tests détectant les mutations chromosomiques et génomiques (Figure 14) (Berthelot-Ricou et al., 2013; Orsière et al., 2005). Un produit est considéré comme génotoxique lorsqu'il induit une réponse positive dans un de ces tests (Nesslany, 2007).

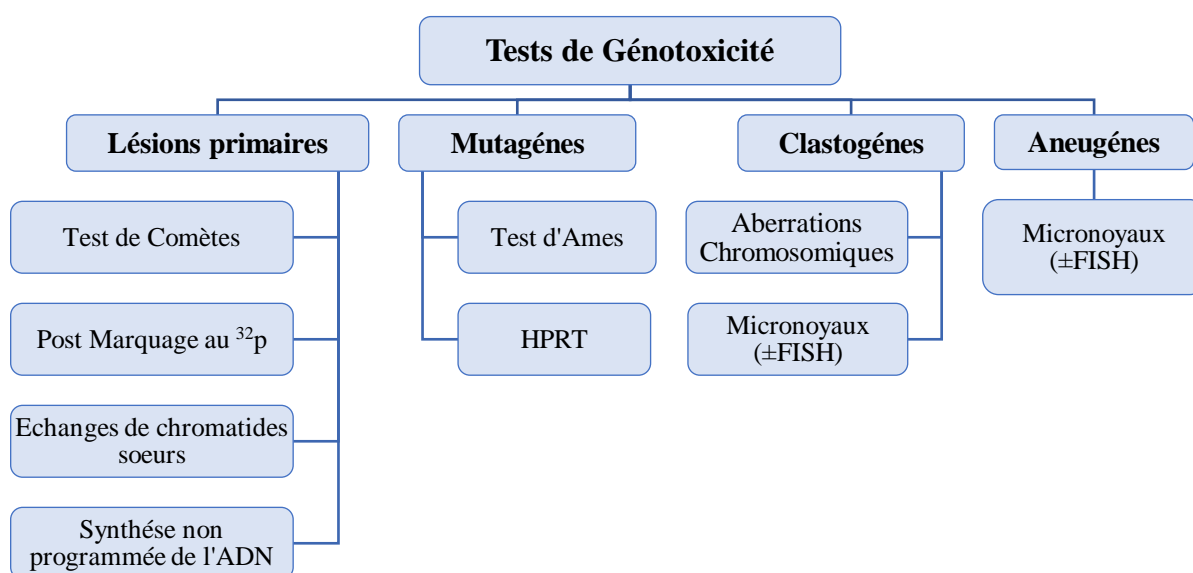


Figure 14 : Tests de génotoxicité déclinés en tests détectant les lésions primaires, les mutations géniques, chromosomiques et génomiques (Orsière et al., 2005).

Les principaux tests de mutagenèse fréquemment rencontrés dans des protocoles de surveillance biologique de populations exposées à des cancérogènes mutagènes sont les tests des comètes, de détection des adduits, d'Ames et des micronoyaux. Il s'avère qu'ils sont complémentaires les uns des autres (Orsière et al., 2005).

I. Détection des lésions primaires de l'ADN

I.1 Détection des lésions primaires de l'ADN sur cellules procaryotes

I.1.1 SOS chromotest

Le SOS chromotest, mis au point par **Quillardet et al. (1982)**, est un test colorimétrique de dépistage rapide du potentiel génotoxique d'une substance. Il est basé sur l'utilisation d'une souche bactérienne, qui sous l'action d'agents génotoxiques, va mettre en place le système de réparation SOS. Ce test détecte donc indirectement les dommages à l'ADN. La souche utilisée est *Escherichia coli* PQ37 pour laquelle un gène rapporteur lacZ, qui est le gène structural de la β -galactosidase, a été inséré dans un gène opérateur du système SOS, le gène *sfiA*. Le test consiste à incuber la souche bactérienne avec la substance à tester. Lorsqu'un agent génotoxique cause une lésion à l'ADN, la protéine RecA est activée, elle-même capable de cliver la protéine LexA, répresseur du système SOS. Le clivage de LexA induit la transcription des gènes SOS (*sfiA*, *uvrA*, *uvrB*, *umuC*, *umuD*...), ainsi que la production de β -galactosidase, mesurable par une simple réaction colorimétrique. L'activité β -galactosidase reflète donc la réponse SOS et le taux de lésion de l'ADN sera alors corrélé à l'augmentation du niveau intracellulaire de β -galactosidase (**Reifferscheid & Heil, 1996**).

I.2 Détection des lésions primaires de l'ADN sur cellules eucaryotes

I.2.1 Test des comètes

Le test des comètes, aussi appelé en anglais *single cell gel electrophoresis* (SCGE), est une technique microélectrophorétique très sensible, fiable et rapide, qui permet de détecter, au niveau des cellules eucaryotes individualisées, les CSBs et CDBs de la molécule d'ADN ainsi que les sites alcali-labiles, qui se forment lorsqu'une base se détache du désoxyribose, donnant naissance à des sites AP. En milieu alcalin (pH>13), ces « points faibles » se rompent et créent des CSBs (**Rojas et al., 1999**).

Contrairement à d'autres tests de génotoxicité, le test des comètes peut s'appliquer sur n'importe quel type cellulaire, à toute lignée ou tissu isolé, humain, animal ou même végétal à

condition qu'une suspension de cellules bien individualisées puisse être obtenue avec une viabilité acceptable (Nesslany, 2007).

L'idée originale de ce test revient à Rydberg et Johanson en 1978. Ils sont les premiers à avoir quantifié les dommages de l'ADN dans des cellules individualisées incluses dans un gel d'agarose déposées sur une lame de microscope. Après lyse en conditions alcalines, permettant le déroulement partiel de l'ADN, et marquage par l'acridine orange, la quantification des dommages se fait par la mesure du rapport fluorescence verte (CDBs) sur fluorescence rouge (CSBs). L'ADN peu endommagé montre alors un rapport fluorescence verte sur rouge élevé et inversement (Rydberg & Johanson, 1978). Dans le but d'améliorer la sensibilité de cette technique, Ostling & Johanson (1984) ont introduit une étape supplémentaire après la lyse, qui est l'électrophorèse en milieu neutre, et ils ont donné à l'essai son nom de test des comètes.

Dans cet essai (Figure 15), les cellules ont été incluses dans un gel d'agarose lui-même étalé sur une lame de microscope, puis lysées par des détergents pour libérer les noyaux. Ces derniers ont ensuite été incubés dans un tampon d'électrophorèse afin de dérouler l'ADN superenroulé. L'ADN ainsi relâché, est soumis à une électrophorèse en milieu neutre puis révélé avec un colorant fluorescent. L'évaluation des lésions peut être effectuée visuellement en classant les comètes selon 5 stades (Figure 16) (Collins et al., 1995; Garcia et al., 2004), ou plus fréquemment de manière automatisée à l'aide d'un analyseur d'image couplé à un logiciel de traitement, qui identifient les paramètres de fluorescence des comètes sélectionnées manuellement. Les cellules dont l'ADN est intact se présentent alors sous la forme d'une sphère compacte. Inversement, si l'ADN est endommagé, les fragments issus des cassures vont migrer en dehors de cette sphère et former une traînée, en direction de l'anode, assimilable à la queue d'une comète. Ainsi naît le test des comètes (Tice et al., 2000).

Cette technique en milieu neutre permet la détection de CDBs de l'ADN mais la présence d'ARN peut conduire à des artéfacts, rendant ainsi son utilisation très limitée. En 1988, Singh modifie la technique en pratiquant l'électrophorèse en conditions alcalines (pH > 13). Dans de telles conditions, le test s'est révélé capable de détecter les CSBs et les sites alcali-labiles (Singh et al., 1988). La plupart des substances génotoxiques induisent beaucoup plus de CSBs et de sites alcali-labiles que de CDBs. Cette version alcaline offre donc une meilleure sensibilité pour la détection des agents génotoxiques (Speit & Rothfuss, 2012). Un groupe d'experts a estimé qu'en terme de toxicologie génétique, la version alcaline du test des comètes est la méthodologie de choix (Tice et al., 2000).

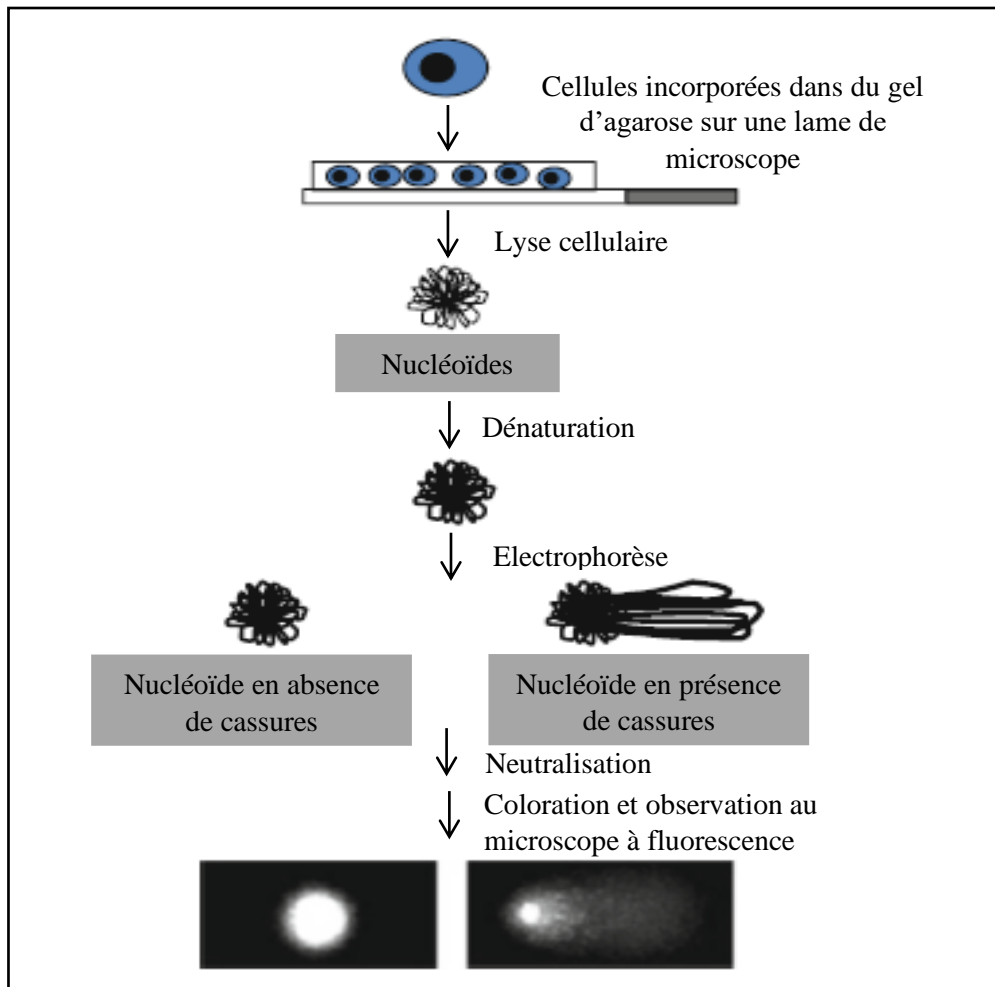


Figure 15 : Principales étapes du test des comètes (Azqueta & Collins, 2014).

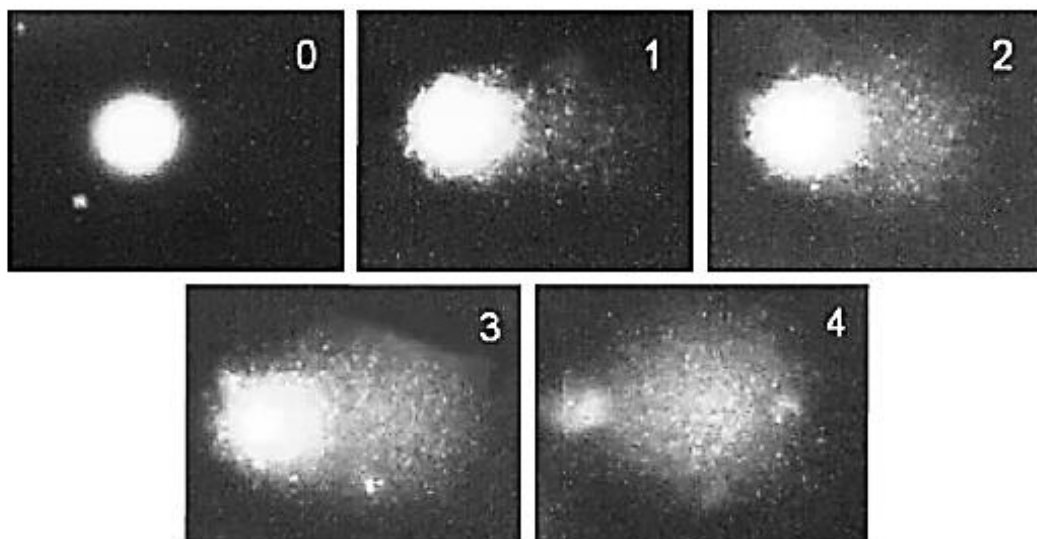


Figure 16 : Classification des comètes en 5 stades selon l'intensité de la migration utilisée en quantification manuelle du niveau de dommages à l'ADN (Azqueta & Collins, 2014).

I.2.2 Test de synthèse non programmée d'ADN

Le test de synthèse non programmée d'ADN (ou test UDS pour *Unscheduled DNA Synthesis*) est une méthode qui met indirectement en évidence les dommages de l'ADN en mesurant la synthèse de réparation de l'ADN après excision et élimination d'un segment d'ADN contenant la région endommagée par l'agent physique ou chimique (OCDE n°486, 1997).

Il s'agit d'un test applicable *in vivo* (OCDE n°486, 1997) et *in vitro* (OCDE n°482). Ce test est basé sur l'incorporation des nucléotides marqués, thymidine tritiée (3H-TdR), dans l'ADN des cellules ne se trouvant pas en phase S du cycle cellulaire (phase de réplication) durant la resynthèse des régions excisées (mécanisme de réparation majoritaire dans les cellules) (CE n°440, 2008). L'incorporation de la thymidine tritiée est habituellement mesurée par autoradiographie (OCDE n°486, 1997). Cette technique autoradiographique permet de visualiser au microscope optique des grains d'argent dans les noyaux des cellules dont l'ADN subit un processus de réparation (Nesslany, 2013; Nicolette, 2017). L'inconvénient de ce test est qu'il quantifie les dommages de l'ADN d'une manière globale sans distinguer les différents types de lésions (Graillet, 2012).

I.2.3 Post-marquage au phosphore 32

Le test de post-marquage au phosphore 32 est l'une des méthodes qui permet la détection des adduits à l'ADN. Il permet d'atteindre une sensibilité de 1 adduit par 10^{10} nucléotides (Reddy & Randerath, 1986). Cette méthode se fait en différentes étapes (Figure 17) (Pitot III & Dragan, 2001) :

- Hydrolyse enzymatique de l'ADN en désoxyribonucléosides 3' monophosphate ; le mélange réactionnel contient donc un mélange de nucléotides normaux et de nucléotides modifiés (adduits) ;
- Sélection des adduits par enrichissement à la nucléase P1, qui coupe le phosphate en 3' des nucléotides normaux mais pas celui des adduits ;
- Marquage spécifique des adduits par phosphorylation en 5' par la T4 polynucléotide kinase en présence de γ - ^{32}P ATP ;
- Séparation des adduits marqués par chromatographie sur couche mince bidimensionnelle ;
- Détection et quantification des adduits après autoradiographie.

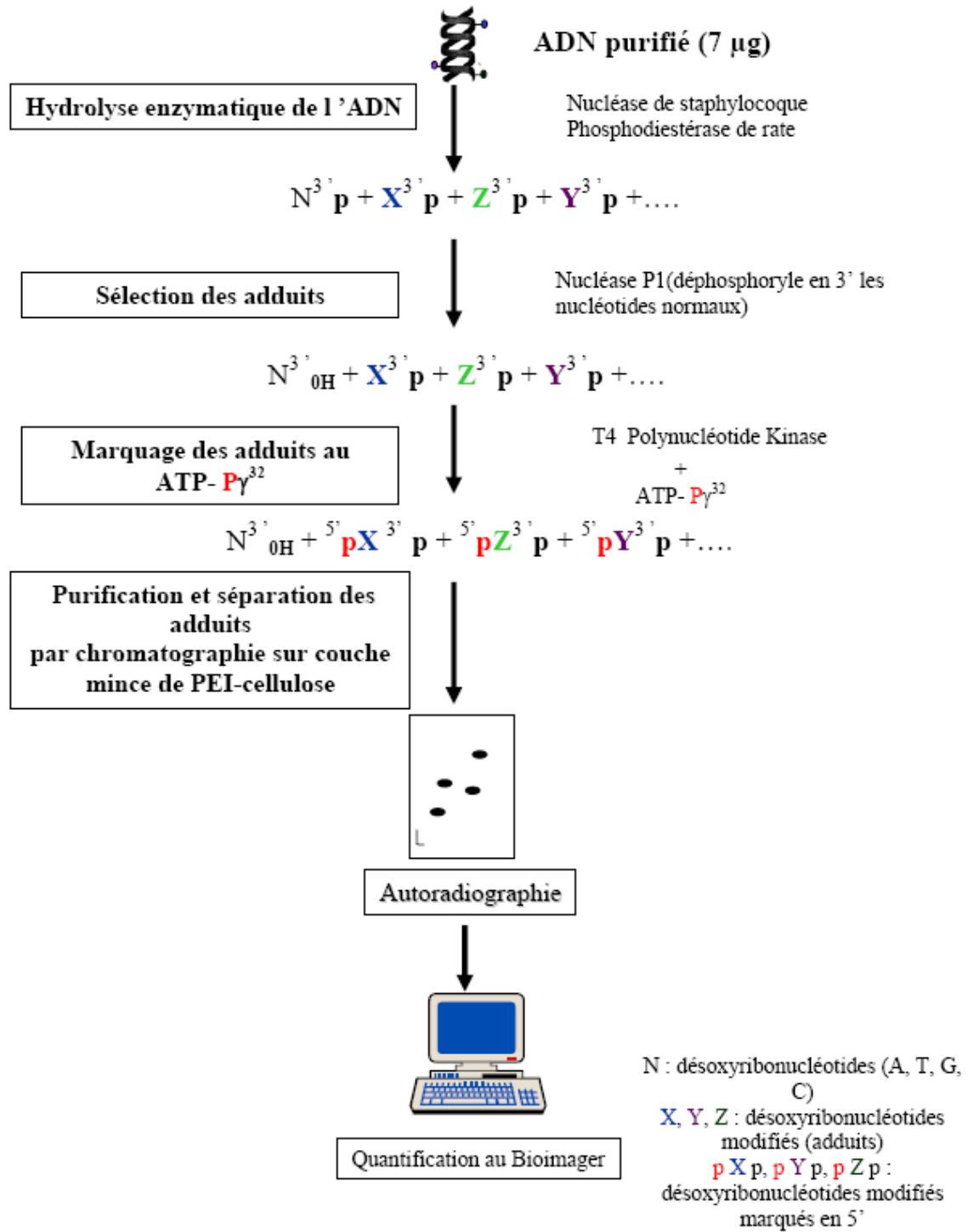


Figure 17 : Principe de la méthode de post-marquage au phosphore 32 de l'ADN (Michel, 2012).

II. Détection des mutations géniques de l'ADN

II.1 Tests de mutations géniques sur cellules procaryotes

II.1.1 Test d'Ames

Le test de mutagénèse le plus connu et le plus communément utilisé dans le monde est le test d'Ames (**Dégremont & Cachot, 2009; Turkez et al., 2017**). Il est décrit dans la ligne directrice n° 471 de l'OCDE (**OCDE n°471, 1997**). Ce test, mis au point dans les années 1970 par le Pr. Bruce Ames, consiste à évaluer la capacité d'une substance chimique ou d'un agent physique à induire des mutations spécifiques dans différentes souches de *S. typhimurium* (TA97, TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538, TA102) (**Maron & Ames, 1983**). Les souches utilisées dans le test portent une mutation préalablement induite dans l'un des gènes de l'opéron histidine qui rend les bactéries incapables de synthétiser l'acide aminé histidine (bactéries auxotrophes vis-à-vis de l'histidine), et par conséquent, elles sont incapables de se développer sur un milieu sélectif dépourvu d'histidine (**Mortelmans & Zeiger, 2000**). L'exposition à un agent mutagène provoque de nouvelles mutations dites réverses dans cette même région de l'ADN conduisant à un retour vers le phénotype sauvage ; c'est-à-dire que les souches bactériennes auxotrophes pour l'histidine (His-) deviendront prototrophes (His+). Ces souches nouvellement mutées sont donc capables de synthétiser l'histidine et capables de croître sur un milieu sans histidine (**Dégremont & Cachot, 2009; Jin, 2016**). Le nombre de révertants (His+), ayant poussé au bout de 48h sur un milieu de culture sans histidine, est proportionnel au pouvoir mutagène de la substance testée (**Dégremont & Cachot, 2009**).

Ce test permet de mettre en évidence en particulier les mutations ponctuelles par substitution de paires de bases et les mutations « *frameshift* » soit par insertion ou délétion d'une ou plusieurs paires de bases dans la molécule d'ADN (**OCDE n°471, 1997**).

Le test d'Ames a été validé pour la première fois dans une étude portant sur 300 produits chimiques, dont la plupart étaient des cancérigènes connus (**Mccann et al., 1975**). Il a ensuite été validé dans des études menées par l'*Imperial Chemical Industries* (**Purchase et al., 1976**), le *National Cancer Center Research Institute* de Tokyo (**Sugimura et al., 1976**) et le CIRC (**Bartsch et al., 1980**). Près de 90% des cancérigènes testés étaient mutagènes dans ces études. Ces valeurs prédictives élevées ont conduit à l'utilisation étendue du test pour le dépistage des mutagènes et des cancérigènes (**Zeiger, 2013**). En outre, un nombre considérable de mutagènes

détectés par le test d'Ames se sont par la suite révélés cancérigènes lors des tests de cancérogenèse effectués sur les animaux (**Ames et al., 1973**).

Cette corrélation entre mutagénicité et cancérogenèse est essentiellement due au fait que les bactéries peuvent également être cultivées *in vitro* en présence d'enzymes de biotransformation (**Nesslany, 2007**). De nombreux produits chimiques sont biologiquement inactifs sous leur forme native et doivent être métabolisés, généralement dans le foie des mammifères, en une espèce électrophile capable de se lier de façon covalente à l'ADN et entraîner ainsi des mutations. Étant donné que les bactéries ne possèdent pas cette capacité métabolique, le Pr. Ames et ses collègues ont ajouté au test un homogénat de foie de rat (appelé S9, car il est préparé à partir d'une fraction hépatique surnageante de $9000 \times g$) et des cofacteurs enzymatiques (**Mortelmans & Zeiger, 2000**). La fraction S9 est préparée à partir de rats prétraités par un inducteur enzymatique (soit l'arochlor 1254, le plus utilisé, soit un mélange polychlorobiphényle ou phénobarbital-plus- β -naphthoflavone) pour induire les enzymes (cytochrome P450) nécessaires à l'activation métabolique. Le S9 a également été préparé à partir de souris, hamsters et autres animaux, mais le S9 à partir de rats est le plus largement utilisé (**Zeiger, 2013**).

Ce test est simple d'exécution, sensible, de coût modique, rapide (48h) et pratique pour estimer le potentiel carcinogène d'un composé, car les tests de cancérogenèse standard chez les souris et les rats sont très longs et coûteux (**Jin, 2016**). De plus, il permet l'analyse d'échantillons variés et a été standardisé (**OCDE n°471, 1997**). Il donne des résultats quantitatifs permettant des études comparatives mais aussi des indications mécanistiques en fonction des souches de *S. typhimurium* utilisées (**Dégremont & Cachot, 2009**). Il est devenu donc une méthode de référence internationale et il est actuellement toujours utilisé comme test de criblage initial pour la détection des mutagènes (**Kumar et al., 2018**). Son succès repose sur la bonne corrélation entre les mutations géniques détectées par ce test et la cancérogenèse expérimentale effectuée sur mammifères.

II.2 Tests de mutations géniques sur cellules eucaryotes

Il existe plusieurs tests permettant d'évaluer le potentiel mutagène d'un produit chimique sur des modèles de lignées cellulaires de mammifères, décrits dans les lignes directrices de l'OCDE n°476 et n° 490 (**OCDE n°476, 2016; OCDE n°490, 2016**). Leur principe repose sur la mise en évidence de mutations directes induites sur un gène qui contrôle la synthèse d'une enzyme particulière, impliquée dans la biosynthèse de nucléotides de l'ADN.

Une mutation sur ce gène entraîne la perte de la capacité de la cellule à synthétiser cette enzyme. L'exposition à ce qu'on appelle l'agent sélectif permettra la croissance exclusive des cellules mutantes qui sont « résistantes » à cet agent, tandis que les cellules non mutantes qui y sont sensibles ne se développeront pas (Nessler, 2007).

Les deux tests courants pour la détection de mutations géniques dans les cellules de mammifères sont : (1) test de thymidine kinase (TK) et (2) test d'hypoxanthine phosphoribosyl transférase (HPRT) (Dewangan et al., 2018).

II.2.1 Test de mutation génique au locus TK

Ce test permet de détecter des événements génétiques, qui affectent le gène de la thymidine kinase, enzyme clé de la biosynthèse des nucléotides de l'ADN en catalysant la phosphorylation de la thymidine en thymidine triphosphate (TMP), notamment des mutations géniques (mutations ponctuelles, mutations décalant le cadre de lecture, petites délétions, etc.) et des événements chromosomiques (délétions importantes, réarrangements chromosomiques et recombinaison mitotique). Ces derniers événements sont exprimés par la perte d'hétérozygotie, qui est une modification génique courante des gènes suppresseurs lors de la tumorigenèse chez l'homme (OCDE n°490, 2016; Schisler et al., 2013).

Des cellules hétérozygotes pour le gène de la thymidine kinase (TK+/-) sont exposées au produit chimique d'essai, en présence et en l'absence d'une source exogène d'activation métabolique. À l'issue de la période de traitement, elles sont cultivées pendant une période de temps définie afin de déterminer le taux de survie des cellules et de permettre l'expression phénotypique des mutations induites. Au bout de ce temps d'expression, les cellules sont exposées à l'agent sélectif des cellules mutantes TK-/-, la trifluorothymidine (TFT) (OCDE n°490, 2016). Cet analogue de la thymidine est non toxique pour les cellules mutantes TK-/- qui, par perte de l'enzyme thymidine kinase, ne peuvent pas phosphoryler la TFT en un dérivé trifluorothymidine monophosphate (TFTMP) toxique et elles deviennent donc capables de survivre et de se multiplier en présence de TFT. En revanche, les cellules non mutantes restent hétérozygotes et vont phosphoryler la TFT en TFTMP qui sera incorporé aux acides nucléiques à la place de la thymidine monophosphate, provoquant ainsi la mort cellulaire par inhibition de la synthèse d'ADN (Moche, 2014).

Le test est capable de définir deux classes phénotypiques distinctes de mutants TK-/- : les mutants dont la croissance est normale qui grandissent à une vitesse similaire à celle des

cellules parentales (cellules hétérozygotes TK+/-), et les mutants à la croissance faible qui grandissent avec des temps de doublement plus longs. Des études sur la nature moléculaire et cytogénétique de ces deux types de mutants ont montré que les mutants à croissance normale correspondent à des mutations géniques du locus TK (substitutions, délétions de paires de bases). Alors que, les mutants à la croissance lente correspondent à des changements structurels bruts au niveau chromosomique (**Schisler et al., 2013**).

II.2.2 Test de mutation génique au locus HPRT

La méthodologie de ce test est très similaire à celle du test de mutation génique au locus TK. L'hypoxanthine phosphoribosyl transférase (HPRT) est l'enzyme qui peut convertir la guanine en guanine-ribosyl-phosphate (GRP) qui sera incorporée dans l'ADN. Ce test est basé sur la phosphorylation de la 6-thioguanine (TG), analogue toxique de la guanine, par l'HPRT en phospho-6-thioguanine toxique pour la cellule. Les délétions, insertions, mutations ponctuelles produites au locus HPRT sont responsables de la perte de fonction de l'enzyme. Les cellules mutantes sont donc résistantes à la TG, agent sélectif des mutants, alors que les cellules non mutantes munies de l'enzyme HPRT sont sensibles à cet agent qui entraîne une inhibition du métabolisme et l'arrêt de la division cellulaire (**OCDE n°476, 2016**).

III. Détection des mutations chromosomiques et génomiques

III.1 Test du micronoyau

Le test du micronoyau a été mis au point dans les années 70 et reste une méthode de choix pour l'évaluation de la génotoxicité. Il est pratiqué *in vivo* ou *in vitro* chez les mammifères ou cellules de mammifères et font l'objet de lignes directrices de l'OCDE n°474 et 487 (**OCDE n°474, 2016; OCDE n°487, 2016**).

Ce test a pour but d'évaluer les anomalies chromosomiques de structure (événements clastogènes) et de nombre (événements aneugènes) induites par des substances génotoxiques (**Iarmarcovai et al., 2007**). En effet, ces anomalies se traduisent par la formation de micronoyaux. En utilisant des techniques de coloration de l'ADN, ces micronoyaux deviennent visibles et dénombrables au microscope. Le nombre de cellules micronucléées, c'est-à-dire contenant un ou plusieurs micronoyaux, pour 1000 cellules nucléées est utilisé comme mesure de la génotoxicité (**Westerink, 2011**). Le protocole opératoire de ce test est détaillé dans la partie « Matériel et méthodes ».

Les micronoyaux, également appelés corps de Howell-Jolly par les hématologistes, sont des entités nucléaires indépendantes du noyau principal formées au cours de la division cellulaire, lors de la transition métaphase/anaphase (**Orsière et al., 2008**). Ils peuvent contenir des fragments de chromosome acentromériques et/ou des chromosomes entiers non intégrés dans les noyaux des cellules filles au cours de la mitose. Ces deux types de contenu correspondent à des mécanismes de formation différents : Les fragments chromosomiques acentromériques sont consécutifs à des cassures double brin de l'ADN et ne peuvent pas se rattacher au fuseau mitotique, du fait de l'absence de centromères (résultats d'un événement clastogène). La perte de chromosomes entiers résulte essentiellement d'altérations et de dysfonctionnement de fuseaux mitotiques impliquées dans la ségrégation et la migration des chromosomes (résultats d'un événement aneugène) (Figure 18) (**Mateuca et al., 2006**).

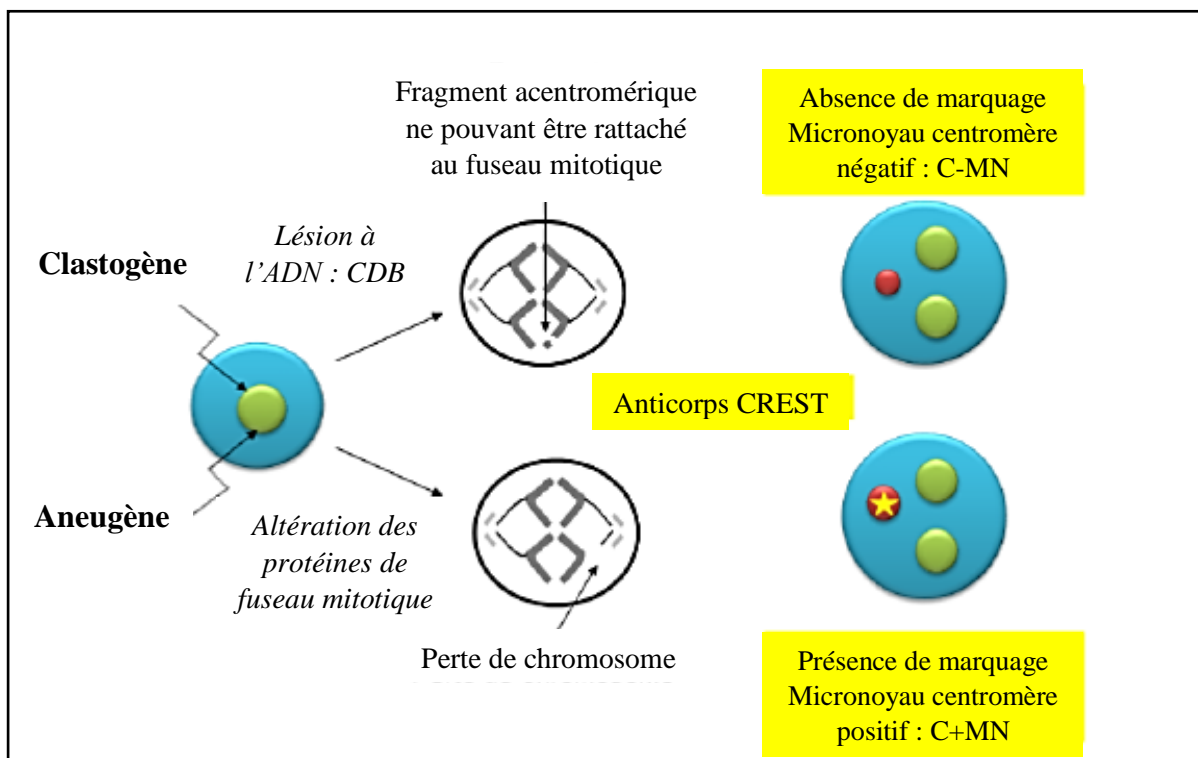


Figure 18 : Mécanisme de formation de micronoyaux et marquage centromérique (**Plumejeaud, 2016**).

Les micronoyaux constituent un dommage stable et persistant (effet mutagène), puisqu'on les retrouve dans la cellule pendant la durée de vie de celle-ci, et il a donc une rémanence longue ; le test des micronoyaux a d'ailleurs été présenté comme ayant une valeur prédictive pour le risque de cancer (**Bonassi et al., 2007**). Son application n'est possible que

sur les cellules eucaryotes capables d'effectuer une division cellulaire en culture (**Berthelot-Ricou et al., 2013**).

Afin de distinguer un évènement clastogène d'un évènement aneugène, le test des micronoyaux est couplé à un marquage des centromères par hybridation *in situ* de sondes pancentromériques fluorescentes (technique FISH), L'apparition d'une fluorescence signe la perte d'un chromosome entier, par conséquent un évènement aneugène (**Kirsch-Volders et al., 2011**).

L'avantage de ce test est qu'il est rapide, très fiable, facile à mettre en œuvre et peut s'utiliser sur tout type cellulaire. D'autre part, il s'agit du seul test qui détecte l'aneuploïdie (**Kirsch-Volders et al., 2011; Turkez et al., 2017**). Il est recommandé dans la batterie de tests pour l'évaluation génotoxique d'une substance (**EFSA, 2011; Kirkland et al., 2005**).

III.2 Test des aberrations chromosomiques

Le test des aberrations chromosomiques, également appelé test d'analyse de métaphases, peut être pratiqué *in vitro* sur des lignées cellulaires de mammifères (**OCDE n°473, 2016**) ou *in vivo* sur des cellules de moelle osseuse de rongeurs (**OCDE n°475, 2016**). Les cellules utilisées sont choisies en fonction de leur potentiel de croissance en culture, de la stabilité de leur caryotype (notamment leur nombre de chromosomes), et de la fréquence des aberrations chromosomiques spontanées (**CE n°440, 2008**).

Ce test permet la détection des aberrations chromosomiques de structures, produites suite à des CDBs de l'ADN et apparaissant sous la forme de délétions, fragmentations et modifications intrachromosomiques ou interchromosomiques (**OCDE n°473, 2016**). Les aberrations de structure peuvent être de deux types : chromosomiques ; se traduisant par une cassure, ou par une cassure et une réunion, des deux chromatides sur le même site, ou chromatidiennes ; se traduisant par une cassure d'un seul chromatide ou par une cassure et une réunion entre chromatides (**CE n°440, 2008**).

Les aberrations chromosomiques indiquent un dommage stable et persistant (mutation) qui représente un événement potentiellement initiateur dans le processus qui mène à la néoplasie (**Ortega, 2004**). Cet essai n'est pas conçu pour évaluer les aberrations de nombre et n'est pas utilisé systématiquement dans ce but (**CE n°440, 2008**).

Des animaux ou des cultures de cellules sont exposées à la substance d'essai. À intervalles prédéterminés, les cellules sont traitées avec une substance qui bloque la métaphase

(par exemple la colchicine ou du colcemid®), récoltées et colorées. Les cellules métaphasiques sont analysées au microscope pour déceler les aberrations chromosomiques (**Jain et al., 2018**).

Le test d'aberration chromosomique est relativement lourd et fastidieux à réaliser. Par contre ce test a par contre pour avantage de permettre la détection de tout type d'atteinte chromosomique. Il comporte une approche cellule par cellule, ce qui permet par conséquent d'avoir un grand nombre de données et donc un traitement statistique performant des résultats (**Fardel et al., 2009**).

MATERIEL & METHODES

I. Échantillonnage

Au total, huit échantillons de viande transformée industriellement (corned-beef fabriqué en Algérie, corned-beef importé, Saucisson salami du bœuf, K-chir, rôti de poulet fumé, rôti de bœuf cuit fumé, chawarma de poulet et jambon de bœuf) sont achetés auprès des supermarchés populaires. Nous avons soigneusement confirmé que tous les échantillons sont extraits avant la date de péremption indiquée sur les emballages. L'emballage et les ingrédients de ces produits sont mentionnés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Emballages et ingrédients de produits carnés transformés industriellement étudiés.

Produits	Emballage	Ingrédients
Corned-beef fabriqué en Algérie	En conserve	Viande de bœuf congelée haché », sel nitrite (0.6% de nitrite de sodium), additifs alimentaires : gélifiant (carraghénane-BPF), stabilisants (Di, Tri et polyphosphate de sodium 2000 mg/ml).
Corned-beef importé	En conserve	Viande de bœuf, céréales, sel, sucre et conservateur SIN 250.
Saucisson Salami du bœuf	Emballé sous- vide	Viande de bœuf, eau, amidon de maïs, sel nitrite (nitrite de sodium), épices, sel de table, dextrose, additifs alimentaires : stabilisant (polyphosphate de sodium), conservateurs (acétate de sodium et diacétate de sodium), colorant (rouge allura AC), exhausteurs de goût (glutamate monosodique, guanilate disodique, inosinate disodique), acidifiant (acide citrique), antioxydants (lactate de sodium, acide ascorbique), antiagglomérant (dioxyde de silicium).
Rôti de bœuf cuit fumé	Emballé sous- vide	Viande de bœuf frais, sel, eau, fumé, mélange d'épices, additif alimentaire : stabilisant (diphosphate de sodium).

Suite (Tableau 2)

Produits	Emballage	Ingrédients
Rôti de poulet fumé	Emballé sous- vide	Escalope de poulet, poulet séparé mécaniquement, fécule de pomme de terre, amidon de maïs, mélange d'épices, sel nitrite, additifs alimentaires : stabilisants (SIN 451 i, SIN 450 i), acidifiants (SIN 325, SIN 330).
K-chir	Emballé sous- vide	Viande de poulet, eau, amidon de maïs, olives verte, huile végétale, betterave, sel nitrite (0.6% nitrite de sodium), protéines de soja, extrait d'arômes (Di et Tri phosphate, glutamate monosodique, dextrose, soja, épices, erythorbate de sodium, acide citrique, oignons), additifs alimentaires : stabilisant (polyphosphate de sodium 2000 mg/Kg), antioxydant (citrate de sodium-BPF), Colorant (rouge allura AC 25 mg/Kg).
Chawarma de poulet	Emballé sous- vide	Viande de poulet, eau, amidon de maïs, sel nitrite (nitrite de sodium), épices, sel de table, dextrose, additifs alimentaires : stabilisant (polyphosphate de sodium), conservateurs (acétate de sodium et diacétate de sodium), exhausteurs de goût (glutamate monosodique, guanilate disodique, inosinate disodique), acidifiant (acide citrique), antioxydants (lactate de sodium, acide ascorbique), antiagglomérant (dioxyde de silicium).
Jambon de bœuf	Emballé sous- vide	Viande de bœuf, protéines végétales, huile de table, fécule de pomme de terre, mélange d'épices, fines herbes, stabilisant E450 AC, colorant alimentaire E120, arôme Jambon de bœuf de nouveau monde.

II. Préparation de l'échantillon

Des possibles composés génotoxiques à partir des échantillons de viande transformée industriellement sont extraits par macération en utilisant un solvant apolaire (*n*-hexane) (Chung et al., 2011) et un solvant polaire (méthanol) (Krone & Iwaoka, 1984 ; Sharif et al., 2008). Chaque échantillon (environ 200 g) est broyé à l'aide d'un hachoir à viande puis macéré avec 800 ml de méthanol ou de *n*-hexane. Le mélange est laissé sous agitation magnétique pendant 24 h à la température ambiante du laboratoire et à l'abri de la lumière. Ensuite, centrifuger à 3000 tour/min pendant 15 min, suivi d'une double filtration sur papier filtre Whatman n°1. Cette procédure est répétée deux fois avec 400 ml de chaque solvant. Les filtrats sont rassemblés et évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif à une température de 37 °C pour obtenir des extraits secs. Les extraits secs de *n*-hexane sont reconstitués dans de l'éthanol à la concentration initiale maximale de 10 mg/ml, tandis que les extraits secs de méthanol sont reconstitués dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à la concentration initiale maximale de 50 mg/ml pour des analyses *in vitro*. Le protocole d'extraction est schématisé dans la figure 19.

Le choix du solvant de reconstitution se fait selon l'ordre préférentiel d'utilisation des solvants compatibles avec le test d'Ames et avec les cultures cellulaires : eau distillée, DMSO, éthanol, acétonitrile, tétrahydrofurane, heptane, cyclohexane, acétone, glycérol, N,N-Diméthylformamide, formamide et 1-méthoxy-2-propanol. En effet, nos extraits méthanoliques ne sont pas solubles dans l'eau distillée, mais ils sont totalement solubles dans le DMSO à la concentration de 50 mg/ml. En revanche, les extraits hexaniques ne sont pas solubles ni dans l'eau distillée ni dans le DMSO, mais font une suspension homogène dans l'éthanol à la concentration de 10 mg/ml. Notons que nous sommes limités pour le choix de la dose maximale par la solubilité des extraits.

III. Calcul du rendement

Le rendement en composé polaire/apolaire est le rapport entre le poids de l'extrait et le poids de l'échantillon traité. Il est exprimé en pourcentage et calculé selon la formule suivante : $\% R = Pa / Pb \times 100$.

Où : **R** : rendement en % ; **Pa** : poids de l'extrait en g ; **Pb** : poids de l'échantillon traité en g.

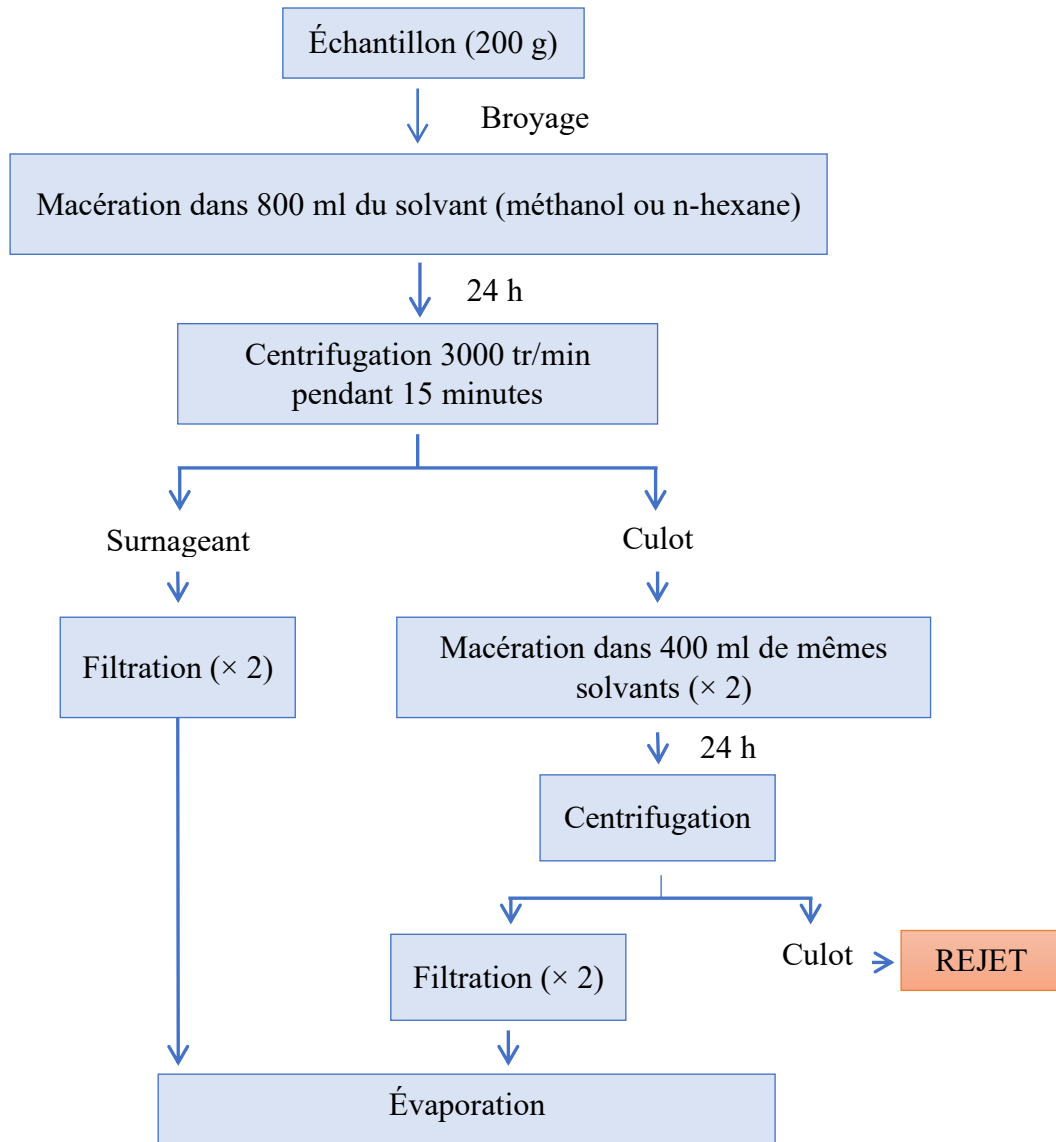


Figure 19 : Protocole de la préparation des extraits secs de viande transformée.

IV. Tests de génotoxicité

Trois tests de génotoxicité (test d'Ames, test des micronoyaux et test de comètes) sont utilisés dans le cadre de ce travail.

IV.1 Test d'Ames

L'objectif de ce test est de rechercher une activité mutagène potentielle sur un modèle bactérien comme le proposent (Ames et al., 1975 ; Maron & Ames, 1983), et conformément aux recommandations de la ligne directrice d'OCDE pour les essais de produits chimiques n°471 (OCDE n°471, 1997) et de la ligne directrice de la Commission européenne n° 440 (CE

n°440, 2008). Les essais sont effectués sur les souches bactériennes de *S. typhimurium* TA1537, TA98, TA100 et TA102.

IV.1.1 Principe

Le principe du test repose sur la détection de mutations qui inversent des mutations présentes au niveau du locus *his* des souches de *S. typhimurium* auxotrophes pour l'histidine (c'est-à-dire qu'elles ne peuvent pas se développer sur un milieu pauvre en histidine) et rétablissent ainsi la capacité fonctionnelle de ces bactéries de synthétiser l'histidine. Les bactéries révertantes (prototrophes) sont détectées d'après leur capacité de se développer en l'absence d'histidine (Turkez et al., 2017).

Le test d'Ames consiste dans sa version classique standard à préparer des mélanges de bactéries, de la substance à tester et de la gélose molle de surface et à les étaler immédiatement sur des boîtes de Pétri contenant un milieu minimum. Après 48 h d'incubation, les colonies révertantes sont comptées et leur nombre est comparé à celui des révertants spontanés dans les boîtes témoins traitées avec le solvant (témoins négatifs). Le produit sera considéré mutagène si le nombre de révertants observés est au moins deux ou trois fois plus important que le nombre de révertants spontanés (Ames et al., 1973, 1975). Les essais sont réalisés en absence et en présence d'activation métabolique à l'aide d'extrait d'homogénat de foie (S9) et de cofacteurs, permettant la mise en évidence des mutagènes directs et des agents pro-mutagènes (mutagènes exclusivement après activation métabolique), respectivement.

Les résultats positifs obtenus lors du test indiquent que la substance induit des mutations ponctuelles par substitutions de bases ou modifications du cadre de lecture dans le génome de *S. typhimurium*. Un résultat négatif signifie que, dans les conditions de l'essai, la substance n'est pas mutagène pour l'espèce utilisée dans l'essai (OCDE n°471, 1997).

IV.1.2 Souches bactériennes de *S. typhimurium*

Les souches de *S. typhimurium* sont obtenues auprès du Pr. Bruce Ames (University of California Berkeley, USA) et sont conservées dans l'azote liquide. Les caractéristiques des souches utilisées dans cet essai sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Souches bactériennes utilisées dans le test d'Ames et leurs caractéristiques (Kumar et al., 2018).

Souches	Mutation du gène histidine	Autres mutations		Plasmide	Séquence d'ADN cible	Types de mutations détectées
		LPS	Réparation de l'ADN			
TA1537	<i>his C</i> 3076	<i>rfa</i>	<i>uvr B</i>	-	CCCC GGGG	<i>Frameshift</i>
TA98	<i>his D</i> 3052	<i>rfa</i>	<i>uvr B</i>	pKM101 (Ap ^r)	CGCGCGCG GCGCGCGC	<i>Frameshift</i>
TA100	<i>his G</i> 46	<i>rfa</i>	<i>uvr B</i>	pKM101 (Ap ^r)	CCC GGG	Substitution de paires de bases
TA102	<i>his G</i> 428	<i>rfa</i>	-	pKM101 (Ap ^r) et pAQ1 (Tc ^r)	CAAGTAAGAGC GTTCAT TCTCG	Substitution de paires de bases

Ap^r, résistance à l'ampicilline ; Tc^r, résistance à la tétracycline

Toutes les souches présentent des mutations différentes dans divers gènes de l'opéron qui gouverne la synthèse de l'histidine ; chacune de ces mutations est conçue pour répondre aux mutagènes qui agissent via différent mécanismes (Mortelmans & Zeiger, 2000) :

- **Mutation en *his G* 46 (TA100)** : C'est une mutation dans le gène *his G* qui code pour la première enzyme de la biosynthèse de l'histidine. Cette mutation (faux-sens), déterminée par le séquençage d'ADN, résulte de la substitution d'une leucine (GAG/CTC) par une proline (GGG/CCC). Elle est rétablie au phénotype sauvage par des mutagènes qui provoquent des substitutions de paires de bases (Mortelmans & Zeiger, 2000).
- **Mutation en *his D* 3052 (TA98)** : C'est une mutation dans le gène *his D* codant pour l'histodinol déshydrogénase. Ce gène contient une séquence de 4 paires de bases cytosine-guanine (CG). La réversion de la mutation *his D*3052 au phénotype sauvage est induite par divers produits provoquant un décalage du cadre de lecture (mutation *frameshift*) (Maron & Ames, 1983).
- **Mutation en *his C* 3076 (TA1537)** : C'est une mutation dans le gène *his C*. Ce dernier contient une boucle de plusieurs cytosines. Cette mutation permet de mettre en évidence les produits provoquant la mutation *frameshift*.

- **Mutation en *his G 428* (TA102) :** C'est une mutation de type Ochre (T-A-A) dans le gène *his G* qui permet de détecter non seulement plusieurs types de mutation par substitution réverse de paires de bases mais aussi de petites délétions.

En plus de la mutation histidine, deux mutations supplémentaires sont apportées dans ces souches pour les rendre plus sensibles à une grande variété de substances (**Ames et al., 1975**) :

- **Mutation en *rfa* :** Cette mutation provoque une altération de la structure des lipopolysaccharidiques (LPS), qui recouvrent la surface de la bactérie, par élimination de la chaîne latérale polysaccharidique. Elle confère à la bactérie une plus forte perméabilité à la pénétration cellulaire pour les grosses molécules, telles que le benzo(a)pyrène, qui ne pénètrent pas la paroi cellulaire normale (**Kumar et al., 2018; Maron & Ames, 1983**).
- **Mutation en *uvrB* :** C'est une mutation par délétion dans laquelle la délétion d'un gène codant pour le système de réparation de l'ADN "excision-resynthèse" rend les souches déficientes en mécanismes de réparation de l'ADN (à l'exception de la souche TA102 qui conserve son système de réparation par excision de l'ADN) entraînant donc une sensibilité considérablement accrue dans la détection de nombreux mutagènes. Pour des raisons techniques, la délétion du gène *uvrB* s'étend jusqu'au gène *bio* et, par conséquent, ces bactéries ont également besoin de biotine pour leur croissance (auxotrophes vis-à-vis de la biotine) (**Mortelmans & Zeiger, 2000**).

Les souches TA98, TA100 et TA102 contiennent le plasmide pKM101, qui est le plasmide de résistance à l'ampicilline. Ce plasmide porte également le gène *mucAB* qui augmente la sensibilité aux agents mutagènes par l'intermédiaire de mécanismes de réparations fautives ("error-prone") (**Kumar et al., 2018**). De plus, la souche TA102 contient un autre plasmide en multicopie, le pAQ1, qui transporte la mutation *his G 428* et un gène de résistance à la tétracycline (**Ames et al., 1975**).

IV.1.3 Vérification des caractères génétiques des souches bactériennes

Le contrôle de chaque caractère est effectué en duplicate.

a) Vérification de la déficience en mécanismes de réparation de l'ADN : mutation en *uvrB* (sensibilité au UV)

Sur une boîte de Pétri contenant le milieu Tryptone-Soja (TSA, Tryptic Soy Agar) un trait de culture de chaque souche étudiée est effectué. La moitié de chaque boîte ensemencée est exposée aux ultraviolets (UV) (lampe germicide " Mazda" de 15 watts) à une distance de 33 cm pendant 6 secondes pour la souche TA1537 et 8 secondes pour les souches TA98, TA100 et TA102. L'autre moitié est protégée par une plaque de verre. Les boîtes sont ensuite incubées à 37 °C pendant 18 h à 24 h. La souche LT2 his G 46 R et la souche sauvage de *S. typhimurium* sont utilisées comme témoin.

Le résultat est exprimé par une inhibition de la poussée bactérienne dans la moitié de la boîte qui a été exposée aux UV, sauf pour la souche TA102, la souche LT2 his G 46 R et la souche sauvage *S. typhimurium*.

b) Vérification de la déficience en LPS : mutation en *rfa* (sensibilité au cristal violet)

Un volume de 1 à 2 ml d'une culture de 18 h à 37 °C, dilué à 10^{-4} dans du bouillon de type Nutrient Broth n°2 (NB n°2), est versé sur une boîte de Pétri contenant du TSA. Après inondation de la boîte, l'excès de suspension bactérienne est retiré par pipetage. Un disque imprégné du cristal violet à 1 mg/ml est déposé sur la boîte. Les boîtes sont laissées 15 min à température ambiante pour pré-diffusion, ensuite incubées à 37° C pendant 18 h à 24 h. La souche LT2 his G 46 R est utilisée comme témoin.

Le résultat est exprimé par la formation d'une zone claire d'inhibition autour du disque (environ 14 mm de diamètre), sauf pour la souche LT2 his G 46 R.

c) Vérification de la résistance à l'ampicilline des souches porteuses du plasmide pKM101 et/ou à la tétracycline des souches porteuses du plasmide pAQ1

Les essais de mutation LPS et la recherche du ou des plasmide(s) sont effectués sur la même boîte. Un disque imprégné d'ampicilline à 10 µg/ml est déposé sur les boîtes des souches TA1537, TA98, TA100 et TA102. Un disque imprégné de tétracycline à 30 UI/disque est ajouté exclusivement pour la souche TA102. La souche LT2 his G 46 R est utilisée comme témoin.

Lecture : Ampicilline	TA1537 (sensible)
	TA98, TA100, TA102 et LT2 his G 46 R (Résistante)
Tétracycline	TA102 (Résistante)

IV.1.4 Mise en culture des souches

Les souches de *S. typhimurium* conservées dans le cryoconservateur sont sorties et laisser décongeler à température ambiante. Le contenu du cryotube est ensuite transféré stérilement dans un flacon de culture à usage unique contenant 20 ml du bouillon nutritif Oxoid n° 2. Puis, 0,5 ml d'une solution d'ampicilline à 1 mg/ml pour les souches TA98, TA100, TA102 et 0,5 ml d'une solution de tétracycline à 40 µg/ml pour la souche TA102 seulement, sont ajoutés. Les flacons sont incubés à 37°C dans un bain-Marie à agitation (120 cycles/min) pendant 12 à 13h de façon à obtenir des cultures contenant 1×10^9 à 2×10^9 bactéries/ml.

IV.1.5 Détermination de la cytotoxicité des extraits testés

Au cours de l'essai principal de mutagénicité, la cytotoxicité est vérifiée par un examen microscopique de la pousse du fond et notée par (Figure 20) :

- : Non toxique (A)
- + : Faiblement toxique (B)
- ++ : Moyennement toxique (C)
- +++ : Fortement toxique (D)
- N : Pousse nulle (E)

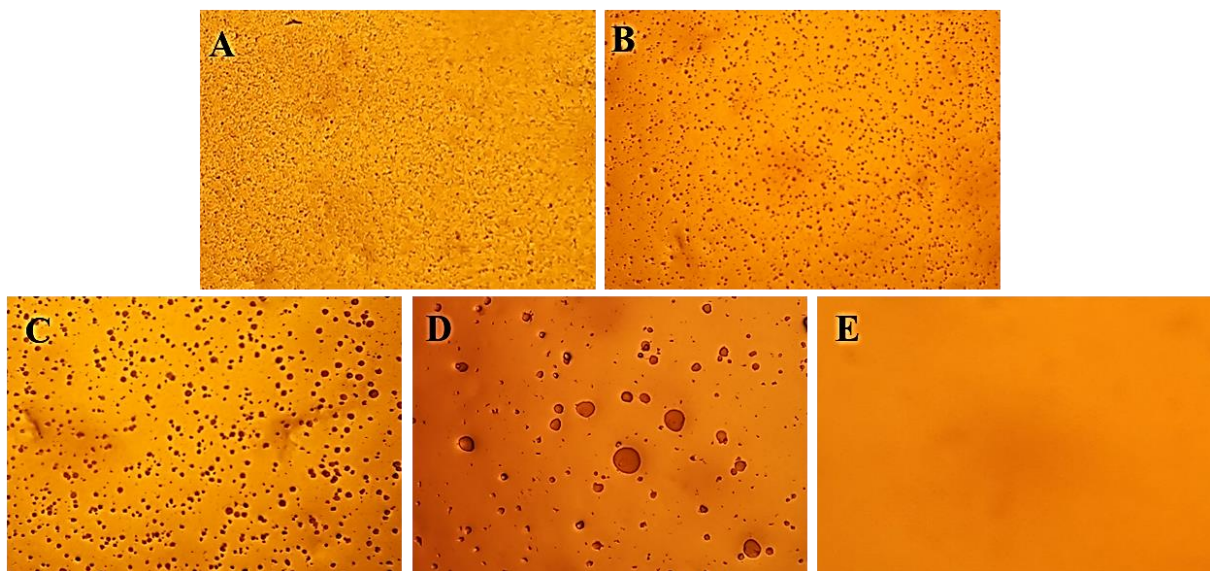


Figure 20 : Photos de différentes pousses de fond bactérienne pouvant être observées au cours du test de mutagénicité.

IV.1.6 Essai de mutagénicité

Plusieurs méthodes permettant de réaliser le test d'Ames sont décrites. Dans cette étude, la méthode d'incorporation directe dans la boîte (méthode standard) est utilisée (Figure 21). Cinq doses différentes des extraits sont testées : 50, 150, 500, 1500 et 5000 $\mu\text{g}/\text{boîte}$ pour les extraits méthanoliques et 10, 30, 100, 300 et 1000 $\mu\text{g}/\text{boîte}$ pour les extraits hexaniques. L'essai est effectué en absence et en présence d'activation métabolique.

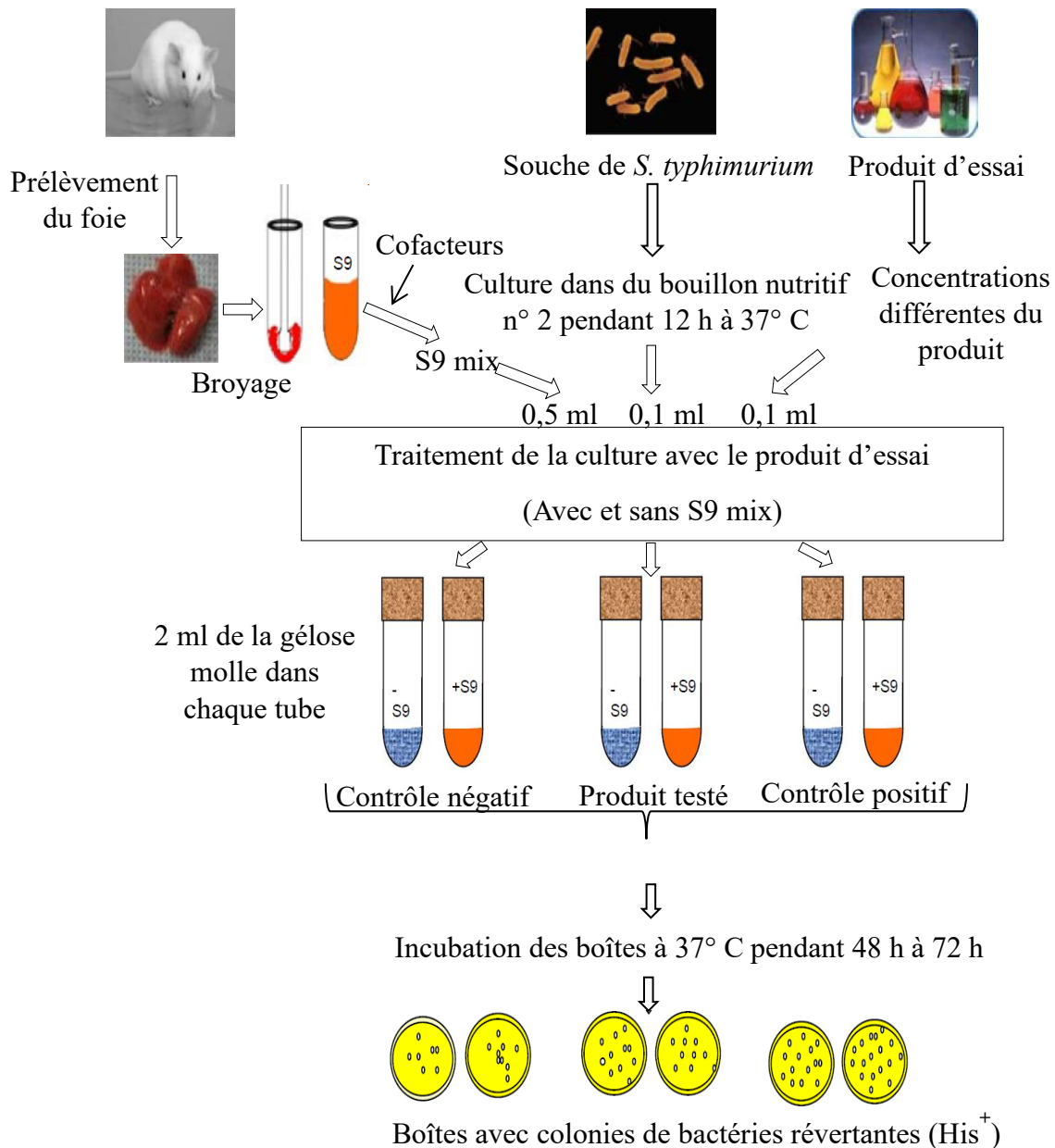


Figure 21 : Représentation schématique du protocole du test d'Ames standard (Kumar et al., 2018).

a) Sans activation métabolique

Avec chacune des souches utilisées, la technique suivante est appliquée : 100 µl d'une suspension bactérienne provenant d'une culture agitée pendant une nuit à 37 °C et 100 µl de l'extrait à étudier à la concentration retenue sont ajoutés successivement à 2 ml de gélose de surface, auxquels sont ajoutés 10% d'une solution d'histidine/biotine à 0,5 mM, maintenue en surfusion à 45 °C. Le contenu de chaque tube est agité, puis étalé dans une boîte de Pétri contenant 20 ml de gélose de fond solidifiée. Après solidification de la surcouche d'Agar, les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 48 h. Après incubation, le nombre de colonies est dénombré pour chaque boîte. Chaque point expérimental est effectué en triple.

b) Avec activation métabolique

La méthodologie est la même que celle décrite ci-dessus sauf qu'immédiatement avant étalement, on ajoute à la gélose de surface 500 µl du système d'activation métabolique (S9 mix) tel que préparé ci-dessous :

La fraction S9 est un système exogène d'activation métabolique permettant de mimer ce qui se passe au niveau hépatique. Rappelons que le foie joue un rôle primordial dans la métabolisation des xénobiotiques dû à la présence de nombreuses enzymes. La fraction est préparée à l'institut Pasteur de Lille selon la méthode décrite par **Ames et al. (1975)** chez les rats Sprague Dawley mâles et selon les procédures standards opératoires de l'institut Pasteur de Lille.

Une induction enzymatique est provoquée, 5 jours avant le sacrifice, par injection intrapéritonéale d'Aroclor 1254 (Origine Monsanto, Saint-Louis - USA) à la dose de 500 mg/kg sous forme d'une solution dans l'huile de maïs à 200 mg/ml. La nourriture et l'eau de boisson sont données *ad-libitum* pendant la période d'induction. La nourriture est retirée 12 heures avant le sacrifice. Toutes les étapes sont effectuées en milieu stérile sous flux laminaire à 0 - 4°C. Après sacrifice des rats par rupture cervicale suivie d'une saignée, les foies sont aseptiquement prélevés et lavés dans une solution de KCl 0,15 M. Ils sont ensuite pesés puis découpés et additionnés de KCl 0,15M (le volume de KCl en ml est équivalent à 3 fois le poids du foie en grammes). Les foies sont homogénéisés indépendamment à l'aide d'un potter, puis les homogénats sont centrifugés à 9000 g pendant 10 minutes à + 4°C. Le surnageant est aliquoté, congelé et conservé dans l'azote liquide jusqu'à utilisation.

Le S9 mix préparé selon **Mortelmans & Zeiger (2000)** contient pour 1 ml (Tableau 4):

Tableau 4 : Composition du S9 mix pour le test d'Ames.

Composés	Volume (ml)	Concentration finale
S9	0,1	10%
MgCl ₂ à 0,4 M	0,02	8 mM
KCl à 1,65 M	0,02	33 mM
Tampon phosphate à 0,2 M (pH 7,4)	0,5	100 mM
NADP à 0,1 M	0,04	4 mM
Glucose-6-phosphate à 1 M	0,005	5 mM
H ₂ O	0,315	-

Tous les cofacteurs sont filtrés sur membrane stérilisante (filtre Millex 0.45 µm) avant utilisation. La fraction S9 de foies ne subit pas cette filtration. Le mélange S9 mix est préparé immédiatement avant chaque test et conservé dans la glace pendant toute la durée du test.

c) Témoins négatifs et positifs

Parallèlement, des témoins négatifs (contenant 0,1 ml du solvant utilisé : le DMSO pour les extraits méthanoliques et l'éthanol pour les extraits hexaniques) sont effectués, 6 boîtes par solvant, dans les mêmes conditions (**Gatehouse et al., 1994**). Des témoins positifs de référence appropriés sont également effectués, 3 boîtes par produit de référence (Tableau 5).

Tableau 5 : Témoins positifs de référence utilisés dans le test d'Ames.

Souches	Sans activation métabolique		Avec activation métabolique	
	Produit	Dose (µg/boîte)	Produit	Dose (µg/boîte)
TA1537	9-amino-acridine	50	2-anthramine	2
TA98	2-nitrofluorène	2		
TA100	Azide de sodium	1		
TA102	Mitomycine C	0,125	Benzo[a]pyrène	2

d) Contrôles de stérilité du S9 mix et des extraits à tester

Avant de commencer le traitement, les 3 plus fortes doses de l'extrait étudié, le S9 mix et la gélose molle de surface sont vérifiés pour leur stérilité par la recherche d'un éventuel développement d'une pousse de microorganismes.

Pour cela, 0.1 ml des 3 plus fortes doses de l'extrait ou 0.5 ml du S9 mix sont ajoutés à 2 ml de la gélose de surface en surfusion. Le mélange est étalé sur une boîte de Pétri contenant de la gélose du fond. Les boîtes sont ensuite incubées à 37 °C pendant 48 h. Aucune colonie n'est observée ; les résultats sont considérés comme satisfaisants.

IV.1.7 Lecture des résultats et critères d'acceptation de l'essai

a) Lecture des résultats

Après 48 h d'incubation, les colonies de mutants prototrophes qui se sont développées dans les boîtes sont dénombrées. Les résultats sont exprimés en nombre moyen de colonies révertantes par boîte puis on établit le rapport suivant pour chaque concentration de l'extrait :

Nombre moyen de révertants par boîte en présence du produit / Nombre moyen de révertants par boîte sans produit (témoin négatif).

b) Critères d'acceptation de l'essai

- L'extrait à étudier doit être stérile c'est-à-dire à la dose la plus élevée après étalement dans les conditions de l'essai de mutagenicité et après 48 h d'incubation à 37 °C, aucune colonie ne doit être visible.
- La moyenne des révertants spontanés (témoin solvant) de chaque souche doit être comprise entre les valeurs extrêmes des valeurs témoins historiques (Annexe II et III).
- Pour chaque souche, la moyenne des révertants induits par les produits positifs de référence (en présence et en absence d'activation métabolique) doit être supérieure à la limite inférieure des valeurs historiques correspondantes et l'augmentation doit être statistiquement significative (Annexe IV).

IV.1.8 Critères de décision du pouvoir mutagène

Dans ces conditions expérimentales et lorsque les critères de validité sont remplis, les critères de décision suivants peuvent être utilisés :

IV.1.8.1 Critères basés sur la significativité biologique

a) Souche TA1537

Un produit est considéré mutagène lorsqu'il provoque une réponse positive (augmentation du nombre de révertants) proportionnelle à la dose sur au moins 3 concentrations

avec, pour la plus forte augmentation, une valeur supérieure ou égale à 3 fois la valeur du témoin négatif.

b) Souches TA98, TA100, TA102

Un produit est considéré mutagène lorsqu'il provoque une réponse positive proportionnelle à la dose sur au moins 3 concentrations avec, pour la plus forte augmentation, une valeur supérieure ou égale à 2 fois la valeur du témoin négatif.

IV.1.8.2 Critères basés sur la significativité statistique

Parallèlement, les résultats obtenus peuvent être interprétés statistiquement (**Mahon et al., 1989**) par la méthode de Dunnett qui permet de comparer la moyenne des valeurs par dose étudiée avec celle du témoin négatif correspondant. Mais, la signification statistique ne doit pas être le seul facteur de décision (**OCDE n°471, 1997**). Cette méthode est particulièrement recommandée au cas où l'on observe une diminution d'une façon marquée du nombre de mutants à une ou aux deux plus fortes doses étudiées.

IV.2 Test d'Ames modifié « *treat and wash assay* »

Les extraits montrant un résultat positif dans le test d'Ames standard sont soumis à un test de traitement et de lavage « *treat and wash assay* » pour vérifier dans quelle mesure la présence d'acide aminé histidine dans l'extrait a contribué au résultat.

IV.2.1 Principe

Le principe du test d'Ames modifié est le même que celui du test d'Ames standard, sauf que le S9 mix/tampon phosphate, les bactéries et le produit à tester sont incubés pendant 90 minutes avant l'ajout de la gélose molle. Cette durée de l'exposition bactérienne sert à compenser l'absence d'exposition bactérienne sur les boîtes, car les bactéries ont été lavées pour éliminer le produit d'essai avant l'étalement sur boîtes de Pétri contenant le milieu minimum (**Thompson et al., 2005**).

IV.2.2 Essai de mutagénicité

L'essai est effectué selon la méthode décrite par **Thompson et al. (2005)**. Les éléments suivants sont successivement ajoutés à un tube stérile de 15 ml : 0,05 ml de culture bactérienne, 0,5 ml de S9 mix ou de tampon phosphate et 0,05 ml de la dilution d'extrait. Ce mélange est incubé au bain marie à 37 °C sous agitation (180 rpm) pendant 90 min. Ensuite, 15 ml d'une solution de lavage de bouillon nutritif Oxoid n° 2 dans un tampon phosphate (1 :7 v/v) sont

ajoutés et les bactéries lavées sont centrifugées à 3000 tr/min pendant 30 min à l'exception de la souche TA102 qui est plus fragile et qui est centrifugée à 2000 tr/min. Tout sauf environ 0,7 ml du surnageant est retiré et jeté. Puis, 2 ml de la gélose molle de surface sont ajoutés aux bactéries remises en suspension dans le surnageant résiduel et étalés dans les boîtes de Pétri contenant la gélose de fond. Les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 48 heures. Chaque point expérimental est effectué en triple.

Des témoins positifs de référence sont étudiés en parallèle, 3 boîtes par produit de référence (Tableau 6).

Tableau 6 : Témoins positifs de référence utilisés dans le test d'Ames modifié.

Souches	Sans activation métabolique		Avec activation métabolique	
	Produit	Dose µg/boîte	Produit	Dose µg/boîte
TA1537	9-amino-acridine	15	2-anthramine	15
TA98	2-nitrofluorène	2	benzo[a]pyrène	15
TA100	4-nitroquinoline-N-oxide	0,5	benzo[a]pyrène	15
TA102	Mitomycine C	1	benzo[a]pyrène	20

IV.3 Test du micronoyau *in vitro* en microméthode

Le test du micronoyau *in vitro* est un test très court, sensible, rapide, pratique et peu coûteux qui permet de détecter les cassures chromosomiques et/ou la perte d'un ou plusieurs chromosomes (Kirsch-Volders et al., 1997). Ce test est réalisé en présence et en absence d'activation métabolique, au cours d'essais indépendants. Le protocole employé est adapté selon celui décrit par (Nesslany & Marzin, 1999), sauf que des cellules lymphoblastoïdes humaines TK6 sont utilisées à la place des cellules de lymphome de souris L5178Y. La figure 22 illustre le protocole depuis la culture jusqu'à l'obtention des lames prêtes pour l'analyse microscopique.

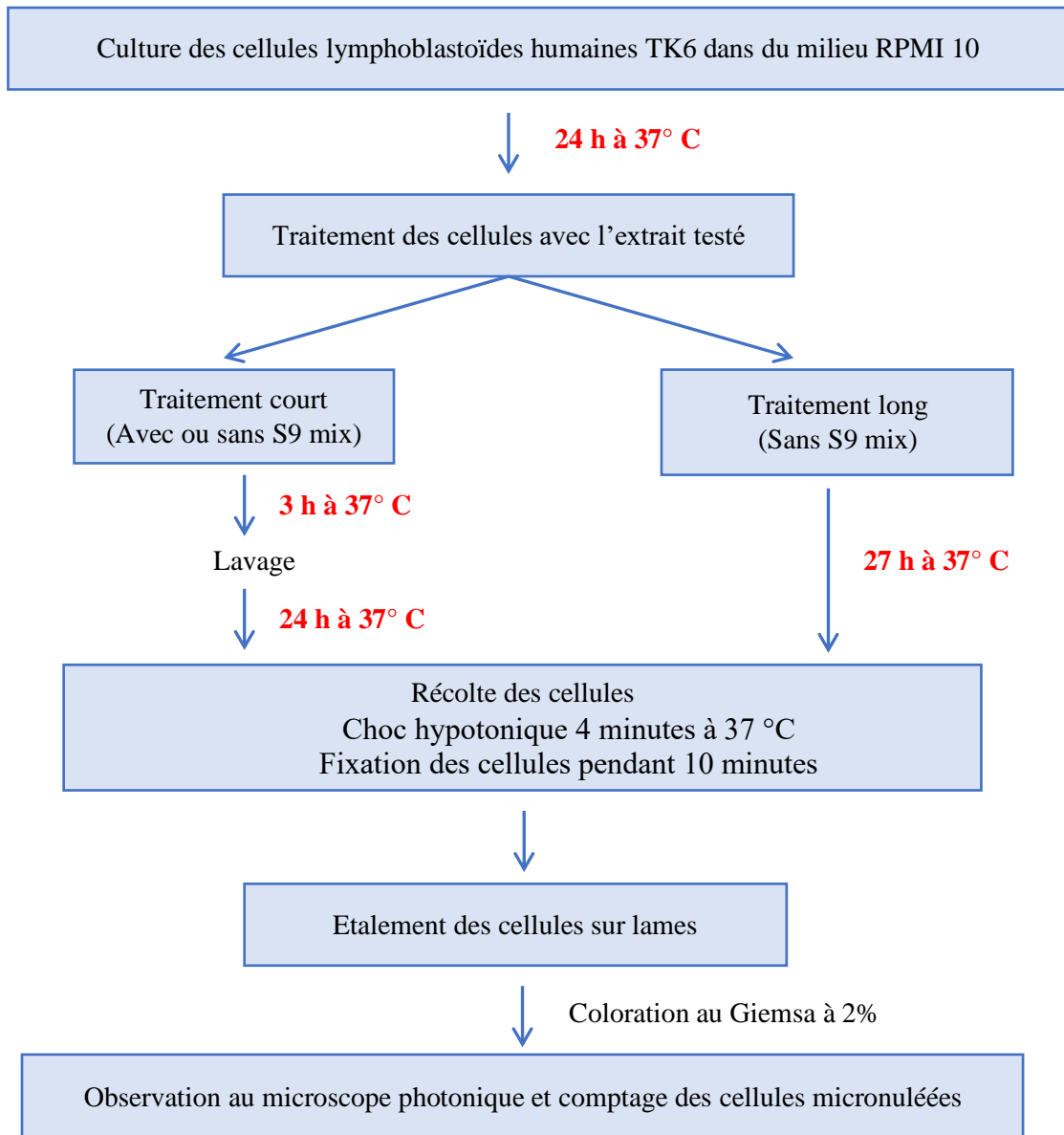


Figure 22 : Schéma résumant les différentes étapes du test des micronoyaux.

IV.3.1 Principe

Lors de la division cellulaire, les cassures chromosomiques ou les altérations du fuseau mitotique, consécutives à l'action d'agent génotoxique, peuvent conduire à des anomalies de répartition des chromosomes (**Kirsch-Volders et al., 2011**). Ceci conduit à la présence de fragments de chromosomes (effet clastogène) ou de chromosomes entiers (effet aneugène) ; qui sont incapables de migrer avec l'ensemble des chromosomes au cours de l'anaphase dans le cytoplasme des cellules filles. Une enveloppe nucléaire se forme autour de ces fragments perdus ou de ces chromosomes isolés et donne ainsi naissance à des micronoyaux (Figure 23) (**Fenech,**

2000). Ce type d'aberration peut être révélé par une coloration spécifique de l'ADN (Orsière et al., 2008).

Des cellules TK6 en phase exponentielle de croissance sont exposées aux différentes doses du produit à tester dans des microplaques de 96 puits en présence et en absence d'activation métabolique lors d'essais indépendants. Parallèlement, des essais de cytotoxicité sont réalisés en utilisant le test du MTT dans les mêmes conditions (Voir principe dans la section IV.3.6.2a). A la fin de la période d'exposition, les cellules sont soit remises en culture (période de recouvrement sans produit d'essai) pour les traitements courts ou exposées pendant une période suffisante pour le traitement continu (sans période de recouvrement). Les périodes de traitements (avec ou sans recouvrement) couvrent au moins 1,5 cycle de division cellulaire pour permettre la formation de micronoyaux en interphase le cas échéant. Après les périodes de traitement et de recouvrement, les cellules sont recueillies, fixées, étalées sur lames et colorées. Le nombre de micronoyaux pour 2000 cellules mononucléées est déterminé par lecture au microscope pour les concentrations pas ou peu cytotoxiques (toxicité ne doit pas dépasser 55 ± 5 %).

Un produit entraînant une augmentation statistiquement significative du nombre de micronoyaux avec au moins un doublement par rapport au témoin négatif avec une relation dose-effet est conclu génotoxique dans ce test.

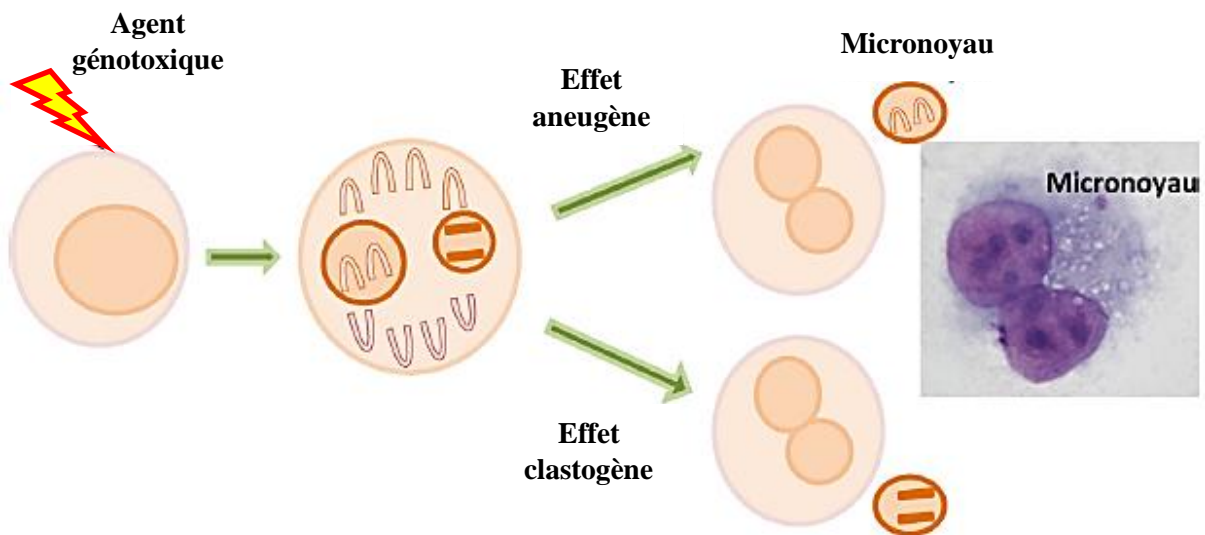


Figure 23 : Principe du test des micronoyaux (Berthelot-Ricou et al., 2013).

IV.3.2 Cellules lymphoblastoïdes humaines TK6

La lignée cellulaire lymphoblastoïde humaine TK6 est obtenue auprès de l'American Type Culture Collection (Rockville, États-Unis) et est décrite précédemment (**Honma, 2005; Liber & Thilly, 1982; Skopek et al., 1978**). Cette lignée cellulaire est dérivée de la rate d'un patient atteint d'anémie sphérocytaire héréditaire et possède un certain nombre de propriétés avantageuses pour les études de génotoxicité : un génome stable, des fréquences de mutations spontanées stables, une protéine p53 fonctionnelle et une capacité de croître en culture cellulaire. Le temps de doublement moyen des cellules TK6 est de 16 à 18 h. Cette lignée cellulaire est l'une des lignées cellulaires recommandées dans la ligne directrice de l'OCDE (**OCDE n°487, 2016**). L'absence de contamination par des mycoplasmes est vérifiée pour chacun des lots utilisés lors de la mise en œuvre du test (MycoAlert^{MT} mycoplasma detection kit. Lonza Walkersville, Inc.).

IV.3.3 Mise en culture des cellules

Une ampoule cryogénique de cellules, conservée à -180 °C dans l'azote liquide contenant environ 4 à 5. 10⁶ cellules, est décongelée au bain marie à 37 °C. Les cellules sont remises en suspension dans un tube de 50 ml à usage unique avec 30 ml de milieu RPMI 10 [milieu RPMI 1640 (RPMI 0) contenant en concentration finale 10% de sérum décomplémenté de cheval, 2 mg/ml de bicarbonate de sodium, 10 ml/l d'acides aminés non essentiels, 200 U/ml de pénicilline, 50 µg/ml de streptomycine, 2,5 µg/ml d'amphotéricine B, 200 µg/ml de L-glutamine, 200 µg/ml de pyruvate de sodium et 500 µg/ml d'acide pluronique] afin d'éliminer le DMSO contenu dans le liquide de congélation. Après une centrifugation de 6 minutes à 1000 tr/min, le surnageant est retiré et remplacé par 30 ml de RPMI 10. Les cellules sont remises en suspension par aspiration-refoulement à l'aide d'une pipette de 10 ml à usage unique puis transvasées dans un flacon de culture de 75 cm². Le flacon est vissé légèrement et incubé en étuve à 5 % CO₂ et à 37 °C pendant 24 heures. On obtient alors une densité cellulaire de l'ordre de 4 à 5.10⁵ cellules/ml.

IV.3.4 Dilution des produits

a) Extraits d'essais

Les extraits méthanoliques de viande transformée sont solubilisés dans le DMSO à la concentration initiale maximale de 50 mg/ml. Tandis que, les extraits hexaniques sont reconstitués dans l'éthanol à la concentration initiale maximale de 10 mg/ml.

Les solutions-mères ainsi préparées sont ensuite diluées dans le milieu RPMI 10 seul (essai sans activation métabolique) ou contenant 10% de S9 mix (essai avec activation métabolique) pour obtenir les solutions-filles de 1000 µg/ml pour les extraits méthanoliques et de 200 µg/ml pour les extraits hexaniques. La concentration de DMSO ou d'éthanol dans le milieu de culture n'excède pas 1% (v/v). Les dilutions successives et l'adjonction des cellules sont effectuées suivant un rapport de 2 comme indiqué en IV.3.5a.

b) Témoins positifs

Essai sans activation métabolique

La mitomycine C (produit de référence clastogène) et la griséofulvine (produit de référence aneugène) sont utilisées en duplicate comme témoin positif à 0,2 µg/ml et à 5 µg/ml respectivement, dans le traitement continu de 27 heures sans période de recouvrement. Tandis que, dans le traitement de 3 heures suivi de 24 heures de recouvrement, la mitomycine C à 0,5 µg/ml est utilisée.

Essai avec activation métabolique

La cyclophosphamide (produit de référence clastogène) est utilisée en duplicate à 5 µg/ml dans le traitement de 3 heures suivi de 24 heures de recouvrement.

c) Témoins négatifs

Des cultures cellulaires également réalisées en triplicate en présence du solvant utilisé (DMSO ou éthanol) avec ou sans S9 mix sont utilisées comme témoin solvant. Le témoin négatif reçoit la même quantité de solvant que celle utilisée dans les cultures traitées, c'est-à-dire 1 % de DMSO ou d'éthanol.

d) Préparation du S9 mix

Le S9 mix préparé selon **Kirkland et al. (1989)** contient pour 1 ml (Tableau 7) :

Tableau 7 : Composition du S9 mix pour le test des micronoyaux *in vitro*.

Composés	Volume (ml)	Concentration finale
S9	0,4	40 %
KCl à 150 mM	0,2	30 mM
NADP à 25 mg/ml	0,2	5 mg/ml
Glucose-6-phosphate à 180 mg/ml	0,2	36 mg/ml

Le S9 mix est préparé dans un tube à usage unique stérile extemporanément à l'essai. Celui-ci est ensuite dilué au 1/10^{ème} dans le RPMI 10 pour obtenir le [RPMI 10 + 10 % S9 mix].

IV.3.5 Traitement

Trois essais de génotoxicité couplés à des essais de cytotoxicité sont réalisés en duplicate :

- Un traitement de 3 heures avec activation métabolique suivi d'un temps de recouvrement de 24 heures (Essai noté **S9+ 3h/+24h**),
- Un traitement de 27 heures sans activation métabolique, avec la récolte immédiatement après (Essai noté **S9- 27h/+0h**),
- Un traitement de 3 heures sans activation métabolique suivi d'un temps de recouvrement de 24 heures (Essai noté **S9- 3h/+24h**).

Les schémas de traitement sont déterminés selon la ligne directrice de l'OCDE (**OCDE n°487, 2016**).

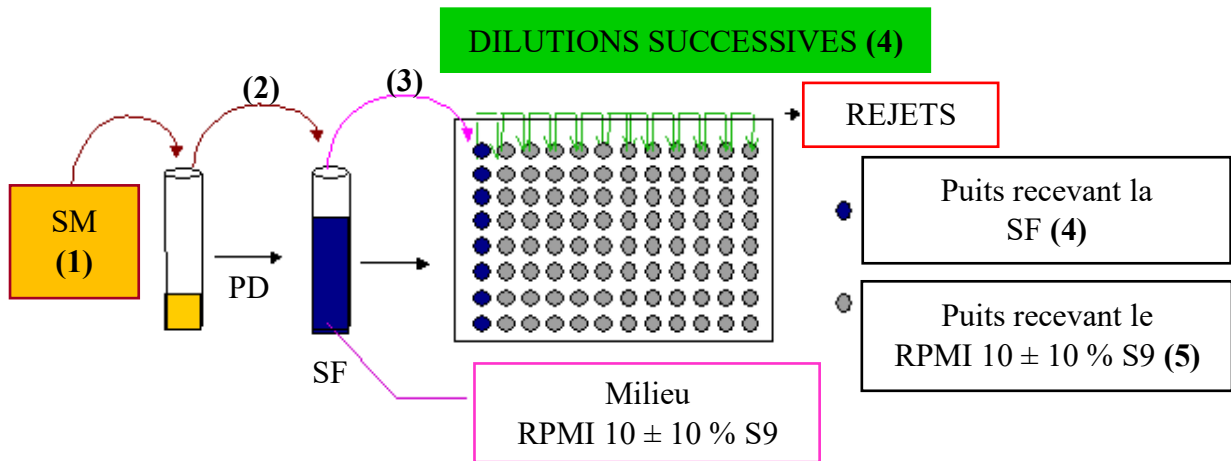
a) Dilutions en microplaques

Deux microplaques sont utilisées par type d'essai : 1 plaque pour l'essai de génotoxicité et 1 plaque pour l'essai de cytotoxicité (Figure 24).

1. Distribution de 100 µl (cytotoxicité) ou 200 µl (génotoxicité) de la solution-fille dans le premier puits de 2 rangées successives,
2. Distribution de 50 µl (cytotoxicité) ou 100 µl (génotoxicité) de RPMI 10 (S9⁻) ou RPMI 10 + 10 % S9 (S9⁺) dans tous les autres puits,
3. Prélèvement de 50 µl (cytotoxicité) ou 100 µl (génotoxicité) du premier puits à l'aide d'une pipette multicanaux et dilutions de puits en puits par aspiration-refoulement,
4. Rejet de 50 µl (cytotoxicité) ou 100 µl (génotoxicité) du dernier puits.

b) Adjonction des cellules

Après dénombrement des cellules TK6 à l'hématimètre de Mallassez, une suspension cellulaire de 6.10⁵ cellules/ml est préparée. Un volume de 50 µl (cytotoxicité) ou 100 µl (génotoxicité) de cette suspension est ajouté à la plaque correspondante. Les plaques sont ensuite incubées dans l'étuve à CO₂ à 37 °C.



- (1) : Solution d'extrait méthanolique (dissous dans le DMSO) à 50 mg/ml ou solution d'extrait hexanique (dissous dans l'éthanol) à 10 mg/ml ;
- (2) : 0,025 ml de SM dans 1,225 ml de RPMI 10 (S9⁻) ou [RPMI 10 + 10 % S9] (S9⁺) ;
- (3) : 0,2 ml de SF pour les plaques génotoxicité ou 0,1 ml de SF pour les plaques cytotoxicité ;
- (4), (5) : 0,1 ml pour les plaques génotoxicité ou 0,05 ml pour les plaques cytotoxicité.

Figure 24 : Schéma général de traitement pour le test du micronoyau in vitro en microméthode. SM, solution-mère ; PD, pré-dilution ; SF, solution-fille.

c) Fin de traitement

A la fin de la période de traitement, les plaques sont centrifugées à 1000 tr/mn pendant 6 minutes. Le milieu de traitement est éliminé par retournement. Les cellules remises en suspension, en tapotant légèrement chaque plaque puis lavées en ajoutant 200 µl de milieu RPMI 10, afin d'enlever le produit d'essai. Après lavage, 100 µl (cytotoxicité) ou 180 µl (génotoxicité) de milieu RPMI 10 sont à nouveau ajoutés, pour remise des cellules en suspension puis les plaques sont réincubées pendant 24 heures pour les traitements court suivi d'un temps de recouvrement [(S9⁺ 3h/+24h) et (S9⁻ 3h/+24h)] afin de permettre la formation éventuelle de micronoyaux.

IV.3.6 Récolte

IV.3.6.1 Essai de génotoxicité

A la fin de la période de recouvrement, les plaques sont centrifugées 6 minutes à 1000 tr/mn, le milieu de culture est retiré par retournement et remplacé par 180 µl de milieu de lavage (RPMI 0 + 0,1% d'acide pluronique). Après centrifugation pendant 6 minutes à 1000 tr/mn et élimination du milieu de lavage, les cellules subissent ensuite un choc hypotonique en ajoutant 140 µl de milieu hypotonique (RPMI 0 dilué au ½ dans l'eau distillée + 0,1% d'acide pluronique) pendant exactement 4 minutes à température du laboratoire, afin de faire gonfler

les cytoplasmes ce qui rend plus facile la détection des micronoyaux au microscope. A la fin de cette période, les cellules sont « pré-fixées » par l'ajout de 40 µl de fixateur (3 volumes d'éthanol absolu + 1 volume d'acide acétique) avant de centrifuger les plaques à nouveau, afin d'arrêter le choc hypotonique. Après élimination du surnageant, les cellules obtenues sont alors fixées par l'ajout de 140 µl de fixateur pendant au moins 10 minutes. A l'aide d'une pipette Pasteur, les cellules sont dispersées par aspiration-refoulement et étalées gouttes à gouttes sur la lame préalablement embuée et identifiée par gravure. Les lames sont laissées à température ambiante pour sécher.

IV.3.6.2 Essai de cytotoxicité

La cytotoxicité est évaluée à l'aide d'un test colorimétrique au bromure de 3-(4,5-diméthylthiazole-2-yl) -2,5-diphényltétrazolium (MTT). Ce test est effectué afin de déterminer la dose maximale non cytotoxique dans les conditions du test de micronoyau qui est retenue comme la dose maximale à étudier. Le protocole du test appliqué est celui recommandé par **Mosmann (1983)** et **Borenfreund et al. (1988)**.

a) Principe

Le test du MTT est basé sur la mesure de l'activité enzymatique des mitochondries (**Mosmann, 1983**). Dans les cellules viables et actives, le sel de tétrazolium MTT est converti par la succinate déshydrogénase en cristaux de formazan de couleur violet insolubles. Ces cristaux de formazan formés sont solubilisés et sont ainsi analysables par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 550 nm. L'absorbance est directement proportionnelle au nombre de cellules viables.

b) Essai

Les plaques de cytotoxicité sont centrifugées 6 minutes à 1000 tr/mn et le milieu est éliminé par retournement. Une solution de MTT à 5 mg/ml est préparée dans du tampon phosphate salin (PBS, Phosphate Buffered Saline). Cette solution est alors diluée au 1/10^{ème} dans du milieu Dulbecco sans rouge de phénol. Un volume de 100 µl de cette solution (0,5 mg/ml) est ajouté dans chaque puit préalablement vidé et les cellules sont incubées pendant 90 minutes à 37 °C sous 5 % CO₂. Après ce temps de contact, les plaques sont centrifugées 15 minutes à 1500 tr/min et le milieu au MTT est enlevé et remplacé par 100 µl d'un mélange Isopropanol / HCl 1 N (23 vol / 1 vol). Les plaques sont placées sous agitation sur agitateur de plaque jusqu'à dissolution complète des cristaux de formazan. Après le transfert des solutions

dans une plaque à fond plat à l'aide d'une pipette multicanaux, les absorbances sont ensuite mesurées sur un lecteur de plaques (Thermo LabSystems, USA) à 550 nm de longueur d'onde de mesure et 620 nm de longueur d'onde de référence. Les résultats sont exprimés en pourcentage de survie relative (% SR). Le rapport suivant est établi pour chaque concentration:

$$\%SR = \frac{\text{Absorbance moyenne des cellules traitées}}{\text{Absorbance moyenne des cellules contrôles}} * 100$$

Selon la ligne directrice de l'OCDE n° 487, un produit est déclaré non toxique quand le pourcentage de survie relative est $\geq 55 \pm 5$.

En fonction des données obtenues lors de l'évaluation de la cytotoxicité, les doses pour lesquelles l'évaluation génotoxique sera effectuée sont sélectionnées.

Trois concentrations non cytotoxiques sont retenues pour la détermination de la fréquence des cellules micronucléées dans l'étude de génotoxicité (**OCDE n°487, 2016**).

IV.3.7 Coloration

Après au moins 24 heures de séchage à l'air ambiant, les lames sont colorées par une solution de Giemsa à 2 % dans l'eau pendant 10 minutes. Elles sont ensuite abondamment rincées à l'eau courante puis brièvement à l'eau déminéralisée. Une lamelle est montée sur chaque lame à l'aide d'Eukitt.

IV.3.8 Lecture

Les lames sont codées, puis lues à l'aveugle au microscope optique à immersion au grossissement X 500. Les micronoyaux sont dénombrés pour 1000 cellules mononucléées, ayant un cytoplasme bien préservé, par lame, à raison de deux lames par dose (soit au total 2000 cellules mononucléées par dose).

Les critères de sélection de micronoyaux suivis sont ceux définis par **Miller et al. (1995)** :

- Le micronoyau doit être situé à l'intérieur du cytoplasme,
- Le diamètre du micronoyau doit être inférieur au 1/3 du diamètre du noyau principal,
- Il doit avoir une intensité de coloration \leq à celle du noyau principal,
- Il doit être clairement entouré par une membrane nucléaire,
- Il ne doit pas être réfringent sous la lumière du microscope et doit être distinct des artéfacts, comme les dépôts de colorant et autres,

- Il ne doit pas être lié ou rattaché au noyau principal par un pont nucléoplasmique.

Pour exclure les phénomènes d'apoptose ou de fragmentation d'ADN (pouvant être étudiés par le biais d'autres méthodes), les cellules mononucléées contenant plus de 5 micronoyaux ne sont pas comptabilisées.

IV.3.9 Critères d'acceptation des résultats

Une étude est acceptée si les critères suivants sont remplis :

- Le nombre moyen de cellules micronucléées observé chez les témoins négatifs est inclus dans l'intervalle des témoins historiques du laboratoire (Annexe V),
- Le nombre moyen de cellules micronucléées observé chez les témoins positifs est inclus dans l'intervalle des témoins historiques du laboratoire et produit une augmentation statistiquement significative par rapport aux témoins négatifs (Annexe V),
- Un nombre suffisant de cellules doit être analysé pour au moins trois concentrations de produit,
- La plus forte concentration du produit d'essai doit présenter une survie relative de cellules $\geq 55 \pm 5 \%$.

IV.3.10 Interprétation des résultats

Pour chacune des doses testées, une comparaison statistique du nombre moyen de micronoyaux pour 2000 cellules mononucléées par rapport au témoin négatif est réalisée en utilisant le test du χ^2 . Si les valeurs du p sont inférieures à 0,05%, les résultats sont considérés comme statistiquement significatifs par rapport au témoin négatif.

Un produit est classé comme étant génotoxique vis-à-vis des cellules de lymphome humain TK6 en culture s'il induit une augmentation statistiquement significative du nombre de micronoyaux par rapport au témoin négatif, si cette augmentation comporte au moins un doublement par rapport au témoin et s'il existe une relation dose-effet.

Dans quelques cas limites, une comparaison entre le nombre de micronoyaux induits par le produit d'essai et les témoins historiques du laboratoire est utilisée. En effet, une augmentation de chaque valeur individuelle qui est supérieur à la limite des témoins historiques (Annexe V) peut aider à supporter une conclusion comme « faiblement » génotoxique.

IV.4 Test des comètes

Le test des comètes est une technique d'électrophorèse de nucléoïdes isolés en microgels d'agarose qui permet en condition alcaline (pH > 13) la détection des CSBs et CDBs ainsi que l'expression des sites alcali-labiles de la molécule d'ADN.

Dans cette étude, ce test est réalisé uniquement en absence d'activation métabolique. Le protocole utilisé est basé sur la méthode décrite par **Singh et al. (1988)**. La composition des différents tampons utilisés pour cet essai est détaillée dans l'annexe I.

IV.4.1 Principe

Le test des comètes est basé sur la capacité des petits fragments d'ADN, présents lorsqu'il y a des cassures, à migrer plus rapidement que l'ADN intact. Les noyaux non endommagés se présentent sous une forme sphérique « sans queue » alors que la présence de cassures de l'ADN entraîne la formation de noyaux en forme de comètes « avec queue » d'où le nom du test.

Des cellules intestinales Caco-2 sont traitées avec différentes doses du produit à étudier dans des microplaques 24 puits en absence d'activation métabolique pendant 4 heures ou 24 heures. Après la détermination de la viabilité cellulaire par la technique au bleu de Trypan (Voir principe en IV.4.8.a), les cellules sont mélangées avec de l'agarose et sont ensuite déposées sur des lames de microscope préalablement couvertes d'un gel d'agarose. Une incubation de ces lames dans un tampon contenant des détergents et une forte concentration en sel permet la destruction des membranes cellulaires et nucléaires de façon à obtenir des nucléoïdes contenant l'ADN superenroulé. Les lames sont ensuite mises à incuber dans un tampon alcalin pour permettre la dénaturation de l'ADN double-brin. Après l'application d'un champ électrique, l'ADN présentant des cassures migrent plus rapidement que l'ADN intact. Une étape de neutralisation est nécessaire pour permettre le marquage de l'ADN à l'aide d'agents intercalants comme le bromure d'éthidium. Le taux de cassures est défini par le pourcentage d'ADN dans la queue de la comète. Ce pourcentage est calculé à l'aide de logiciels de traitement d'images (**Azqueta & Collins, 2014; Møller, 2006**).

IV.4.2 Cellules Caco-2

Les cellules Caco-2 (**Cancer coli-2**) constituent une lignée cellulaire tumorale humaine d'origine intestinale isolée d'un adénocarcinome colique. Elles sont la lignée cellulaire la plus

utilisée pour simuler la barrière épithéliale intestinale (Akik, 2017). Elles sont principalement utilisées comme modèle de la barrière épithéliale intestinale.

Les cellules Caco-2 sont cultivées en routine dans du milieu RPMI 1640 (ou Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) dans lequel sont ajoutés 10 % de sérum de veau fœtal, 1 % d'acides aminés non essentiels, 50 μ M de thioglycérol et 25 mg/ml de l'antibiotique gentamycine (milieu complet). Les cellules Caco-2 doivent être maintenues à 37 °C dans une atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO₂ (Lea, 2015).

Une des voies principales d'exposition aux contaminants alimentaires est la voie digestive. La lignée cellulaire Caco-2 représente donc un bon modèle d'exposition pour cette étude.

IV.4.3 Mise en culture des cellules Caco-2

Une ampoule de cellules est décongelée et mise en culture dans une flasque de 75 cm² contenant 15 ml du milieu complet, puis incubée à 37 °C sous 5 % de CO₂. Le milieu de culture doit être changé tous les trois jours. À confluence de 80 %, le tapis cellulaire est rincé par 15 ml de la solution saline équilibrée de Hanks (HBSS, Hanks' Balanced Salt Solution) afin d'éliminer les éventuelles cellules mortes puis trypsiné en ajoutant 3 ml de la solution de trypsine/EDTA pendant 5 minutes à l'étuve (37°C, 5 % de CO₂) afin de décoller les cellules (l'incubation avec la trypsine doit être aussi courte que possible car ce processus peut affecter la viabilité cellulaire). Dès que les cellules sont détachées, l'action de la trypsine est stoppée en ajoutant 6 ml du milieu complet contenant du sérum de veau fœtal. La suspension cellulaire est ensuite transférée dans un tube conique de 15 ml et centrifugée à 1800 rpm pendant 10 minutes. Le culot est alors repris par 3 ml du milieu complet et 10 μ l de cette suspension sont prélevés pour un comptage cellulaire au bleu de Trypan en cellules de Malassez (Voir principe IV.4.8a). Après le comptage de la suspension cellulaire, une dilution avec le milieu complet est effectuée pour avoir une concentration cellulaire finale de 5.10⁴ cellules/ml.

IV.4.4 Pré-culture des cellules en plaques

Les cellules sont mises en culture dans des plaques 24 puits, à raison de 50 000 cellules/puit. Les plaques sont immédiatement incubées à l'étuve à 37 °C avec 5% de CO₂ pendant 24 h afin de permettre l'attachement cellulaire.

IV.4.5 Dilutions des produits

Les extraits méthanoliques et les extraits hexaniques sont préalablement reconstitués dans le DMSO à la concentration initiale maximale de 50 mg/ml et dans l'éthanol à la concentration de 10 mg/ml, respectivement.

Les solutions-mères ainsi préparées sont ensuite diluées dans le milieu complet pour obtenir les solutions-filles de 500 µg/ml pour les extraits méthanoliques et de 100 µg/ml pour les extraits hexaniques. La concentration de DMSO ou d'éthanol dans le milieu de culture n'excède pas 1 % (v/v).

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (témoin positif) à la concentration initiale de 10 mM est dilué directement dans le milieu complet (10 µl d'H₂O₂ à 10 mM dans 490 µl du milieu complet) ce qui donne une concentration finale de 200 mM.

Des cultures cellulaires également réalisées en duplicate en présence du solvant utilisé (DMSO ou éthanol) sont utilisées comme témoin solvant. Le témoin négatif reçoit la même quantité de solvant que celle utilisée dans les cultures traitées, c'est-à-dire 1 % de DMSO ou d'éthanol.

IV.4.6 Traitement

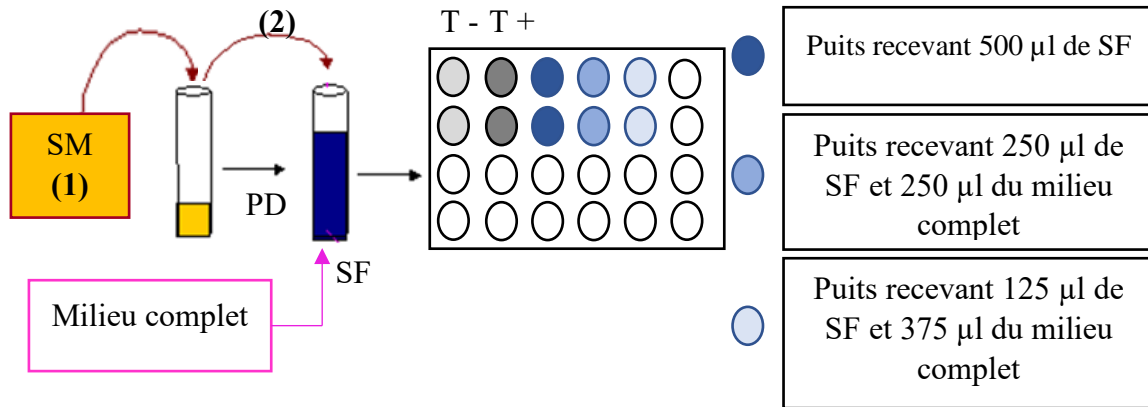
Deux essais de génotoxicité selon les recommandations de **Tice et al. (2000)**, couplés à des essais de cytotoxicité, sont réalisés en absence d'activation métabolique (au cours d'essais indépendants) :

- Un traitement de 4 heures,
- Un traitement de 24 heures.

Deux puits par concentration sont prévus.

a) Dilutions en microplaques

Après 24 heures d'incubation des cellules dans des plaques, le milieu de culture est éliminé et les cellules sont lavées par du HBSS. Elles sont ensuite exposées aux concentrations choisies de l'extrait à tester. Le milieu complet, les solutions-filles des extraits à étudier et les témoins sont ajoutés aux puits comme suit (Figure 25) :



- (1) : Solution d'extrait méthanolique (dissous dans le DMSO) à 50 mg/ml ou solution d'extrait hexanique (dissous dans l'éthanol) à 10 mg/ml ;
 (2) : 20 µl de SM dans 1980 µl du milieu complet ;

Figure 25 : Schéma général de traitement pour le test des comètes. SM, solution-mère ; PD, pré-dilution ; SF, solution-fille ; T-, témoin négatif ; T+, témoin positif.

- Distribution de 495 µl du milieu complet et 5 µl de témoin solvant (DMSO ou éthanol) dans le premier puits des 2 premières rangées (duplicate),
- Distribution de 490 µl du milieu complet et 10 µl de témoin positif (H₂O₂) à 10 mM dans le deuxième puits (duplicate), 10 minutes avant la fin de temps d'incubation,
- Distribution de 500 µl de la solution-fille de 100 µg/ml ou 500 µg/ml dans le troisième puits (duplicate),
- Distribution de 250 µl du milieu complet et 250 µl de la solution-fille de 100 µg/ml ou 500 µg/ml, ce qui permet d'obtenir une concentration finale de 50 µg/ml ou 250 µg/ml, respectivement, dans le quatrième puits (duplicate),
- Distribution de 375 µl du milieu complet et 125 µl de la solution-fille de 100 µg/ml ou 500 µg/ml, ce qui donne une concentration finale de 25 µg/ml ou 125 µg/ml, respectivement, dans le cinquième puits (duplicate).

Les plaques sont incubées à 37 °C sous 5% CO₂ pendant 4 heures ou 24 heures.

IV.4.7 Récolte

À la fin de la période de traitement (4 heures ou de 24 heures), les milieux de traitement sont aspirés à l'aide d'une pipette de 10 ml à usage unique. Les tapis cellulaires sont ensuite rincés par du HBSS et trypsinés par 250 µl de la solution de trypsine/EDTA pendant 10 minutes à l'étuve (37 °C, 5% de CO₂). L'effet de la trypsine est arrêté en ajoutant 500 µl du milieu

complet. À la fin de cette période, les cellules sont homogénéisées par aspiration-refoulement pour déstructurer les amas de cellules et recueillies dans un tube Eppendorf puis, pour chaque concentration, la viabilité est estimée par la technique au bleu de Trypan avant de suivre la procédure de préparation des lames pour le test des comètes (Voir IV.4.8.b). 10 µl de suspension cellulaire sont prélevés pour le test d'exclusion au bleu de Trypan et le reste de la suspension est centrifugé à 1000 rpm pendant 10 minutes.

IV.4.8 Essai de cytotoxicité

La cytotoxicité est évaluée en utilisant la technique d'exclusion du bleu de Trypan. Le protocole utilisé est adapté à celui de **Strober (2015)**.

a) Principe

Le test au bleu de Trypan repose sur l'intégrité membranaire des cellules. Le bleu de trypan est un colorant anionique exclu des cellules vivantes. Il pénètre et se concentre dans les cellules mortes dont la membrane cellulaire est lésée, les colorant en bleu. La détermination de la viabilité cellulaire est réalisée par numération en hématimètre de Malassez en comptabilisant les cellules vivantes (réfringentes) et les cellules mortes (colorées en bleu) (**Strober, 2015**).

b) Essai

Un aliquote de 10 µl de la suspension cellulaire est mélangé avec 10 µl de la solution du bleu de Trypan à 0,4 %. Successivement, le mélange est étalé sur l'hématimètre de Mallassez. Les cellules vivantes et les cellules mortes sont comptées au microscope optique à un grossissement de X100. Le pourcentage de viabilité est calculé comme suit :

$$\% \text{ de viabilité} = \frac{\text{Nombre total de cellules vivantes en fin de traitement}}{\text{Nombre total de cellules (vivantes + mortes) en fin de traitement}} * 100$$

Suivant les recommandations d'un panel d'experts, la diminution de la viabilité ne devrait pas être supérieure à 30 % par rapport au témoin négatif. C'est-à-dire le pourcentage de viabilité doit être supérieur à 70 % (**Tice et al., 2000**).

Une fois le pourcentage de viabilité établi, seules les concentrations assurant une viabilité supérieure à 70% sont ensuite utilisées pour l'essai de comètes.

IV.4.9 Essai de comètes

Les principales étapes de l'essai sont représentées dans la figure 26, et sont décrites dans la suite du chapitre. Toutes les étapes sont effectuées sous un éclairage jaune pour éviter les dommages artéfactuels à l'ADN causés par la lumière.

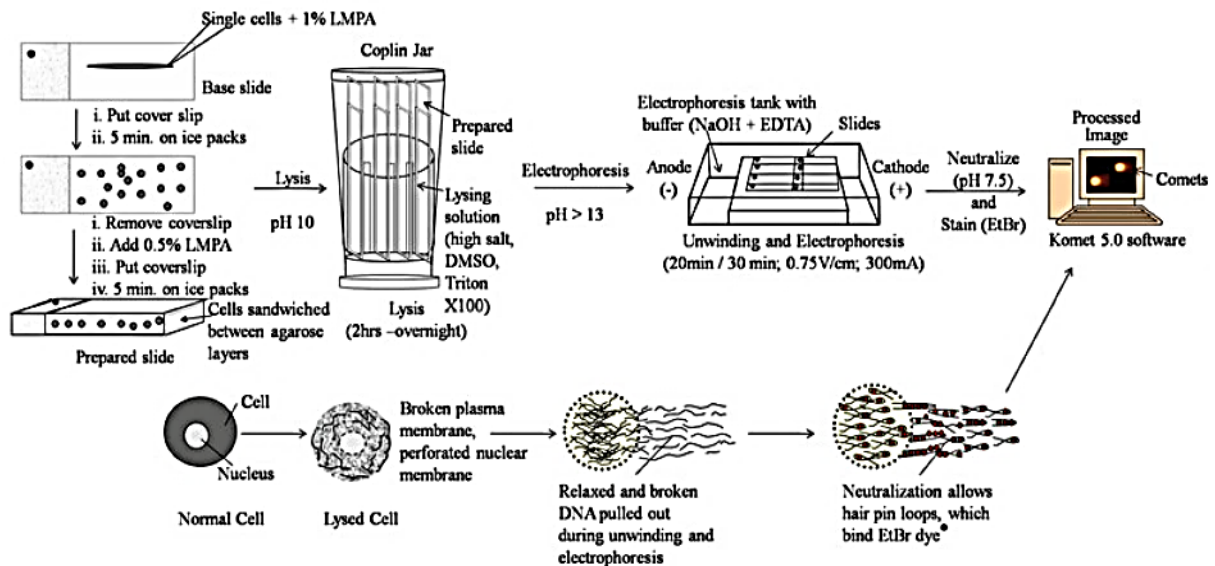


Figure 26 : Protocole schématisé de l'essai de comète (Bajpayee et al., 2013).

IV.4.9.1 Préparation des lames

Après centrifugation de la suspension cellulaire à 1000 rpm pendant 10 minutes, le culot de cellules en tube Eppendorf est mis en suspension dans 150 μ l d'agarose à bas point de fusion (Low Melting Agarose, LMA) à 0,5 % préparé dans du PBS maintenu en surfusion à 37°C, puis mélangé délicatement par aspirations refoulements. Ce mélange cellule-agarose est inclus « en sandwich » entre deux autres couches de gel d'agarose comme le montre la figure 27 ci-dessous.

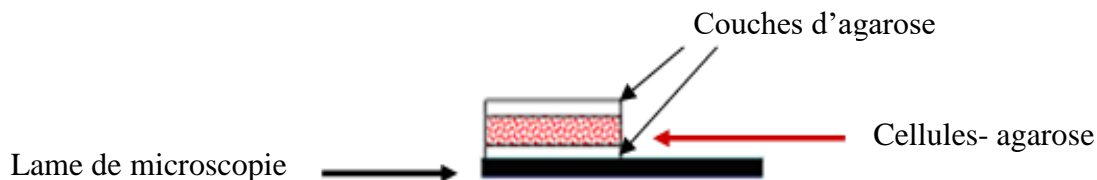


Figure 27 : « Un sandwich » de trois couches d'agarose.

La veille de l'essai, on fait fondre une solution d'Agarose Normale (Normal Agarose, NA) à 1 % préparé dans du PBS au micro-onde et on la verse dans un bécher puis on y plonge délicatement les lames destinées au test. On les dispose alors horizontalement sur une surface

bien plane jusqu'à durcissement. Cette première couche d'agarose permet d'assurer l'adhérence de la totalité du « sandwich » à la lame.

Le jour de l'essai, on dépose 75 µl de la suspension cellulaire en LMA sur la lame préparée la veille que l'on couvre immédiatement d'une lamelle 24 x 32 mm bien à plat. Le tout est déposé sur un lit de glace jusqu'à durcissement complet de l'agarose. La lamelle est ensuite enlevée délicatement et une troisième couche d'agarose est ajoutée (85 µL de LMA à 0,5%) sur la lame. On dépose immédiatement une nouvelle lamelle et on replace une dernière fois la lame sur le lit de glace jusqu'à durcissement de l'agarose (10 à 15 minutes). Cette dernière couche, facultative, permettrait de « protéger » le tout, évitant une perte de cellules ou même de fragments d'ADN.

IV.4.9.2 Lyse des membranes cellulaires et nucléaires

Une fois la dernière couche d'agarose prise en masse, les lamelles sont retirées et les lames sont ensuite plongées dans la solution de lyse contenue dans des bacs prévus à cet effet (NaCl à 2,5 M, Na₂ EDTA à 100 mM, Trizma base à 10 mM, 10 % de DMSO et 1% de Triton-X 100). Ces bacs sont conservés pendant 1 heure à + 4° C à l'obscurité. Il est recommandé de maintenir la solution de lyse à basse température afin de ne pas déstabiliser le gel d'agarose. La solution de lyse est donc maintenue au réfrigérateur avant et pendant son utilisation.

Le chlorure de sodium (NaCl) provoque la dégradation des protéines nucléaires, dont les histones, ce qui va relaxer la molécule d'ADN. Par ailleurs, l'éthylènediaminetétraacétate disodique (Na₂ EDTA) inhibe les nucléases, enzymes qui dégradent l'ADN, en complexant les cofacteurs métalliques (calcium et/ou magnésium) et le Trizma base assure les conditions alcalines (**Kienzler, 2013**). Le Triton X-100 est un détergent qui va provoquer la destruction des membranes cellulaires et nucléaires (**Fairbairn et al., 1995**).

L'ADN est ainsi mis à nu, et est particulièrement sensible. Un antioxydant, le DMSO est ajouté dans la solution de lyse pour prévenir la formation des radicaux libres de l'oxygène qui sont susceptibles d'altérer l'intégrité de l'ADN (**Kienzler, 2013**).

IV.4.9.3 Dénaturation et électrophorèse

À la fin de la lyse, les lames sont déposées dans une cuve d'électrophorèse horizontale puis, le tampon d'électrophorèse fraîchement préparé (60 ml de NaOH à 10N, 10 ml de Na₂ EDTA à 200 mM et de 2 litres d'eau distillée à 4° C, pH>13) est versé délicatement dans la cuve jusqu'à immersion complète des lames. Les lames sont maintenues dans ce tampon

pendant 20 minutes. Le pH basique du tampon d'électrophorèse va rompre les liaisons hydrogènes entre les deux brins de la molécule d'ADN (dénaturation), qui va passer d'une forme bicaténaire à une forme monocaténaire.

Après ce temps de dénaturation terminé, les lames sont soumises à un champ électrique de 25 V et 300 mA dans le même tampon pendant encore 20 minutes. Le champ électrique oriente l'ADN vers l'anode du fait de la charge négative des groupements phosphates associés. Les fragments d'ADN beaucoup plus légers seront entraînés plus loin, formant ainsi une traînée ; la queue de la comète.

Lors de la dénaturation et la migration, la cuve est déposée sur un lit de glace afin que les variations de température ne perturbent pas la migration.

IV.4.9.4 Neutralisation et déshydratation

À la suite de la migration, les lames sont rincées au moyen d'une solution de tampon Tris (Tris-HCl 0,4 M, pH 7,5) pendant 5 minutes ; cette opération est répétée 2 fois.

Cette étape permet un réappariement partiel des brins de la molécule d'ADN et élimine les sels et les détergents qui entraîneraient lors de la lecture un bruit de fond important (**Zennouche, 2005**). Les lames sont ensuite déshydratées par un bref rinçage à l'éthanol absolu, mises à sécher à l'air libre pendant 12 heures et stockées pour lecture ultérieure (environ 6 mois).

IV.4.9.5 Coloration

On dépose 100 µL de bromure d'éthidium, agent intercalant et marqueur fluorescent permettant de révéler les fragments d'ADN, à 2 µg/ml sur les lames et on observe immédiatement la totalité de la lame. Le bromure d'éthidium a pour avantage de permettre d'obtenir des images de très bonne qualité avec un contraste élevé entre l'ADN et l'agarose ainsi qu'un faible bruit de fond (**Zennouche, 2005**).

IV.4.9.6 Lecture et analyse des lames

Les lames colorées sont observées au microscope à fluorescence (Leica Microscopy et Scientific Instruments Group, Heerbrugg, Suisse) avec un grossissement de X 200. L'examen des comètes s'effectue grâce à une caméra CDD (Hitachi KP-M1EK/KINIEM) connectée au système d'analyse d'images couplé à un logiciel d'analyses d'images (Kinetic Imaging Ltd., Komet, version 5). Ce dernier fournit pour chaque comète formée plusieurs paramètres. Mais

les quatre paramètres le plus souvent pris en compte par les auteurs dans la bibliographie sont (Foltete, 2010) :

- Le pourcentage d'ADN dans la queue de la comète (% *Tail DNA*) : il reflète le taux d'ADN dégradé par rapport à l'ADN total ;
- La longueur de la queue de la comète (*Tail Length*) en μm : elle représente selon les auteurs, soit la longueur totale de la comète (Miyamae et al., 1997), soit la distance à partir du centre de la tête jusqu'à la fin de la queue (Olive et al., 1991) ou bien strictement la longueur de la queue de la comète ;
- Le moment de queue de la comète (*Tail Extent Moment*) en μm : c'est le produit du pourcentage d'ADN dans la queue de la comète avec la longueur de la queue de la comète ;
- Le moment d'Olive (*Olive Tail Moment*) : c'est le produit du pourcentage d'ADN dans la queue de la comète avec la distance entre les centres de gravité de la queue et de la tête (Olive et al., 1991).

Dans cette étude, le paramètre choisi pour exprimer la génotoxicité est le pourcentage d'ADN dans la queue de la comète (% *Tail DNA*), car il est considéré comme le paramètre le plus informatif et le plus fiable : il représente exactement ce que nous désirons connaître, c'est à dire le taux de dégradation de l'ADN (Kumaravel & Jha, 2006; Lovell & Omori, 2008; Olive & Durand, 2005). De plus, le % *Tail DNA* est le paramètre recommandé par le 4th *International Workshop on Genotoxicity testing* pour décrire les dommages à l'ADN dans les études réglementaires (Kumaravel et al., 2009). Ce paramètre tient compte à la fois l'intensité de la fluorescence dans la tête et dans la queue de la comète (% d'ADN dans la queue = Intensité de fluorescence dans la queue/ Intensité totale dans la comète (queue + tête) x 100).

Pour chaque dose, quatre lames ont été analysées. Sur chaque lame, 25 noyaux sont lus « en aveugle » sur la partie centrale du gel d'agarose. L'analyse est semi-automatique : les cellules sont sélectionnées une à une en balayant la lame sous le microscope.

Les résultats correspondent à la moyenne de % d'ADN des comètes \pm écart-type. Les figures 28 et 29 ci-dessous présentent l'écran de travail du logiciel ainsi qu'une comète sélectionnée et analysée par le logiciel Komet 5-Kinetic Imaging.

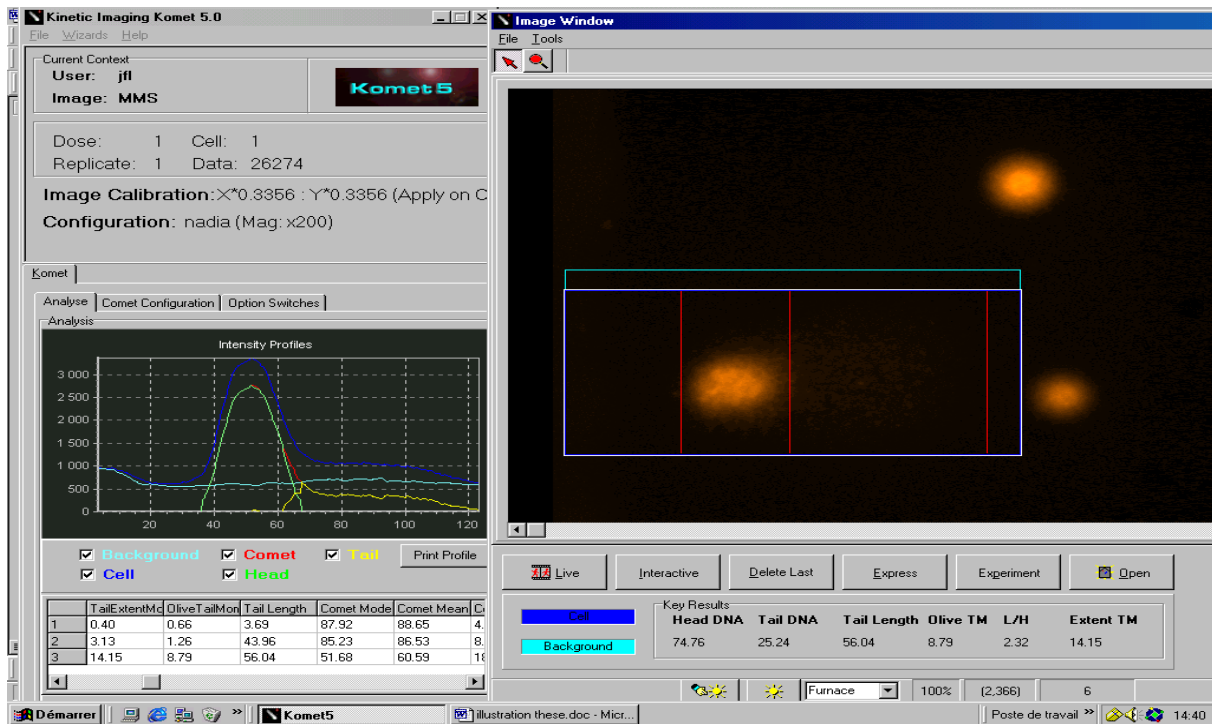


Figure 28 : Ecran de travail du logiciel d'analyse d'images Komet 5-Kinetic Imaging.

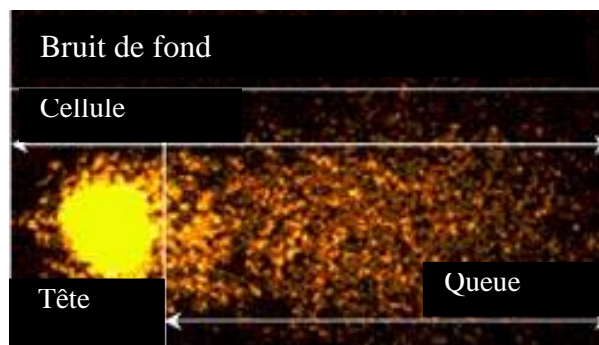


Figure 29 : Une comète sélectionnée et analysée par le logiciel Komet 5-Kinetic Imaging

RESULTATS ET DISCUSSION

Une partie des résultats présentés dans ce chapitre a fait l'objet d'une publication parue dans le journal « Toxicology in vitro ».

Dans ce chapitre, l'ensemble des résultats obtenus à l'issue des différentes expérimentations menées est exposé.

I. Extraction et rendement en extraits secs

Chaque extrait a été caractérisé par sa couleur et son rendement. Ces éléments sont présentés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Couleur et rendement des extraits de produits de viandes transformées.

Produits étudiés	Solvant d'extraction	Couleur	Rendement %
Corned-beef fabriqué en Algérie	Méthanol	Jaune	4,51
	<i>n</i> -hexane	Jaune pâle	9,13
Corned-beef importé	Méthanol	Jaune	4,68
	<i>n</i> -hexane	Jaune pâle	9,56
Saucisson salami du bœuf	Méthanol	Rouge foncé	4,70
	<i>n</i> -hexane	Jaune pâle	3,39
K-chir	Méthanol	Rouge foncé	3,39
	<i>n</i> -hexane	Jaune pâle	6,03
Rôti de poulet fumé	Méthanol	Jaune	2,91
	<i>n</i> -hexane	Jaune pâle	5,50
Rôti de bœuf cuit fumé	Méthanol	Jaune orangé	4,13
	<i>n</i> -hexane	Jaune pâle	1,09
Chawarma de poulet	Méthanol	Jaune	3,79
	<i>n</i> -hexane	Jaune pâle	7,78
Jambon de bœuf	Méthanol	Rouge foncé	4,42
	<i>n</i> -hexane	Jaune pâle	5,17

La différence de rendement entre les extraits est due à la composition chimique qui diffère d'un extrait à un autre.

II. Résultats des tests de génotoxicité

II.1 Test d'Ames

II.1.1 Résultats de la vérification des caractères génétiques des souches bactériennes

Les résultats de la vérification des caractères génétiques des souches de *S. typhimurium* TA1537, TA98, TA100 et TA102 sont comme suit :

a) Résultats de la vérification de la déficience en mécanismes de réparation de l'ADN : mutation en *uvr B* (sensibilité au UV)

Après 24 heures d'incubation, une inhibition de la poussée bactérienne a été observée dans la moitié de la boîte exposée aux UV pour les souches TA1537, TA98 et TA100, alors que la souche LT2 his G 46 R et la souche sauvage de *S. typhimurium* qui sont utilisées comme témoins et la souche TA102 poussent dans cette partie (Figure 30). Ces résultats confirment que ces dernières souches possèdent le système de réparation par excision (*uvrB*), ce qui n'est pas actif dans les souches TA1537, TA98 et TA100 à cause de la mutation au niveau du gène *uvrB*.

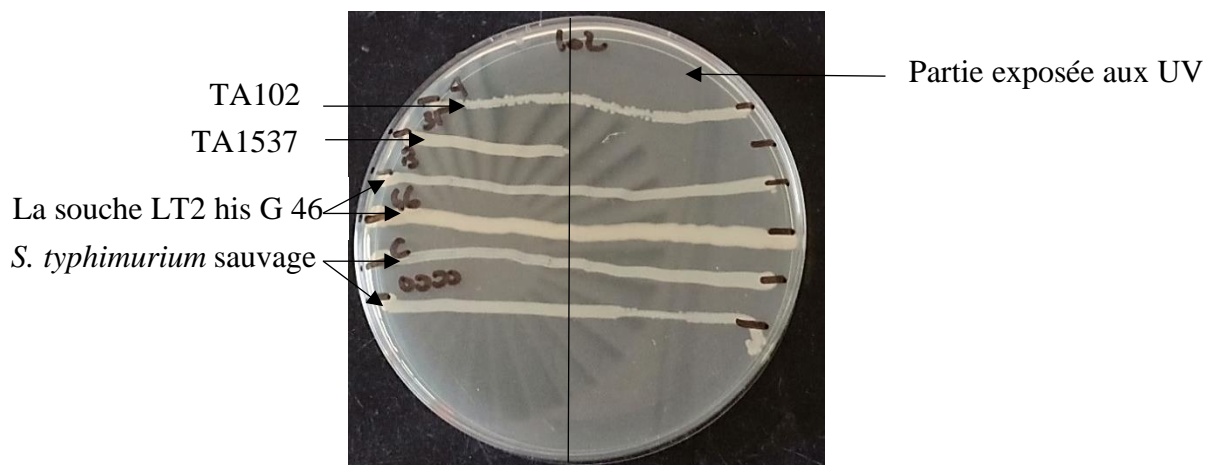


Figure 30 : Effet des UV sur les souches d'Ames (TA102 et TA1537) et les souches témoins (la souche LT2 his G 46 R et la souche sauvage de *S. typhimurium*).

b) Résultats de la vérification de la déficience en lipopolysaccharide (LPS) : mutation en *rfa* (sensibilité au cristal violet)

Après 18 heures d'incubation, une zone claire d'inhibition bactérienne (14 mm de diamètre) a été observée autour des disques imbibés par le cristal violet pour toutes les souches

(TA1537, TA98, TA100 et TA102) à l'exception de la souche témoin LT2 his G46 R qui est résistante au cristal violet (Figure 31). Ces résultats confirment que les quatre souches sensibles au cristal violet sont porteuses de la mutation *rfa* ; mutation qui provoque l'altération de la structure des LPS et qui confère donc aux souches une perméabilité au cristal violet qui est incapable de pénétrer la paroi cellulaire normale.

c) Résultats de la vérification de la résistance à l'ampicilline des souches porteuses du plasmide pKM101 et/ou à la tétracycline des souches porteuses du plasmide pAQ1

Une poussée bactérienne a été observée autour des disques imbibés par l'ampicilline pour les souches TA98, TA100, TA102 et LT2 his G46 R (témoin) et autour du disque imbibé par la tétracycline pour la souche TA102 (Figure 31). Ces résultats montrent que les souches résistantes à l'ampicilline possèdent le plasmide pKM101, et la souche résistante à la tétracycline contient le plasmide pAQ1. Ces deux plasmides portent les gènes de résistance de l'Ampicilline et de tétracycline, respectivement.

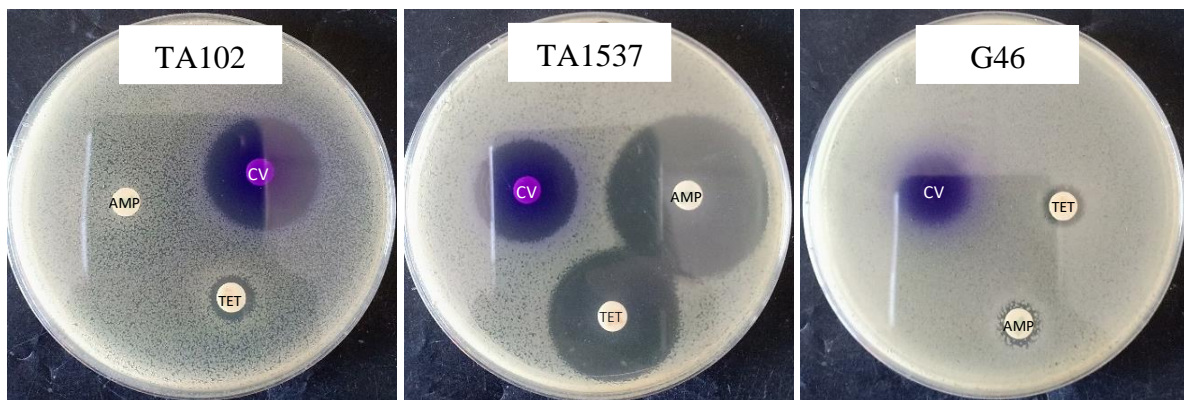


Figure 31 : Effet du cristal violet, de l'ampicilline et de la tétracycline sur les souches d'Ames (TA102 et TA1537) et la souche témoin LT2 his G 46 R. CV : cristal violet ; AMP : ampicilline ; TET : tétracycline.

II.1.2 Critères d'acceptation des résultats

Pour tous les extraits étudiés, dans les conditions de l'essai de mutagenicité et après environ 48 heures d'incubation à 37 °C, aucune colonie n'a été observée. Le contrôle de stérilité des extraits étudiés est donc conforme.

Les moyennes des révertants spontanés (témoin solvant) de chaque souche se situent dans l'intervalle des valeurs généralement observées dans les conditions expérimentales du laboratoire (témoins historiques) (Annexe II et III).

Parallèlement aux essais principaux, des tests ont été menés sur des produits de référence (témoins positifs) pour démontrer la capacité du laboratoire d'identifier les mutagènes dans les conditions du protocole d'essai utilisé, la sensibilité des souches testées ainsi que l'efficacité du système d'activation métabolique exogène. Comme prévu, des augmentations statistiquement et biologiquement significatives ont été observées en présence des témoins positifs. De plus, les valeurs observées sont supérieures à la limite inférieure des témoins historiques (Annexe IV).

Les critères d'acceptation des résultats ont donc été remplis.

II.1.3 Cytotoxicité des extraits testés

Après examen microscopique de la pousse de fond, aucune toxicité (Figure 32) n'a été observée vis-à-vis de l'ensemble des souches testées (TA1537, TA98, TA100 et TA102) avec tous les extraits étudiés tant en absence qu'en présence d'activation métabolique.



Figure 32 : Photo d'une pousse de fond non toxique.

II.1.4 Essai de mutagénicité

L'activité mutagène des extraits méthanoliques et hexaniques des produits carnés étudiés a été analysée en utilisant quatre souches de *S. typhimurium* TA1537, TA98, TA100 et TA102 en présence et en absence d'un système d'activation métabolique. Les nombres moyens de révertants par boîte obtenus au cours des essais de mutagenèse par le test d'Ames standard sont présentés dans les tableaux 9 et 10.

Tableau 9 : Résultats du test d'Ames pour les extraits méthanoliques des produits de viandes transformées.

Extraits méthanoliques	Doses µg/boîte	Nombre de revertants (moyenne ± écart-type)							
		TA1537		TA98		TA100		TA102	
		S9 -	S9 +	S9 -	S9 +	S9 -	S9 +	S9 -	S9 +
Corned-beef fabriqué en Algérie	0 ^a	10.3 ± 2.3	14.5 ± 6.2	32.0 ± 3.2	35.0 ± 5.3	103.0 ± 10.7	85.5 ± 9.6	203.3 ± 48.7	226.3 ± 39.7
	50	8.7 ± 3.8	9.7 ± 3.1	28.0 ± 6.6	33.3 ± 2.9	106.0 ± 10.8	76.3 ± 6.0	234.7 ± 11.4	399.3 ± 8.3*
	150	13.7 ± 3.1	13.3 ± 6.7	24.3 ± 6.5	39.0 ± 2.0	112.0 ± 17.5	90.0 ± 6.0	250.3 ± 24	420.0 ± 68.1*
	500	10.7 ± 2.5	10.0 ± 5.3	47.3 ± 15.9	46.7 ± 4.6	126.3 ± 15.5	94.3 ± 11.1	335.7 ± 22.9*	400.7 ± 98*
	1500	14.0 ± 4.4	14.7 ± 7.6	41.3 ± 3.8	58.3 ± 12.9*	175.7 ± 16.1*	137.0 ± 28.4	342.0 ± 44.5*	422.0 ± 39.9*
	5000	Tapis	Tapis	Tapis	Tapis	185.3 ± 30.1*	152.7 ± 55.1*	Tapis	Tapis
Témoin positif	(b)	484 ± 144.3*	236.7 ± 13.3*	274.7 ± 25.8*	1658.7 ± 247.1*	874.7 ± 208.7*	1461.3 ± 219.7*	1394.7 ± 552.1*	528.0 ± 77.1*
Corned-beef importé	0 ^a	9.0 ± 2.4	6.7 ± 2.5	14.8 ± 2.1	22.7 ± 4.9	106.5 ± 6.8	89.8 ± 7.1	156.0 ± 16.6	167.8 ± 36.9
	50	10.7 ± 5.0	5.3 ± 2.1	13.7 ± 2.9	24.0 ± 4.6	112.7 ± 7.5	106.7 ± 7.4	162.7 ± 3.1	238.7 ± 68.2
	150	10.7 ± 3.1	5.0 ± 1.0	15.0 ± 1.7	21.0 ± 4.6	96.3 ± 1.5	103.0 ± 11.1	146.0 ± 14.0	219.3 ± 38.2
	500	6.3 ± 1.2	5.3 ± 2.9	13.0 ± 2.6	24.3 ± 2.1	94.0 ± 12.3	93.7 ± 9.6	134.7 ± 17.2	270.7 ± 45.0*
	1500	3.3 ± 0.6	4.0 ± 1.7	21.0 ± 4.6	27.0 ± 2.0	81.0 ± 8.7*	101.7 ± 11.4	164.0 ± 26.2	332.0 ± 2.0*
	5000	3.7 ± 1.5	9.0 ± 5.0	17.3 ± 5.5	46.0 ± 1.7*	86.0 ± 1.7	145.3 ± 3.1*	81.7 ± 5.8*	390.0 ± 22.7*
Témoin positif	(b)	290.7 ± 97.2*	326.7 ± 137.2*	482.7 ± 24.4*	1536.0 ± 84.7*	302.7 ± 54.5*	1509.3 ± 33.3*	960.0 ± 69.7*	725.3 ± 128.3*
Saucisson salami du bœuf	0 ^a	10.5 ± 2.4	13.5 ± 4.0	24.3 ± 6.1	23.8 ± 9.2	99.2 ± 13.1	91.0 ± 12.0	194.5 ± 25.6	223.0 ± 31.3
	50	11.7 ± 1.2	15.7 ± 3.2	22.7 ± 4.7	25.3 ± 1.5	97.7 ± 4.0	106.3 ± 9.6	230.0 ± 55.2	263.0 ± 19.5
	150	11.0 ± 5.3	16.7 ± 2.3	28.3 ± 3.1	29.0 ± 4.4	106.3 ± 10.8	107.7 ± 6.7	277.3 ± 9.0	415.3 ± 17.2*
	500	9.0 ± 2.6	13.7 ± 3.1	29.0 ± 3.6	25.3 ± 3.5	112.7 ± 4.9	103.7 ± 5.0	376.0 ± 45.7*	386.0 ± 25.0*
	1500	10.0 ± 5.3	12.3 ± 4.0	29.0 ± 3.6	33.0 ± 1.7	129.0 ± 7.2*	125.3 ± 13.8*	364.7 ± 44.4*	470.7 ± 68.9*
	5000	8.3 ± 2.5	13.7 ± 5.5	28.0 ± 6.1	34.3 ± 6.7	217.3 ± 16.9*	129.7 ± 8.0*	Tapis	Tapis
Témoin positif	(b)	316.7 ± 80.8*	204.7 ± 24.2*	271.3 ± 26.4*	2650.7 ± 547.8*	561.3 ± 74.3*	2800.0 ± 688.0*	874.7 ± 124.0*	869.3 ± 203.9*

^a DMSO; ^b TA100 (- S9): azide de Sodium (1 µg/ml) ; TA1537 (- S9): 9-amino-acridine (50 µg/ml) ; TA98 (- S9): 2-nitrofluorène (2 µg/ml) ; TA102 (- S9) : Mitomycine C (0.125 µg/ml). TA1537, TA98, TA100 (+ S9) : 2-anthramine (2 µg/ml) ; TA102 (+ S9) : benzo(a)pyrène (2 µg/ml) ; ■ : Biologiquement significatif ; * Statistiquement significatif (test Dunnett, $p < 0.01$).

Suite (Tableau 9)

Extraits méthanoliques	Doses µg/boîte	Nombre de revertants (moyenne ± écart-type)							
		TA1537		TA98		TA100		TA102	
		S9 -	S9 +	S9 -	S9 +	S9 -	S9 +	S9 -	S9 +
K-chir	0 ^a	10.5 ± 2.4	13.5 ± 4.0	24.3 ± 6.1	23.8 ± 9.2	99.2 ± 13.1	91.0 ± 12.0	194.5 ± 25.6	223.0 ± 31.3
	50	9.7 ± 4.0	17.0 ± 5.6	19.3 ± 4.9	31.0 ± 6.2	104.0 ± 15.1	96.0 ± 19.2	214.7 ± 18.6	285.3 ± 14.5
	150	8.7 ± 2.1	20.3 ± 5.5	17.7 ± 3.1	20.3 ± 6.4	92.7 ± 6.7	92.3 ± 11.2	271.3 ± 23.9	273.3 ± 44.1
	500	8.0 ± 1.7	11.3 ± 2.5	19.5 ± 2.1	19.7 ± 6.4	99.3 ± 20.4	113.3 ± 8.5	267.3 ± 30.7	313.3 ± 12.2
	1500	7.3 ± 1.5	10.0 ± 4.4	18.3 ± 4.0	22.7 ± 4.0	79.0 ± 9.5	93.3 ± 8.1	324.0 ± 51.4*	366.7 ± 71.8*
	5000	14.0 ± 1.0	10.7 ± 6.7	18.0 ± 1.7	22.7 ± 4.0	109.0 ± 21.9	110.7 ± 21.2	352.0 ± 45.0*	387.3 ± 32.9*
Témoin positif	(b)	316.7 ± 80.8*	204.7 ± 24.2*	271.3 ± 26.4*	2650.7 ± 547.8*	561.3 ± 74.3*	2800.0 ± 688.0*	874.7 ± 124.0*	869.3 ± 203.9*
Rôti de poulet fumé	0 ^a	5.7 ± 1.6	5.8 ± 2.9	12.8 ± 3.9	22.8 ± 1.8	92.3 ± 9.0	92.8 ± 14.4	150.7 ± 16.5	157.2 ± 13.8
	50	4.7 ± 0.6	7.7 ± 1.2	13.3 ± 1.5	17.7 ± 0.6	76.7 ± 9.0	95.7 ± 2.9	139.3 ± 17.2	171.3 ± 15.8
	150	6.7 ± 2.1	9.7 ± 5.5	12.0 ± 5.3	25.0 ± 7.8	87.0 ± 8.5	82.0 ± 10.4	122.7 ± 7.6	215.3 ± 36.5
	500	4.3 ± 2.1	5.3 ± 1.2	11.0 ± 6.1	27.7 ± 2.9	87.7 ± 10.2	103.7 ± 5.5	144.7 ± 25.5	228.3 ± 24.8*
	1500	9.7 ± 2.1	6.7 ± 4.9	17.7 ± 1.5	30.7 ± 3.8	88.7 ± 2.5	100.3 ± 4.7	182.0 ± 15.1	281.0 ± 36.0*
	5000	9.3 ± 4.7	9.7 ± 3.1	16.7 ± 7.1	31.3 ± 10.1	123.3 ± 8.4*	160.7 ± 19.4*	161.3 ± 34.8	304.0 ± 25.0*
Témoin positif	(b)	354.0 ± 83.2*	210.7 ± 28.0*	256.0 ± 49.2*	1882.7 ± 24.4*	392.7 ± 41.7*	2805.3 ± 64.7*	1040.0 ± 264.4*	386.7 ± 143.6*
Rôti de bœuf cuit fumé	0 ^a	10.2 ± 2.9	16.0 ± 1.7	26.8 ± 4.6	39.8 ± 3.0	98.0 ± 8.3	85.8 ± 13.4	183.7 ± 37.8	230.3 ± 50.7
	50	9.0 ± 6.1	15.7 ± 4.5	21.7 ± 4.0	33.7 ± 6.8	102.0 ± 9.8	94.3 ± 14.3	220.7 ± 45.0	291.3 ± 38.1
	150	10.7 ± 3.5	17.0 ± 6.0	28.3 ± 6.1	37.7 ± 2.1	125.3 ± 3.1*	109.3 ± 8.5	251.3 ± 41.3	393.3 ± 41.0*
	500	11.3 ± 2.1	15.0 ± 4.4	26.3 ± 4.2	38.3 ± 4.0	110.7 ± 8.1	114.3 ± 4.2	248.7 ± 41.1	398.7 ± 16.0*
	1500	10.3 ± 4.0	17.3 ± 3.5	22.0 ± 4.4	38.0 ± 5.3	99.3 ± 6.5	114.0 ± 10.0	356.0 ± 12.0*	430.0 ± 44.5*
	5000	12.7 ± 1.5	12.3 ± 1.5	35.5 ± 10.6	39.3 ± 4.0	118.0 ± 1.7*	130.3 ± 15.5*	336.7 ± 29.1*	447.3 ± 76.8*
Témoin positif	(b)	609.7 ± 112.1*	320.0 ± 83.8*	501.3 ± 30.3*	1488.0 ± 226.8*	661.3 ± 33.3*	2501.3 ± 563.7*	1085.3 ± 266.6*	516.0 ± 34.2*

^a DMSO; ^b TA100 (- S9): azide de Sodium (1 µg/ml) ; TA1537 (- S9): 9-amino-acridine (50 µg/ml) ; TA98 (- S9): 2-nitrofluorène (2 µg/ml) ; TA102 (- S9) : Mitomycine C (0.125 µg/ml).
TA1537, TA98, TA100 (+ S9) : 2-anthramine (2 µg/ml) ; TA102 (+ S9) : benzo(a)pyrène (2 µg/ml) ; ■ : Biologiquement significatif ; * Statistiquement significatif (test Dunnett, *p* < 0.01).

Suite (Tableau 9)

Extraits méthanoliques	Doses µg/boîte	Nombre de revertants (moyenne ± écart-type)							
		TA1537		TA98		TA100		TA102	
		S9 -	S9 +	S9 -	S9 +	S9 -	S9 +	S9 -	S9 +
Chawarma de poulet	0 ^a	7.0 ± 2.3	8.5 ± 4.3	16.3 ± 4.4	27.5 ± 1.9	89.0 ± 5.6	84.3 ± 6.7	164.7 ± 36.1	185.0 ± 26.2
	50	6.7 ± 2.1	7.7 ± 1.2	15.0 ± 6.0	21.0 ± 3.5	124.0 ± 15.1*	84.0 ± 10.0	212.7 ± 26.4	183.3 ± 52.6
	150	5.7 ± 2.1	9.0 ± 5.0	14.0 ± 5.6	23.7 ± 5.9	88.7 ± 9.2	110.7 ± 19.2	218.0 ± 37.4	236.7 ± 32.4
	500	7.3 ± 1.2	3.7 ± 2.1	19.0 ± 3.5	23.0 ± 4.4	92.0 ± 12.5	102.7 ± 19.7	256.7 ± 42.9*	233.3 ± 19.0
	1500	11.3 ± 3.1	7.0 ± 1.7	15.0 ± 5.2	32.0 ± 8.5	144.0 ± 10.6*	113.3 ± 5.0	322.7 ± 27.6*	287.3 ± 18.1*
	5000	7.7 ± 5.1	5.7 ± 1.5	21.3 ± 3.8	36.3 ± 9.9	154.7 ± 28.4*	170.7 ± 24.0*	384.0 ± 33.4*	312.0 ± 30.2*
Témoin positif	(b)	542.7 ± 69.9*	235.3 ± 28.9*	245.3 ± 53.7*	2378.7 ± 536.7*	432.0 ± 34.9*	2741.3 ± 320.5*	546.7 ± 56.9*	477.3 ± 56.9*
Jambon de bœuf	0 ^a	10.2 ± 2.9	16.0 ± 1.7	26.8 ± 4.6	39.8 ± 3.0	98.0 ± 8.3	85.8 ± 13.4	183.7 ± 37.8	230.3 ± 50.7
	50	12.3 ± 1.5	13.0 ± 1.7	27.3 ± 5.7	47.0 ± 3.6	100.7 ± 9.1	94.3 ± 22.2	163.3 ± 3.1	202.7 ± 6.1
	150	12.3 ± 4.7	14.7 ± 5.1	30.3 ± 6.1	44.3 ± 12.3	127.3 ± 8.1*	108.0 ± 9.6	207.3 ± 26.6	282.7 ± 14.2
	500	6.3 ± 3.2	12.7 ± 3.2	35.3 ± 6.8	47.0 ± 7.0	109.3 ± 6.7	117.3 ± 14.8	261.3 ± 44.4	287.3 ± 15.5
	1500	13.3 ± 3.1	14.0 ± 2.6	36.3 ± 2.5	49.3 ± 9.8	113.7 ± 8.1	110.0 ± 7.5	254.7 ± 30.3	357.3 ± 23.2*
	5000	12.0 ± 2.6	13.7 ± 4.0	47.0 ± 10.6*	58.0 ± 14.7	157.0 ± 20.7*	145.3 ± 11.8*	212.7 ± 21.2	402.7 ± 11.0*
Témoin positif	(b)	609.7 ± 112.1*	320.0 ± 83.8*	501.3 ± 30.3*	1488.0 ± 226.8*	661.3 ± 33.3*	2501.3 ± 563.7*	1085.3 ± 266.6*	516.0 ± 34.2*

^a DMSO; ^b TA100 (- S9): azide de Sodium (1 µg/ml) ; TA1537 (- S9): 9-amino-acridine (50 µg/ml) ; TA98 (- S9): 2-nitrofluorène (2 µg/ml) ; TA102 (- S9) : Mitomycine C (0.125 µg/ml).
TA1537, TA98, TA100 (+ S9) : 2-anthramine (2 µg/ml) ; TA102 (+ S9) : benzo(a)pyrène (2 µg/ml) ; ■ : Biologiquement significatif ; * Statistiquement significatif (test Dunnett, $p < 0.01$).

Tableau 10 : Résultats du test d'Ames pour les extraits héxaniques des produits de viandes transformées.

Extraits héxaniques	Doses µg/boîte	Nombre de révertants (moyenne ± écart-type)							
		TA1537		TA98		TA100		TA102	
		S9 -	S9 +	S9 -	S9 +	S9 -	S9 +	S9 -	S9 +
Corned-beef fabriqué en Algérie	0 ^a	6.2 ± 2.8	7.5 ± 3.5	19.5 ± 6.1	23.5 ± 7.0	86.8 ± 12.8	83.0 ± 7.2	144.2 ± 32.6	170.0 ± 30.3
	10	7.7 ± 1.2	7.7 ± 1.5	24.7 ± 6.4	28.3 ± 4.2	99.7 ± 10.1	91.3 ± 7.6	145.3 ± 11.6	210.7 ± 42.3
	30	7.7 ± 2.1	8.3 ± 3.1	22.7 ± 3.2	30.0 ± 9.8	116.3 ± 4.2	85.0 ± 16.1	151.3 ± 11.0	264.0 ± 6.9*
	100	8.3 ± 3.8	6.3 ± 2.5	23.0 ± 3.0	30.3 ± 7.5	95.0 ± 13.9	93.0 ± 6.9	172.7 ± 19.6	228.0 ± 34.0
	300	5.0 ± 1.7	4.7 ± 1.5	20.3 ± 2.5	27.3 ± 7.0	110.7 ± 12.4	93.3 ± 12.1	183.7 ± 6.7	230.7 ± 29.7
	1000	6.0 ± 3.6	5.7 ± 1.5	20.0 ± 7.5	30.3 ± 4.0	96.7 ± 9.5	81.7 ± 10.2	166.3 ± 38.4	221.3 ± 31.6
Témoin positif	(b)	423.3 ± 45.0*	330.0 ± 35.4*	250.7 ± 32.1*	2640.0 ± 267.3*	393.3 ± 78.4*	2560.7 ± 393.8*	857.3 ± 173.0*	838.7 ± 81.2*
Corned-beef importé	0 ^a	8.8 ± 4.5	6.7 ± 0.8	24.5 ± 5.0	32.5 ± 6.0	76.7 ± 9.5	70.2 ± 9.8	81.0 ± 23.5	173.7 ± 38.3
	10	7.0 ± 2.0	4.7 ± 2.1	24.3 ± 0.6	22.3 ± 4.7	75.0 ± 15.1	81.7 ± 10.7	114.0 ± 39.9	206.7 ± 15.0
	30	9.3 ± 3.1	5.7 ± 2.5	17.3 ± 3.8	35.3 ± 6.1	77.3 ± 10.2	61.3 ± 5.5	149.0 ± 46.1	180.7 ± 35.6
	100	7.7 ± 2.1	6.0 ± 2.0	18.3 ± 5.5	22.0 ± 3.6	87.3 ± 2.5	73.0 ± 15.7	108.0 ± 16.6	169.3 ± 32.9
	300	8.3 ± 6.0	4.0 ± 3.5	19.0 ± 6.1	28.0 ± 6.1	86.7 ± 7.6	78.7 ± 5.9	166.0 ± 23.6*	194.7 ± 27.0
	1000	7.7 ± 2.9	6.0 ± 1.7	22.7 ± 7.5	27.3 ± 3.5	91.3 ± 8.1	71.7 ± 4.2	150.3 ± 12.2	128.7 ± 20.5
Témoin positif	(b)	618.7 ± 211.3*	528.0 ± 42.3*	258.0 ± 65.8*	3234.3 ± 882.1*	661.3 ± 24.4*	1568.0 ± 112.0*	1333.3 ± 60.6*	738.7 ± 192.1*
Saucisson salami du bœuf	0 ^a	7.8 ± 1.7	10.0 ± 2.8	25.8 ± 3.1	35.0 ± 4.0	81.5 ± 8.5	60.7 ± 4.4	109.8 ± 26.7	162.7 ± 15.9
	10	11.0 ± 4.0	8.0 ± 2.0	27.3 ± 6.7	26.7 ± 1.5	89.7 ± 3.8	69.7 ± 6.7	104.7 ± 9.5	204.0 ± 7.2*
	30	8.0 ± 2.0	13.7 ± 1.2	30.0 ± 3.0	26.7 ± 2.1	94.7 ± 3.2	77.3 ± 16.0	127.3 ± 19.7	234.0 ± 9.2*
	100	9.3 ± 3.2	8.3 ± 3.5	27.3 ± 3.2	27.3 ± 2.1	87.3 ± 15.9	86.0 ± 13.5*	134.0 ± 7.2	244.7 ± 33.8*
	300	8.0 ± 3.0	6.0 ± 2.6	32.7 ± 3.1	28.3 ± 2.9	85.3 ± 15.5	79.3 ± 13.7	125.3 ± 18.1	202.7 ± 10.3
	1000	9.3 ± 0.6	10.0 ± 3.6	24.0 ± 7.9	33.3 ± 3.5	95.3 ± 9.1	74.7 ± 0.6	96.7 ± 18.9	212.7 ± 15.0*
Témoin positif	(b)	294.0 ± 80.2*	201.3 ± 46.4*	294.0 ± 66.8*	1098.7 ± 88.1*	538.0 ± 53.9*	1141.3 ± 148.7*	654.7 ± 53.7*	634.7 ± 28.1*

^a éthanol ; ^b TA100 (- S9) : azide de Sodium (1 µg/ml) ; TA1537 (- S9) : 9-amino-acridine (50 µg/ml) ; TA98 (- S9) : 2-nitrofluorène (2 µg/ml) ; TA102 (- S9) : Mitomycine C (0.125 µg/ml).
 TA1537, TA98, TA100 (+ S9) : 2-anthramine (2 µg/ml) ; TA102 (+ S9) : benzo(a)pyrène (2 µg/ml) ; ■ : Biologiquement significatif ; * Statistiquement significatif (test Dunnett, $p < 0.01$).

Suite (Tableau 10)

Extraits héxaniques	Doses µg/boîte	Nombre de révertants (moyenne ± écart-type)							
		TA1537		TA98		TA100		TA102	
		S9 -	S9 +	S9 -	S9 +	S9 -	S9 +	S9 -	S9 +
K-chir	0 ^a	7.8 ± 1.7	10.0 ± 2.8	25.8 ± 3.1	35.0 ± 4.0	81.5 ± 8.5	60.7 ± 4.4	109.8 ± 26.7	162.7 ± 15.9
	10	9.7 ± 3.8	16.7 ± 3.8	32.3 ± 4.6	36.0 ± 1.0	95.3 ± 10.0	83.3 ± 7.4	125.7 ± 33.5	261.3 ± 61.0
	30	8.7 ± 3.8	15.7 ± 2.9	29.7 ± 4.5	37.0 ± 2.0	96.7 ± 5.0	88.7 ± 17.0	186.0 ± 14.1*	336.7 ± 77.0*
	100	8.7 ± 3.2	16.0 ± 1.7	26.7 ± 1.2	33.3 ± 3.2	100.0 ± 7.5	89.7 ± 19.6	190.3 ± 31.1*	348.0 ± 45.8*
	300	10.3 ± 3.2	11.3 ± 1.5	32.0 ± 2.0	35.7 ± 3.8	90.0 ± 8.7	98.3 ± 18.2*	211.3 ± 25.7*	380.0 ± 48.9*
	1000	10.3 ± 1.2	13.7 ± 4.0	29.3 ± 4.5	36.0 ± 2.6	105.7 ± 9.0*	89.0 ± 1.0	141.7 ± 37.2	265.3 ± 41.1
Témoin positif	(b)	294.0 ± 80.2*	201.3 ± 46.4*	294.0 ± 66.8*	1098.7 ± 88.1*	538.0 ± 53.9*	1141.3 ± 148.7*	654.7 ± 53.7*	634.7 ± 28.1*
Rôti de poulet fumé	0 ^a	3.7 ± 1.2	6.7 ± 2.4	17.0 ± 4.5	27.3 ± 6.1	84.7 ± 7.5	67.3 ± 14.2	90.2 ± 13.1	177.7 ± 26.1
	10	8.7 ± 0.6	7.0 ± 3.6	23.3 ± 3.1	29.0 ± 6.1	86.7 ± 16.8	75.3 ± 5.5	108.7 ± 9.5	145.7 ± 19.6
	30	9.0 ± 6.6	10.7 ± 4.0	18.7 ± 4.7	29.0 ± 4.6	90.0 ± 10.4	93.3 ± 23.2	126.0 ± 23.6	226.7 ± 56.0
	100	6.7 ± 0.6	8.0 ± 1.0	17.0 ± 6.6	35.0 ± 4.0	85.7 ± 29.7	91.3 ± 10.7	111.3 ± 18.1	233.3 ± 27.7
	300	7.3 ± 3.1	6.7 ± 2.5	19.0 ± 2.6	34.7 ± 7.5	95.3 ± 4.7	85.3 ± 7.5	114.7 ± 18.5	247.3 ± 18.1
	1000	9.7 ± 0.6	7.7 ± 6.0	19.3 ± 2.9	28.7 ± 8.1	80.3 ± 11.2	61.7 ± 24.0	93.3 ± 8.1	144.7 ± 64.7
Témoin positif	(b)	453.3 ± 126.0*	248.0 ± 4.0*	236.7 ± 51.3*	2848.0 ± 306.5*	474.7 ± 18.1*	1492.0 ± 250.0*	452.7 ± 33.2*	412.0 ± 62.1*
Rôti de bœuf cuit fumé	0 ^a	6.3 ± 1.6	7.7 ± 1.8	20.3 ± 2.5	24.0 ± 6.7	79.8 ± 6.8	72.3 ± 15.2	121.3 ± 31.2	159.0 ± 33.9
	10	5.0 ± 3.0	5.7 ± 2.1	18.3 ± 4.2	27.7 ± 2.3	70.3 ± 9.1	75.7 ± 13.9	122.0 ± 10.6	166.7 ± 18.6
	30	6.3 ± 2.1	5.3 ± 3.8	14.0 ± 3.6	23.0 ± 1.0	78.0 ± 14.8	72.3 ± 9.5	132.0 ± 13.9	210.7 ± 25.3
	100	7.3 ± 4.5	5.7 ± 0.6	20.7 ± 7.2	22.7 ± 5.9	76.3 ± 3.8	70.7 ± 3.5	140.0 ± 27.1	190.0 ± 20.0
	300	2.7 ± 1.5	7.0 ± 3.0	20.3 ± 9.0	25.7 ± 1.5	68.0 ± 13.0	68.7 ± 7.5	130.0 ± 14.0	202.7 ± 17.5
	1000	4.0 ± 3.6	5.0 ± 1.0	19.0 ± 2.0	31.0 ± 6.6	60.7 ± 5.9	66.3 ± 5.7	120.0 ± 12.2	179.3 ± 20.5
Témoin positif	(b)	249.3 ± 9.0*	405.3 ± 52.8*	202.7 ± 20.0*	2240.0 ± 284.4*	348.0 ± 29.5*	2944.0 ± 461.2*	830.7 ± 237.7*	374.7 ± 58.0*

^a éthanol ; ^b TA100 (- S9) : azide de Sodium (1 µg/ml) ; TA1537 (- S9) : 9-amino-acridine (50 µg/ml) ; TA98 (- S9) : 2-nitrofluorène (2 µg/ml) ; TA102 (- S9) : Mitomycine C (0.125 µg/ml).
TA1537, TA98, TA100 (+ S9) : 2-anthramine (2 µg/ml) ; TA102 (+ S9) : benzo(a)pyrène (2 µg/ml) ; ■ : Biologiquement significatif ; * Statistiquement significatif (test Dunnett, $p < 0.01$).

Suite (Tableau 10)

Extraits héxaniques	Doses µg/boîte	Nombre de révertants (moyenne ± écart-type)							
		TA1537		TA98		TA100		TA102	
		S9 -	S9 +	S9 -	S9 +	S9 -	S9 +	S9 -	S9 +
Chawarma de poulet	0 ^a	3.7 ± 1.2	6.7 ± 2.4	17.0 ± 4.5	27.3 ± 6.1	84.7 ± 7.5	67.3 ± 14.2	90.2 ± 13.1	177.7 ± 26.1
	10	5.0 ± 2.0	9.0 ± 1.0	21.3 ± 4.0	19.7 ± 1.2	95.7 ± 27.2	74.7 ± 16.0	98.7 ± 20.4	174.0 ± 22.5
	30	10.3 ± 1.5*	8.7 ± 2.1	21.3 ± 6.4	22.0 ± 3.5	99.0 ± 12.3	95.0 ± 4.6	116.0 ± 7.2	158.0 ± 19.3
	100	4.3 ± 3.2	9.0 ± 4.0	17.3 ± 0.6	16.0 ± 2.6*	84.3 ± 11.2	87.3 ± 10.7	111.3 ± 9.0	193.3 ± 7.0
	300	7.3 ± 2.3	8.7 ± 4.6	21.3 ± 9.1	15.7 ± 0.6*	88.7 ± 7.4	87.7 ± 9.0	114.7 ± 12.7	221.3 ± 67.0
	1000	4.3 ± 0.6	8.3 ± 0.6	23.3 ± 4.2	17.0 ± 3.6*	95.7 ± 15.6	89.0 ± 22.5	60.0 ± 62.5	180.7 ± 6.1
Témoin positif	(b)	453.3 ± 126.0*	248.0 ± 4.0*	236.7 ± 51.3*	2848.0 ± 306.5*	474.7 ± 18.1*	1492.0 ± 250.0*	452.7 ± 33.2*	412.0 ± 62.1*
Jambon de bœuf	0 ^a	6.3 ± 1.6	7.7 ± 1.8	20.3 ± 2.5	25.7 ± 7.3	79.8 ± 6.8	72.3 ± 15.2	99.7 ± 49.0	159.0 ± 33.9
	10	8.0 ± 2.6	7.3 ± 1.5	29.3 ± 2.5	30.7 ± 8.4	89.7 ± 12.7	73.0 ± 10.4	114.0 ± 4.0	220.0 ± 30.3
	30	5.3 ± 1.5	8.3 ± 0.6	26.3 ± 2.5	34.0 ± 4.4	92.3 ± 19.6	96.0 ± 13.0	185.3 ± 34.2	225.3 ± 11.0
	100	7.3 ± 2.5	7.0 ± 3.6	22.7 ± 8.6	42.7 ± 7.6	110.3 ± 12.1	100.3 ± 5.9	188.7 ± 27.3	244.7 ± 27.3*
	300	7.0 ± 2.0	11.0 ± 4.4	24.3 ± 4.5	36.3 ± 4.5	105.3 ± 17.6	109.3 ± 27.2	197.3 ± 9.2	310.7 ± 11.0*
	1000	6.7 ± 2.1	7.7 ± 0.6	21.0 ± 5.3	36.0 ± 19.3	94.7 ± 16.8	95.7 ± 4.5	166.0 ± 26.2	217.7 ± 26.6
Témoin positif	(b)	249.3 ± 9.0*	405.3 ± 52.8*	202.7 ± 20.0*	2240.0 ± 284.4*	348.0 ± 29.5*	2944.0 ± 461.2*	830.7 ± 237.7*	374.7 ± 58.0*

^a éthanol ; ^b TA100 (- S9) : azide de Sodium (1 µg/ml) ; TA1537 (- S9) : 9-amino-acridine (50 µg/ml) ; TA98 (- S9) : 2-nitrofluorène (2 µg/ml) ; TA102 (- S9) : Mitomycine C (0.125 µg/ml).
 TA1537, TA98, TA100 (+ S9) : 2-anthramine (2 µg/ml) ; TA102 (+ S9) : benzo(a)pyrène (2 µg/ml) ; ■ : Biologiquement significatif ; * Statistiquement significatif (test Dunnett, $p < 0.01$).

II.1.4.1 Extraits de corned-beef fabriqué en Algérie

L'extrait méthanolique et hexanique de corned-beef fabriqué en Algérie ne présente aucune activité mutagène vis-à-vis des souches de *S. typhimurium* étudiées aussi bien en absence qu'en présence d'un système d'activation métabolique. En effet, aucune augmentation biologiquement significative du nombre moyen de révertants n'a été observée de 50 à 5000 µg/boîte, correspondant à la dose maximale recommandée par la ligne directrice de l'OCDE, pour l'extrait méthanolique, et de 10 à 1000 µg/boîte, correspondant à la dose maximale qui a été limitée par la solubilité d'extrait dans le solvant, pour l'extrait hexanique. En revanche, des augmentations statistiquement significatives du nombre moyen de révertants ont été notées vis-à-vis des souches TA98, TA100 et TA102 pour l'extrait méthanolique en l'absence et/ou en présence de fraction S9 et vis-à-vis de la souche TA102 en présence de fraction S9 pour l'extrait hexanique.

II.1.4.2 Extraits de corned-beef importé

Une augmentation biologiquement et statistiquement significative du nombre de révertants a été retrouvée, en présence d'activation métabolique, avec l'extrait méthanolique du corned-beef importé (1) vis-à-vis de la souche TA98 à la dose maximale de 5000 µg/boîte, et (2) vis-à-vis de la souche TA102 aux deux doses maximales de 1500 et 5000 µg/boîte. De plus, des augmentations statistiquement mais non biologiquement significatives du nombre moyen de révertants ont été trouvées pour la souche TA100 à la dose de 1500 µg/boîte en absence d'activation métabolique et à la dose plus forte dose de 5000 µg/boîte en présence d'activation métabolique, et pour la souche TA102 à la plus forte dose de 5000 µg/boîte en absence d'activation métabolique et à la dose 500 µg/boîte en présence du S9-mix. Par ailleurs, une augmentation statistiquement mais non biologiquement significative du nombre moyen de révertants a été également trouvée avec l'extrait hexanique vis-à-vis uniquement la souche TA102 à la dose de 300 µg/boîte en absence d'activation métabolique.

II.1.4.3 Extraits de saucisson salami du bœuf

L'extrait méthanolique a induit une augmentation biologiquement et statistiquement significative du nombre de révertants (1) vis-à-vis de la souche TA100 à la plus forte dose de 5000 µg/boîte en absence d'activation métabolique et (2) vis-à-vis de la souche TA102 à la dose de 1500 µg/boîte en présence d'activation métabolique. Des augmentations statistiquement mais non biologiquement significatives du nombre moyen de révertants ont été

trouvées avec (1) l'extrait méthanolique pour la souche TA100 à 1500 µg/boîte en absence de la fraction S9 et aux doses de 1500 et 5000 µg/boîte en présence du S9-mix, et pour la souche TA102 aux doses de 500 et 1500 µg/boîte en absence du S9 et aux 150 et 500 µg/boîte en présence du S9-mix, (2) l'extrait hexanique à la dose de 100 µg/boîte pour la souche TA100 en présence du S9-mix et aux doses de 10, 30, 100 et 1000 µg/boîte pour la souche TA102 en présence du S9-mix.

II.1.4.4 Extraits du K-chir

Une augmentation biologiquement et statistiquement significative du nombre de révertants a été observée avec l'extrait hexanique aux doses de 30, 100 et 300 µg/boîte pour la souche TA102 en présence d'activation métabolique avec une relation dose-effet claire. En outre, des augmentations statistiquement mais non biologiquement significatives du nombre moyen de révertants ont été notées avec l'extrait méthanolique aux 2 doses maximales de 1500 et 5000 µg/boîte pour la souche TA102 en absence et en présence d'activation métabolique, et avec l'extrait hexanique pour la souche TA100 à la plus forte dose de 1000 µg/boîte en absence du S9-mix et à la dose de 300 µg/boîte en présence du S9-mix et pour la souche TA102 aux 3 doses intermédiaires de 30, 100 et 300 µg/boîte.

II.1.4.5 Extraits du rôti de poulet fumé

L'extrait hexanique du rôti de poulet fumé n'a induit aucune augmentation biologiquement et/ou statistiquement significative du nombre moyen de révertants vis-à-vis de l'ensemble des souches de *S. typhimurium* testées, tant en absence qu'en présence d'un système d'activation métabolique. Par ailleurs, l'extrait méthanolique a induit des augmentations statistiquement, mais non biologiquement, significatives du nombre moyen de révertants vis-à-vis de la souche TA100 à la dose maximale de 5000 µg/boîte en présence et en absence du S9-mix et vis-à-vis de la souche TA102 aux 3 doses maximales en présence du S9-mix.

II.1.4.6 Extraits du rôti de bœuf cuit fumé

Comme l'extrait hexanique du rôti de poulet, L'extrait hexanique du rôti de bœuf cuit fumé n'a provoqué aucune augmentation biologiquement et/ou statistiquement significative du nombre moyen de révertants vis-à-vis de l'ensemble des souches de *S. typhimurium* testées, tant en absence qu'en présence d'un système d'activation métabolique. En outre, des augmentations statistiquement, mais non biologiquement, significatives du nombre moyen de révertants ont

été notées avec l'extrait méthanolique vis-à-vis des souches TA100 et TA102 en présence et en absence d'activation métabolique.

II.1.4.7 Extraits du chawarma de poulet

L'extrait méthanolique du chawarma de poulet a induit des augmentations biologiquement et statistiquement significatives du nombre moyen de révertants vis-à-vis de la souche TA100 en présence d'activation métabolique à la plus forte dose de 5000 µg/boîte et vis-à-vis de la souche TA102 aux deux doses maximales en absence d'activation métabolique. De plus, des augmentations statistiquement, mais non biologiquement, significatives du nombre moyen de révertants ont été trouvées aux doses de 50, 1500 et 5000 µg/boîte pour la souche TA100 en absence du S9, à la dose de 500 µg/boîte en absence du S9 et aux deux doses maximales de 1500 et 5000 µg/boîte en présence du S9 pour la souche TA102. Par ailleurs, l'extrait hénanique ne provoque qu'une augmentation statistiquement significative du nombre moyen de révertants aux trois doses maximales de 100, 300 et 1000 µg/boîte vis-à-vis de la souche TA98 en présence d'activation métabolique.

II.1.4.8 Extraits du Jambon de bœuf

Les extraits du Jambon de bœuf, méthanolique et hénanique, ne présentent que des augmentations statistiquement mais non biologiquement significatives du nombre moyen de révertants vis-à-vis de la souche TA102 aux deux doses de 100 et 300 µg/boîte pour l'extrait hénanique et vis-à-vis de la souche TA98 à la plus forte dose de 5000 µg/boîte en absence du S9, de la souche TA100 à la dose de 150 en absence du S9 et à la dose de 5000 µg/boîte en absence et en présence du S9 et de la souche TA102 aux deux plus fortes doses en présence du S9 pour l'extrait méthanolique.

II.2 Test d'Ames modifié « *treat and wash assay* »

Les résultats du test d'Ames modifié pour les extraits présentant un taux d'induction supérieur à 2 dans le test d'Ames standard sont présentés dans le tableau 11.

Aucune augmentation biologiquement significative du nombre moyen de révertants n'a été observée vis-à-vis de l'ensemble des souches testées pour tous les extraits analysés (extraits méthanoliques de corned-beef importé, de saucisson salami de bœuf et de chawarma de poulet ; et l'extrait hénanique du K-chir). En revanche, des augmentations statistiquement mais non biologiquement significatives du nombre moyen de révertants ont été noté vis-à-vis de la souche TA102 (en présence d'activation métabolique) (1) pour l'extrait méthanolique du corned-beef

Tableau 11 : Résultats du test d'Ames modifié pour les extraits présentant une signification biologique dans le test d'Ames standard.

Extraits	Doses µg/boîte	Nombre de révertants (moyenne ± écart-type)				
		TA98		TA100		TA102
		S9 +	S9 -	S9 +	S9 -	S9 +
Corned-beef importé (extrait méthanolique)	0 ^a	31.3 ± 10.7	-	-	-	203.7 ± 46.7
	50	36.0 ± 7.5	-	-	-	172.7 ± 16.8
	150	39.0 ± 1.4	-	-	-	197.3 ± 30.1
	500	33.3 ± 9.5	-	-	-	277.3 ± 8.1
	1500	35.3 ± 5.7	-	-	-	318.7 ± 12.9*
	2500	38.0 ± 6.1	-	-	-	320.7 ± 18.9*
Témoin positif	(c)	990.7 ± 135.3*	-	-	-	628.0 ± 58.9*
Saucisson salami du bœuf (extrait méthanolique)	0 ^a	-	142.0 ± 6.7	-	-	203.7 ± 46.7
	50	-	105.3 ± 23.2	-	-	226.7 ± 27.0
	150	-	144.0 ± 19.7	-	-	261.3 ± 23.4
	500	-	145.0 ± 23.5	-	-	263.3 ± 31.0
	1500	-	131.0 ± 39.6	-	-	310.7 ± 21.4*
	2500	-	122.0 ± 36.4	-	-	283.3 ± 50.0
Témoin positif	(c)	-	2885.3 ± 1257.9*	-	-	628.0 ± 58.9*
Chawarma de poulet (extrait méthanolique)	0 ^a	-	-	114.5 ± 15.6	208.3 ± 23.6	-
	50	-	-	125.3 ± 1.2	226.0 ± 22.5	-
	150	-	-	131.7 ± 1.5	230.0 ± 16.4	-
	500	-	-	146.0 ± 16.1	215.7 ± 43.0	-
	1500	-	-	143.3 ± 9.1	238.7 ± 36.5	-
	2500	-	-	122.3 ± 18.9	209.0 ± 1.0	-
Témoin positif	(c)	-	-	1968.0 ± 180.3*	1050.7 ± 73.9*	-
K-chir (extrait héxanique)	0 ^b	-	-	-	-	192.3 ± 24.3
	10	-	-	-	-	218.7 ± 41.2
	30	-	-	-	-	279.3 ± 14.7*
	100	-	-	-	-	272.7 ± 4.2
	200	-	-	-	-	236.7 ± 46.6
	250	-	-	-	-	283.3 ± 21.4*
Témoin positif	(c)	-	-	-	-	757.3 ± 89.2*

^a DMSO; ^b ethanol; ^c TA98 et TA100 (+ S9): benzo (a) pyrène (15 µg/ml); TA100 (- S9): 4NQO (0.5 µg/ml); TA102 (- S9): Mitomycine C (1 µg/ml); TA102 (+ S9): benzo (a) pyrène (20 µg/ml) ; * Statistiquement significatif (test Dunnett, $p < 0.01$)

importé aux deux plus fortes doses de 1500 et 2500 µg/boîte (2) pour l'extrait méthanolique du saucisson salami de bœuf à la dose de 1500 µg/boîte (3) pour l'extrait hélianique du K-chir aux deux doses de 30 et 250 µg/boîte. En effet, les données mettent en évidence des résultats clairement négatifs dans le test d'Ames modifié. Compte tenu de la nature des échantillons analysés, on peut supposer que les effets biologiquement significatifs observés dans le test d'Ames standard sont probablement dus à la présence d'acide aminé (histidine) dans les extraits (Khandoudi et al., 2009; Thompson et al., 2005).

II.3 Test du micronoyau *in vitro* en microméthode

II.3.1 Critères d'acceptation des résultats

Les nombres moyens de cellules micronucléées observés avec les témoins négatifs sont inclus dans l'intervalle des témoins historiques.

Les résultats obtenus avec les témoins positifs ont été comparables à ceux habituellement observés au laboratoire dans les mêmes conditions expérimentales. Les valeurs obtenues sont incluses dans l'intervalle des témoins historiques. De plus, des augmentations statistiquement significatives du nombre moyen de micronoyaux par rapport au témoin négatif ont bien été observées.

Un nombre suffisant de cellules (2000 cellules) a été analysé pour trois doses de chaque extrait testé.

Pour tous les extraits analysés et dans les trois schémas de traitement, la plus forte dose de l'extrait testé pour évaluer la génotoxicité a montré une survie relative $\geq 55 \pm 5 \%$.

Tous les critères d'acceptation des résultats ont donc été remplis.

II.3.2 Essai de cytotoxicité

L'étude de cytotoxicité par la méthode MTT montre des taux de survie relative supérieurs à $55 \pm 5 \%$ pour tous les extraits de produits carnés analysés, que ce soient les extraits méthanoliques ou hélianiques, avec toutes les doses testées et dans les trois schémas de traitement, comme cela est recommandé dans la ligne directrice de l'OCDE n° 487. Les extraits sont donc non cytotoxiques.

Les tableaux 12 et 13 récapitulent les valeurs obtenues lors du test MTT.

Tableau 12 : Résultats du test MTT pour les extraits méthanoliques des produits de viandes transformées.

Extraits méthanoliques	Doses µg/ml	% de survie relative		
		S9- 3h/+24h	S9- 27h/+0h	S9+ 3h/+24h
Corned-beef fabriqué en Algérie	125	93.7	114.2	96.0
	250	101.4	110.9	95.2
	500	106.2	111.4	96.4
Corned-beef importé	125	96.7	113.4	101.1
	250	94.7	110.2	104.2
	500	99.9	110.7	107.6
Saucisson salami du bœuf	125	97.8	109.9	99.7
	250	96.7	104.3	102.7
	500	99.9	109.9	107.4
K-chir	125	103.6	111.5	108.6
	250	98.0	102.5	113.9
	500	103.1	108.7	110.4
Rôti de poulet fumé	125	107.8	108.3	105.6
	250	101.8	108.3	101.3
	500	105.6	104.2	106.5
Rôti de boeuf cuit fumé	125	101.3	103.2	107.1
	250	94.4	97.8	98.8
	500	103.8	103.9	105.6
Chawarma de poulet	125	101.6	106.7	106.5
	250	97.5	106.2	105.6
	500	105.6	110.9	109.0
Jambon de boeuf	125	103.4	112.2	106.5
	250	94.9	101.5	96.8
	500	103.4	105.8	109.2
Témoin négatif : DMSO	0	100	100	100
Témoin positif : Mitomycine C	0.5	64.9	-	-
Mitomycine C	0.2	-	64.3	-
Griséofulvine	5	-	66.8	-
Cyclophosphamide	5	-	-	91.4

Tableau 13 : Résultats du test MTT pour les extraits hexaniques des produits de viandes transformées.

Extraits hexaniques	Doses µg/ml	% de survie relative		
		S9- 3h/+24h	S9- 27h/+0h	S9+ 3h/+24h
Corned-beef fabriqué en Algérie	25	92.2	95.0	92.8
	50	90.8	96.3	92.2
	100	93.7	97.2	103.4
Corned-beef importé	25	86.0	96.8	98.7
	50	93.5	103.2	104.0
	100	91.8	109.1	108.0
Saucisson salami du bœuf	25	84.5	97.6	102.4
	50	89.8	98.8	104.8
	100	90.2	107.8	110.9
K-chir	25	89.2	89.9	105.0
	50	88.2	91.9	102.4
	100	94.0	94.3	116.3
Rôti de poulet fumé	25	104.1	98.2	94.5
	50	102.4	95.4	99.0
	100	102.7	95.5	97.2
Rôti de bœuf cuit fumé	25	99.5	101.0	103.5
	50	89.0	96.2	100.0
	100	104.5	90.5	105.1
Chawarma de poulet	25	95.7	96.6	102.0
	50	96.1	96.6	103.2
	100	104.3	97.9	99.0
Jambon de bœuf	25	98.9	104.8	103.5
	50	92.0	97.6	85.7
	100	100.3	95.9	102.0
Témoin négatif : DMSO	0	100	100	100
Témoin positif : Mitomycine C	0.5	60.6	-	-
Mitomycine C	0.2	-	64.7	-
Griséofulvine	5	-	67.4	-
Cyclophosphamide	5	-	-	85.5

II.3.3 Essai de génotoxicité

Les résultats obtenus au cours du test des micronoyaux sont présentés dans les figures 33-35. Lors de l'analyse microscopique, des cellules lymphoblastoïdes humaines TK6 avec ou sans micronoyau sont retrouvées comme le montre la figure 36.

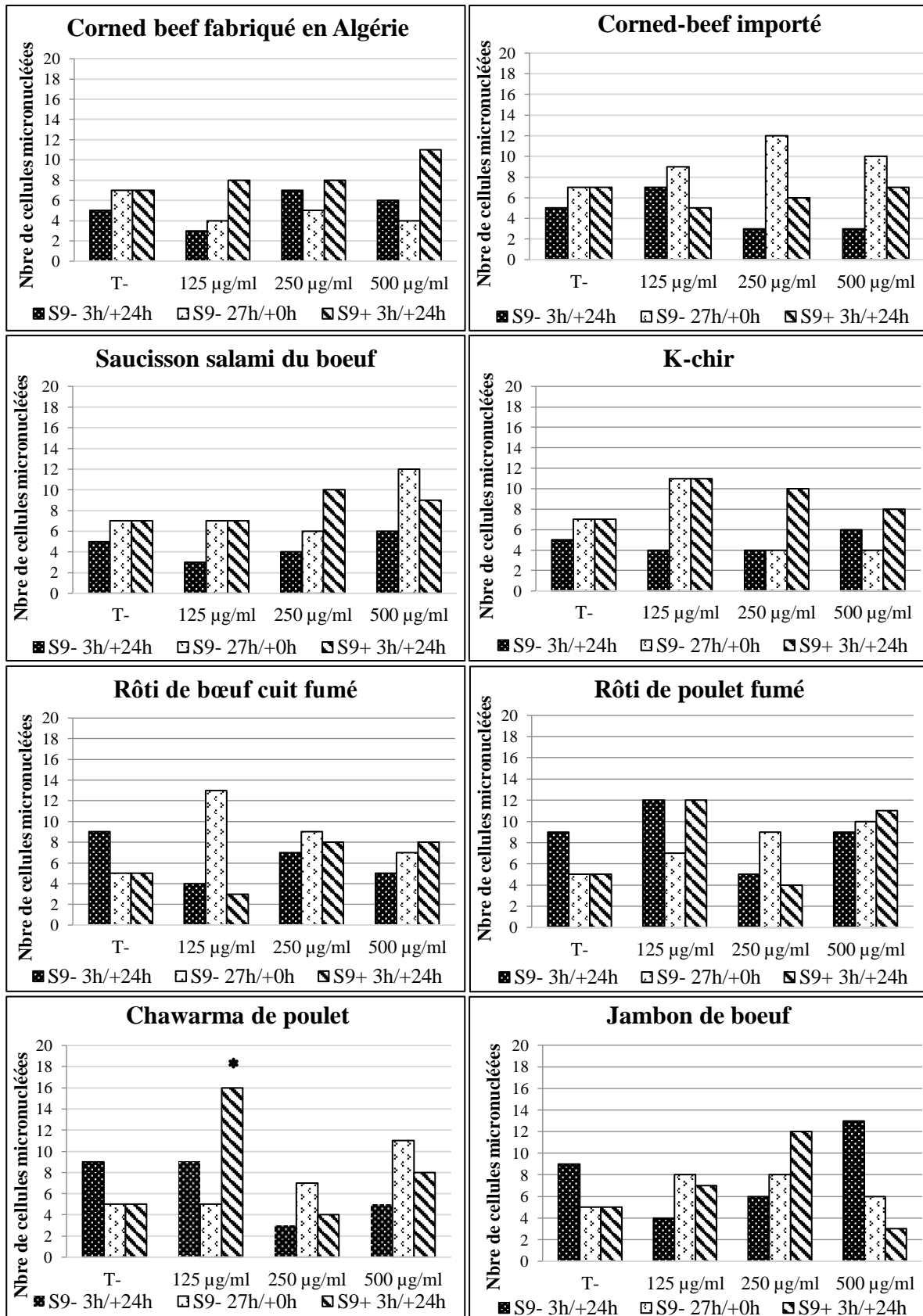


Figure 33 : Résultats du test de micronoyau pour les extraits méthanoliques des produits de viandes transformées. * $p < 0.05$.

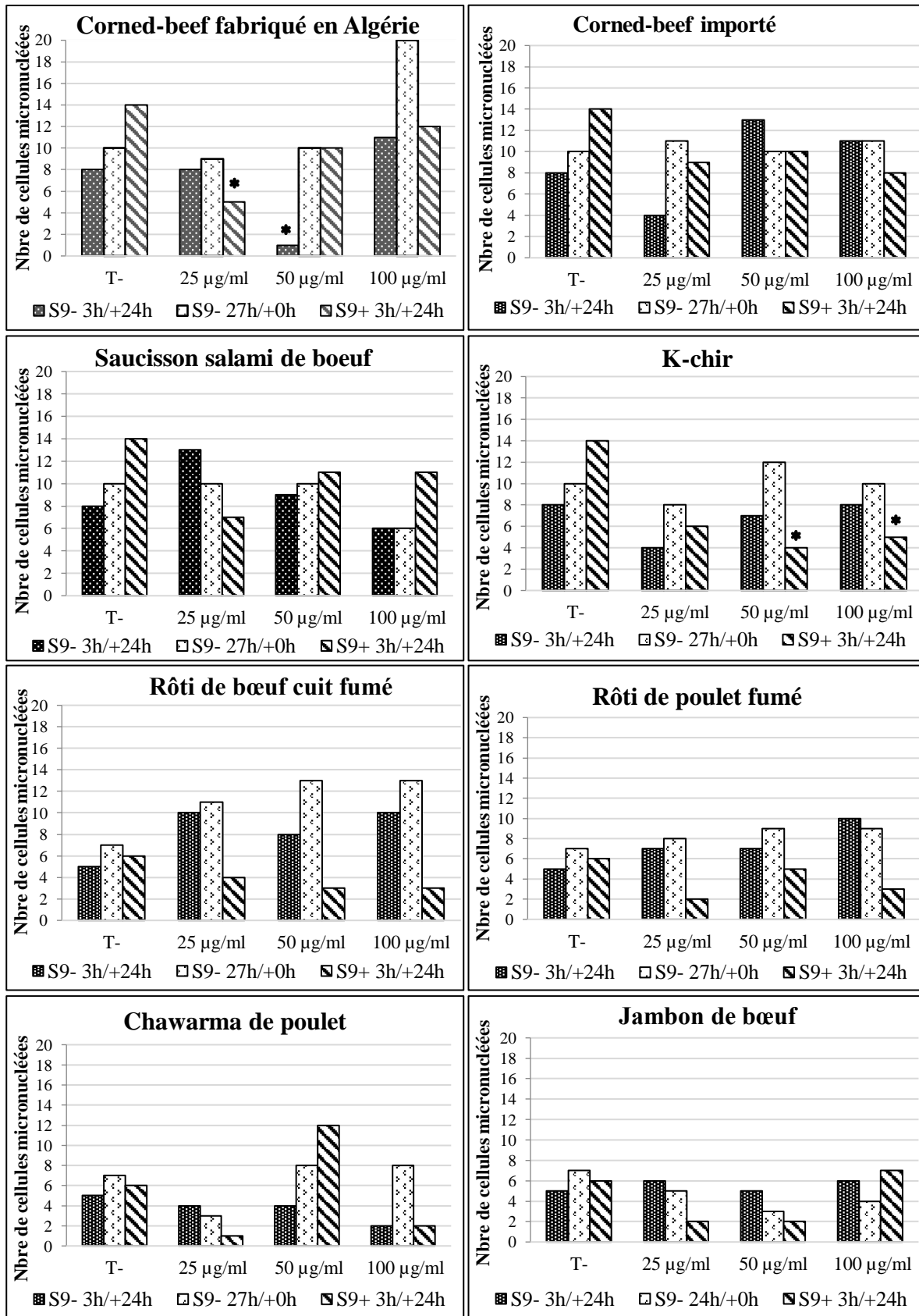


Figure 34 : Résultats du test de micronoyaux pour les extraits hexaniques des produits de viandes transformées. * $p < 0.05$.

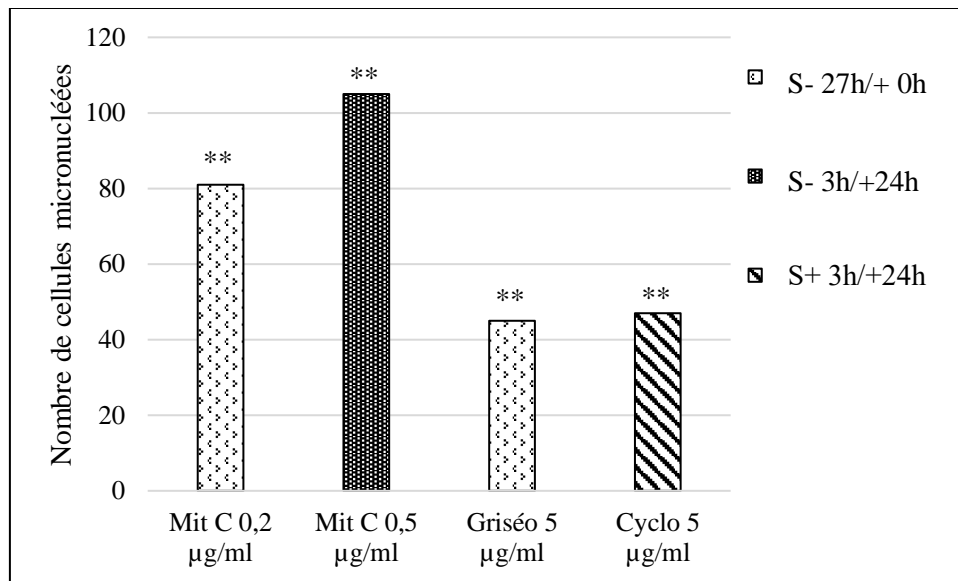


Figure 35 : Résultats du test de micronoyaux pour les témoins positifs. Mit C : Mitomycine C ; Griséo : Griséofulvine ; Cyclo : Cyclophosphamide. $**p < 0,001$

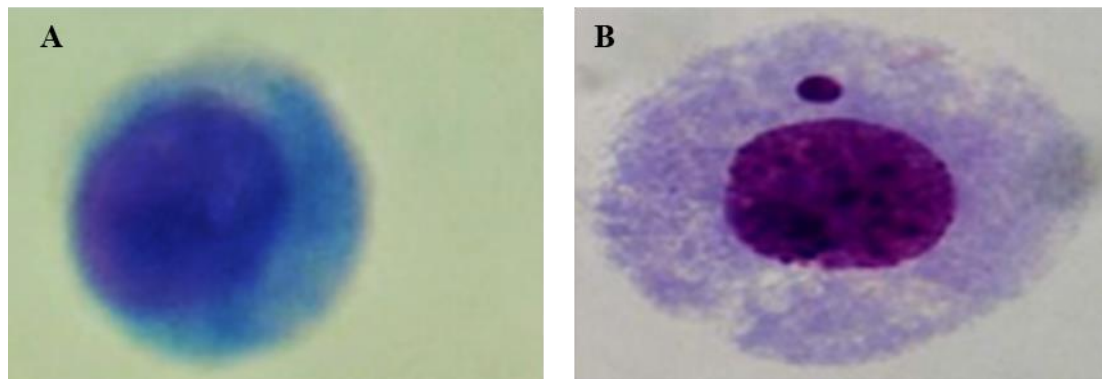


Figure 36 : Cellules lymphoblastoïdes humaines TK6 avec ou sans micronoyau (grossissement X 200). **A)** Absence de micronoyaux dans une cellule mononucléées. **B)** Présence d'un micronoyau.

Tous les extraits méthanoliques des produits de viandes analysés ne provoquent aucune augmentation statistiquement significative du nombre de cellules lymphoblastoïdes humaines TK6 micronucléées, aussi bien en absence d'activation métabolique (suivi ou non d'une période de 24 heures de recouvrement), qu'en présence d'activation métabolique. A l'exception de l'extrait du chawarma de poulet ; l'augmentation du nombre de micronoyaux a été observée dans le traitement de 3 heures en présence d'activation métabolique suivi d'une période de 24 heures de recouvrement (S9 + 3 h / + 24 h) uniquement à la plus faible dose testée de 125 µg/ml avec 16 cellules micronucléées pour 2000 cellules mononucléées vs 5 pour le témoin négatif.

Mais aucune relation dose-effet n'a été observée. Cet extrait est donc considéré comme non génotoxique dans ces conditions de l'essai.

Concernant les extraits héxaniques, aucune augmentation statistiquement significative du nombre de micronoyaux n'a également été observée. En revanche, une augmentation biologiquement mais non statistiquement significative du nombre de cellules micronucléées a été notée seulement avec l'extrait du corned-beef fabriqué en Algérie dans le traitement continu de 27 heures en absence d'activation métabolique sans période de recouvrement (S9- 27 h /+ 0 h) à la plus forte dose de 100 µg/ml avec 20 cellules micronucléées pour 2000 cellules mononucléées. Cette valeur est largement supérieure à la valeur maximale des témoins historiques du laboratoire (*i.e.* 8) (Annexe V) ; on peut donc en conclure qu'il est faiblement génotoxique. De plus, des diminutions statistiquement significatives du nombre de micronoyaux par rapport au témoin négatif ont été retrouvées avec (1) l'extrait du corned-beef fabriqué en Algérie à la plus faible dose de 25 µg/ml dans le traitement de 3 heures en présence d'activation métabolique suivi d'une période de 24 heures de recouvrement avec 5 cellules micronucléées pour 2000 cellules mononucléées *vs* 14 pour le témoin négatif et à la dose de 50 µg/ml dans le traitement de 3 heures en absence d'activation métabolique suivi d'une période de 24 heures de recouvrement avec 1 cellule micronucléée *vs* 8 pour le témoin négatif, et avec (2) l'extrait du K-chir, dans le traitement de 3 heures en présence d'activation métabolique suivi d'une période de 24 heures de recouvrement, aux deux doses maximales de 50 et 100 µg/ml avec respectivement 4 et 5 cellules micronucléées *vs* 14 pour le témoin négatif. Cependant, ces effets n'ont aucune signification en termes de génotoxicité. C'est pourquoi ces deux extraits sont considérés comme non génotoxique.

II.4 Test des comètes

II.4.1 Essai de cytotoxicité

Les résultats de la cytotoxicité, évaluée par la technique au bleu de trypan, sont présentés dans les tableaux 14 et 15. Il est nécessaire d'évaluer la cytotoxicité, lors du test des comètes, afin d'éviter une fausse classification d'un produit chimique comme génotoxique, alors qu'en fait les dommages causés à l'ADN sont secondaires à la cytotoxicité (Azqueta & Collins, 2013; Kirkland et al., 2011).

Tableau 14 : Pourcentages de viabilité des cellules Caco-2 après traitement avec les extraits héxaniques de produits carnés transformés.

Extraits héxaniques	Doses	% Viabilité	
		4 h	24 h
Corned-beef fabriqué en Algérie	0	93,26	82,88
	25 µg/ml	89,32	88,39
	50 µg/ml	89,28	87,18
	100 µg/ml	88,69	78,51
	Témoin positif	100 mM	92,85
Corned-beef importé	0	93,26	82,88
	25 µg/ml	94,06	85,84
	50 µg/ml	98,29	90,38
	100 µg/ml	92,43	57,28
	Témoin positif	100 mM	92,85
Saucisson salami du bœuf	0	92,66	95,89
	25 µg/ml	87,27	91,53
	50 µg/ml	81,48	93,18
	100 µg/ml	80	80
	Témoin positif	100 mM	87,9
K-chir	0	92,66	95,89
	25 µg/ml	89,2	89,43
	50 µg/ml	79,36	84,82
	100 µg/ml	72,95	79,85
	Témoin positif	100 mM	87,9
Rôti de poulet fumé	0	81,37	78,88
	25 µg/ml	89,15	86,02
	50 µg/ml	73	83,76
	100 µg/ml	72,22	70,58
	Témoin positif	100 mM	84,21
Rôti de bœuf cuit fumé	0	81,37	78,88
	25 µg/ml	80	93,51
	50 µg/ml	76,92	83,51
	100 µg/ml	85,91	81,45
	Témoin positif	100 mM	84,21
Chawarma de poulet	0	81,37	78,88
	25 µg/ml	81,31	69,6
	50 µg/ml	84,48	86,32
	100 µg/ml	66,43	78,46
	Témoin positif	100 mM	84,21
Jambon de bœuf	0	82,35	82,88
	25 µg/ml	83,05	90,59
	50 µg/ml	89,81	82,75
	100 µg/ml	83,05	82,5
	Témoin positif	100 mM	89,81

Aucune cytotoxicité n'a été noté pour les extraits héxaniques de corned-beef fabriqué en Algérie, de saucisson salami du bœuf, de K-chir, de rôti de poulet fumé, de rôti de bœuf cuit fumé et de Jambon de bœuf, aussi bien dans le traitement court de 4 heures que dans le traitement long de 24 heures. En effet, le pourcentage de viabilité est supérieur à 70% à toutes les doses testées. Nos résultats sont cohérents avec ceux recommandés par **Tice et al., 2000**. En revanche, une cytotoxicité légère a été observée pour l'extrait de chawarma de poulet (1) à la dose de 25 µg/ml dans le traitement de 24 heures, avec un pourcentage de viabilité de 69,6% et (2) à la dose de 100 µg/ml dans le traitement de 4 h, avec un pourcentage de viabilité de 66,43%. De plus, une cytotoxicité modérée a également été notée pour l'extrait de corned-beef importé à la plus forte dose testée de 100 µg/ml dans le traitement de 24 heures, avec un pourcentage de viabilité de 57,28%.

Tableau 15 : Pourcentages de viabilité des cellules Caco-2 après traitement avec les extraits méthanoliques de produits carnés transformés.

Extraits méthanoliques	Doses	% Viabilité	
		4 h	24 h
Saucisson salami de bœuf	0	86,4	97,6
	125 µg/ml	80	77,8
	250 µg/ml	59,5	85,7
	500 µg/ml	21,7	93,1
	Témoin positif	200 mM	88
Rôti de poulet fumé	0	93,18	89,6
	125 µg/ml	91,8	86
	250 µg/ml	90,2	78
	500 µg/ml	94,3	70,5
	Témoin positif	200 mM	87,5
Rôti de bœuf cuit fumé	0	86,4	97,6
	125 µg/ml	88,5	91,3
	250 µg/ml	100	95,3
	500 µg/ml	87,5	79,2
	Témoin positif	200 µg/ml	88
Chawarma de poulet	0	93,18	89,6
	125 µg/ml	98,7	81,8
	250 µg/ml	96,5	94,8
	500 µg/ml	83,6	77,4
	Témoin positif	200 mM	87,5
Jambon de bœuf	0	86,4	97,6
	125 µg/ml	100	94,6
	250 µg/ml	98	90,3
	500 µg/ml	85,4	86
	Témoin positif	200 mM	88

Aucune cytotoxicité n'a été également observée avec les extraits méthanoliques de rôti de poulet fumé, de rôti de bœuf cuit fumé, de chawarma de poulet et de Jambon de bœuf, tant dans le traitement de 4 heures que dans le traitement de 24 heures, avec des pourcentages de viabilité cellulaire supérieur à 70% avec toutes les doses testées. Par ailleurs, une cytotoxicité a été observée pour l'extrait de saucisson salami de bœuf, uniquement dans le traitement court de 4 heures mais pas dans le traitement long de 24 heures, aux deux plus fortes doses de 250 et 500 µg/ml, avec des pourcentages de viabilité de 59,5 et 21,7 %, respectivement.

II.4.2 Essai de génotoxicité

Les cellules intestinales humaines Caco-2 ont été exposées aux différentes doses des extraits hexaniques (25, 50 et 100 µg/ml) et des extraits méthanoliques (125, 250 et 500 µg/ml) pendant 4 heures et 24 heures. Lors de l'analyse microscopique, des cellules Caco-2 avec différents degrés de dommages d'ADN ont été retrouvées comme le montre la figure 37.

L'ensemble des résultats, exprimés par le pourcentage moyen d'ADN dans la queue de la comète, relatifs au test des comètes réalisé en conditions alcalines (pH>13) sur les cellules Caco-2 est présenté dans les figures 38-45. Les valeurs exactes des pourcentages sont présentées dans les Annexes VI et VII. L'astérisque (*) indique une augmentation statistiquement significative des dommages à l'ADN en comparaison au témoin négatif avec une valeur de $p < 0.05$ (ANOVA).

La dose de contrôle positif (H_2O_2) utilisée dans les premiers essais est de 100 mM. Cependant, le pourcentage d'ADN dans la queue des comètes, avec cette dose, n'ayant pas été jugé suffisamment élevé par rapport au témoin négatif (n'est pas statistiquement significatif) avec certains extraits *e.i.* extrait hexanique de Jambon de bœuf et de corned-beef fabriqué en Algérie et importé dans le traitement de 4 heures, extrait hexanique du K-chir dans le traitement de 4 heures et de 24 heures, extrait hexanique de rôti de bœuf cuit fumé et de chawarma de poulet dans le traitement long de 24 heures. En conséquence, nous avons augmenté la dose du contrôle positif (H_2O_2) de 100 mM à 200 mM pour le reste des essais. A signaler que la dose à 200 mM a donné une fragmentation de l'ADN nette et reproductible tout au long des essais.

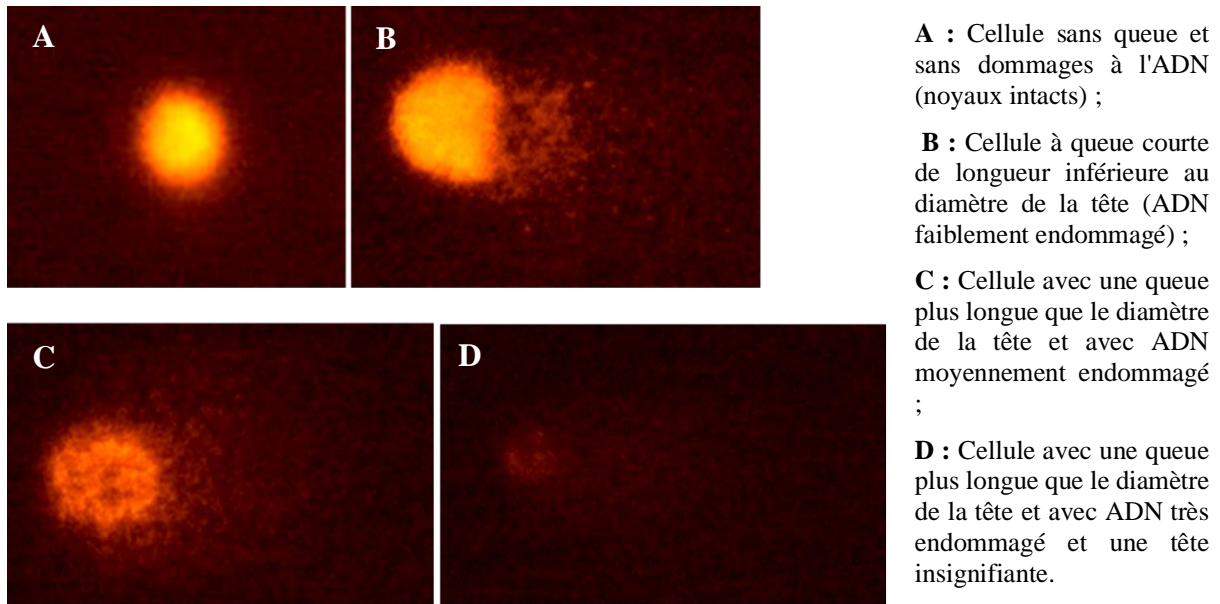


Figure 37 : Images de cellules Caco-2 traitées en utilisant le test des comètes visualisées au microscope à fluorescence (grossissement X 200).

II.4.2.1 Extrait héxanique du corned-beef fabriqué en Algérie

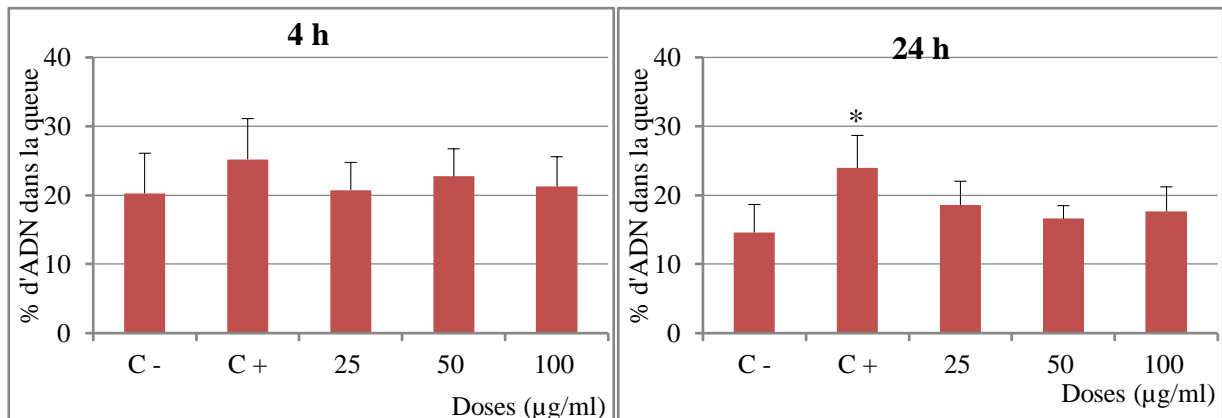


Figure 38 : Dommages à l'ADN des cellules Caco-2 exposés pendant 4 et 24 heures à l'extrait héxanique du corned-beef fabriqué en Algérie.

Des résultats clairement négatifs ont été obtenus avec l'extrait héxanique du corned-beef fabriqué en Algérie. En effet, il n'a entraîné aucune augmentation statistiquement significative des lésions de l'ADN ($p > 0.05$) quelle que soit la dose testée, aussi bien après un temps court qu'après un temps long de traitement.

II.4.2.2 Extrait héxanique du corned-beef importé

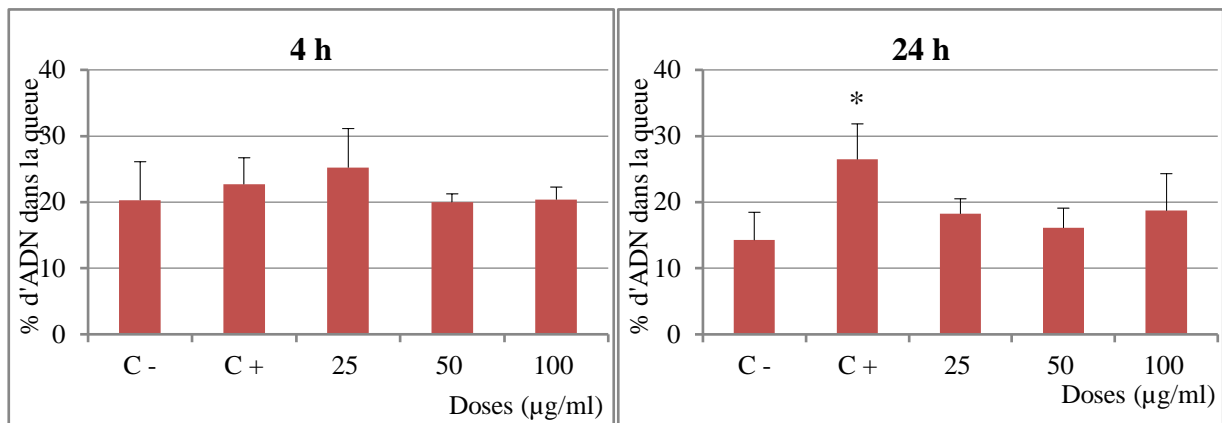


Figure 39 : Dommages à l'ADN des cellules Caco-2 exposés pendant 4 et 24 heures à l'extrait héxanique du corned-beef importé.

Des résultats clairement négatifs ont été également obtenus avec l'extrait héxanique du corned-beef importé, quel que soit le temps de traitement et quelle que soit la dose testée.

II.4.2.3 Extraits du saucisson salami de bœuf

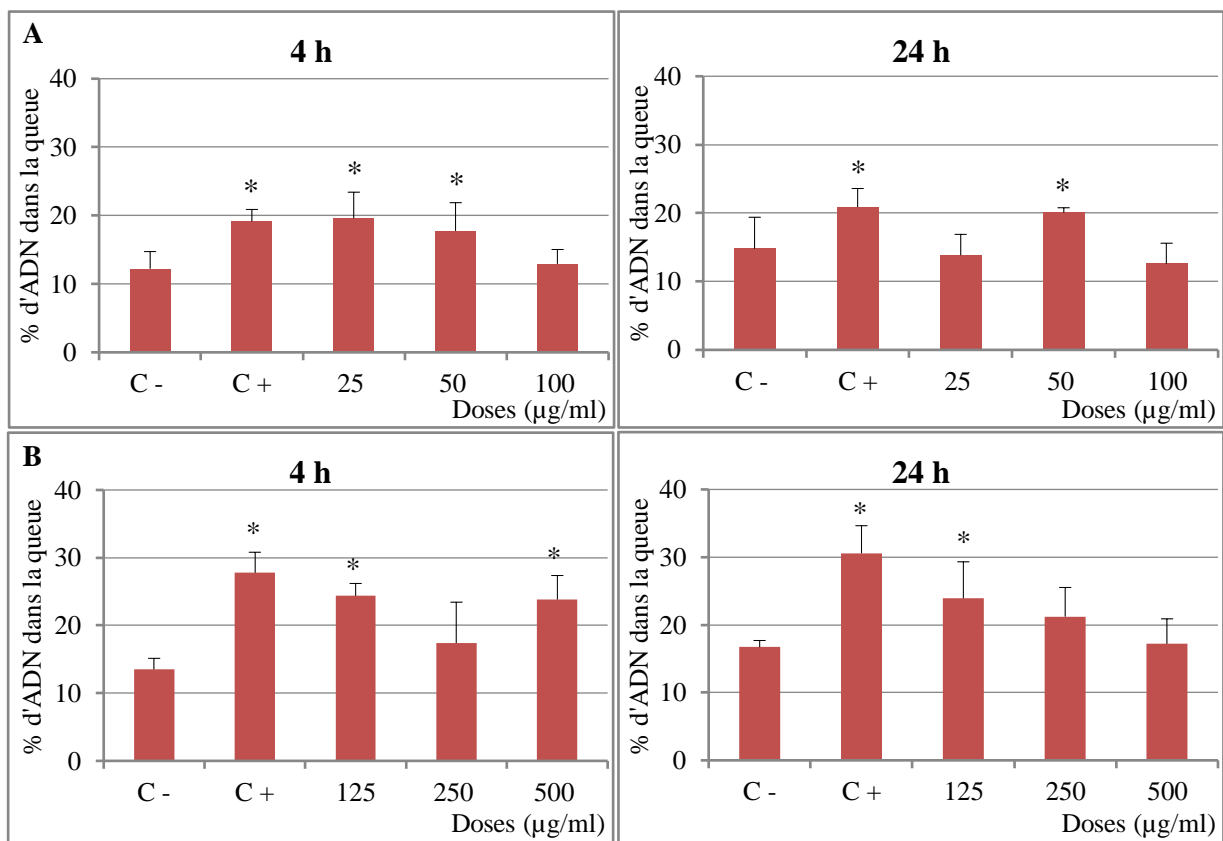


Figure 40 : Dommages à l'ADN des cellules Caco-2 exposés pendant 4 et 24 heures aux extraits du saucisson salami de bœuf. A) extrait héxanique, B) extrait méthanolique.

L'extrait héxanique du saucisson salami de bœuf a entraîné, après 4 heures de traitement, une augmentation statistiquement significative de la fragmentation de l'ADN aux deux plus faibles doses de 25 et 50 µg/ml avec des pourcentages d'ADN dans la queue respectivement de 19,60 et 17,74 vs 12,21 pour le témoin négatif. Et comme ces deux doses présentent une viabilité cellulaire supérieure à 70% (donc non cytotoxique), l'effet observé est donc dû à la génotoxicité mais non pas à la cytotoxicité. Cependant, aucune augmentation statistiquement significative n'a été observée à la plus forte dose de 100 µg/ml. Il est possible qu'à cette dose, les cellules soient fortement endommagées et sont entrées en apoptose et que l'ADN fragmenté ait disparu du gel, ne laissant que des cellules relativement intactes. Cela se traduirait donc par une réduction drastique du nombre de comètes détectées lors de la lecture (**Lorenzo et al., 2013**). De plus, après 24 heures de traitement, l'extrait produit un effet positif statistiquement significatif uniquement à la dose de 50 µg/ml avec un pourcentage d'ADN dans la queue de la comète de 20,04 vs 14,78 pour le témoin négatif. En revanche, une diminution de la fragmentation de l'ADN a été observée à la dose de 25 µg/ml. Ceci suggère que la dose de 25 µg/ml induit des dommages faibles à l'ADN qui sont facilement réparables par les mécanismes cellulaires de réparation, alors que la dose de 50 µg/ml induit des grands dommages à l'ADN qui sont difficiles à être réparer et donc l'effet persiste (**Sekihashi et al., 2003**). Ainsi, l'extrait héxanique est considéré comme génotoxique dans les conditions de l'essai de comète.

Par ailleurs, dans le cas de l'extrait méthanolique, on prend en considération que le résultat obtenu avec la dose de 125 µg/ml, car les autres doses de 250 et 500 µg/ml sont cytotoxiques dans le traitement de 4 heures. Il est important de faire d'autres essais pour confirmer les résultats. L'extrait a induit une augmentation statistiquement significative dans le traitement de 4 heures et de 24 heures, avec des pourcentages d'ADN dans la queue de la comète de 24,36 et 23,93, vs 13,52 et 16,72 pour le témoin négatif, respectivement aux deux temps de traitement.

II.4.2.4 Extrait héxanique du K-chir

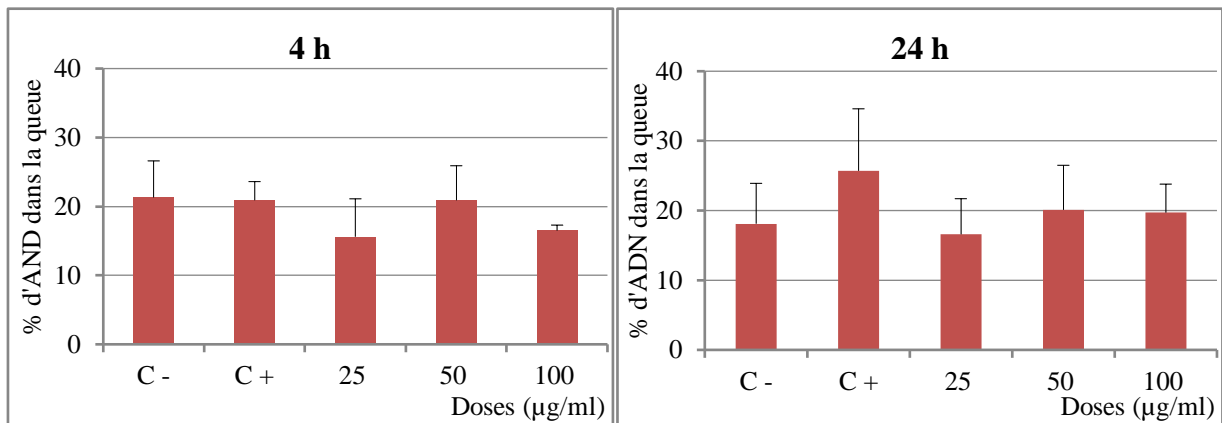


Figure 41 : Dommages à l'ADN des cellules Caco-2 exposés pendant 4 et 24 heures à l'extrait héxanique du K-chir.

Aucune augmentation statistiquement significative des lésions de l'ADN n'a été observée quelle que soit la dose testée et quel que soit le temps de traitement.

II.4.2.5 Extraits de rôti de poulet fumé

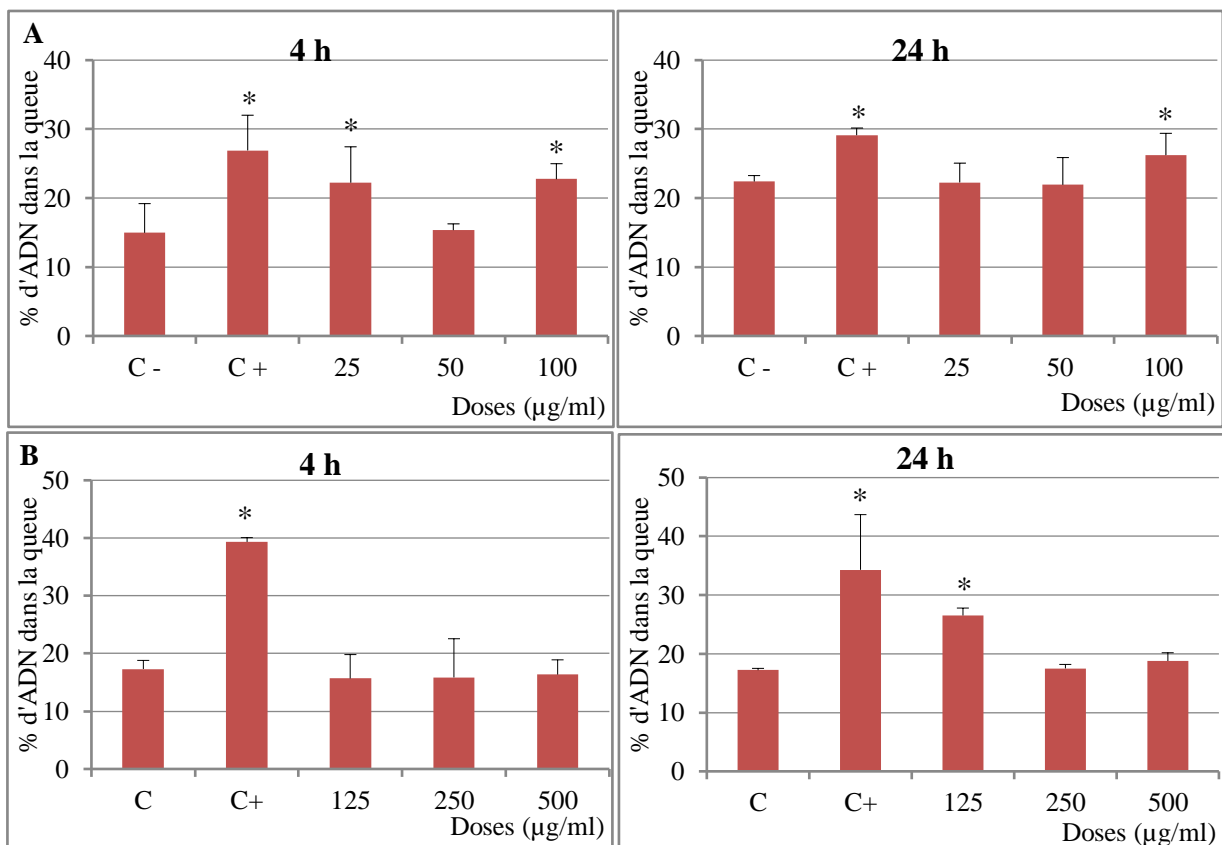
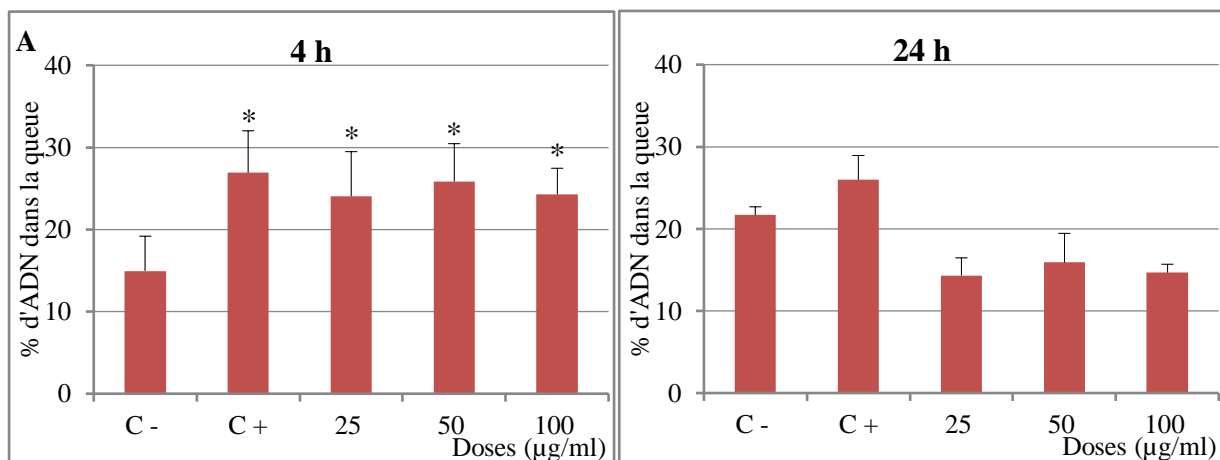


Figure 42 : Dommages à l'ADN des cellules Caco-2 exposés pendant 4 et 24 heures aux extraits du rôti de poulet. A) extrait héxanique, B) extrait méthanolique.

Dans le cas de l'extrait héxanique de rôti de poulet fumé et dans le traitement court de 4 heures, des augmentations statistiquement significatives ont été observées uniquement aux doses de 25 et 100 µg/ml, avec respectivement des pourcentages d'ADN dans la queue de 22,23 et 22,75 vs 14,95 pour le témoin négatif, mais pas à la dose intermédiaire de 50 µg/ml. Ceci est difficile à être interpréter. Afin de valider ce résultat, un second essai est nécessaire. Par ailleurs, après un traitement long de 24 heures, l'effet génotoxique observé dans le traitement court à la plus faible dose de 25 µg/ml a disparu. Alors que l'effet est persisté à la plus forte dose de 100 µg/ml avec un pourcentage de 26,24 vs 22,41 pour le témoin négatif. Ceci suggère que les cellules intestinales seraient capables de réparer les dommages causés par la plus faible dose de 25µg/ml, mais pas ceux causés par la plus forte dose de 100 µg/ml à cause du taux élevé de dommages provoquées par cette dernière dose.

Dans le cas de l'extrait méthanolique de rôti de poulet fumé, aucune augmentation statistiquement significative n'a été observée dans le traitement court de 4 heures quelle que soit la dose testée. Alors que, après 24 heures de traitement, une augmentation statistiquement significative de la fragmentation de l'ADN a été notée uniquement à la plus faible dose de 125 µg/ml, avec un pourcentage d'ADN dans la queue de 26,52 vs 17,22 pour le témoin négatif. Cela pourrait être expliqué par le fait que l'extrait ne peut exercer son effet qu'après un traitement long. L'absence d'effet aux deux fortes doses de 250 et 500 µg/ml peut expliquer par le fait que l'extrait induit à ces deux doses des taux élevés de dommages à l'ADN. Ces cellules fortement endommagées soient entrées en apoptose et l'ADN fragmenté a disparu du gel, ne laissant que des cellules relativement intactes. Cela se traduirait donc par une réduction drastique du nombre de comètes détectées lors de la lecture.

II.4.2.6 Extraits du rôti de bœuf cuit fumé



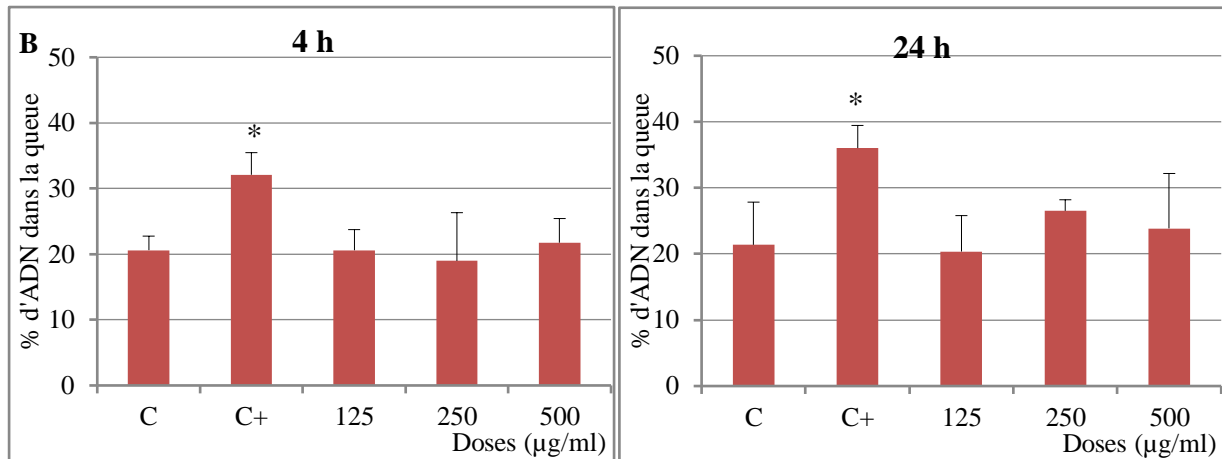


Figure 43 : Dommages à l'ADN des cellules Caco-2 exposés pendant 4 et 24 heures aux extraits du rôti de bœuf cuit fumé. A) extrait hexanique, B) extrait méthanolique.

Dans le cas de l'extrait hexanique du rôti de bœuf cuit fumé et dans le traitement court de 4 heures, l'extrait a induit des augmentations statistiquement significatives des pourcentages d'ADN dans la queue de la comète par rapport au témoin négatif. Ces effets significatifs ont été observés sur l'ensemble de la gamme de concentrations testées 25, 50 et 100 $\mu\text{g/ml}$, avec respectivement des pourcentages de 24,06, 25,87 et 24,31 vs 14,95 pour le témoin négatif. Cependant, dans le traitement long de 24 heures, aucune dose n'a entraîné une différence statistiquement significative par rapport au témoin négatif. L'augmentation statistiquement significative de la fragmentation de l'ADN uniquement dans le traitement court de 4 heures mais pas dans le traitement de 24 heures pourrait être expliqué par le fait que cet extrait agisse via la formation de radicaux libres qui sont libérés à des temps plus courts mais disparaissent après des expositions plus longues au cours desquelles des mécanismes de réparation de l'ADN ont également lieu.

Concernant l'extrait méthanolique du rôti de bœuf cuit fumé, des résultats clairement négatifs ont été obtenus. En effet, il n'a entraîné aucune augmentation statistiquement significative des lésions de l'ADN quelle que soit la dose testée, aussi bien après un temps court qu'après un temps long de traitement.

II.4.2.7 Extraits du chawarma de poulet

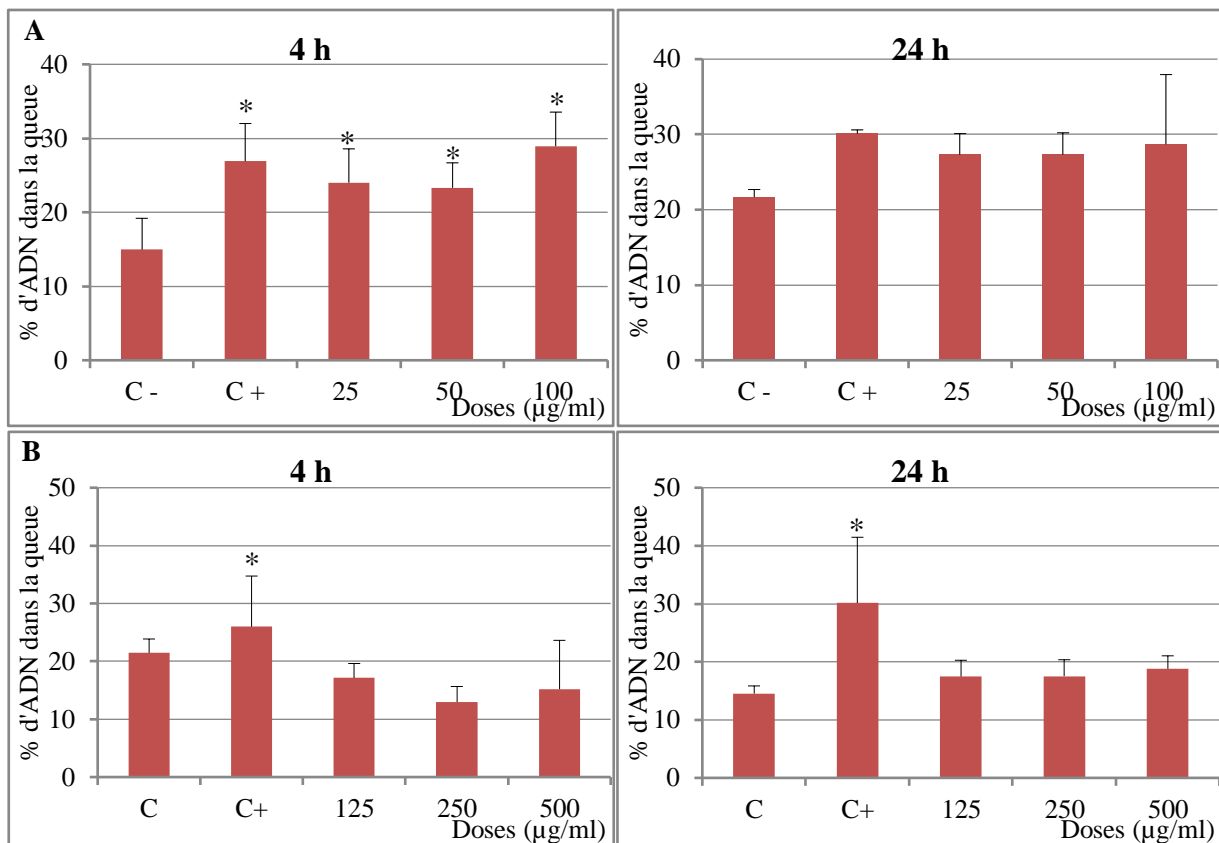


Figure 44 : Dommages à l'ADN des cellules Caco-2 exposés pendant 4 et 24 heures aux extraits du chawarma de poulet. A) extrait hexanique, B) extrait méthanolique.

Dans le cas de l'extrait hexanique de chawarma de poulet, des augmentations statistiquement significatives de la fragmentation de l'ADN ont été observées aux trois doses testées de 25, 50 et 100 µg/ml, avec des pourcentages d'ADN dans la queue respectivement de 24,01, 23,30 et 28,94 vs 14,95 pour le témoin négatif. À la dose de 100 µg/ml, bien qu'acceptable, nous pouvons remarquer que la viabilité cellulaire est moins bonne (elle est de 66,43%). En conclusion, nous pouvons noter une différence de résultats entre le temps court et le temps long. Cependant, un temps de 4 heures de traitement est déjà suffisant pour permettre à l'extrait d'exercer sa génotoxicité et que les cellules intestinales Caco-2 sont capables de réparer les dommages d'ADN après 24 heures de traitement par les mécanismes cellulaires de réparation.

Concernant l'extrait méthanolique de chawarma de poulet, aucune augmentation significative des lésions de l'ADN n'a été observée quelle que soit la dose testée et quel que soit le temps de traitement.

II.4.2.8 Extraits du Jambon de bœuf

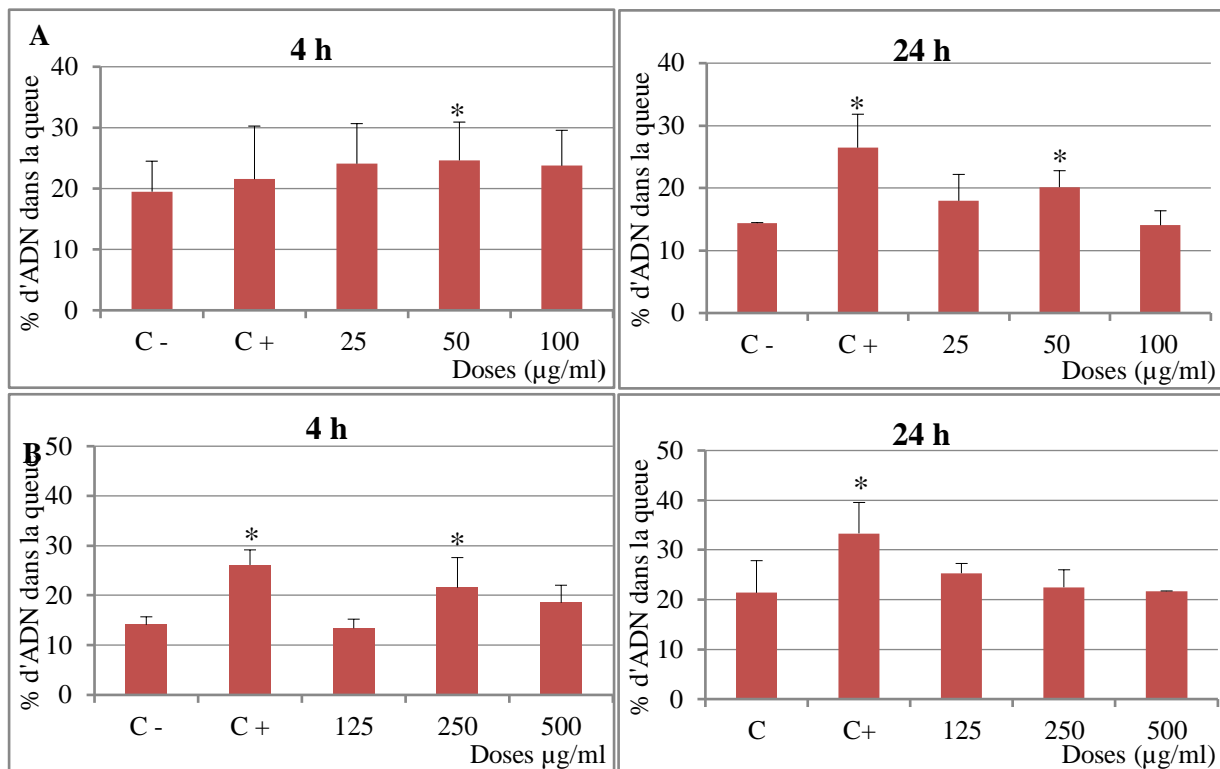


Figure 45 : Dommages à l'ADN des cellules Caco-2 exposés pendant 4 et 24 heures aux extraits du Jambon de bœuf. A) extrait héxanique, B) extrait méthanolique.

Dans le cas de l'extrait héxanique de Jambon de bœuf, des lésions de l'ADN statistiquement significatives ont été induites uniquement à la dose intermédiaire de 50 µg/ml aux deux temps de traitement ; (1) dans le traitement de 4 heures, le pourcentage d'ADN dans la queue de la comète est de 24,63 vs 19,48 pour le témoin négatif, (2) dans le traitement de 24 heures, le pourcentage d'ADN dans la queue est de 20,17 vs 14,4 pour le témoin négatif. La diminution de pourcentage de la fragmentation d'ADN à la plus forte dose 100 µg/ml peut être expliquée par l'effet génotoxique qui était plus fort et qui peut entraîner des taux élevés de dommages d'ADN. L'ADN fragmenté a disparu du gel, ne laissant que des cellules relativement intactes. Cela se traduirait donc par une réduction drastique du nombre de comètes détectées lors de la lecture.

Concernant l'extrait méthanolique de Jambon de bœuf, une augmentation statistiquement significative de la fragmentation de l'ADN a été notée à la dose intermédiaire de 250 µg/ml dans le traitement court avec un pourcentage d'ADN dans la queue de 21,57 vs 14,08 pour le témoin négatif. Cet effet a disparu après un long temps de traitement. Ceci montre que les cellules intestinales sont capables de réparer les dommages avec le temps par les mécanismes cellulaires de réparation.

Discussion générale

La consommation des viandes et, en particulier, les viandes transformées, est liée à l'incidence du cancer colorectal depuis 1975 dans plusieurs études épidémiologiques (**Demeyer et al., 2008**). **Gonzalez & Riboli (2006)** ont rapporté que le risque de cancer colorectal peut augmenter jusqu'à 12 à 17 % lorsque les gens consomment 100 g de viande rouge par jour. Alors que, pour les viandes transformées, ce chiffre atteint 49 % lorsque la consommation quotidienne est de 25 g. Une recherche épidémiologique à grande échelle, impliquant 500 000 personnes, aux États-Unis a révélé que le rapport de risque d'incidence du cancer colorectal est de 1,20 ($p < 0,001$) lorsque l'apport est de 63 g de viande rouge ou de 23 g de viande transformée (**Cross et al., 2007**). Trois méta-analyses ont également montré que la consommation de viandes transformées est associée au risque de cancer colorectal (**Larsson & Wolk, 2006; Norat et al., 2002; Sandhu et al., 2001**). **Santarelli et al. (2008)** ont estimé, à partir de ces méta-analyses, que 1 g de viande transformée augmente le risque de cancer colorectal 2, 6, ou 11 fois plus que 1 g de viande rouge fraîche, respectivement, pour les trois méta-analyses. Une autre méta-analyse de 200 études publiées en 2015 confirme la corrélation entre la consommation de viande transformée (supérieure à 50 g par jour) et de viande rouge (500 g par semaine) et le cancer colorectal. De plus, des associations positives ont été retrouvées entre la consommation de viande transformée et un risque accru de cancer de l'estomac (**Larsson et al., 2006**), du pancréas (**Larsson & Wolk, 2012**), de l'œsophage et de la vessie (**Lippi et al., 2016**). Une autre grande étude a estimé que la consommation de plus de 20 g de viande transformée par jour augmentait le taux de mortalité (**Rohrmann et al., 2013**). Bien que les études épidémiologiques des viandes transformées soient importantes pour l'évaluation du risque toxicologique pour l'homme, ces études ne peuvent pas évaluer avec précision l'exposition. Ainsi, l'évaluation des risques dépend largement des études expérimentales menées en laboratoire.

Les études d'alimentation chronique menées sur les rongeurs pour évaluer l'effet cancérigène de la consommation des viandes transformées sont limitées (**Santarelli et al., 2010**). Cependant, ce type d'études prend beaucoup de temps et coûteux. Par conséquent, des tests plus simples, rapides et moins coûteux, tels que les tests de mutagénicité et de génotoxicité, peuvent être envisagés (**Grobstein et al., 1982**).

Dans la présente étude on s'est intéressé aux viandes transformées industriellement. Malgré la grande consommation de ce type de viande dans le monde, il existe très peu de données sur leur effets génotoxiques.

En Algérie, les produits carnés transformés industriellement sont largement consommés, notamment en raison de leur disponibilité en différentes saveurs et de leur faible coût par rapport aux viandes fraîches (**Chikhi & Bencharif, 2016**). Ainsi, il est très important de s'assurer qu'en plus de leur sécurité microbiologique, ces produits vendus dans les marchés populaires ne contiennent pas de substances susceptibles de présenter un risque toxicologique pour la santé des consommateurs. À cet égard, le risque potentiel concevable est la présence de composés génotoxiques : (1) ajoutés délibérément tels que les additifs alimentaires, et/ou (2) résultant de la transformation des viandes, par des méthodes physiques ou chimiques, tels que HAPs, AHAs et les NAs (**ANSES, 2015; Omoruyi & Pohjanvirta, 2014**). Des études de criblage sont donc nécessaires pour vérifier que les procédés utilisés par l'industrie des produits carnés sont appropriés de ce point de vue. La présente étude a été réalisée pour déterminer le potentiel mutagène et génotoxique des produits carnés transformés industriellement. Pour ce faire, le test d'Ames, le test du micronoyau *in vitro* et le test des comètes *in vitro* ont été réalisés pour avoir une idée globale sur les effets de ces produits. Fait intéressant, cette combinaison de tests complémentaires permet de couvrir des événements génétiques pouvant conduire à une génotoxicité, qui sont des mutations géniques, des aberrations chromosomiques (structurelles et numériques) et des cassures de brins d'ADN. La stratégie qui combine le test d'Ames avec le test du micronoyau est recommandée par l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments pour l'évaluation *in vitro* de la génotoxicité des aliments (**EFSA, 2011**). De plus, cette approche a été complétée par le test de comète *in vitro* afin d'évaluer les lésions pré-mutagènes potentielles.

En ce qui concerne le test d'Ames, les résultats montrent que la majorité des extraits de viandes transformées analysés sont non mutagènes avec l'ensemble des souches de *S. typhimurium* testées (TA1537, TA98, TA100 et TA102), tant en absence qu'en présence du système d'activation métabolique. Les rares augmentations biologiquement significatives du nombre moyen de révertants obtenues avec certains extraits (les extraits méthanoliques de corned-beef importé, de salami et de chawarma de poulet ainsi que l'extrait hexanique de K-chir) ne sont pas réellement pertinentes en termes de mutagénicité, car ces extraits peuvent contenir des acides aminés tels que l'histidine qui peuvent provoquer au cours du test d'Ames

standard une croissance supplémentaire de *S. typhimurium* sur les boîtes de Pétri contenant le milieu minimum et entraîner des mutations spontanées supplémentaires et/ou une prolifération de la pousse de fond de bactéries non révertantes qui obscurcissent les colonies révertantes (Thompson et al., 2005). De faibles quantités d'acide aminé histidine peuvent entraîner une augmentation modérée du nombre de colonies révertantes, tandis que des quantités plus élevées provoquent une prolifération importante de la pousse bactérienne de fond, rendant impossible le comptage de colonies révertantes (Thompson et al., 2005), cela pourrait expliquer ce que l'on observe à la plus forte dose de 5000 µg/ boîte avec l'extrait méthanolique du corned-beef fabriqué en Algérie (TA1537, TA98 et TA102) et avec l'extrait méthanolique du saucisson salami de bœuf (TA102). Ainsi, afin de pouvoir conclure quant au potentiel mutagène des extraits présentant une augmentation biologiquement et statistiquement significative du nombre moyen de révertants, un essai complémentaire, test d'Ames modifié « *treat and wash assay* » a été réalisé. Ce test a le même principe que celui du test d'Ames standard, sauf qu'une étape supplémentaire a été ajoutée *i.e.* le lavage des bactéries pour éliminer le produit à tester, y compris les acides aminés, après une exposition de 90 minutes avant l'étalement sur boîtes de Pétri contenant le milieu minimum. Les résultats obtenus avec ce test montrent que les extraits analysés sont non mutagènes. Par conséquent, leurs premiers résultats positifs étaient probablement dus à la présence d'acides aminés notamment l'histidine dans les extraits qui ont conduit à des résultats faussement positifs. Il est intéressant de noter que les extraits qui montrent une signification statistique, on ne peut pas les considérer comme mutagène, car selon l'OCDE la signification statistique ne doit pas être le seul facteur de décision (OCDE n°471, 1997). Cette méthode est particulièrement recommandée au cas où l'on observe une diminution d'une façon marquée du nombre de mutants à une ou aux deux plus fortes doses étudiées.

Dans notre étude, les résultats négatifs obtenus avec le rôti de bœuf cuit fumé et le rôti de poulet fumé dans le test Ames (en présence du système d'activation métabolique) peuvent être considérés comme inattendus. En effet, il est bien établi que les HAPs et les AHAs sont les principaux mutagènes formés lors du fumage et du rôtissage des viandes (Jägerstad & Skog, 2005). L'explication possible de ces résultats réside dans les méthodes de traitement des viandes utilisées par l'industrie, comme la cuisson à des températures basses pendant de courtes périodes de temps qui peut diminuer ou empêcher la formation de mutagènes (Knize et al., 1994). De plus, dans le cas du rôti de poulet fumé qui contient le nitrite dans ses ingrédients, le résultat négatif obtenu pourrait être également expliqué par l'interaction des AHAs avec les nitrites

résultant en la diminution de l'activité mutagène. **Yoshida & Matsumoto (1978)** ont signalé que lorsque l'extrait mutagène de viande de poulet rôti, le condensat de fumée de tabac et certaines AHAs étaient traités avec du nitrite dans des conditions acides, il y avait une diminution de l'activité mutagène de ces substances lorsque tester sur *S. typhimurium*. De même, **Tsuda et al. (1980)** ont découvert qu'un traitement acide avec une solution de nitrite de sodium entraînait la perte de l'activité mutagène des amines hétérocycliques Trp-P-1, Trp-P-2 et Glu-P-1.

La mutagénicité des viandes transformées industriellement a été étudiée pour la première fois par **Krone et Iwaoka (1984)** en utilisant le test d'Ames, en absence et en présence du système d'activation métabolique, avec deux souches de *S. typhimurium* (TA1538 et TA100). Ils ont trouvé une activité mutagène vis-à-vis de la souche TA1538, en présence de S9, avec les extraits de corned-beef et de rôti de bœuf en conserve, et ils ont conclu que ce type d'aliment peut présenter un risque important et cumulatif pour la santé humaine en raison de sa large consommation au cours du temps. Mais il convient de noter que Krone et Iwaoka n'ont pas envisagé la présence d'histidine dans les extraits de produits alimentaires analysés, ce qui pourrait être conduire à des résultats faussement positifs. Une autre étude a été réalisée par **Omoruyi et Pohjanvirta (2014)** sur la mutagénicité des aliments transformés industriellement, y compris les viandes transformées, en utilisant le test d'Ames standard et les deux tests d'Ames modifiés (*treat and wash assay* et *methylcellulose overlay assay*). Ils ont rapporté que les extraits de bœuf fumé à froid et de poulet fumé montrent une activité mutagène vis-à-vis de la souche TA100, en présence et en absence d'activation métabolique, dans les trois tests utilisés, indiquant que l'effet mutagène n'était pas secondaire à la libération d'histidine par les produits alimentaires. De plus, ils ont conclu que le véritable potentiel mutagène du salami au poivre reste incertain, car ce produit présentait une activité mutagène sur la souche TA100 lorsqu'il a été examiné par le test d'Ames standard, cependant, il a été trouvé mutagène que dans le *methylcellulose overlay assay*, mais pas dans le *treat and wash assay*. Contrairement à nos résultats, le corned-beef, le salami, le rôti de bœuf cuit fumé et le rôti poulet fumé n'étaient pas mutagènes. Cette différence dans les résultats pourrait être due d'une part à la différence des ingrédients et des méthodes de transformation de ces produits, et d'autre part à la différence des méthodes d'extraction utilisées et de la gamme de concentrations testées. Nous ne pouvons également pas exclure des résultats faussement négatifs produits à la suite d'une extraction

incomplète des éventuels mutagènes avec les solvants d'extraction utilisés (méthanol et *n*-héxane) (Grüter et al., 1991).

En ce qui concerne les résultats du test des micronoyaux, seul l'extrait héxanique du corned-beef fabriqué en Algérie qui a montré un effet faiblement génotoxique dans le traitement continu de 27 heures en absence d'activation métabolique sans période de recouvrement (S9-27 h /+ 0 h). Au meilleur de notre connaissance, notre étude est la première dans son genre qui a étudié l'effet des extraits de viandes transformées industriellement, tel qu'évalué par le test des micronoyaux *in vitro* réalisé sur les cellules lymphoblastoïdes humaines TK6.

Les résultats du test des comètes montrent que 3/8 des extraits méthanoliques de produits analysés (Saucisson salami de bœuf, rôti de poulet fumé et Jambon de bœuf) et 5/8 des extraits héxaniques de produits analysés (Saucisson salami de bœuf, rôti de poulet fumé, rôti de bœuf cuit fumé, chawarma de poulet et Jambon de bœuf) ont un effet génotoxique sur les cellules intestinales Caco-2. Ces résultats ne s'accordent pas avec ceux d'une étude précédente en Finlande où ils ont trouvé des résultats négatifs avec tous les extraits de viandes transformées analysés en utilisant le test des comètes en condition alcaline (pH > 13) sur les cellules hépatiques HepG2 (Omoruyi & Pohjanvirta, 2014).

Les effets génotoxiques observés dans notre étude pourraient être dus à la présence des additifs alimentaires dans les extraits. Récemment, les additifs alimentaires ont attiré l'attention en tant que causes potentielles de diverses maladies humaines ; ils sont parmi les facteurs responsables de l'apparition du cancer, des insuffisances hépatiques et néphritiques, et du potentiel génotoxique (Demir et al., 2008; Tanaka, 2007; Türkoğlu, 2007). De nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ont montré la génotoxicité de plusieurs additifs alimentaires, qui sont autorisés à être utilisés de manière cohérente, dans différentes lignées cellulaires. Parmi ces additifs, le nitrite de sodium, l'acétate de sodium, le rouge allura AC, le glutamate de sodium et l'acide citrique (SIN 330) qui sont parmi les ingrédients de quelques produits carnés étudiés (saucisson salami de bœuf, rôti de poulet fumé et corned-beef en Algérie).

- Le nitrite de sodium est largement utilisé dans l'industrie alimentaire comme fixateur de couleur et conservateur des produits à base de poisson et de viande. Il agit comme un exhausteur de goût et retarde le rancissement en empêchant l'oxydation des graisses. Il inhibe également la croissance des micro-organismes, en particulier *Clostridium botulinum* qui provoque le botulisme (Dosay-Akbulut, 2020). Cependant, le nitrite de sodium peut provoquer des effets néfastes sur la santé humaine, notamment la

cancérogénicité et la génotoxicité (Gui et al., 2016; Zhou et al., 2016). Cela est en accord avec de nombreuses études qui ont été menées pour étudier l'effet génotoxique du nitrite de sodium en utilisant le test des comètes. **Peycheva et al., (2014)** ont évalué l'effet génotoxique d'un groupe d'additifs alimentaires, y compris le nitrite de sodium, à des concentrations inférieures aux niveaux normaux d'utilisation, sur les cellules d'érythroleucémie humaine K562. Ils ont trouvé que le nitrite de sodium a une activité génotoxique à toutes les concentrations testées de 0,5, 10 et 100 µmol/L. Dans une autre étude *in vivo* menée par **Ansari et al., (2017)** sur le risque génotoxique potentiel de nitrite de sodium, le test des comètes a montré que le traitement avec le nitrite de sodium induit des dommages à l'ADN de manière dose-dépendante dans les cellules intestinales des rats.

- Il a été rapporté également que le rouge allura AC, principalement utilisé comme colorant alimentaire, a des effets génotoxiques selon différents systèmes de test. En utilisant le test des comètes *in vivo* en condition alcaline, **Tsuda et al. (2001)** et **Shimada et al. (2010)** ont trouvé que le rouge allura causait des dommages à l'ADN du côlon chez les souris après 3 heures de traitement. Les dommages peuvent persister jusqu'à 24 heures (**Tsuda et al., 2001**). **Sasaki et al. (2002)** ont étudié l'effet génotoxique de 39 additifs alimentaires, notamment des colorants alimentaires, des fixateurs de couleurs, des conservateurs, des antioxydants, des fongicides et des édulcorants. Après administration orale de ces substances à des souris, leurs tissus de l'estomac, du côlon, du foie, des reins, de la vessie, de la moelle osseuse, des poumons et du cerveau ont été collectés et utilisés pour le test des comètes. Ils ont indiqué que parmi tous les additifs, les colorants alimentaires ont l'effet de génotoxicité le plus élevé. Tous les colorants alimentaires étudiés, y compris le rouge allura, ont induit des dommages à l'ADN dans les cellules de l'estomac et du côlon, à des doses proches des apports quotidiens acceptables, après trois heures de traitement. Ils ont également remarqué que ces colorants situaient des dommages à l'ADN dans les organes gastro-intestinaux.
- L'acide citrique (SIN 330), largement utilisé comme acidifiant, régulateur de pH, exhausteur de goût et comme antioxydant dans de nombreux aliments, peut également causer des dommages à l'ADN (**Dosay-Akbulut, 2020**). **Yilmaz et al. (2014)** et **Abdelhakim et al. (2018)** ont étudié l'effet génotoxique de l'acide citrique sur les lymphocytes humains et les lymphocytes de rats, respectivement, en utilisant le test des

comètes en condition alcaline. Les résultats ont montré une augmentation statistiquement significative de la fragmentation de l'ADN par rapport au témoin négatif. **Pandir (2014)** a également trouvé que l'acide citrique a induit une augmentation statistiquement significative du pourcentage d'ADN dans la queue de la comète dans des cellules germinales mâles humaines après une heure d'exposition.

- L'acétate de sodium est fréquemment utilisé comme conservateur pour prolonger la durée de conservation des produits en les protégeant de la détérioration causée par des micro-organismes (**Mohammadzadeh-aghdash et al., 2018**). Il a été rapporté qu'il avait un effet génotoxique sur les lymphocytes de rats en utilisant le test des comètes (**Abd-elhakim et al., 2018**).
- Le glutamate monosodique est l'un des exhausteurs de goût les plus utilisés dans le monde. Des études, utilisant le test des comètes, ont rapporté que cet additif a causé des dommages à l'ADN dans (1) des cellules corticales cérébrales de rats Sprague-Dawley (**Yang et al., 2010**), (2) des cellules testiculaires de rats après 90 jours d'exposition *in vivo* (**Ismail, 2012**), (3) des lymphocytes humaines après une heure d'exposition *in vitro* (**Ataseven et al., 2016**) et (4) des cellules de neuroblastome humain IMR-32 (**Shah et al., 2019**).

Les effets positifs pourraient être également dûs aux NAs comme dans le cas du corned-beef fabriqué en Algérie en utilisant le test du micronoyau, et de saucisson salami du bœuf, de rôti de poulet fumé et de chawarma de poulet en utilisant le test des comètes. Ces composés peuvent se former de façon non-intentionnelle dans ces produits, car ils contiennent le nitrite dans ses ingrédients. Elles sont formées à partir de la réaction de certaines amines avec des nitrites. La plupart de ces NAs sont connus pour être génotoxiques et sont classés comme cancérigènes pour l'homme (**Byun et al., 2004; IARC, 1978**). Il est prouvé que de faibles doses de NAs exercent un effet cancérigène sur les animaux de laboratoire et c'est pourquoi les autorités sanitaires s'inquiètent de l'utilisation du nitrite dans les produits carnés (**Flores et al., 2019**). Certaines NAs, comme celles formées dans les aliments et qui sont impliquées dans le cancer de l'œsophage ou de l'estomac, sont des cancérogènes à action directe, c'est-à-dire ne nécessitent pas une activation métabolique pour exercer leur effet (**Barnes et al., 2018**). Il n'y a pas de base scientifique disponible qui établit les limites des quantités de nitrite qu'elles doivent ajouter pendant l'industrialisation par rapport à la formation des NAs. Par ailleurs, même si des inhibiteurs de la nitrosation (l'acide ascorbique dans le cas du salami et de

chawarma de poulet) sont utilisés pour réduire la possibilité de formation des NAs. Il convient de noter que les nitrites restants peuvent encore produire des effets toxiques (**Codex Committee on Food Additives 17/49/11 [CX/FA], 2016**). De plus, il faut tenir compte la contribution d'épices comme par exemple le poivre noir à la formation des NAs. Cela a été démontré avec des mélanges d'épices et de nitrite qui ont généré des NAs, principalement NPIP et NPYR. Ceci est dû à la présence de précurseurs de NPIP et de NPYR dans le poivre noir comme la pyrropérine, la pyrrolidine, la pipérine et la pipéridine (**De Mey et al., 2014; Nakamura et al., 1981**). Par conséquent, dans plusieurs réglementations comme la FDA (*Food and Drug Administration*), il est déconseillé de combiner des nitrites avec des épices (**Flores et al., 2019**). Les emballages en plastique contenant des dibutyles ou des diéthylthiocarbamates, peuvent également être nitrosés et conduire à la formation des NAs (**Molognoni et al., 2019**). Des NAs ont été détectés dans des produits carnés estoniens (tels que les viandes en conserve [porc, boeuf, poulet], le salami, les saucisses de Francfort, les saucisses fumés...) (**Yurchenko & Mölder, 2007**), produits turcs (saucisses, salami, soudjouk et doner kebab) (**Ozel et al., 2010**), produits espagnols (tels que le poulet en conserve, mortadelle, le jambon de dinde, les saucisses de Francfort, le pâté de dinde, le saucisson sec assaisonné au paprika...) (**Campillo et al., 2011**), produits danois (filet fumé, salami et d'autres) (**Herrmann et al., 2015**) et des produits indonésiens (les saucisses, le corned-beef, les hamburgers et le bœuf fumé) (**Cintya et al., 2019**). De plus, dans une étude récente d'**Özbay et Şireli (2021)**, des NAs (NDMA, NPYR, NPIP et NDBA) ont été détectées dans tous les échantillons de salami analysés (100 %) appartenant à 20 marques différentes et qui provenaient de différents types de viandes (bœuf, dinde, poulet, dinde + bœuf, dinde + poulet, bœuf + poulet). Par ailleurs, l'effet positif observé avec les extraits héxaniques de rôti de bœuf cuit fumé et le Jambon de bœuf pourrait être dû à d'autres sous-produits de transformation de viandes. Il est donc très important d'effectuer des études analytiques sur ces extraits pour identifier le ou les composés chimiques responsables de l'activité génotoxique.

Il est bien établi que la transformation et la cuisson des viandes peuvent produire des composés connus comme génotoxiques tels que les HAPs et les AHAs (**Mandal et al., 2018**). Cependant, nous pensons que les effets génotoxiques observés dans notre étude ne sont probablement pas dus à ces composés, car ils nécessitent une activation métabolique dans les cellules hôtes pour les transformer en intermédiaires réactifs capables d'exercer des effets génotoxiques (**Barnes et al., 2018**).

Ainsi, d'autres investigations utilisant une approche analytique rigoureuse sont nécessaires pour l'identification exacte du ou des composés chimiques responsables de l'activité génotoxique observée.

L'effet génotoxique obtenu peut être attribué à l'utilisation des procédés de fabrication inappropriés par l'industrie. Dans ce contexte, nous recommandons aux fabricants de prendre des mesures de maîtrise strictes pendant la fabrication des produits de viandes, tels que par exemple le contrôle des modalités des procédés (la température et le temps de cuisson) et/ou la réduction d'utilisation des additifs alimentaires, pour réduire le risque potentiel pour les consommateurs. Ces résultats constituent une base pour de futures études sur ce sujet.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Conclusion et Perspectives

Les viandes transformées sont les aliments les mieux reliés au risque de cancer en épidémiologie. Ces aliments sont le plus fréquemment retrouvés comme facteurs de risque, et sont aussi ceux qui présentent les risques relatifs les plus élevés globalement. À ce jour, les études épidémiologiques tendent à montrer une augmentation du risque de cancer colorectal pour les individus consommant beaucoup de viandes rouges, le risque serait même multiplié par trois ou quatre à poids égal pour les viandes transformées. Cependant, l'effet de ces viandes a été très peu (ou pas) étudié par des études expérimentales *in vitro* ou *in vivo* pour confirmer les études épidémiologiques. C'est pour cette raison, notre étude visait à évaluer l'effet mutagène et génotoxique potentiel d'extraits polaires et non polaires de certains produits de viandes industriellement transformées commercialisés en Algérie. Pour atteindre cet objectif, nous avons mis en œuvre trois tests, le test d'Ames en utilisant quatre souches de *S.typhimurium*, le test du micronoyau sur des cellules lymphoblastoïdes humaines TK6 et le test des comètes sur des cellules intestinales humaines Caco-2.

Globalement, les résultats du test d'Ames ont montré que tous les extraits de viandes transformées analysés sont non mutagènes avec l'ensemble des souches de *S. typhimurium* testées, tant en absence qu'en présence du système d'activation métabolique. Cependant, le test des micronoyaux et le test des comètes ont montré que certains extraits de viandes analysés ont un effet génotoxique. Nos résultats confirment que les produits de viandes transformées présentent un risque majeur pour la santé humaine. Par conséquent, la présente étude démontre l'importance d'effectuer un suivi diététique des aliments transformés à l'aide de tests de génotoxicité pour évaluer leurs effets nocifs potentiels sur les consommateurs.

Plusieurs hypothèses ont été avancées quant aux composés possibles responsables à la génotoxicité obtenue, qui semblent toutes plausibles : l'apparition d'AHAs et HAPs lors de la cuisson, la présence des additifs alimentaires et la formation des NAs par l'interaction des nitrites avec les amines. Des études complémentaires doivent donc être effectuées dans le domaine d'analyse pour identifier et quantifier le ou les composés chimiques responsable de l'activité génotoxique obtenue. Cette tâche sera nécessaire pour déterminer les sources de contaminants toxiques et pour concevoir des mesures de maîtrise pour réduire ou même supprimer les substances dangereuses dans les produits carnés, afin d'éliminer le risque et de s'assurer de la sécurité des consommateurs. La génération de toutes ces substances dangereuses peut être évitée si des précautions appropriées et de bonnes pratiques de fabrication sont prises

pendant le traitement. Ainsi, les stratégies pour réduire la formation des NAs sont principalement orientées vers la réduction moins possible des quantités de nitrites ajoutées au produit et l'évitement de la combinaison de nitrites avec épices. Dans le cas des AHAs et HAPs, la meilleure mesure préventive est de contrôler la température et le temps de cuisson (utilisation des températures basses et des temps de cuisson réduits). De plus, il est conseillé de limiter le recours aux additifs alimentaires.

L'exposition à des doses faibles d'additifs alimentaires et de composés issus de la transformation, qui ne sont pas détectables par les tests *in vitro*, mais régulière présente un danger réel pour la santé des consommateurs. L'évaluation du risque découlant de cette exposition par des travaux à long terme sur des animaux est donc indispensable.

En l'état actuel des connaissances scientifiques, les consommateurs sont invités à limiter leurs apports en charcuterie. Dans les conclusions de son enquête nationale sur l'alimentation, l'Office fédéral de la sécurité alimentaire et des affaires vétérinaires (OSAV) recommande « *de ne pas consommer des produits à base de viande transformée plus d'une fois par semaine* ». Cependant, en cas de consommation de charcuteries, selon les recommandations de l'Institut National du Cancer, il est conseillé de réduire autant que possible la taille des portions et la fréquence de consommation.

Comme perspectives, nous préconisons :

- Elargir l'étude de génotoxicité sur d'autres produits carnés commercialisés ;
- Dosage des additifs alimentaires dans les extraits présentant un effet positif ;
- Identification et la quantification des substances néoformées susceptibles d'apparaître dans les produits carnés tels que les AHAs, HAPs et les NAs en utilisant HPLC et GC ;
- Recours à des études *in vivo* ;
- Evaluation des viandes cuites par les différentes méthodes de cuisson.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Aardema, M. J., Albertini, S., Arni, P., Henderson, L. M., Kirsch-Volders, M., Mackay, J. M., Sarrif, A. M., Stringer, D. A., & Taalman, R. D. F. (1998). Aneuploidy: A report of an ECETOC task force. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 410(1), 3–79. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(97\)00029-X](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(97)00029-X)
- Abd-elhakim, Y. M., Moustafa, G. G., Anwar, A., Hashem, M. M., & Abo-el-sooud, K. (2018). Sodium Acetate , Sodium Acid Pyrophosphate , and Citric Acid Impacts on Isolated Peripheral Lymphocyte Viability , Proliferation , and DNA Damage. *J Biochem Mol Toxicol.*, April, 1–6. <https://doi.org/10.1002/jbt.22171>
- Adamson, R. H., Takayama, S., Sugimura, T., & Thorgeirsson, U. P. (1994). Induction of hepatocellular carcinoma in nonhuman primates by the food mutagen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline. *Environmental Health Perspectives*, 102(2), 190–193. <https://doi.org/10.1289/ehp.94102190>
- Adamson, R. H., Thorgeirsson, U. P., Snyderwine, E. G., Thorgeirsson, S. S., Reeves, J., Dalgard, D. W., Takayama, S., & Sugimura, T. (1990). Carcinogenicity of 2-Amino-3-methylimidazo[4, 5-f]quinoline in Nonhuman Primates: Induction of Tumors in Three Macaques. *Jpn. J. Cancer Res*, 81, 10–14. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1990.tb02500.x>
- Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l’Alimentation, de l’Environnement et du Travail. (2011). *Nutrition et cancer : Légitimité de recommandations nutritionnelles dans le cadre de la prévention des cancers*. <https://www.anses.fr/fr/system/files/NUT2007sa0095Ra.pdf>
- Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l’Alimentation, de l’Environnement et du Travail. (2015). *Dangers chimiques liés à la présence de substances néoformées dans les aliments au cours des procédés de fabrication, de transformation et de préparation des aliments*. <https://www.anses.fr/fr/system/files/GBPH2014SA0036.pdf>
- Akik, W. (2017). *Étude de la perméabilité intestinale des médicaments par la reconstitution du transporteur BCRP / ABCG2 dans des protéoliposomes* [Mémoire de Master, Université de Montréal]. Archives des thèses et mémoires de l'université de Montréal. https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/bitstream/handle/1866/20545/Akik_Wided_2017_memoire.pdf?sequence=2&isAllowed=y

- Alomirah, H., Al-Zenki, S., Al-Hooti, S., Zaghoul, S., Sawaya, W., Ahmed, N., & Kannan, K. (2011). Concentrations and dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from grilled and smoked foods. *Food Control*, 22(12), 2028–2035. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.05.024>
- Ames, B. N., Lee, F. D., & Durston, W. E. (1973). An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(3), 782–786. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.3.782>
- Ames, B. N., McCann, J., & Yamasaki, E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 31(6), 347–363. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(75\)90046-1](https://doi.org/10.1016/0165-1161(75)90046-1)
- Amiard, J.-C. (2013). *Le risque radioactif : Devenir des radionucléides dans l'environnement et impacts sur la santé*. Lavoisier.
- Anand, P., Kunnumakara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai, O. S., Sung, B., & Aggarwal, B. B. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical Research*, 25(9), 2097–2116. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9661-9>
- Ansari, F. A., Ali, S. N., Arif, H., Khan, A. A., & Mahmood, R. (2017). Acute oral dose of sodium nitrite induces redox imbalance , DNA damage , metabolic and histological changes in rat intestine. *PLoS ONE*, 12(4), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175196>
- Ataseven, N., Yüzbaşıoğlu, D., Keskin, A. Ç., & Ünal, F. (2016). Genotoxicity of Monosodium Glutamate. *Food and Chemical Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.02.021>
- Azqueta, A., & Collins, A. R. (2013). The essential comet assay: A comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of Toxicology*, 87(6), 949–968. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1070-0>
- Azqueta, A., & Collins, A. R. (2014). The Comet Assay: High Throughput Use of FPG. In L. Sierra & I. Gaivao (Eds.), *Genotoxicity and DNA Repair : A Practical Approach, Methods in Pharmacology and Toxicology* (pp. 199-217). Springer Science+Business

Media New York.

- Bajpayee, M., Kumar, A., & Dhawan, A. (2013). The Comet Assay : Assessment of in vitro and in vivo DNA damage. In A. Dhawan & M. Bajpayee (Eds.), *Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (pp. 325–345). Springer Science+Business Media New York.
- Barillet, S. (2007). *Toxicocinétique, toxicité chimique et radiologique de l'uranium chez le poisson zèbre (Danio rerio)*[Thèse de doctorat, Université Paul Verlaine de Metz]. Archives des thèses et mémoires de l'université Paul Verlaine de Metz. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00274850>
- Barnes, J. L., Zubair, M., John, K., Poirier, M. C., & Martin, F. L. (2018). Carcinogens and DNA damage. *Biochemical Society Transactions*, 46, 1213–1224. <https://doi.org/10.1042/BST20180519>
- Bartsch, H., Malaveille, C., Camus, A. M., Martel-Planche, G., Brun, G., Hautefeuille, A., Sabadie, N., & Barbin, A. (1980). Validation and comparative studies on 180 chemicals with *S.typhimurium* of various metabolizing systems. *Mutation Research*, 76, 1–50. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(80\)90002-0](https://doi.org/10.1016/0165-1110(80)90002-0)
- Battaglia Richi, E., Baumer, B., Conrad, B., Darioli, R., Schmid, A., & Keller, U. (2015). Aspects sanitaires de la consommation de viande. *Forum Médical Suisse – Swiss Medical Forum*, 15(24), 566–572. <https://doi.org/10.4414/fms.2015.02296>
- Bellamri, M. (2016). *Activation métabolique et génotoxicité des Amines Hétérocycliques Aromatiques (AHA) chez l ' Homme* [Thèse de doctorat, Université de Rennes 1]. Archives des thèses et mémoires de l'université de Rennes 1. <http://www.theses.fr/2016REN1B033>
- Bellon, S. (2003). *Lésions pontées radio-induites de l ' ADN: synthèse , mesure et incorporation dans des oligonucléotides pour l ' étude de leur réplication et de leur réparation* [Thèse de doctorat, Université de Joseph Fourier - Grenoble 1]. Archives des thèses et mémoires de l'université de Joseph Fourier - Grenoble 1. https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/48/078/48078386.pdf
- Berthelot-Ricou, A., Perrin, J., Orsière, T., Aye, M., Roustan, A., Botta, A., & Courbiere, B. (2013). Risque génotoxique et ovocytes : principes de toxicologie génétique et

- applications. *Gynecologie Obstetrique et Fertilité*, 41(9), 544–547.
<https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2013.07.008>
- Bjeldanes, L. F., Morris, M. M., Timourian, H., & Hatch, F. T. (1983). Effects of Meat Composition and Cooking Conditions on Mutagen Formation in Fried Ground Beef. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31(1), 18–21.
<https://doi.org/10.1021/jf00115a005>
- Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, P., Bolognesi, C., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L., Mirkova, E., Scarfi, M. R., Zijno, A., Norppa, H., & Fenech, M. (2007). An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 28(3), 625–631. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl177>
- Borenfreund, E., Babich, H., & Martin-Alguacil, N. (1988). Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicology in Vitro*, 2(1), 1–6. [https://doi.org/10.1016/0887-2333\(88\)90030-6](https://doi.org/10.1016/0887-2333(88)90030-6)
- Botta, A. (2006). De la génotoxicité à la cancérogenèse. *Arch Mal Prof Env*, 295–297.
- Bouvard, V., Loomis, D., Guyton, K. Z., Grosse, Y., Ghissassi, F. El, Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Mattock, H., Straif, K., Stewart, B. W., Smet, S. D., Corpet, D., Meurillon, M., Caderni, G., Rohrmann, S., Verger, P., Sasazuki, S., Wakabayashi, K., Weijenberg, M. P., ... Wu, K. (2015). Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *The Lancet Oncology*, 2045(15), 1599–1600. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00444-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00444-1)
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424.
<https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Byun, M., Ahn, H., Kim, J., Lee, J., Yook, H., & Han, S. (2004). Determination of volatile N-nitrosamines in irradiated fermented sausage by gas chromatography coupled to a thermal energy analyzer. *Journal of Chromatography A*, 1054, 403–407.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.07.096>
- Campillo, N., Vinas, P., Martínez-castillo, N., & Hernández-córdoba, M. (2011). Determination

- of volatile nitrosamines in meat products by microwave-assisted extraction and dispersive liquid – liquid microextraction coupled to gas chromatography – mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218, 1815–1821. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.010>
- Chikhi, K., & Bencharif, A. (2016). La consommation de produits carnés en Méditerranée : quelles perspectives pour l'Algérie ? *Options Méditerranéennes. Series A: Mediterranean Seminars*, 440(115), 435–440. <http://om.ciheam.org/om/pdf/a115/00007311.pdf>
- Chung, S. Y., Yettella, R. R., Kim, J. S., Kwon, K., Kim, M. C., & Min, D. B. (2011). Effects of grilling and roasting on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in beef and pork. *Food Chemistry*, 129(4), 1420–1426. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.092>
- Cintya, H., Silalahi, J., De Lux Putra, E., & Siburian, R. (2019). Analysis of nitrosamines in processed meat products in Medan city by liquid chromatography-mass spectrometry. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 7(8), 1382–1387. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2019.261>
- Codex Committee on Food Additives 17/49/11. (2016). *Document de discussion sur l'emploi des nitrates (SIN 251, 252) et des nitrites (SIN 249, 250)*. Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires comité du codex sur les additifs alimentaires, quarante-neuvième session CX/FA 17/49/11 Décembre 2016. http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/fr/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-711-49%252FWD%252Ffa49_11f.pdf
- Collins, A. R., Ai-guo, M., & Duthie, S. J. (1995). The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutation research*, 336, 69–77. [https://doi.org/10.1016/0921-8777\(94\)00043-6](https://doi.org/10.1016/0921-8777(94)00043-6)
- Collins, A. R., Dobson, V. L., Dušinská, M., Kennedy, G., & Štětina, R. (1997). The comet assay: What can it really tell us? *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 375(2), 183–193. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00013-4](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00013-4)
- Commission Européenne Règlement n°440. (2008). Mutagénicité: Essai de mutation réverse sur bactéries. *Journal Officiel de l'Union Européenne n° L142 du 31 Mai 2008*.

http://publications.europa.eu/resource/cellar/927741c0-494d-414f-b6a1-b0e3dc3fa491.0010.04/DOC_1

- Commoner, B., Vithayathil, A. J., Dolara, P., Nair, S., Madyastha, P., & Cuca, G. C. (1978). Formation of mutagens in beef and beef extract during cooking. *Science*, 201(4359), 913–916. <https://doi.org/10.1126/science.567374>
- Crespo, A. (2009). *Présence et sources des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans le Bassin d’Arcachon* [Thèse de doctorat, Université de Bordeaux 1]. Archives des thèses et mémoires de l'université de de Bordeaux 1. http://ori-oai.u-bordeaux1.fr/pdf/2009/CRESPO_ALEXIA_2009.pdf
- Crews, C. (2014). Processing Contaminants: N-Nitrosamines. *Encyclopedia of Food Safety*, 2, 409–415. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00217-1>
- Cross, A. J., Leitzmann, M. F., Gail, M. H., Hollenbeck, A. R., Schatzkin, A., & Sinha, R. (2007). A prospective study of red and processed meat intake in relation to cancer risk. *PLoS Medicine*, 4(12), 1973–1984. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040325>
- Cross, A. J., & Sinha, R. (2004). Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44(1), 44–55. <https://doi.org/10.1002/em.20030>
- Darolles, C. (2010). *Discrimination des effets chimiotoxiques et radiotoxiques de l’ uranium : définition de marqueurs biologiques pour l’ évaluation des risques professionnels dans l’ industrie du nucléaire* [Thèse de doctorat, Université de de la Méditerranée Aix-Marseille II]. Archives des thèses et mémoires de l'université de la Méditerranée Aix-Marseille II. https://www.irsn.fr/FR/Larecherche/Formation_recherche/Theses/Theses-soutenues/DRPH/Documents/2010-these-darolles.pdf
- Darroudi, F., Meijers, C. M., Hadjidekova, V., & Natarajan, A. T. (1996). Detection of aneugenic and clastogenic potential of X-rays, directly and indirectly acting chemicals in human hepatoma (Hep G2) and peripheral blood lymphocytes, using the micronucleus assay and fluorescent in situ hybridization with a DNA centromeric pro. *Mutagenesis*, 11(5), 425–433. <https://doi.org/10.1093/mutage/11.5.425>
- De Mey, E., De Maere, H., Dewulf, L., Paelinck, H., Sajewicz, M., Fraeye, I., & Kowalska, T. (2014). Assessment of the N-nitrosopiperidine formation risk from piperine and piperidine

- contained in spices used as meat product additives. *European Food Research and Technology*, 238(3), 477–484. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-2125-4>
- Dearfield, K. L., Cimino, M. C., Mccarroll, N. E., Mauer, I., & Valcovic, L. R. (2002). Genotoxicity risk assessment : a proposed classification strategy. *Mutation Research* 521,121–135. [https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(02\)00236-x](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(02)00236-x)
- Dégremont, C., & Cachot, J. (2009). La génotoxicité : Quel risque pour les espèces aquatiques ? *Fascicule Seine-Aval 2.2*, 36p. <https://www.seine-aval.fr/wp-content/uploads/2010/05/2-2-Genotox.pdf>
- Demeyer, D., Honikel, K., & Smet, S. D. (2008). The World Cancer Research Fund report 2007 : A challenge for the meat processing industry. *Meat Science*, 80, 953–959. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.06.003>
- Demir, E., Kocaoğlu, S., & Kaya, B. (2008). Genotoxicity testing of four benzyl derivatives in the *Drosophila* wing spot test. *Food and Chemical Toxicology*, 46(3), 1034–1041. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.10.035>
- Deoula, M. S., El Kinany, K., Huybrechts, I., Gunter, M. J., Hatime, Z., Boudouaya, H. A., Benslimane, A., Nejjari, C., El Abkari, M., Badre, W., El Feydi, A. E., Afkir, S., Abda, N., & El Rhazi, K. (2019). Consumption of meat, traditional and modern processed meat and colorectal cancer risk among the Moroccan population: A large–scale case–control study. *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.32689>
- Dewangan, J., Pandey, P. K., Divakar, A., Mishra, S., Srivastava, S., & Rath, S. K. (2018). Detection of Gene Mutation in Cultured Mammalian Cells. In A. Kumar, V.N. Dobrovolsky, A. Dhawan & R. Shanker (Eds), *Mutagenicity: Assays and Applications* (pp. 49-69). Academic Press of Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809252-1.00003-1>
- Di Sotto, A., Maffei, F., Hrelia, P., Di Giacomo, S., Pagano, E., Borrelli, F., & Mazzanti, G. (2014). Genotoxicity assessment of some cosmetic and food additives. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 68(1), 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2013.11.003>
- Djinovic, J., Popovic, A., & Jira, W. (2008). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in different types of smoked meat products from Serbia. *Meat Science*, 80(2), 449–456. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.01.008>

- Domingo, J. L., & Nadal, M. (2016). Carcinogenicity of consumption of red and processed meat: What about environmental contaminants? *Environmental Research*, 145, 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.11.031>
- Dosay-Akbulut, M. (2020). Determination of DNA damage caused by food additives using comet assay method. *Progress in Nutrition*, 22(4), 1–9. <https://doi.org/10.23751/pn.v22i4.9095>
- Druckrey, H. (1973). Specific carcinogenic and teratogenic effects of “indirect” alkylating methyl and ethyl compounds, and their dependency on stages of ontogenic developments. *Xenobiotica*, 3(5), 271–303. <https://doi.org/10.3109/00498257309151524>
- Eastman, A., & Barry, M. A. (1992). The origins of DNA breaks: A consequence of DNA damage, DNA repair, or apoptosis?: New drugs. *Cancer Investigation*, 10(3), 229–240. <https://doi.org/10.3109/07357909209032765>
- European Commission. (2005). Commission recommendation on the further investigation into the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in certain foods. *Official Journal of the European Union n° L34 du 4 February 2005*. <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/47b2ff0d-c718-4417-b96d-a926537818d5/language-en>
- European Food Safety Authority. (2010). *Scientific Opinion on the re-evaluation of Amaranth (E 123) as a food additive*. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1649>
- European Food Safety Authority. (2011). *Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment*. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2011.2379>.
- European Food Safety Authority. (2012). *Scientific Opinion on the re-evaluation of vegetable carbon (E 153) as a food additive*. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2592>
- Fairbairn, D. W., Olive, P. L., & O'Neill, K. L. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 339(1), 37–59. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(94\)00013-3](https://doi.org/10.1016/0165-1110(94)00013-3)
- Fardel, O., Vernhet, L., Nouvel, V., & Jung, A. (2009). *Utilisation des tests de génotoxicité pour la surveillance de l'exposition des travailleurs dans l'industrie du traitement et recyclage des déchets*. https://record-net.org/storage/etudes/07-0667-1A/synthese/Synth_record07-0667_1A.pdf

- Farhadian, A., Jinap, S., Abas, F., & Sakar, Z. I. (2010). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meat. *Food Control*, 21(5), 606–610. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.09.002>
- Faucet-Marquis, V. (2005). *L'ochratoxine A, contaminant alimentaire, est-elle un cancérogène génotoxique ou épigénétique ? Recherche des effets génotoxiques par la technique de post-marquage de l'ADN au 32P en relation avec la métabolisation de l'ochratoxine A* [Thèse de doctorat, Université de Toulouse]. Archives des thèses et mémoires de l'université de Toulouse. <https://core.ac.uk/download/pdf/78383325.pdf>
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1–2), 81–95. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8)
- Fenech, M. (2002). Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. *Drug Discovery Today*, 7(22), 1128–1137. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(02\)02502-3](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(02)02502-3)
- Flores, M., Mora, L., Reig, M., & Toldrá, F. (2019). Risk assessment of chemical substances of safety concern generated in processed meats. *Food Science and Human Wellness*, 8(3), 244–251. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.07.003>
- Foltete, A. (2010). *Effets génotoxiques et systèmes de détoxification chez Vicia faba (Fabaceae) dans le cadre de l ' évaluation des sols pollués* [Thèse de doctorat, Université de Lorraine]. Archives des thèses de l'Université de Lorraine. <https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752919>
- Garcia, O., Mandina, T., Lamadrid, A. I., Diaz, A., Remigio, A., Gonzalez, Y., Piloto, J., & Gonzalez, J. E. (2004). Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay Results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. *Mutation Research*, 556, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.06.035>
- Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Ohta, T., Venitt, S., & Zeiger, E. (1994). Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 312(3), 217–233. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(94\)90037-X](https://doi.org/10.1016/0165-1161(94)90037-X)
- Gibis, M., & Weiss, J. (2015). Impact of Precursors Creatine, Creatinine, and Glucose on the Formation of Heterocyclic Aromatic Amines in Grilled Patties of Various Animal Species.

- Journal of Food Science*, 80(11), C2430–C2439. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13090>
- Gonzalez, C. A., & Riboli, E. (2006). Diet and Cancer Prevention : Where We Are , Where We Are Going. *Nutrition and Cancer*, 56(2), 225–231. <https://doi.org/10.1207/s15327914nc5602>
- Graillot, V. (2012). *Appréciation quantitative de l'exposition alimentaire à des mélanges de pesticides et mécanismes de génotoxicité* [Thèse de doctorat, Université de Toulouse III-Paul Sabatier]. Archives des thèses de l'Université de Toulouse III-Paul Sabatier. <http://thesesups.ups-tlse.fr/2077/1/2012TOU30338.pdf>
- Grobstein, C., Cairns, J., Berliner, R., Broitman, S. A., Campbell, T. C., Gussow, J. D., Kolonel, L. N., Kritchevsky, D., Mertz, W., Miller, A. B., Prival, M. J., Slaga, T., Wattenberg, L., & Sugimura, T. (1982). Mutagens in food. In F. M. Peter (Ed.), *Diet, Nutrition and Cancer* (pp.277-303). National Academy Press, Washington.
- Grüter, A., Friederich, U., & Würigler, F. E. (1991). The mutagenicity of edible mushrooms in a histidine-independent bacterial test system. *Food and Chemical Toxicology*, 29(3), 159–165. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(91\)90033-4](https://doi.org/10.1016/0278-6915(91)90033-4)
- Gui, G., Meng, S., Li, L., Liu, B., Liang, H., & Huangfu, C. (2016). Sodium nitrite enhanced the potentials of migration and invasion of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells through induction of mitophagy. *Xue Xue Bao*, 51, 59–67. <https://doi.org/16438/j.0513-4870.2015-0551>
- Hallé, V. C. H. (2002). *Consommation de viande et cancer colorectal chez l'homme : une revue de l'épidémiologie*[Thèse de doctorat, Université Paul-Sabatier de Toulouse]. Archives des thèses de l'Université Paul-Sabatier de Toulouse. http://oatao.univ-toulouse.fr/963/1/debouch_963.pdf
- Hanna, N., Parfait, B., Vidaud, D., & Vidaud, M. (2005). Mécanismes et conséquences des mutations. *Médecine/Sciences*, 21, 969–980. <https://doi.org/10.1051/medsci/20052111969>
- Hashimoto, K., Nakajima, Y., Matsumura, S., & Chatani, F. (2010). An in vitro micronucleus assay with size-classified micronucleus counting to discriminate aneugens from clastogens. *Toxicology in Vitro*, 24(1), 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.09.006>

- Herrmann, S. S., Duedahl-Olesen, L., & Granby, K. (2015). Occurrence of volatile and non-volatile N-nitrosamines in processed meat products and the role of heat treatment. *Food Control*, 48, 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.030>
- Herrmann, Susan Strange. (2014). *N-nitrosamines in processed meat products: Analysis, Occurrence, Formation, Mitigation and Exposure*. National Food Institute, Technical University of Denmark. https://orbit.dtu.dk/files/103384341/PhD_thesis_Susan_Strange_Herrmann.pdf.%20(Eri%20%C5%9Fim
- Heu Biabi Bodiandjel, A. M. (2018). *Nutrition et Cancérogénèse : Physiologie, facteurs nutritionnels et Prévention du cancer* [Thèse de doctorat, Université de Mohammed V de Rebat]. <http://ao.um5.ac.ma/xmlui/bitstream/handle/123456789/17030/P1032018.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Hill, J. (1761). Cautions against the immoderate use of snuff: founded on the known qualities of the tobacco plant : and the effects it must produce when this way taken into the body : and enforced by instances of persons who have perished miserably of diseases, occasione. The National Library of Medicine believes this item to be in the public domain. <http://resource.nlm.nih.gov/2166041R>
- Hoeijmakers, J. H. J. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411(6835), 366–374. <https://doi.org/10.1038/35077232>
- Honma, M. (2005). Generation of loss of heterozygosity and its dependency on p53 status in human lymphoblastoid cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 45 (2–3), 162–176. <https://doi.org/10.1002/em.20113>
- Iarmacovai, G. (2008). Mutagenèse et cancérogénèse. *International Web Journal*. <https://doi.org/10.7202/1064408ar>
- Iarmacovai, G., Botta, A., & Orsière, T. (2006). Number of centromeric signals in micronuclei and mechanisms of aneuploidy. *Toxicology Letters*, 166(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.05.015>
- Iarmacovai, G., Botta, A., & Orsière, T. (2007). Micronoyaux et polymorphismes génétiques : de l'exposition à la susceptibilité. *Annales de Biologie Cliniques*, 65(4), 357–363.

<https://www.em-consulte.com/article/179071/les-micronoyaux-un-biomarqueur-de-susceptibilite>

Institut National du Cancer. (2015). *Nutrition et prévention primaire des cancers: actualisation des données*. https://www.e-cancer.fr/content/download/193333/2586578/file/Nutrition-et-prevention-primaire-des-cancers-actualisation-des-donnees-Rapport_mel_20150601.pdf.pdf

International Agency for Research on Cancer. (1978). *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans : Some N-nitroso compounds*. 17, 1–349. https://publications.iarc.fr/_publications/media/download/1565/12f27b1bb900b6286a5da21c926a24880fc9399e.pdf

International Agency for Research on Cancer. (1993). *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans : Some naturally occurring substances, Food items and constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins*. 56, 1–599. https://publications.iarc.fr/_publications/media/download/1901/a815bd2f53a323de205a5e997377bc38cc80e4b9.pdf

International Agency for Research on Cancer. (2018). Red Meat and Processed Meat. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 114, 1-506. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol114/mono114.pdf>

Ismail, N. H. (2012). Assessment of DNA Damage in Testes from Young Wistar Male Rat Treated with Monosodium Glutamate. *Life Science Journal*, 9(1), 930–939.

Jägerstad, M., & Skog, K. (2005). Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 574(1-2), 156–172. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.01.030>

Jain, A. K., Singh, D., Dubey, K., & Maurya, R. (2018). Chromosomal Aberrations. In A. Kumar, V. N. Dobrovolsky, A. Dhawan & R. Shanker (Eds.), *Mutagenicity: Assays and Applications* (pp. 69-92). Academic Press of Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809252-1.00004-3>

Jin, J. (2016). Modifications of Ames Test for Assessing the Mutagenicity of Traditional Chinese Medicines. *Journal of Clinical Toxicology*, 6(2), 2–4. <https://doi.org/10.4172/2161-0495.1000285>

- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. (2005). *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*, Sixty-fourth meeting Rome du 8-17 February 2005, JECFA/64/SC. In Jecfa/64/Sc. <http://www.fao.org/3/a-at877e.pdf>
- Kazerouni, N., Sinha, R., Hsu, C. H., Greenberg, A., & Rothman, N. (2001). Analysis of 200 food items for benzo[a]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. *Food and Chemical Toxicology*, 39(5), 423–436. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(00\)00158-7](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(00)00158-7)
- Khandoudi, N., Porte, P., Chtourou, S., Nessler, F., Marzin, D., & Le Curieux, F. (2009). The presence of arginine may be a source of false positive results in the Ames test. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 679(1–2), 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.03.010>
- Khanna, K. K., & Jackson, S. P. (2001). DNA double-strand breaks: Signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics*, 27(3), 247–254. <https://doi.org/10.1038/85798>
- Kienzler, A. (2013). *Intérêt des lignées cellulaires de poisson en écotoxicologie pour l'étude de nouveaux biomarqueurs de génotoxicité* [Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon]. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00952888/document>
- Kim, E., Coelho, D., & Blachier, F. (2013). Review of the association between meat consumption and risk of colorectal cancer. *Nutrition Research*, 33(12), 983–994. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2013.07.018>
- Kirkland, D., Aardema, M., Henderson, L., & Lutz, M. (2005). Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. *Mutation Research*, 584, 1–256. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.02.004>
- Kirkland, D. J., Marshall, R. R., McEnaney, S., Bidgood, J., Rutter, A., & Mullineux, S. (1989). Aroclor-1254-induced rat-liver S9 causes chromosomal aberrations in CHO cells but not human lymphocytes: A role for active oxygen? *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 214(1), 115–122. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(89\)90204-2](https://doi.org/10.1016/0027-5107(89)90204-2)
- Kirkland, D., Reeve, L., Gatehouse, D., & Vanparrys, P. (2011). A core in vitro genotoxicity battery comprising the Ames test plus the in vitro micronucleus test is sufficient to detect

- rodent carcinogens and in vivo genotoxins. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 721(1), 27–73. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.12.015>
- Kirsch-Volders, M., Decordier, I., & Lison, D. (2013). Génotoxicité et exposition professionnelle ou environnementale. *EMC - Pathologie Professionnelle et de l'Environnement*, 8(1), 1–15. [https://doi.org/10.1016/s1877-7856\(12\)58381-9](https://doi.org/10.1016/s1877-7856(12)58381-9)
- Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E., & Van Hummelen, P. (1997). The in vitro micronucleus test: A multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 392(1–2), 19–30. [https://doi.org/10.1016/S0165-1218\(97\)00042-6](https://doi.org/10.1016/S0165-1218(97)00042-6)
- Kirsch-Volders, M., Plas, G., Elhajouji, A., Lukamowicz, M., Gonzalez, L., Vande Loock, K., & Decordier, I. (2011). The in vitro MN assay in 2011: Origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology*, 85(8), 873–899. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0691-4>
- Kılıçlı, P., & Önen, Ö. (2018). Genotoxic Effects of Some Food Additives on Mammals. *E-Journal of New World Sciences Academy*, 13(1), 43–50. <https://doi.org/10.12739/nwsa.2018.13.1.5a0093>
- Knize, M. G., Dolbeare, F. A., Carroll, K. L., Moore, D. H., & Felton, J. S. (1994). Effect of cooking time and temperature on the heterocyclic amine content of fried beef patties. *Food and Chemical Toxicology*, 32(7), 595–603. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(94\)90002-7](https://doi.org/10.1016/0278-6915(94)90002-7)
- Knize, M. G., Salmon, C. P., Hopmans, E. C., & Felton, J. S. (1997). Analysis of foods for heterocyclic aromatic amine carcinogens by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 763(1–2), 179–185. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00720-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00720-0)
- Krone, C. A., & Iwaoka, W. T. (1984). Occurrence of mutagens in canned foods. *Mutation Research*, 141, 131–134. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(84\)90084-8](https://doi.org/10.1016/0165-7992(84)90084-8)
- Krone, C. A., & Iawoka, W. T. (1987). Commercial Food Processing Operations and Mutagen Formation. *Journal of Food Protection*, 50(2), 167–174. [132](https://doi.org/10.4315/0362-</p></div><div data-bbox=)

028x-50.2.167

- Kumar, A., Shanker, R., & Dhawan, A. (2018). Detection of Mutation in Prokaryotic Cells. In A. Kumar, V.N. Dobrovolsky, A. Dhawan & R. Shanker (Eds.), *Mutagenicity: Assays and Applications* (pp. 35-48). Academic Press of Elsevier. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809252-1.00002-X>
- Kumaravel, T. S., & Jha, A. N. (2006). Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 605(1-2), 7-16. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.03.002>
- Kumaravel, T. S., Vilhar, B., Faux, S. P., & Jha, A. N. (2009). Comet Assay measurements: A perspective. *Cell Biology and Toxicology*, 25(1), 53-64. <https://doi.org/10.1007/s10565-007-9043-9>
- La, D. K., & Swenberg, J. A. (1996). DNA adducts: Biological markers of exposure and potential applications to risk assessment. *Mutation Research - Reviews in Genetic Toxicology*, 365(1-3), 129-146. [https://doi.org/10.1016/S0165-1110\(96\)90017-2](https://doi.org/10.1016/S0165-1110(96)90017-2)
- Langouët, S. (2018). *Le potentiel génotoxique des amines hétérocycliques aromatiques chez l'homme e : Évaluation du potentiel génotoxique des amines hétérocycliques aromatiques chez l'homme*. Les cahiers de la Recherche. Santé, Environnement, Travail, ANSES, Cancer et environnement, pp.24-25. <https://hal-anses.archives-ouvertes.fr/anses-01725615/document>
- Larsson, B. K., Sahlberg, G. P., Eriksson, A. T., & Busk, L. A. (1983). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Grilled Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31(4), 863-867. <https://doi.org/10.1021/jf00118a048>
- Larsson, S. C., & Wolk, A. (2012). Red and processed meat consumption and risk of pancreatic cancer: Meta-analysis of prospective studies. *British Journal of Cancer*, 106, 603-607. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.585>
- Larsson, S. C., Bergkvist, L., & Wolk, A. (2006). Processed meat consumption, dietary nitrosamines and stomach cancer risk in a cohort of Swedish women. *International Journal of Cancer*, 119, 915-919. <https://doi.org/10.1002/ijc.21925>
- Larsson, S. C., & Wolk, A. (2006). Meat consumption and risk of colorectal cancer : A meta-

- analysis of prospective studies. *International Journal of Cancer*, 119, 2657–2664.
<https://doi.org/10.1002/ijc.22170>
- Lawrence, J. F., & Weber, D. F. (1984). Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Some Canadian Commercial Fish, Shellfish, and Meat Products by Liquid Chromatography with Confirmation by Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32(4), 789–794.
<https://doi.org/10.1021/jf00124a022>
- Lea, T. (2015). Caco-2 Cell Line. In K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka & H. Wichers (Eds.), *The impact of food bioactives on health : In Vitro and Ex Vivo Models* (pp. 103-111). Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_10
- Lebraud, E. (2019). *Rôle du médiateur et des cohésines dans la réparation des dommages oxydatifs de l'ADN* [Thèse de doctorat, Université Paris-Saclay]. Archives des thèses de l'Université Paris-Saclay. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02117109/document>
- Lecerf, J.-M. (2012). Cuisson et cancer: pourquoi pas ? : Cuisson des aliments, nutrition et santé. *Correspondances En MHDN*, 16(5), 155–160.
- Lemière, S. (2004). *Intérêt du test des Comètes pour l'évaluation de la génotoxicité environnementale* [Thèse de doctorat, Université de Paul Verlaine - Metz]. Archives des thèses de l'Université de Lorraine. <https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750248/document>
- Liber, H. L., & Thilly, W. G. (1982). Mutation assay at the thymidine kinase locus in diploid human lymphoblasts. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 94(2), 467–485. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(82\)90308-6](https://doi.org/10.1016/0027-5107(82)90308-6)
- Lijinsky, W., & Shubik, P. (1964). Benzo (a) pyrene and Other Polynuclear Hydrocarbons in charcoal-broiled meat. *Science*, 145(2), 53–55.
- Lijinsky, W. (1999). N -Nitroso compounds in the diet. *Mutation Research*, 443, 129–138.
- Lippi, G., Mattiuzzi, C., & Cervellin, G. (2016). Meat consumption and cancer risk: A critical review of published meta-analyses. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 97, 1–14.
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.11.008>

- Lorenzo, Y., Costa, S., Collins, A. R., & Azqueta, A. (2013). The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: Hedgehogs are not always dead. *Mutagenesis*, 28(4), 427–432. <https://doi.org/10.1093/mutage/get018>
- Lovell, D. P., & Omori, T. (2008). Statistical issues in the use of the comet assay. *Mutagenesis*, 23(3), 171–182. <https://doi.org/10.1093/mutage/gen015>
- Lutz, W. K. (1990). Dose-response relationship and low dose extrapolation in chemical carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 11(8), 1243–1247. <https://doi.org/10.1093/carcin/11.8.1243>
- Mahon, G. A. T., Middleton, B., Robinson, W. D., Green, M. H. L., Mitchell, I. D. G., & Tweats, D. J. (1989). Analysis of data from microbial colony assays. In: D. J. Kirkland (Ed.), *UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report: Part III Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data* (pp. 26-65). Cambridge University Press, Cambridge, New York, pp. 26–6.
- Mandal, P., Rai, A., Mishra, S., & Tripathi, A. (2018). Mutagens in Food. In A. Kumar, V. N. Dobrovolsky, A. Dhawan & R. Shanker (Eds.), *Mutagenicity: Assays and Applications* (pp. 133-160). Academic Press of Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809252-1.00007-9>
- Maron, D. M., & Ames, B. N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. In *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 113 (3–4), 173–215. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9)
- Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P. V., Decordier, I., & Kirsch-Volders, M. (2006). Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, 88(11), 1515–1531. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.07.004>
- McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., & Ames, B. N. (1975). Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(12), 5135–5139. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.12.5135>
- Meurillon, M., & Engel, E. (2019). Les composés néoformés toxiques et leur remédiation-Focus sur les produits carnés. *Innovations Agronomiques*, 73, 27–41. <https://hal.archives->

ouvertes.fr/hal-02275512/

- Michel, C. (2012). *Biomarqueurs de génotoxicité chez Dreissena polymorpha : indicateurs de la pression chimique urbaine et variabilité naturelle des lésions de l'ADN* [Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI]. Archives des thèses de l'Université Pierre et Marie Curie - Paris VI. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00703238/document>
- Miller, B. M., Pujadas, E., & Gocke, E. (1995). Evaluation of the micronucleus test in vitro using chinese hamster cells: Results of four chemicals weakly positive in the in vivo micronucleus test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 26(3), 240–247. <https://doi.org/10.1002/em.2850260309>
- Miyamae, Y., Iwasaki, K., Kinae, N., Tsuda, S., Murakami, M., Tanaka, M., & Sasaki, Y. F. (1997). Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens using the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay. 2. Relationship between DNA migration and alkaline condition. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 393(1–2), 107–113. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(97\)00091-0](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(97)00091-0)
- Moche, H. (2014). *Utilisation du carbure de tungstène-cobalt (WC-Co) comme témoin positif génotoxique nanoparticulaire et étude de la génotoxicité de candidats nanovecteurs de médicaments* [Thèse de doctorat, Université du Droit et de la Santé - Lille II]. Archives des thèses de l'université de Lille II. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01163344/document>
- Mohammadzadeh-aghdash, H., Sohrabi, Y., Mohammadi, A., Shanebandi, D., Dehghan, P., Ezzati, J., & Dolatabadi, N. (2018). Safety assessment of sodium acetate, sodium diacetate and potassium sorbate food additives. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.020>
- Møller, P. (2006). The alkaline comet assay: Towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 98(4), 336–345. https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2006.pto_167.x
- Molognoni, L., Daguer, H., Emiliano, G., Cardoso, T., Federal, L., Agropecuária, D. D., Catarina, S., Sc, S., Rs, L., & Agricultura, M. (2019). Interactions of preservatives in meat processing : Formation of carcinogenic compounds, analytical methods, and inhibitory agents. *Food Research International*, 125(August), 108608.

- <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108608>
- Mortelmans, K., & Zeiger, E. (2000). The Ames Salmonella / microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455, 29–60.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to prolifération and cytotoxicity assays. *Journal Of Immunological Methods*, 65, 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Nagao, M., Honda, M., Seino, Y., Yahagi, T., & Sugimura, T. (1977). Mutagenicities of smoke condensates and the charred surface of fish and meat. *Cancer Letters*, 2(4–5), 221–226. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(77\)80025-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(77)80025-6)
- Nakamura, M., Katoh, K., & Kawabata, T. (1981). Precursors to Nitrosopyrrolidine and Nitrosopiperidine in Black Pepper Treated with Nitrous Acid. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(5), 1257–1259. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.45.1257>
- Nepalia, A., Singh, A., Mathur, N., Kamath, R., & Pareek, S. (2018). Assessment of mutagenicity caused by popular baby foods and baby plastic-ware products: An imperative study using microbial bioassays and migration analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 162, 391–399. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.002>
- Nesslany, F. (2007). *Etude de la spécificité du test des Comètes in vivo : application à l ' étude de produits à tropisme rénal* [Thèse de doctorat non publiée]. Université de Lille II.
- Nesslany, F. (2013). Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells In Vivo. In A. Dhawan & M. Bajpayee (Eds.), *Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (pp. 373–388). Springer Science+Business Media New York.
- Nesslany, F., & Marzin, D. (1999). A micromethod for the in vitro micronucleus assay. *Mutagenesis*, 14(4), 403–410. <https://doi.org/10.1093/mutage/14.4.403>
- Nicolette, J. (2017). Genetic Toxicology Testing. In : A comprehensive Guide to Toxicology in Non clinical Drug Development. In A. S. Faqi (Ed.), *Comprehensive Guide to Toxicology in Non clinical Drug Development* (pp. 129-154). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803620-4.00006-2>
- Norat, T., Lukanova, A., Ferrari, P., & Riboli, E. (2002). Meat consumption and colorectal cancer risk: Dose-response meta-analyses of epidemiological studies. *International*

- Journal of Cancer*, 98, 241–256. <https://doi.org/10.1002/ijc.10126>
- Ohgaki, H., Takayama, S., & Sugimura, T. (1991). Carcinogenicities of heterocyclic amines in cooked food. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 259(3–4), 399–410. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(91\)90130-E](https://doi.org/10.1016/0165-1218(91)90130-E)
- Olive, P. L., & Durand, R. E. (2005). Heterogeneity in DNA damage using the comet assay. *Cytometry Part A*, 66(1), 1–8. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20154>
- Olive, P. L., Wlodek, D., & Banath, J. P. (1991). DNA Double-Strand Breaks Measured in Individual Cells Subjected to Gel Electrophoresis. *Cancer Research*, 51(17), 4671–4676.
- Omoruyi, I. M. (2015). *Mutagenic and Oestrogenic Activities of Commercially Processed Food Items and Water Samples: a Comparison Between Finland and Nigeria* [Thèse de doctorat, Université d'Helsinki]. Helsingin yliopisto. <https://helda.helsinki.fi/handle/10138/157405>
- Omoruyi, I. M., Ahamioje, D., & Pohjanvirta, R. (2014). Dietary exposure of Nigerians to mutagens and estrogen-like chemicals. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(8), 8347–8367. <https://doi.org/10.3390/ijerph110808347>
- Omoruyi, I. M., & Pohjanvirta, R. (2014). Genotoxicity of processed food items and ready-to-eat snacks in Finland. *Food Chemistry*, 162, 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.055>
- Organisation de coopération et de développement économiques n°471. (1997). *Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques : Essai de mutation réverse sur des bactéries*. https://www.oecd-ilibrary.org/fr/essai-n-471-essai-de-mutation-reverse-sur-des-bacteries_5lmqcr2k7md4.pdf?itemId=%2Fcontent%2Fpublication%2F9789264071254-fr&mimeType=pdf
- Organisation de coopération et de développement économiques n°473. (2016). *Ligne directrice de L'OCDE pour les essais de produits chimiques : Essai d'Aberration Chromosomique in vitro chez les Mammifères*. https://www.oecd-ilibrary.org/fr/essai-n-473-essai-d-aberration-chromosomique-in-vitro-chez-les-mammiferes_5jlsgzvv3j1q.pdf?itemId=%2Fcontent%2Fpublication%2F9789264264656-fr&mimeType=pdf

- Organisation de coopération et de développement économiques n°474. (2016). *Ligne directrice de L'OCDE pour les essais de produits chimiques : Test du micronoyau sur érythrocytes de mammifères*. https://www.oecd-ilibrary.org/essai-n-474-test-du-micronoyau-sur-erythrocytes-de-mammiferes_5jlsq2g07jf8.pdf
- Organisation de coopération et de développement économiques n°475. (2016). *Ligne directrice de L'OCDE pour les essais de produits chimiques : Essai d'Aberration chromosomique sur moelle osseuse de Mammifères*. https://www.oecd-ilibrary.org/fr/essai-n-475-essai-d-aberration-chromosomique-sur-moelle-osseuse-de-mammiferes_5jlsq2fjppqd.pdf?itemId=%2Fcontent%2Fpublication%2F9789264264793-fr&mimeType=pdf
- Organisation de coopération et de développement économiques n°476. (2016). *Ligne directrice de L'OCDE pour les essais de produits chimiques : Essais in vitro de mutation génique sur cellules de mammifères utilisant les gènes Hprt et xprr*. <https://www.oecd.org/fr/env/ess/essais/essai-n-476-essais-in-vitro-de-mutation-genique-sur-cellules-de-mammiferes-utilisant-les-genes-hprt-et-xprr-9789264264816-fr.htm>
- Organisation de coopération et de développement économiques n°486. (1997). *Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques : Essai de synthèse non programmée de l'ADN (UDS) sur des hépatocytes de mammifères in vivo*. https://www.oecd-ilibrary.org/fr/environment/essai-n-486-essai-de-synthese-non-programmee-de-l-adn-uds-sur-des-hepatocytes-de-mammiferes-in-vivo_9789264071537-fr
- Organisation de coopération et de développement économiques n°487. (2016). *Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques : Test du micronoyau In vitro sur cellules de mammifères*. https://www.oecd-ilibrary.org/essai-n-487-essai-in-vitro-de-micronoyaux-sur-cellules-de-mammiferes_5jlrq2g721wc.pdf
- Organisation de coopération et de développement économiques n°490. (2016). *Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques : Essai In Vitro de Mutation Génique Sur Cellules de Mammifères Utilisant le Gène de la Thymidine Kinase*. <https://www.oecd.org/fr/publications/essai-n-490-essai-in-vitro-de-mutation-genique-sur-cellules-de-mammiferes-utilisant-le-gene-de-la-thymidine-kinase-9789264264915-fr.htm>
- Orsière, T., Iarmarcovai, G., & Botta, A. (2008). Les micronoyaux, un biomarqueur de

- susceptibilité ? *Archives Des Maladies Professionnelles et de l'Environnement*, 69(3), 475–484. <https://doi.org/10.1016/j.admp.2008.02.002>
- Orsière, T., Sari-Minodier, I., Decome, L., Botta, C., Iarmarcovai, G., & Botta, A. (2005). De la génotoxicologie à la biosurveillance. *Journées Nationales de Santé Au Travail Dans Le BTP, Annale 28*, 25–28.
- Ortega, E. M. I. (2004). Tests de genotoxicité : Utilité en médecine du travail Difficultés lors de son application à la surveillance médicale des travailleurs. *Arch Public Health*, 62, 71–81.
- Ostling, O., & Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(1), 291–298.
- Oz, F., & Yuzer, M. O. (2016). The effects of cooking on wire and stone barbecue at different cooking levels on the formation of heterocyclic aromatic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons in beef steak. *Food Chemistry*, 203, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.041>
- Özbay, S., & Şireli, U. T. (2021). Volatile N-nitrosamines in processed meat products and salami from Turkey. *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*, 14(2), 110–114. <https://doi.org/10.1080/19393210.2021.1885502>
- Ozel, M. Z., Gogus, F., Yagci, S., Hamilton, J. F., & Lewis, A. C. (2010). Determination of volatile nitrosamines in various meat products using comprehensive gas chromatography – nitrogen chemiluminescence detection. *Food and Chemical Toxicology*, 48(11), 3268–3273. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.08.036>
- Pandir, D. (2014). DNA damage in human germ cell exposed to the some food additives in vitro. *Cytotechnology*, 68, 725-733. <https://doi.org/10.1007/s10616-014-9824-y>
- Panisset, J. C., Dewailly, E., & Doucet-Leduc, H. (2003). Contamination alimentaire. In M. Gérin, P. Gosselin, S. Cordier, C. Viau, P. Quénel & E. Dewailly (Eds.), *Environnement et Santé Publique - Fondements et Pratiques* (pp. 369–395). Elsevier Masson SAS.
- Pariza, M. W., Ashoor, S. H., Chu, F. S., & Lund, D. B. (1979). Effects of temperature and time on mutagen formation in pan-fried hamburger. *Cancer Letters*, 7(2–3), 63–69. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(79\)80097-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(79)80097-X)

- Peycheva, E., Alexandrova, R., & Miloshev, G. (2014). Application of the yeast comet assay in testing of food additives for genotoxicity. *LWT - Food Science and Technology*, 59(1), 510–517. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.023>
- Pham, T. C. Van, & Pham, T. C. Van. (2011). *Évaluation de la fréquence des micronoyaux et du potentiel clastogène et / ou aneugène du benzo-a-pyrène suite à une exposition in vitro des lymphocytes humains* [Mémoire de Master, Université de Montréal]. Archives des thèses et mémoires de l'Université de Montréal. https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/bitstream/handle/1866/6209/Pham_Thi_Cam_Van_2011_memoire.pdf?sequence=4&isAllowed=y
- Pitot III, H. C., & Dragan, Y. P. (2001). Chemical carcinogenesis. In C. D. Klaassen (Ed.), *Casarett & Doull's. Toxicology : The Basic Science of Poisons* (pp. 241-319). McGraw-Hill Companies, Inc.
- Plumejeaud, S. (2016). *Evaluation des potentiels génotoxiques de particules atmosphériques et de poussières de sols dans les Observations hommes-milieux du bassin Miner de Provence et d'Estrreja* [Thèse de doctorat, Université d'Aix-Marseille]. Archives des thèses de l'Université d'Aix-Marseille. https://www.spppi-paca.org/_depot_sppi/_depot_arko/basesdoc/6/15818/eje1dm_evaluation-des-potentiels-ga-notoxiques-de-particules-atmospha-riques-et-de-poussia-res-de-sols-dans.pdf
- Pott, P. (1775). *Chirurgical observations relative to the cataract, the polypus of the nose, the cancer of the scrotum, the different kinds of ruptures, and the mortification of the toes and feet* (London: Printed by T.J. Carnegy, for L. Hawes, W. Clarke, and R. Collins). <https://wellcomecollection.org/works/pvdd4yrv/items>
- Poul, M., Jarry, G., Elhkim, M. O., & Poul, J. M. (2009). Lack of genotoxic effect of food dyes amaranth, sunset yellow and tartrazine and their metabolites in the gut micronucleus assay in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 47(2), 443–448. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.11.034>
- Preston, R. J., & Hoffmann, G. R. (2001). Genetic Toxicology. In C. D. Klaassen (Ed.), *Casarett & Doull's. Toxicology : The Basic Science of Poisons* (pp. 321-350). McGraw-Hill Companies, Inc.
- Purchase, I. F. H. ., Longstaff, E., Ashby, A., Styles, J. A., Anderson, D., Lefevre, P. A., & Westwood, F. R. (1976). Evaluation of six short term tests for detecting organic chemical

- carcinogens and recommendations for their use. *Nature*, 264, 624–627.
<https://doi.org/10.1038/264624a0>
- Quillardet, P., Huismant, O., Dyarit, R., & Hofnung, M. (1982). SOS chromotest , a direct assay of induction of an SOS function in Escherichia coli K-12 to measure genotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(October), 5971–5975.
- Reddy, M. V., & Randerath, K. (1986). Nudasease PI-mediated enhancement of sensitivity of 32 P-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts. *Carcinogenesis*, 7(9), 1543–1551. <https://doi.org/10.1093/carcin/7.9.1543>
- Reifferscheid, G., & Heil, J. (1996). Validation of the SOS / umu test using test results of 486 chemicals and comparison with the Ames test and carcinogenicity data. *Mutation Research*, 369, 129–145.
- Reinik, M., Tamme, T., Roasto, M., Juhkam, K., Tenno, T., & Kiis, A. (2007). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in meat products and estimated PAH intake by children and general population in Estonia. *Food Additives and Contaminants*, 24(04), 429–437.
- Rohrmann, S., Overvad, K., Bas Bueno-de-Mesquita, H., Jakobsen, M. U., Egeberg, R., Tjønneland, A., Nailler, L., Boutron-Ruault, M.-C., Clavel-Chapelon, F., Krogh, V., Palli, D., Panico, S., Tumino, R., Ricceri, F., Bergmann, M. M., Boeing, H., Li, K., Kaaks, R., Johansson, I., ... Jakob Linseisen, A. (2013). Meat consumption and mortality -results from the European Prospectives Insectigation into Cancer and Nutrition. *BMC Medicine*, 11(63), 1–12. <http://www.biomedcentral.com/1741-7015/11/63>
- Rojas, E., Lopez, M. C., & Valverde, M. (1999). Single cell gel electrophoresis assay : methodology and applications. *Journal of Chromatography B*, 722, 225–254.
- Romé, P., Prigent, C., & Giet, R. (2010). Le fuseau mitotique, le centrosome et le cancer : trouvez l'intrus ! *Médecine/Sciences*, 26(4), 377–383.
<https://doi.org/10.1051/medsci/2010264377>
- Rosefort, C., Fauth, E., & Zankl, H. (2004). Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay. *Mutagenesis*, 19(4), 277–284. <https://doi.org/10.1093/mutage/geh028>
- Ruan, E. D., Juárez, M., Thacker, R., Yang, X., Dugan, M. E. R., & Aalhus, J. L. (2014). Dietary

- vitamin E effects on the formation of heterocyclic amines in grilled lean beef. *Meat Science*, 96(2), 849–853. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.09.016>
- Rydberg, B., & Johanson, K. J. (1978). Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In P. C. Hanwalt & C. Friedberg (Eds.), *DNA Repair Mechanisms* (pp. 465-468). *Academie Press, New York*.
- Saks, M., Upreti, S., Rajendra, S. V., & Dang, R. (2017). Genotoxicity: Mechanisms, Testing Guidelines and Methods. *Global Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 1(5), 1–6. <https://doi.org/10.19080/GJPPS.2017.02.555575>
- Sandhu, M. S., White, I. R., & Mc Pherson, K. (2001). Systematic Review of the Prospective Cohort Studies on Meat Consumption and Colorectal Cancer Risk :A Meta-Analytical Approach. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 10, 439–446.
- Santarelli, R. L., Pierre, F., & Corpet, D. E. (2008). Processed meat and colorectal cancer: A review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutrition and Cancer*, 60(2), 131–144. <https://doi.org/10.1080/01635580701684872>
- Santarelli, R. L., Vendevre, J., Naud, N., Taché, S., Guéraud, F., Viau, M., Genot, C., Corpet, D. E., & Pierre, F. H. F. (2010). Meat Processing and Colon Carcinogenesis : Cooked , Nitrite-Treated , and Oxidized High-Heme Cured Meat Promotes Mucin-Depleted Foci in Rats. *Cancer Prevention Research*, 3(7), 852–864. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-09-0160>
- Sanz-Serrano, J., López de Cerain, A., Garayoa, R., Azqueta, A., & Vettorazzi, A. (2019). Genotoxicity evaluation of fried meat: A comprehensive review. *Food and Chemical Toxicology*, 110943. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110943>
- Sanz Alaejos, M., Ayala, J. H., González, V., & Afonso, A. M. (2008). Analytical methods applied to the determination of heterocyclic aromatic amines in foods. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 862(1–2), 15–42. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.11.040>
- Sanz Alaejos, Maite, & Afonso, A. M. (2011). Factors That Affect the Content of Heterocyclic Aromatic Amines in Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(2), 52–108. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00141.x>
- Sarniguet, C. (2016). *Etude de l'effet co-initiateur du fer héminique et du 4-hydroxynonéol*,

- un produit d'oxydation des lipides insaturés, sur la cancérogenèse colorectale chez le rat : Dénombrement des foyers de cryptes aberrantes* [Thèse de doctorat, Université de Toulouse]. Archives des thèses de l'Université de Toulouse. https://oatao.univ-toulouse.fr/17365/1/Sarniguet_17365.pdf
- Sasaki, Y. F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Taniguchi, K., & Tsuda, S. (2002). The comet assay with 8 mouse organs: Results with 39 currently used food additives. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 519(1–2), 103–119. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00128-6](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00128-6)
- Schins, R. P. F. (2002). Mechanisms of genotoxicity of particles and fibers. *Inhalation Toxicology*, 14(1), 57–78. <https://doi.org/10.1080/089583701753338631>
- Schisler, M. R., Moore, M. M., & Gollapudi, B. B. (2013). In Vitro Mouse Lymphoma (L5178Y Tk +/- -3.7.2C) Forward Mutation Assay. In A. Dhawan & M. Bajpayee (Eds.), *Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (pp. 27–50). Springer Science+Business Media New York.
- Sekihashi, K., Saitoh, H., Saga, A., Hori, K., Nakagawa, M., Miyagawa, M., & Sasaki, Y. F. (2003). Effect of in vitro exposure time on comet assay results. *Environmental Mutagen Research*, 25(2), 83–86. <https://doi.org/10.3123/jems.25.83>
- Shah, N., Nariya, A., Pathan, A., Desai, P., & Shah, J. (2019). Monosodium glutamate induced impairment in antioxidant defense system and genotoxicity in human neuronal cell line IMR-32. *EurAsian Journal of BioSciences*, 13, 1121–1128.
- Sharif, R., Ghazali, A. R., Rajab, N. F., Haron, H., & Osman, F. (2008). Toxicological evaluation of some Malaysian locally processed raw food products. *Food and Chemical Toxicology*, 46(1), 368–374. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.08.010>
- Shimada, C., Kano, K., Sasaki, Y. F., Sato, I., & Tsudua, S. (2010). Differential colon DNA damage induced by azo food additives between rats and mice. *Journal of Toxicological Sciences*, 35(4), 547–554. <https://doi.org/10.2131/jts.35.547>
- Šimko, P. (2002). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoke flavouring food additives. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 770(1–2), 3–18. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00438-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00438-8)

- Singh, L., Varshney, J. G., & Agarwal, T. (2016). Polycyclic aromatic hydrocarbons' formation and occurrence in processed food. *Food Chemistry*, 199, 768–781. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.074>
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184–191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- Skog, K. I., Johansson, M. A. E., & Jägerstad, M. I. (1998). Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: A review on formation, occurrence and intake. *Food and Chemical Toxicology*, 36(9–10), 879–896. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(98\)00061-1](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(98)00061-1)
- Skopek, T. R., Liber, H. L., Penman, B. W., & Thilly, W. G. (1978). Isolation of a human lymphoblastoid line heterozygous at the thymidine kinase locus: possibility for a rapid human cell mutation assay. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 84(2), 411–416.
- Speit, G., & Rothfuss, A. (2012). The Comet Assay : A Sensitive Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage and Repair. In L. Bjergbæk (ed.), *DNA Repair Protocols, Methods in Molecular Biology* (pp. 79-90). Springer Science+Business Media New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-998-3>
- Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*, 111(1), A3.B.1-A3.B.3. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>
- Sugimura, T., Sato, S., Nagao, M., Yahagi, T., Matsushima, T., Seino, Y., Takeuchi, M., & Kawachi, T. (1976). Overlapping of carcinogens and mutagens. In D. Alberts & L. M. Hess (Eds.), *Fundamentals in cancer prevention* (pp. 191-215). University Park Press.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Tanaka, R. (2007). Inhibitory effects of xanthone on paraquat- and NaNO₂- induced genotoxicity in cultured cells. *Journal of Toxicological Sciences*, 32(5), 571–574. <https://doi.org/10.2131/jts.32.571>

- Thompson, C., Morley, P., Kirkland, D., & Proudlock, R. (2005). Modified bacterial mutation test procedures for evaluation of peptides and amino acid-containing material. *Mutagenesis*, 20(5), 345–350. <https://doi.org/10.1093/mutage/gei045>
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., & Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), 206–221. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J)
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(2), 87–108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>
- Tsuda, M., Takahashi, Y., Nagao, M., Hirayama, T., & Sugimura, T. (1980). Inactivation of mutagens from pyrolysates of tryptophan and glutamic acid by nitrite in acidic solution. *Mutation Research*, 78, 331–339.
- Tsuda, S., Murakami, M., Matsusaka, N., Kano, K., Taniguchi, K., & Sasaki, Y. F. (2001). DNA Damage induced by red food dyes orally administered to pregnant and male mice. *Toxicological Sciences*, 61(1), 92–99. <https://doi.org/10.1093/toxsci/61.1.92>
- Turesky, R. J., Yuan, J. M., Wang, R., Peterson, S., & Yu, M. C. (2007a). Tobacco smoking and urinary levels of 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole in men of Shanghai, China. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 16(8), 1554–1560. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-0132>
- Turesky, R. J., Goodenough, A. K., Ni, W., McNaughton, L., LeMaster, D. M., Holland, R. D., Wu, R. W., & Felton, J. S. (2007b). Identification of 2-amino-1,7-dimethylimidazo[4,5-g]quinoxaline: An abundant mutagenic heterocyclic aromatic amine formed in cooked beef. *Chemical Research in Toxicology*, 20(3), 520–530. <https://doi.org/10.1021/tx600317r>
- Turkez, H., Arslan, M. E., & Ozdemir, O. (2017). Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 13(10), 1089–1098. <https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1375097>
- Türkoğlu, Ş. (2007). Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa*

- L. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 626(1–2), 4–14. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.07.006>
- Vernet, E. (2015). *Evaluation du potentiel génotoxique in vitro de particules sur des cultures de cellules pulmonaires humaines* [Thèse de doctorat non publiée]. Université Claude Bernard - Lyon 1.
- Vignet, C. (2015). *Altération de la physiologie des poissons exposés à des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) : comportement et reproduction* [Thèse de doctorat, Université de La Rochelle]. Archives des thèses de La Rochelle. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01174986/document>
- Wakabayashi, K., Nagao, M., Esumi, H., & Sugimura, T. (1992). Food-derived Mutagens and Carcinogens. *Cancer Research*, 52, 2092s-2098s.
- Westerink, W. (2011). *The development of improved and new in vitro assays for detecting the genotoxic and non-genotoxic carcinogenic potential of chemicals in the discovery phase of drug development* [Thèse de doctorat, Université de Wageningen, Pays-Bas]. Archives des thèses de Université de Wageningen. <https://edepot.wur.nl/159546>
- Wretling, S., Eriksson, A., Eskhult, G. A., & Larsson, B. (2010). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Swedish smoked meat and fish. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(3), 264–272. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.10.003>
- Wyatt, M. D., & Pittman, D. L. (2006). Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. *Chemical Research in Toxicology*, 19(12), 1580–1594. <https://doi.org/10.1021/tx060164e>
- Yabiku, H. Y., Martins, M. S., & Takahashi, M. Y. (1993). Levels of benzo [a] pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke flavour and some smoked foods. *Food Additives and Contaminants*, 10(4), 399–405. <https://doi.org/10.1080/02652039309374163>
- Yang, J., Tadokoro, T., Keijzers, G., Mattson, M. P., & Bohr, V. A. (2010). Neurons Efficiently Repair Glutamate-induced Oxidative DNA Damage by a Process Involving CREB-mediated Up-regulation of Apurinic Endonuclease 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(36), 28191–28199. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.082883>
- Yilmaz, S., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D., & Çelik, M. (2014). DNA damage in human lymphocytes

- exposed to four food additives in vitro. *Toxicology and Industrial Health*, 30(10), 926–937. <https://doi.org/10.1177/0748233712466132>
- Yoshida, D., & Matsumoto, T. (1978). Changes in mutagenicity of protein pyrolyzates by reaction with nitrite. *Mutation Research*, 58, 35–40.
- Yoshimi, N., Sugie, S., Iwata, H., Mori, H., & Williams, G. M. (1988). Species and sex differences in genotoxicity of heterocyclic amine pyrolysis and cooking products in the hepatocyte primary culture/dna repair test using rat, mouse, and hamster hepatocytes. *Environmental Mutagenesis*, 12(1), 53–64. <https://doi.org/10.1002/em.2860120108>
- Yurchenko, S., & Mölder, U. (2007). The occurrence of volatile N-nitrosamines in Estonian meat products. *Food Chemistry*, 100(4), 1713–1721. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.017>
- Zeiger, E. (2013). Bacterial mutation assays. In A. Dhawan & M. Bajpayee (Eds.), *Genotoxicity Assessment : Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (pp. 3-26). Springer Science+Business Media New York. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-529-3_1
- Zennouche, N. (2005). *Le test des comètes : Validation et études de sa sensibilité et spécificité in vitro et in vivo* [Thèse de doctorat, Université Henri Poincaré-Nancy 1]. Archives des thèses de l'Université de Lorraine. <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01733874/document>
- Zhou, C., Li, Z., Diao, H., Yu, Y., Zhu, W., Dai, Y., Chen, F. F., & Yang, J. (2006). DNA damage evaluated by γ H2AX foci formation by a selective group of chemical/physical stressors. *Mutat Res*, 604(1–2), 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.12.004>.DNA
- Zhou, L., Zahid, M., Anwar, M. M., Pennington, K. L., Cohen, S. M., Wisecarver, J. L., Shostrom, V., Mirvish, S. S., Zhou, L., Zahid, M., Anwar, M. M., Pennington, K. L., Cohen, S. M., Wisecarver, J. L., Shostrom, V., & Suggestive, S. S. M. (2016). Suggestive evidence for the induction of colonic aberrant crypts in mice fed sodium nitrite. *Nutrition and Cancer*, 68(1), 105–112. <https://doi.org/10.1080/01635581.2016.1102298>

ANNEXES

Annexe I : Préparation des milieux de culture et des réactifs utilisés dans les tests de génotoxicité.

I. Milieux de culture et réactifs pour le test d'Ames

I.1 Milieu TSA (Tryptone Soja Agar)

Milieu TSA	40 g
Eau distillée	1000 ml

I.2 Milieu liquide pour cultures bactériennes (Bouillon nutritif Oxoïd n° 2)

Bouillon nutritif Oxoïd n° 2	10 g
Eau distillée	400 ml

I.3 Gélose de fond

➤ **Solution de glucose à 40%**

Glucose anhydre	20 g
Eau distillée	50 ml

Filtrer la solution sur un Sterifilm 0,22 µm (filtre MILLIPORE 500 ml)

➤ **Milieu Vogel Bonner (Milieu E)**

Dans un bécher de 2 L, introduire environ 500 ml d'eau stérile très chaude (80 à 100 °C environ) et faire dissoudre sur agitateur magnétique dans l'ordre et en agitant :

Sulfate de magnésium $MgSO_4, 7 H_2O$	10 g
Acide citrique monohydrate	100 g
Hydrogénophosphate dipotassique anhydre $K_2 HPO_4$	500 g
Hydrogénophosphate de sodium et d'ammonium $NaNH_4 HPO_4, 4 H_2O$	175 g

Compléter à 1000 ml

➤ **Préparation de la gélose de fond**

Agar Oxoid	15 g
Solution de glucose à 40%	50 ml
Milieu E	20 ml
Eau Stérile	970 ml

I.4 Milieu M (0,5 mM)

L-Histidine	209,6 mg
D-Biotine	244 mg

Eau distillée stérile (légèrement tiède) 2000 ml

Agiter sur agitateur magnétique, à froid, pendant au moins 4 heures jusqu'à dissolution complète des ingrédients.

Filtrer à l'aide d'une trompe à vide sur filtre Millex 0,2 μm dans des bouteilles de stockage (sous flux laminaire).

I.5 Gélose molle de surface

Agar oxoïd 6 g
Chlorure de sodium 5 g
Eau distillée stérile 1000 ml

Porter le mélange à ébullition jusqu'à solubilisation et clarification puis porter à l'autoclave pour stérilisation pendant 15 minutes à 120° C.

Maintenir la gélose en surfusion dans un bain marie à 45 -50° C, puis ajouter 10 % (concentration finale) de milieu M.

Répartir à l'aide d'un répartiteur automatique Wheaton à raison de 2 ml en petits tubes stériles placés au bain-marie à sec à 45° C \pm 1.

I.6 Réactifs pour la préparation du S9-mix

I.6.1 Solution KCl 1,65 M (123,2 mg/ml)

Chlorure de potassium anhydre 12,32 g
Eau distillée stérile 100 ml

Stériliser la solution à l'autoclave pendant 15 minutes à 120° C.

I.6.2 Solution MgCl₂ 0,4 M (81,2 mg/ml)

Chlorure de magnésium (6 H₂O) 8,12 g
Eau distillée stérile 100 ml

Stériliser la solution à l'autoclave pendant 15 minutes à 120° C.

I.6.3 Solution d'amide nicotinique adénine-dinucléotide phosphate (NADP) 0,1 M (78,7 mg/ml)

NADP 5 g
Eau distillée stérile 63,5 ml

Stériliser la solution par filtration sur membrane Millex 0,45 μm .

I.6.4 Solution de glucose 6 phosphate 1 M (304 mg/ml)

Glucose 6 phosphate	5 g
Eau distillée stérile	16,45 ml

Stériliser la solution par filtration sur membrane Millex 0,45 µm.

I.6.5 Tampon phosphate pH 7,4 à 0,2 M➤ **Préparation de la solution A**

Na H ₂ PO ₄ , H ₂ O	13,8 g
Eau distillée stérile	500 ml

➤ **Préparation de la solution B**

Na ₂ HPO ₄	14,2 g
Eau distillée stérile	500 ml

➤ **Préparation de la solution tampon**

Solution A	100 ml
Solution B	450 ml

I.7 Solution de NaOH 0,02 N (0,8 g/l)

NaOH	80 mg
Eau distillée	100 ml

I.8 Solution d'ampicilline à 1 mg/ml

Ampicilline trihydrate	100 mg
Solution NaOH à 0,02 N	100 ml

Stériliser la solution par filtration sur membrane Millex 0,45 µm dans un flacon stérile.

I.9 Solution de tétracycline à 40 µg/ml

Tétracycline	4 mg
Eau distillée	100 ml

Stériliser la solution par filtration sur membrane Millex 0,45 µm dans un flacon stérile.

I.10 Solution de cristal violet à 1 mg/ml

Cristal violet	100 mg
----------------	--------

Eau distillée stérile	100 ml
-----------------------	--------

II. Milieux de culture et réactifs pour le test du micronoyau

II.1 Milieu RPMI 0 (milieu de culture de base)

Ce milieu contient en concentration finale 2 g/l de bicarbonate de sodium, 10 ml/l d'acides aminés non essentiels, 200 UI/ml de pénicilline, 50 µg/ml de streptomycine et 0.2 ml d'HCl 7.5 N.

RPMI de base (poudre)	10,43 g
Acides aminés non essentiels	10 ml
Pénicilline/streptomycine	4 ml
Eau	1000 ml
NaHCO ₃	2 g
HCl 7.5 N	0,2 ml

II.2 Milieu RPMI 10

Milieu RPMI 0 auquel sont ajoutés à 10% de sérum de cheval décomplémenté, 0.05% d'acide pluronique (solution de poloxamer 188), 2% de L-glutamine, 2% de pyruvate de sodium et 0.25% d'amphotéricine B.

RPMI 0 (préparation interne)	840 ml
L-glutamine à 3% (préparation interne)	6,4 ml
Pyruvate de sodium 20mg/ml (préparation interne)	9,2 ml
Sérum de cheval décomplémenté	95 ml
Amphotéricine B (préparation interne)	60 µl
Solution de poloxamer 188	4,8 ml

II.3 Milieu de lavage pour le test de génotoxicité (60 ml)

Ce milieu contient : milieu RPMI 0 + 1% d'une solution de poloxamer 188 à 10%.

RPMI 0	60 ml
Solution de poloxamer 188 à 10%	600 µl

II.4 Milieu du choc hypotonique pour le test de génotoxicité (60 ml)

Ce milieu contient : milieu RPMI 0 dilué au ½ dans l'eau distillée + 1% d'une solution de poloxamer 188 à 10%.

RPMI 0	30 ml
Eau distillée	30 ml
Solution de poloxamer 188 à 10%	600 µl

II.5 Solution de fixation pour le test de génotoxicité (72 ml)

Cette solution contient : 3 volumes d'éthanol absolu + 1 volume d'acide acétique.

Acide acétique	18 ml
Ethanol absolu	54 ml

II.6 Solution MTT à 0.5 mg/ml pour le test de cytotoxicité (30 ml)

Cette solution contient : solution à 5 mg/ml (dans PBS) diluée au 1/10^{ème} dans le milieu Dulbecco sans rouge de phénol.

Milieu Dulbecco	27 ml
Solution MTT à 5 mg/ml	3 ml

II.7 Solution Isopropanol/HCl pour le test de cytotoxicité (36 ml)

Isopropanol	34,5 ml
HCl à 1 N	1,5 ml

II.8 Réactifs pour la préparation du S9-mix

II.8.1 Préparation du NADP à 25 mg/ml

La préparation est effectuée à partir de la solution de NADP à 0.1 M (utilisée pour le test d'Ames).

- Mélanger 0.4 ml de NADP à 0.1 M + 0.86 ml d'eau distillée stérile.
- Prélever 1 ml de cette solution pour 5 ml de S9 mix.

II.8.2 Préparation du glucose-6-phosphate (G6P) à 180 mg/ml

La préparation est effectuée à partir de la solution de G6P à 1 M (utilisée pour le test d'Ames).

- Mélanger 0.8 ml de G6P à 1 M + 0.55 ml d'eau stérile.
- Prélever 1 ml de cette solution pour 5 ml de S9 mix.

II.8.3 Préparation du KCl à 150 mM (11.18 g/l)

KCl	1,118 g
Eau distillée	100 ml

III. Réactifs du test de comètes

III.1. Solution de NaOH à 10 N

Hydroxyde de sodium (NaOH)	200 g
Eau distillée	500 ml

III.2. Solution d'EDTA à 200 mM (pH 10)

Ethylènediaminetétraacétate disodique (Na ₂ EDTA)	14,9 g
Eau distillée	200 ml

III.3. Préparation de la solution de lyse

➤ Solution en sels

Eau distillée	700 ml
NaCl	146,1 g
Na ₂ EDTA	37,2 g
Trizma base	1,2 g
Eau distillée	700 ml
NaOH	8 g

Ajuster le pH à 10 puis compléter le volume à 900 ml. Conserver à température ambiante pour 6 mois maximum.

➤ Solution de lyse

Solution en sels	72 ml
Triton X-100	0,8 ml
DMSO	8 ml

III.4. Solution de neutralization (Tris-HCl à 0,4 M)

Trisma base	48,5 g
Eau distillée	1000 ml
pH	7,5

III.5. Tampon d'électrophorèse

Solution de NaOH à 10 N	30 ml
Solution d'EDTA à 200 mM	5 ml
Eau distillée	965 ml

pH > 13

III.6. Solution de bromure d'éthidium (2 µg/ml)

Bromure d'éthidium 20 µg

Eau distillée 1 ml

Diluer à 1/ 10^{ème} pour obtenir une concentration finale de 2 µg/ml.

Annexe II : Témoin négatif (DMSO) historiques du test d'Ames.

Résultats des essais effectués au laboratoire avec le témoin négatif (DMSO) (50 études de Novembre 2016 – Octobre 2018).

Souches	Témoin négatif (DMSO)	
	Sans activation métabolique	Avec activation métabolique
	Moyenne ± écart-type (Écarts extrêmes)	Moyenne ± écart-type (Écarts extrêmes)
TA1537	5.7 ± 2.4	6.6 ± 2.7
	(0 – 13)	(1 – 16)
TA98	16.1 ± 4.7	24.2 ± 6.1
	(4 – 34)	(10 – 43)
TA100	94.2 ± 15.2	90.1 ± 20.2
	(53 – 138)	(46 – 154)
TA102	179.8 ± 42.6	229.1 ± 58.8
	(76 – 332)	(96 – 424)

Annexe III : Témoin négatif (éthanol pure) historiques du test d'Ames.

Résultats des essais effectués au laboratoire avec le témoin négatif (éthanol pure) (49 études de Novembre 2015 – Novembre 2018).

Souches	Témoin négatif (éthanol)	
	Sans activation métabolique	Avec activation métabolique
	Moyenne ± écart-type (Écarts extrêmes)	Moyenne ± écart-type (Écarts extrêmes)
TA1537	6.0 ± 2.7	6.6 ± 2.7
	(0 – 19)	(1 – 16)
TA98	17.5 ± 5.7	24.2 ± 6.1
	(5 – 37)	(10 – 43)
TA100	92.0 ± 18.3	90.1 ± 20.2
	(51 – 230)	(46 – 154)
TA102	145.9 ± 54.6	229.1 ± 58.8
	(40 – 326)	(96 – 424)

Annexe IV : Témoins positifs historiques du test d'Ames.

Résultats des essais effectués au laboratoire avec les témoins positifs (49 études de Novembre 2015 – Novembre 2018).

Souches	Témoins positifs ($\mu\text{g/ml}$)	Sans activation métabolique	Avec activation métabolique
		Moyenne \pm écart-type (Écart extrême)	Moyenne \pm écart-type (Écart extrême)
TA1537	2- anthramine (2)	329.6 \pm 144.5	341.4 \pm 157.5
		(78 – 694)	(102 – 1056)
310.8 \pm 114.5		1924.7 \pm 691.9	
(124 – 800)		(278 – 4016)	
779.8 \pm 210.4		1977.3 \pm 724.5	
(336 – 1616)		(640 – 4352)	
TA102	Benzo(a)pyrène (2)	1224.3 \pm 282.0	1090.1 \pm 249.2
		(512 – 2336)	(560 – 1952)

Annexe V : Témoins historiques du test des micronoyaux in vitro (en microméthode) sur cellules lymphoblastoïdes humaines TK6.

Résultats des essais effectués au laboratoire avec le témoin négatif et le témoin positif (20 études de Janvier 2018 - Décembre 2018).

	Nombre de cellules micronucléées par 2000 cellules mononucléées						
	Sans activation métabolique					Avec activation métabolique	
	S- 3h /+24h		S- 27h /+0h			S+ 3h /+24h	
	Contrôle négatif	Mitomycine C 0,5 $\mu\text{g/ml}$	Contrôle négatif	Mitomycine C 0,2 $\mu\text{g/ml}$	Griséofulvine 5 $\mu\text{g/ml}$	Contrôle négatif	Cyclophosphamide 5 $\mu\text{g/ml}$
	Moyenne	5,1	161,6	4,8	152,5	58,7	3,6
Ecart-type	2,26	53,79	1,81	61,26	14,94	1,85	17,59
Minimum	1	68	2	37	37	1	33
Maximum	9	240	8	270	83	8,5	92

Annexe VI : Pourcentages d'ADN dans la queue de la comète obtenus lors du test de comètes avec les extraits héliques.

Extraits héliques	Doses ($\mu\text{g/ml}$)	% d'ADN dans la queue de la comète	
		4 h	24 h
Corned-beef fabriqué en Algérie	C-	20,3	14,63
	C+	25,22	23,95
	25	20,77	18,59
	50	22,74	16,6
	100	21,3	17,68
Corned-beef importé	C-	20,3	14,27
	C+	22,7	26,47
	25	25,22	18,23
	50	20	16,1
	100	20,38	18,7
Saucisson salami du bœuf	C-	12,22	14,79
	C+	19,16	20,88
	25	19,61	13,84
	50	17,75	20,04
	100	12,93	12,58
K-chir	C-	21,3	18,11
	C+	20,9	25,7
	25	15,6	16,6
	50	20,9	20,1
	100	16,5	19,7
Rôti de poulet fumé	C-	14,95	22,21
	C+	26,92	29,13
	25	22,23	22,27
	50	15,36	21,91
	100	22,75	26,24
Rôti de bœuf cuit fumé	C-	14,95	21,68
	C+	26,92	25,98
	25	24,06	14,32
	50	25,87	15,90
	100	24,31	14,66
Chawarma de poulet	C-	14,96	21,68
	C+	26,92	30,10
	25	24,01	27,31
	50	23,31	27,31
	100	28,94	28,71
Jambon de bœuf	C-	19,49	14,4
	C+	21,56	26,47
	25	24,07	17,96
	50	24,64	20,17
	100	23,73	14,06

Annexe VII : Pourcentages d'ADN dans la queue de la comète obtenus lors du test de comètes avec les extraits méthanoliques.

Extraits méthanoliques	Doses (µg/ml)	% d'ADN dans la queue de la comète	
		4 h	24 h
Saucisson salami du bœuf	C-	13,52	16,72
	C+	27,78	30,57
	125	24,36	23,93
	250	17,40	21,22
	500	23,83	17,20
Rôti de poulet fumé	C-	17,32	17,22
	C+	39,33	34,30
	125	15,57	26,53
	250	15,86	17,52
	500	16,35	18,79
Rôti de bœuf cuit fumé	C-	20,62	21,38
	C+	32,11	36,93
	125	20,61	20,37
	250	18,97	26,52
	500	21,76	23,87
Chawarma de poulet	C-	21,47	14,52
	C+	25,98	30,13
	125	17,12	17,46
	250	12,96	17,53
	500	15,19	18,79
Jambon de bœuf	C-	14,08	21,38
	C+	26,13	33,34
	125	13,39	25,31
	250	21,57	22,50
	500	18,51	21,71

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publication internationale

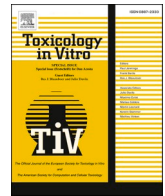
Naima Chamlal, Djamel Eddine Benouareth, Messaouda Khallef, Sophie Simar-Mentières, Fabrice Nesslany. Mutagenicity and genotoxicity assessments of some industrially processed meat products in Algeria. *Toxicology in vitro* 73, 2021.

Communications internationales

- 1- Naima Chamlal, Messaouda Khallef, Choayb Bounar, Yassamine Lahiouel, Imane Guerroui, Djamel Eddine Benouareth. Effets mutagénique et génotoxique des viandes transformées : cas du corned-bœuf. Séminaire International sur l'Agroalimentaire. Université 8 Mai 1945 Guelma, 2018.
- 2- Naima Chamlal. Evaluation of mutagenic potential of roasted chicken by Ames test. Séminaire international de "Progress in Natural Antioxidants: sources, mechanisms of actions and valorization in health". Université Abderrahmane Mira de Béjaia, 2019.

Communications nationales

- 1- Naima Chamlal, Djamel Eddine Benouareth, Messaouda Khallef, Fabrice Nesslany. Assessment of the cytotoxic and genotoxic potential of processed meat "cachir" by in vitro micronucleus assay. Séminaire nationale de Biodiversité, Biologie Médicale et Ecotoxicologie Environnementale. Université 20 août 1955 Skikda, 2019.
- 2- Naima Chamlal, Messaouda Khallef, Fabrice Nesslany, Djamel Eddine Benouareth. Evaluation de l'effet mutagène de salami fabriqué en Algérie en utilisant le test d'Ames. Séminaire nationale de Microbiologie et les Sciences Alimentaires. Université de Jijel, 2019.



Mutagenicity and genotoxicity assessments of some industrially processed meat products in Algeria

Naima Chamlal^a, Djamel Eddine Benouareth^b, Messaouda Khallel^b, Sophie Simar-Mentières^c, Fabrice Nesslany^{c,d,*}

^a Laboratoire de biologie, eau et environnement, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, Département de Biologie, Université 8 Mai 1945 Guelma, BP 401, Guelma 24000, Algeria

^b Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'univers, Université 8 Mai 1945 Guelma, BP 401, Guelma 24000, Algeria

^c Laboratoire de Toxicologie Génétique, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr. Calmette, Lille Cedex 59019, France

^d Université de Lille, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, EA4483-IMPECS, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Industrially processed meat
Mutagenicity
Genotoxicity
Ames test
In vitro micronucleus assay

ABSTRACT

Processed meat products are presumptive sources of mutagens and genotoxins for consumers. Several epidemiological studies have reported that these products' high intakes have a positive link with cancer incidence. In Algeria, industrially processed meat products are widely consumed. However, there are no earlier studies involving their genotoxic activity. For this end, the current study aimed at evaluating the mutagenicity and the genotoxicity of some representative industrially processed meat products sold in popular supermarkets. All samples were extracted by established method, using both polar and non-polar solvents. The meat extracts mutagenicity was assessed by Ames test, using four strains of *Salmonella typhimurium* in the presence and absence of metabolic activation, and subsequently by treat and wash assay for extracts showing biologically significant results. The genotoxicity was determined in TK6 human lymphoblastoid cells using the *in vitro* micronucleus assay in micromethod. The results showed that all extracts analyzed induce no mutagenic activity. However, one of these extracts induced a biologically significant increase in the number of micronucleated cells. Our findings indicate the importance of the genetic damage detection for taking measures to suppress or reduce the exposure to harmful contaminants and encourage further research investigating genotoxic effects of industrially processed meat worldwide.

1. Introduction

Meat is a valuable food and is an important source of protein of high biological value, essential amino acids, vitamins and iron (Domingo and Nadal, 2016). However, it is well-established that its transformation and preservation, by chemical and/or physical methods, have the potential to generate mutagenic and genotoxic agents (Ruan et al., 2014). It has become evident that these compounds have a high degree of correlation with carcinogenicity (McCann et al., 1975). Several epidemiological studies have also shown that there is a causal relationship between the consumption of meat, especially in processed form, and the appearance of several types of cancer notably colorectal, gastric, esophageal and bladder cancers (Cross et al., 2007; Deoula et al., 2019; Lippi et al., 2016). Indeed, the International Agency for Research on Cancer has

been classified the processed meat as carcinogenic to humans (Group 1; IARC, 2018).

There have been many reports regarding the mutagenic effects of cooking meat which is prepared by grilling, frying, boiling or broiling (Bjeldanes et al., 1983; Commoner et al., 1978; Nagao et al., 1977; Omoruyi et al., 2014; Pariza et al., 1979). However, very little attention has been focused on the mutagenic and genotoxic potential of industrially processed foods, particularly processed meat products. Krone and Iwaoka (1984) reported for the first time the mutagenic activity of some commercially canned meats like corned-beef, beef broth and roast beef. Study in Finland by Omoruyi and Pohjanvirta (2014) showed also that industrially processed, cold-smoked beef, smoked chicken and grilled turkey induce mutagenic activity in Ames test with the TA 100 *Salmonella typhimurium* strain with and without metabolic activation.

* Corresponding author at: Laboratoire de Toxicologie Génétique, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr. Calmette, Lille Cedex 59019, France.

E-mail address: fabrice.nesslany@pasteur-lille.fr (F. Nesslany).

Therefore, these products appear to be a probable important source of mutagens. In Algeria, the low production and high prices of meats lead a large majority of consumers to move towards the consumption of industrially processed meat products, which may constitute a risk for human health (Chikhi and Bencharif, 2016). The fact of the high consumption of these products available in various flavors and low cost when compared to raw meats, emphasizes the importance of investigating their mutagenic and genotoxic activity. Furthermore, food additives like coloring agents, flavoring agents and preservatives might be the potential cause of genotoxicity (Nepalia et al., 2018). On the other hand, the processing/cooking methods of meat such as smoking, roasting and grilling might also be responsible for genotoxic compounds formation. Among these genotoxic compounds, polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic aromatic amines which are produced at high and mild cooking temperatures, respectively (Sanz-Serrano et al., 2020).

Even though mutagen substances may appear during household cooking, the consumers can reduce their formation using lower temperature methods like steaming, boiling or microwave heating. While, this opportunity is not available to the consumers of industrially processed meat products (Krone and Iwaoka, 1987). Hence, if these final products exhibit any genotoxic activity, they can cause deleterious effects for consumers.

In this context, the present study aimed at evaluating the potential mutagenic and genotoxic effects of polar and non-polar extracts of some industrially processed meat products currently available in Algerian supermarkets using the Ames test on four *S. typhimurium* strains together with complementary test "treat and wash test" and the *in vitro* micronucleus test on the TK6 human lymphoblastoid cell line, respectively.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Chemicals used in this study were purchased from the following suppliers: dimethyl sulfoxide (DMSO) from Acros Organics (Noisy le Grand, France); RPMI 1640 medium, horse serum, non-essential amino acids and phosphate-buffered saline (PBS) from GIBCO Invitrogen SARM (Cergy-Pontoise, France); distilled water from Fresenius (Bad Homburg, Germany); HCl, L-glutamine, Na₂HPO₄, absolute ethanol and 2-nitrofluorene from Merck (Darmstadt, Germany); acetic acid, NaH₂PO₄ and MgCl₂ from Merck VWR (Fontenay-sous-Bois, France); oxidant nutrient broth N^o 2 and Agar from Oxoid (Basingstoke, United Kingdom); glucose-6-phosphate and NADP from Roche (Mannheim, Germany); sodium bicarbonate, L-histidine, biotin, Giemsa stain, sodium pyruvate, penicillin, streptomycin, pluronic acid, KCl, NaCl, amphotericin B, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT), benzo[a]pyrene, cyclophosphamide, sodium azide, 9-amino-acridine, griseofulvin and mitomycin C from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France); 2-anthramine and 4-nitroquinoline-N-oxide (4-NQO) from Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Germany).

2.2. Metabolic activation system

After enzymatic induction with Arochlor 1254, rat liver S9 was prepared according to Ames et al. (1975) and Maron and Ames (1983).

In the bacterial mutation assay, one mL of S9-mix contained 0.1 mL of S9, 0.02 mL of MgCl₂ (0.4 M), 0.02 mL of KCl (1.65 M), 0.5 mL of phosphate buffer (0.2 M, PH 7.4), 0.04 mL of NADP (0.1 M), 0.005 mL of glucose-6-phosphate (1 M) and 0.315 mL of distilled water.

In the *in vitro* micronucleus assay, one mL of S9-mix contained 0.4 mL of S9, 0.2 mL of KCl (150 mM), 0.2 mL of NADP (25 mg/mL) and 0.2 mL of glucose-6-phosphate (180 mg/mL). Except S9, all co-factors were filtered through a 0.45 µm sterilizing membrane before use. S9-mix was used under a volume of 5%, for a final S9 concentration of 2%.

Table 1

Packaging and ingredients of industrially processed meat products.

Meat products	Packaging	Ingredients
Corned-beef made in Algeria	Canned	Frozen ground beef, salt, nitrite (0.6% sodium nitrite), food additives: gelling agent (carrageenan), stabilizers (sodium Di, Tri and polyphosphate) 2000 mg/Kg.
Imported corned-beef	Canned	Beef, cereals, salt, sugar and preservative INS 250.
Salami	Vacuum-packed	Beef, water, corn starch, nitrite salt (sodium nitrite), spices, table salt, dextrose, food additives: stabilizer (sodium polyphosphate), preservatives (sodium acetate and sodium diacetate), coloring agent (Allura red AC), flavor enhancer (monosodium glutamate, disodium guanilate, disodium inosinate), acidifier (citric acid), antioxidant (sodium lactate, ascorbic acid), anti-caking agent (silicon dioxide).
K-chir	Vacuum-packed	Chicken meat, water, corn starch, green olive, vegetable oil, beet, nitrite salt (0.6% sodium nitrite), soy protein, flavor extract (Di and Tri phosphate, monosodium glutamate, dextrose, soy, spices, sodium erythorbate, citric acid, onions), food additives: stabilizer (sodium polyphosphate 2000 mg/Kg), antioxidants (sodium citrate), Color (Allura red AC 25 mg/Kg).
Smoked roast chicken	Vacuum-packed	Chicken escalope, mechanically separated chicken, potato starch, corn starch, mixed spices, nitrite salt, food additives: stabilizers (INS 451 i, INS 450 i), acidifiers (INS 325, INS 330).
Smoked roast beef	Vacuum-packed	Fresh beef, salt, water, spice blend, food additives: stabilizer (sodium diphosphate).
Chicken chawarma	Vacuum-packed	Chicken meat, water, corn starch, nitrite salt (sodium nitrite), spices, table salt, dextrose, food additives: stabilizer (sodium polyphosphate), preservative (sodium acetate and sodium diacetate), flavor enhancer (monosodium glutamate, disodium guanilate, disodium inosinate), acidifier (citric acid), antioxidant (sodium lactate, ascorbic acid), anti-caking agent (silicon dioxide).
Beef jambon	Vacuum-packed	Beef, vegetable protein, edible oil, potato starch, mix of spices, herbs, stabilizer E450 AC, food coloring E120, beef flavoring.

2.3. Sampling

A total of eight industrially processed meat products (corned-beef made in Algeria, imported corned-beef, salami, K-chir, smoked roast chicken, smoked roast beef, chicken chawarma and beef jambon) were purchased from a popular supermarket in Algeria. All these products are directly consumed, without any cooking process. In this study, one batch per product was analyzed. The ingredients and packaging of each product are listed in the Table 1. We carefully confirmed that all meat products were extracted before the expiry date revealed on the packages.

2.4. Sample preparation

Industrially processed meat samples were extracted in the non-polar phase by using n-hexane and in the polar phase by using methanol (Sharif et al., 2008; Takahashi et al., 1979). Each sample (about 200 g) was minced and then extracted with 800 mL of methanol or n-hexane. The mixture was left on stirring overnight at room temperature. Then it was separated by centrifugation at 3000 rpm for 15 min, followed by double filtration through Whatman No. 1 filter paper. This procedure was repeated twice with 400 mL of the same solvents. The filtrates were pooled and evaporated using a rotary evaporator. Hexane extracts were reconstituted in ethanol, while methanol extracts were reconstituted in

DMSO for *in vitro* analyses.

2.5. Bacterial mutagenicity assays

The mutagenic activity of meat extracts was evaluated initially by the standard plate incorporation assay. Extracts showing a significant outcome in this assay were subjected to treat-and-wash assay to check to what degree a release of histidine, peptides and/or proteins from the sample contributed to the result.

2.5.1. Standard plate incorporation assay

The standard plate incorporation assay, with and without metabolic activation, was performed using the histidine-requiring *S. typhimurium* strains as described by Ames et al. (1975), Maron and Ames (1983) and OECD Guideline No.471 (OECD, 1997) except that 4 strains were used instead of 5 (TA1537, TA98, TA100 and TA102). The tester strains were grown in Oxoid nutrient broth No. 2 at 37 °C, with shaking (120 rpm), for 12–13 h to obtain a final concentration of 1–2.10⁹ cells/mL. Without metabolic activation, a 0.1 mL aliquot of this fresh culture and 0.1 mL of the test substance were successively added to 2 mL of molten top agar containing 10% of 0.5 mM biotin/histidine solution. This mixture was then agitated and poured on glucose minimal agar plates. The plates were incubated for 48 h at 37 °C. The method with metabolic activation was the same except that immediately before spreading in the plates, 0.5 mL of the S9-mix was added in top agar, *i.e.* 2% of S9 in final concentration.

Five different doses of the meat extracts were tested: 50, 150, 500, 1500 and 5000 µg per plate for methanol extracts, *i.e.* up to the recommended dose and 10, 30, 100, 300 and 1000 µg per plate for n-hexane extracts. The top dose was limited by the solubility of the extracts in the solvent. DMSO or ethanol was used as negative controls for all strains. Positive controls were assayed concurrently [without S9-mix: 9-aminoacridine (50 µg/plate) for TA1537, 2-nitrofluorene (2 µg/plate) for TA98, sodium azide (1 µg/plate) for TA100, mitomycin C (0.125 µg/plate) for TA102; with S9-mix: 2-anthramine (2 µg/plate) for TA1537, TA98 and TA100 and benzo[*a*]pyrene (2 µg/plate) for TA102]. Triplicate plates were used for the test samples and positive controls, while sextuplicate plates for negative controls. Histidine-revertant colonies were counted 48 h after treatment. A response is considered positive in the assay if a dose-response relationship is observed on three consecutive doses with, for the highest increase, an induction ratio greater than or equal to 2 (TA98, TA100 and TA102) or 3 (TA1537) (Mortelmans and Zeiger, 2000). In parallel, data were analyzed by means of Dunnett's method (Mahon et al., 1989) allowing the comparison of the values for each dose with the values for the corresponding negative control.

2.5.2. Treat-and-wash assay

The treat and wash assay was conducted according to the method described by Thompson et al. (2005). The following were successively added to a sterile 15 mL tube: 0.05 mL of bacterial culture, 0.5 mL of S9-mix or phosphate buffer and 0.05 mL of sample extract dilution. This mixture was incubated for 90 min at +37 °C with stirring. Then, 15 mL of a wash solution of Oxoid No. 2 nutrient broth in phosphate buffered saline (1:7 v/v) were added and the washed bacteria were collected by centrifugation at 3000 rpm for 30 min. All but approximately 0.7 mL of the supernatant was removed and discarded, and the bacteria were resuspended in the residual supernatant prior to plating *via* top agar.

2.6. *In vitro* micronucleus assay in micromethod

The *in vitro* micronucleus assay in micromethod was carried out as previously detailed by Nessler and Marzin (1999) except that TK6 human lymphoblastoid cells were used instead of L5178Y mouse lymphoma cells.

2.6.1. Cells

The TK6 human lymphoblastoid cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, USA) and has been described previously (Honma, 2005; Liber and Thilly, 1982; Skopek et al., 1978). This cell line is derived from the spleen of a patient with hereditary spherocytic anaemia and has a number of properties that are advantageous for mutagenicity and genotoxicity studies: a stable genome, stable spontaneous mutation frequencies, a functional p53 protein, and the ability to grow in suspension culture. The average doubling time of the TK6 cells was 16–18 h.

2.6.2. Cell culture

The TK6 human lymphoblastoid cells were cultured in RPMI 1640 growth medium (RPMI 0), which was supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated horse serum, 2 mg/mL sodium bicarbonate, 10 mL/L non-essential amino acids, 200 U/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin, 2.5 µg/mL amphotericin B, 200 µg/mL L-glutamine, 200 µg/mL sodium pyruvate and 500 µg/mL pluronic acid (RPMI 10 medium). Cells were maintained in tissue-culture flasks at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ for 24 h.

2.6.3. Cell treatment

Exponentially growing TK6 cells, at a density of 6.10⁵ cells/mL, were treated in 96-well microplates with different doses of the sample extracts. Each treatment was conducted in duplicate and was coupled to cytotoxicity assessment. Three types of treatment were performed:

- In the first treatment, the cells were treated in the presence of metabolic activation for 3 h followed by a recovery period of 24 h (+S9, 3 h/+24 h).
- In the second, the cells were treated without metabolic activation for 3 h followed by recovery period of 24 h (–S9, 3 h/+24 h).
- In the last one, the cells were continuously treated without metabolic activation for 27 h and were harvested immediately (–S9, 27 h/+ 0 h).

At the end of each treatment or recovery period, the microplates were centrifuged for 6 min at 1000 rpm. The cells were washed (180 µL RPMI 0 culture medium +0.1% pluronic acid), gently resuspended and centrifuged. The cells were then treated for 4 min with 150 µL of hypotonic solution (RPMI 0 diluted 1:1, v/v in distilled water +0.1% pluronic acid) and pre-fixed by adding 50 µL of cold Carnoy's fixative (absolute ethanol/acetic acid, 3:1, v/v). After centrifugation, the cells were fixed with 150 µL of Carnoy's fixative for at least 10 min at room temperature, then 24 h at 4 °C. Subsequently, the cells were re-suspended, dropped onto clean glass slides and dried at room temperature at least overnight. Finally, air-dried slides were stained for 10 min with 2% Giemsa aqueous solution, rinsed with distilled water and dried at room temperature. Positive controls [without S9-mix: mitomycin C at 0.5 µg/mL (3 h/ + 24 h treatment), mitomycin C at 0.2 µg/mL and griseofulvin at 5 µg/mL (27 h/ + 0 h treatment); with S9-mix: cyclophosphamide at 5 µg/mL] were included in each corresponding treatment schedule. Micronuclei were counted in at least 2000 intact mononucleated cells for the three retained doses (1000 mononucleated cells per slide) at 500 × magnification. The identification of micronuclei was conducted according to previously described by Miller et al. (1995). The statistical significance of differences between doses was determined using the CHI2-test. Differences were considered statistically significant ($p < 0.05$). A product is classified as genotoxic to TK6 cells if at least one of the test concentrations exhibits a statistically significant increase compared with the concurrent negative control, the increase is dose-related in at least one experimental condition when evaluated with an appropriate trend test and any of the results are outside the distribution of the historical negative control data.

Table 2
Mutagenic activity of methanol extracts of industrially processed meat products.

Methanol extracts	Doses µg/ plate	Number of revertant colonies (Mean ± standard deviation (SD))							
		TA1537		TA98		TA100		TA102	
		0	0	0	0	0	0	0	0
Corned-beef made in Algeria	0 ^a	10.3 ± 2.3	14.5 ± 6.2	32.0 ± 3.2	35.0 ± 5.3	103.0 ± 10.7	85.5 ± 9.6	203.3 ± 48.7	226.3 ± 39.7
	50	8.7 ± 3.8	9.7 ± 3.1	28.0 ± 6.6	33.3 ± 2.9	106.0 ± 10.8	76.3 ± 6.0	234.7 ± 11.4	399.3 ± 8.3*
	150	13.7 ± 3.1	13.3 ± 6.7	24.3 ± 6.5	39.0 ± 2.0	112.0 ± 17.5	90.0 ± 6.0	250.3 ± 24	420.0 ± 68.1*
	500	10.7 ± 2.5	10.0 ± 5.3	47.3 ± 15.9	46.7 ± 4.6	126.3 ± 15.5	94.3 ± 11.1	335.7 ± 22.9*	400.7 ± 98*
	1500	14.0 ± 4.4	14.7 ± 7.6	41.3 ± 3.8	58.3 ± 12.9*	175.7 ± 16.1*	137.0 ± 28.4	342.0 ± 44.5*	422.0 ± 39.9*
	5000	ov	ov	ov	ov	185.3 ± 30.1*	152.7 ± 55.1*	ov	ov
Positive control	^b	484 ± 144.3*	236.7 ± 13.3*	274.7 ± 25.8*	1658.7 ± 247.1*	874.7 ± 208.7*	1461.3 ± 219.7*	1394.7 ± 552.1*	528.0 ± 77.1*
Imported corned-beef	0 ^a	9.0 ± 2.4	6.7 ± 2.5	14.8 ± 2.1	22.7 ± 4.9	106.5 ± 6.8	89.8 ± 7.1	156.0 ± 16.6	167.8 ± 36.9
	50	10.7 ± 5.0	5.3 ± 2.1	13.7 ± 2.9	24.0 ± 4.6	112.7 ± 7.5	106.7 ± 7.4	162.7 ± 3.1	238.7 ± 68.2
	150	10.7 ± 3.1	5.0 ± 1.0	15.0 ± 1.7	21.0 ± 4.6	96.3 ± 1.5	103.0 ± 11.1	146.0 ± 14.0	219.3 ± 38.2
	500	6.3 ± 1.2	5.3 ± 2.9	13.0 ± 2.6	24.3 ± 2.1	94.0 ± 12.3	93.7 ± 9.6	134.7 ± 17.2	270.7 ± 45.0*
	1500	3.3 ± 0.6	4.0 ± 1.7	21.0 ± 4.6	27.0 ± 2.0	81.0 ± 8.7*	101.7 ± 11.4	164.0 ± 26.2	332.0 ± 2.0*
	5000	3.7 ± 1.5	9.0 ± 5.0	17.3 ± 5.5	46.0 ± 1.7*	86.0 ± 1.7	145.3 ± 3.1*	81.7 ± 5.8*	390.0 ± 22.7*
Positive control	^b	290.7 ± 97.2*	326.7 ± 137.2*	482.7 ± 24.4*	1536.0 ± 84.7*	302.7 ± 54.5*	1509.3 ± 33.3*	960.0 ± 69.7*	725.3 ± 128.3*
Salami	0 ^a	10.5 ± 2.4	13.5 ± 4.0	24.3 ± 6.1	23.8 ± 9.2	99.2 ± 13.1	91.0 ± 12.0	194.5 ± 25.6	223.0 ± 31.3
	50	11.7 ± 1.2	15.7 ± 3.2	22.7 ± 4.7	25.3 ± 1.5	97.7 ± 4.0	106.3 ± 9.6	230.0 ± 55.2	263.0 ± 19.5
	150	11.0 ± 5.3	16.7 ± 2.3	28.3 ± 3.1	29.0 ± 4.4	106.3 ± 10.8	107.7 ± 6.7	277.3 ± 9.0	415.3 ± 17.2*
	500	9.0 ± 2.6	13.7 ± 3.1	29.0 ± 3.6	25.3 ± 3.5	112.7 ± 4.9	103.7 ± 5.0	376.0 ± 45.7*	386.0 ± 25.0*
	1500	10.0 ± 5.3	12.3 ± 4.0	29.0 ± 3.6	33.0 ± 1.7	129.0 ± 7.2*	125.3 ± 13.8*	364.7 ± 44.4*	470.7 ± 68.9*
	5000	8.3 ± 2.5	13.7 ± 5.5	28.0 ± 6.1	34.3 ± 6.7	217.3 ± 16.9*	129.7 ± 8.0*	ov	ov
Positive control	^b	316.7 ± 80.8*	204.7 ± 24.2*	271.3 ± 26.4*	2650.7 ± 547.8*	561.3 ± 74.3*	2800.0 ± 688.0*	874.7 ± 124.0*	869.3 ± 203.9*
K-chir	0 ^a	10.5 ± 2.4	13.5 ± 4.0	24.3 ± 6.1	23.8 ± 9.2	99.2 ± 13.1	91.0 ± 12.0	194.5 ± 25.6	223.0 ± 31.3
	50	9.7 ± 4.0	17.0 ± 5.6	19.3 ± 4.9	31.0 ± 6.2	104.0 ± 15.1	96.0 ± 19.2	214.7 ± 18.6	285.3 ± 14.5
	150	8.7 ± 2.1	20.3 ± 5.5	17.7 ± 3.1	20.3 ± 6.4	92.7 ± 6.7	92.3 ± 11.2	271.3 ± 23.9	273.3 ± 44.1
	500	8.0 ± 1.7	11.3 ± 2.5	19.5 ± 2.1	19.7 ± 6.4	99.3 ± 20.4	113.3 ± 8.5	267.3 ± 30.7	313.3 ± 12.2
	1500	7.3 ± 1.5	10.0 ± 4.4	18.3 ± 4.0	22.7 ± 4.0	79.0 ± 9.5	93.3 ± 8.1	324.0 ± 51.4*	366.7 ± 71.8*
	5000	14.0 ± 1.0	10.7 ± 6.7	18.0 ± 1.7	22.7 ± 4.0	109.0 ± 21.9	110.7 ± 21.2	352.0 ± 45.0*	387.3 ± 32.9*
Positive control	^b	316.7 ± 80.8*	204.7 ± 24.2*	271.3 ± 26.4*	2650.7 ± 547.8*	561.3 ± 74.3*	2800.0 ± 688.0*	874.7 ± 124.0*	869.3 ± 203.9*
Smoked roast chicken	0 ^a	5.7 ± 1.6	5.8 ± 2.9	12.8 ± 3.9	22.8 ± 1.8	92.3 ± 9.0	92.8 ± 14.4	150.7 ± 16.5	157.2 ± 13.8
	50	4.7 ± 0.6	7.7 ± 1.2	13.3 ± 1.5	17.7 ± 0.6	76.7 ± 9.0	95.7 ± 2.9	139.3 ± 17.2	171.3 ± 15.8
	150	6.7 ± 2.1	9.7 ± 5.5	12.0 ± 5.3	25.0 ± 7.8	87.0 ± 8.5	82.0 ± 10.4	122.7 ± 7.6	215.3 ± 36.5
	500	4.3 ± 2.1	5.3 ± 1.2	11.0 ± 6.1	27.7 ± 2.9	87.7 ± 10.2	103.7 ± 5.5	144.7 ± 25.5	228.3 ± 24.8*
	1500	9.7 ± 2.1	6.7 ± 4.9	17.7 ± 1.5	30.7 ± 3.8	88.7 ± 2.5	100.3 ± 4.7	182.0 ± 15.1	281.0 ± 36.0*
	5000	9.3 ± 4.7	9.7 ± 3.1	16.7 ± 7.1	31.3 ± 10.1	123.3 ± 8.4*	160.7 ± 19.4*	161.3 ± 34.8	304.0 ± 25.0*
Positive control	^b	354.0 ± 83.2*	210.7 ± 28.0*	256.0 ± 49.2*	1882.7 ± 24.4*	392.7 ± 41.7*	2805.3 ± 64.7*	1040.0 ± 264.4*	386.7 ± 143.6*
Smoked roast beef	0 ^a	10.2 ± 2.9	16.0 ± 1.7	26.8 ± 4.6	39.8 ± 3.0	98.0 ± 8.3	85.8 ± 13.4	183.7 ± 37.8	230.3 ± 50.7
	50	9.0 ± 6.1	15.7 ± 4.5	21.7 ± 4.0	33.7 ± 6.8	102.0 ± 9.8	94.3 ± 14.3	220.7 ± 45.0	291.3 ± 38.1
	150	10.7 ± 3.5	17.0 ± 6.0	28.3 ± 6.1	37.7 ± 2.1	125.3 ± 3.1*	109.3 ± 8.5	251.3 ± 41.3	393.3 ± 41.0*
	500	11.3 ± 2.1	15.0 ± 4.4	26.3 ± 4.2	38.3 ± 4.0	110.7 ± 8.1	114.3 ± 4.2	248.7 ± 41.1	398.7 ± 16.0*
	1500	10.3 ± 4.0	17.3 ± 3.5	22.0 ± 4.4	38.0 ± 5.3	99.3 ± 6.5	114.0 ± 10.0	356.0 ± 12.0*	430.0 ± 44.5*
	5000	12.7 ± 1.5	12.3 ± 1.5	35.5 ± 10.6	39.3 ± 4.0	118.0 ± 1.7*	130.3 ± 15.5*	336.7 ± 29.1*	447.3 ± 76.8*
Positive control	^b	609.7 ± 112.1*	320.0 ± 83.8*	501.3 ± 30.3*	1488.0 ± 226.8*	661.3 ± 33.3*	2501.3 ± 563.7*	1085.3 ± 266.6*	516.0 ± 34.2*
Chicken chawarma	0 ^a	7.0 ± 2.3	8.5 ± 4.3	16.3 ± 4.4	27.5 ± 1.9	89.0 ± 5.6	84.3 ± 6.7	164.7 ± 36.1	185.0 ± 26.2
	50	6.7 ± 2.1	7.7 ± 1.2	15.0 ± 6.0	21.0 ± 3.5	124.0 ± 15.1*	84.0 ± 10.0	212.7 ± 26.4	183.3 ± 52.6
	150	5.7 ± 2.1	9.0 ± 5.0	14.0 ± 5.6	23.7 ± 5.9	88.7 ± 9.2	110.7 ± 19.2	218.0 ± 37.4	236.7 ± 32.4
	500	7.3 ± 1.2	3.7 ± 2.1	19.0 ± 3.5	23.0 ± 4.4	92.0 ± 12.5	102.7 ± 19.7	256.7 ± 42.9*	233.3 ± 19.0

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Methanol extracts	Doses µg/ plate	Number of revertant colonies (Mean ± standard deviation (SD))							
		TA1537		TA98		TA100		TA102	
		0	0	0	0	0	0	0	0
	1500	11.3 ± 3.1	7.0 ± 1.7	15.0 ± 5.2	32.0 ± 8.5	144.0 ± 10.6*	113.3 ± 5.0	322.7 ± 27.6*	287.3 ± 18.1*
	5000	7.7 ± 5.1	5.7 ± 1.5	21.3 ± 3.8	36.3 ± 9.9	154.7 ± 28.4*	170.7 ± 24.0*	384.0 ± 33.4*	312.0 ± 30.2*
Positive control	^b	542.7 ± 69.9*	235.3 ± 28.9*	245.3 ± 53.7*	2378.7 ± 536.7*	432.0 ± 34.9*	2741.3 ± 320.5*	546.7 ± 56.9*	477.3 ± 56.9*
Beef jambon	^{0a}	10.2 ± 2.9	16.0 ± 1.7	26.8 ± 4.6	39.8 ± 3.0	98.0 ± 8.3	85.8 ± 13.4	183.7 ± 37.8	230.3 ± 50.7
	50	12.3 ± 1.5	13.0 ± 1.7	27.3 ± 5.7	47.0 ± 3.6	100.7 ± 9.1	94.3 ± 22.2	163.3 ± 3.1	202.7 ± 6.1
	150	12.3 ± 4.7	14.7 ± 5.1	30.3 ± 6.1	44.3 ± 12.3	127.3 ± 8.1*	108.0 ± 9.6	207.3 ± 26.6	282.7 ± 14.2
	500	6.3 ± 3.2	12.7 ± 3.2	35.3 ± 6.8	47.0 ± 7.0	109.3 ± 6.7	117.3 ± 14.8	261.3 ± 44.4	287.3 ± 15.5
	1500	13.3 ± 3.1	14.0 ± 2.6	36.3 ± 2.5	49.3 ± 9.8	113.7 ± 8.1	110.0 ± 7.5	254.7 ± 30.3	357.3 ± 23.2*
	5000	12.0 ± 2.6	13.7 ± 4.0	47.0 ± 10.6*	58.0 ± 14.7	157.0 ± 20.7*	145.3 ± 11.8*	212.7 ± 21.2	402.7 ± 11.0*
Positive control	^b	609.7 ± 112.1*	320.0 ± 83.8*	501.3 ± 30.3*	1488.0 ± 226.8*	661.3 ± 33.3*	2501.3 ± 563.7*	1085.3 ± 266.6*	516.0 ± 34.2*

^a DMSO; ov: Overgrown revertants; <FX>: Biologically significant.

* Statistically significant difference compared with the negative control ($p < 0.01$);

^b TA100 (– S9): Sodium azide (1); TA1537 (– S9): 9-amino-acridine (50); TA98 (– S9): 2-nitrofluorene (2); TA102 (– S9): Mitomycin C (0.125). TA1537, TA98, TA100 (+ S9): 2-anthramine (2); TA102 (+ S9): benzo(a)pyrene (2).

2.6.4. Cytotoxicity assay

The Cytotoxicity was evaluated using a 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide colorimetric method (Borenfreund et al., 1988). Metabolically active mitochondrial dehydrogenases convert the tetrazolium salt MTT to insoluble purple colored formazan crystals. The extent of formazan formed is proportional to cell viability. After the treatment, cells were centrifuged, washed with RPMI 0 and the MTT solution (5 mg/mL in Dulbecco medium without phenol-red) was added to each well in a volume of 100 µl. Plates were then incubated for an additional 2 h at 37 °C in the dark. Thereafter, MTT solution was discarded and 100 µl of HCl/isopropanol solution (1:11.5, v/v) was added in order to dissolve the formazan products. Culture plates were gently shaken for 15 min. Finally, the absorbance was read at 550 and 620 nm using a spectrophotometer microplate reader (Thermo Labsystems, USA). To exclude cytotoxicity as a confounding factor, the cell viability should be equal or more than 55 ± 5%. At least six doses were retained for genotoxicity assay.

3. Results

3.1. Standard plate incorporation assay

The mutagenic activity of polar and non-polar extracts of industrially processed meat products, expressed as the number of revertant colonies per plate, is presented in Tables 2 and 3.

For corned-beef made in Algeria and beef jambon extracts, methanol and n-hexane extracts induced no biologically significant changes in the mean number of revertants (induction ratio higher than 2) in the four *S. typhimurium* strains TA1537, TA98, TA100 and TA102, either in the absence or in the presence of metabolic activation system. In contrast, a statistically significant increases in the mean number of revertants were noted for methanol extracts in TA98, TA100 and TA102 strains in the absence and/or presence of S9 fraction and for hexane extracts in TA102 strain in the presence of S9 fraction.

The methanol extract of imported corned-beef induced a biologically and statistically significant increases in the mean number of revertants in strain TA98 at the highest dose of 5000 µg/plate, and in strain TA102 at the two highest doses of 1500 and 5000 µg/plate in the presence of S9, and a statistically but not biologically significant increases in strains TA100 and TA102 in the absence and presence of S9. As for hexane extract, in strain TA102, a statistically significant response was observed at the dose of 300 µg/plate in the absence of S9.

For salami extracts, the methanol extract induced also a biologically and statistically significant increases in the mean number of revertants in strain TA100 at the dose of 5000 µg/plate in the absence of S9 and in strain TA102 at the dose of 1500 µg/plate in the presence of S9. Furthermore, a statistically but not biologically significant increases in the mean number of revertants were noted in TA100 and TA102 strains for both methanol and hexane extracts.

For K-chir extracts, biologically significant responses were observed, for hexane extract, in strain TA102 at the doses of 30, 100 and 300 µg/plate in the presence of metabolic activation, with a clear dose–response relationship. Statistically significant responses were also observed in strains TA100 and/or TA102 for both methanol and hexane extracts.

For smoked roast chicken and smoked roast beef extracts, the methanol extracts showed statistically significant increases in the mean number of revertants in strains TA100 and TA102. However, for hexane extracts, neither a biologically nor a statistically significant increase in the mean number of revertants was noted in the four *S. typhimurium* strains TA1537, TA98, TA100 and TA102.

Finally, for chicken chawarma extracts, the methanol extract showed biologically and statistically significant increases in the number of revertants in strains TA100 and TA102. In return, for hexane extract, a statistically significant increase in the mean number of revertants was observed in strain TA98 at the three highest doses of 100, 300 and 1000 µg/plate in the presence of S9 fraction.

No signals of toxicity and/or precipitation were observed during the test performance.

3.2. Treat-and-wash assay

Table 4 shows the results of the mutagenic potential using the treat-and-wash assay for the industrially processed meat extracts, which produced an induction ratio higher than 2 in the standard plate incorporation assay.

No biologically and/or statistically significant changes in the mean number of revertants in strain TA98 for methanol extract of imported corned-beef, in strains TA100 and TA102 for methanol extract of chicken chawarma and in strain TA100 for methanol extract of salami. In return, statistically but not biologically significant changes in the mean number of revertants were noted in strain TA102 for methanol extract of imported corned-beef at the two highest doses of 1500 and 2500 µg/plate, for methanol extract of salami at the dose of 1500 µg/plate and for hexane extract of K-chir at the doses of 30 and 250 µg/

Table 3 (continued)

Hexane extracts	Doses µg/plate	Number of revertant colonies (Mean ± standard deviation (SD))							
		TA1537		TA98		TA100		TA102	
		0	0	0	0	0	0	0	0
Positive control	1000	6.7 ± 2.1	7.7 ± 0.6	21.0 ± 5.3	36.0 ± 19.3	94.7 ± 16.8	95.7 ± 4.5	166.0 ± 26.2	217.7 ± 26.6
	^b	249.3 ± 9.0*	405.3 ± 52.8*	202.7 ± 20.0*	2240.0 ± 284.4*	348.0 ± 29.5*	2944.0 ± 461.2*	830.7 ± 237.7*	374.7 ± 58.0*

^a Ethanol; <FX>: Biologically significant.

* Statistically significant difference compared with the negative control;

^b TA100 (-S9): Sodium azide (1); TA1537 (-S9): 9-amino-acridine (50); TA98 (-S9): 2-nitrofluorene (2); TA102 (-S9): Mitomycin C (0.125). TA1537, TA98, TA100 (+ S9): 2-anthramine (2); TA102 (+ S9): benzo(a)pyrene (2).

plate. Indeed, the data highlight clear negative results in the modified Ames test. Taking into account the nature of test items, it can be assumed that the significant effects observed in the main trials are probably due to the presence of amino acid (histidine), peptides and/or proteins in the extracts.

3.3. In vitro micronucleus assay in micromethod

The results of the *in vitro* micronucleus assay of industrially processed meat extracts are demonstrated in Tables 5 and 6.

The values of the cytotoxicity calculated in TK6 human lymphoblastoid cells were above the limit recommended in the OECD guideline No. 487 (value ≥55 ± 5%). The positive controls showed a significant increase (*p* < 0.001) in micronucleated cell frequencies in the presence and absence of S9-mix.

For all methanol extracts, no significant effects on the formation of

micronuclei in TK6 cells either in the presence or in the absence of metabolic activation were observed except a statistically significant increase in chicken chawarma methanol extract only at the lowest dose of 125 µg/mL in the 3 h treatment followed by 24 h recovery period with S9 fraction.

For hexane extracts, only the corned-beef made in Algeria in the 27 h continuous treatment without metabolic activation showed a biologically significant increase in the number of micronucleated cells at the highest dose of 100 µg/mL, with 20 micronucleated cells/2000 mononucleated cells *versus* 10 for the negative control; thus it can be concluded that it has a weak genotoxic effect.

4. Discussion

Industrially processed meat products are widely consumed by the Algerian population especially because of their availability in various

Table 4

Number of revertants in the treat-and-wash assay generated by the different concentrations of sample extracts showing biologically significant in the standard plate incorporation assay.

Sample extracts	Doses µg/plate	Number of revertant colonies (Mean ± standard deviation (SD))				
		TA98	TA100		TA102	
		0	0	0	0	0
Imported corned-beef (methanol extract)	0 ^a	31.3 ± 10.7	-	-	-	203.7 ± 46.7
	50	36.0 ± 7.5	-	-	-	172.7 ± 16.8
	150	39.0 ± 1.4	-	-	-	197.3 ± 30.1
	500	33.3 ± 9.5	-	-	-	277.3 ± 8.1
	1500	35.3 ± 5.7	-	-	-	318.7 ± 12.9*
	2500	38.0 ± 6.1	-	-	-	320.7 ± 18.9*
Positive control	^c	990.7 ± 135.3*	-	-	-	628.0 ± 58.9*
Salami (methanol extract)	0 ^a	-	142.0 ± 6.7	-	-	203.7 ± 46.7
	50	-	105.3 ± 23.2	-	-	226.7 ± 27.0
	150	-	144.0 ± 19.7	-	-	261.3 ± 23.4
	500	-	145.0 ± 23.5	-	-	263.3 ± 31.0
	1500	-	131.0 ± 39.6	-	-	310.7 ± 21.4*
	2500	-	122.0 ± 36.4	-	-	283.3 ± 50.0
Positive control	^c	-	2885.3 ± 1257.9*	-	-	628.0 ± 58.9*
Chicken chawarma (methanol extract)	0 ^a	-	-	114.5 ± 15.6	208.3 ± 23.6	-
	50	-	-	125.3 ± 1.2	226.0 ± 22.5	-
	150	-	-	131.7 ± 1.5	230.0 ± 16.4	-
	500	-	-	146.0 ± 16.1	215.7 ± 43.0	-
	1500	-	-	143.3 ± 9.1	238.7 ± 36.5	-
	2500	-	-	122.3 ± 18.9	209.0 ± 1.0	-
Positive control	^c	-	-	1968.0 ± 180.3*	1050.7 ± 73.9*	-
K-chir (hexane extract)	0 ^b	-	-	-	-	192.3 ± 24.3
	10	-	-	-	-	218.7 ± 41.2
	30	-	-	-	-	279.3 ± 14.7*
	100	-	-	-	-	272.7 ± 4.2
	200	-	-	-	-	236.7 ± 46.6
	250	-	-	-	-	283.3 ± 21.4*
Positive control	^c	-	-	-	-	757.3 ± 89.2*

^a DMSO.

^b Ethanol.

* Significantly different from the negative control at *p* < 0.01.

^c TA98 and TA100 (+ S9): benzo (a) pyrene (15); TA100 (- S9): 4NQO (0.5); TA102 (- S9): Mitomycin C (1); TA102 (+ S9): benzo (a) pyrene (20).

Table 5

In vitro micronucleus assay results in TK6 human lymphoblastoid cells following treatment with methanol extracts of processed meat.*

Methanol extracts	Doses µg/mL	Without S9-mix				With S9-mix	
		3 h short treatment with a 24 h recovery period		27 h continuous treatment without recovery period		3 h short treatment with a 24 h recovery period	
		% RS	MMNC/ 2000 MNC	% RS	MMNC/ 2000 MNC	% RS	MMNC/ 2000 MNC
Corned-beef made in Algeria	0	100	5	100	7	100	7
	125	93.7	3	114.2	4	96	8
	250	101.4	7	110.9	5	95.2	8
	500	106.2	6	111.4	4	96.4	11
	0	100	5	100	7	100	7
Imported corned-beef	125	96.7	7	113.4	9	101.1	5
	250	94.7	3	110.2	12	104.2	6
	500	99.9	3	110.7	10	107.6	7
	0	100	5	100	7	100	7
	125	97.8	3	109.9	7	99.7	7
Salami	250	96.7	4	104.3	6	102.7	10
	500	99.9	6	109.9	12	107.4	9
	0	100	5	100	7	100	7
	125	103.6	4	111.5	11	108.6	11
	250	98	4	102.5	4	113.9	10
K-chir	500	103.1	6	108.7	4	110.4	8
	0	100	9	100	5	100	5
	125	107.8	12	108.3	7	105.6	12
	250	101.8	5	108.3	9	101.3	4
	500	105.6	9	104.2	10	106.5	11
Smoked roast chicken	0	100	9	100	5	100	5
	125	101.3	4	103.2	13	107.1	3
	250	94.4	7	97.8	9	98.8	8
	500	103.8	5	103.9	7	105.6	8
	0	100	9	100	5	100	5
Smoked roast beef	125	101.6	9	106.7	5	106.5	16*
	250	97.5	3	106.2	7	105.6	4
	500	105.6	5	110.9	11	109	8
	0	100	9	100	5	100	5
	125	103.4	4	112.2	8	106.5	7
Chicken chawarma	250	94.9	6	101.5	8	96.8	12
	500	103.4	13	105.8	6	109.2	3
	0	100	9	100	5	100	5
	125	103.4	13	105.8	6	109.2	3
	500	103.4	13	105.8	6	109.2	3
Beef jambon	0.5	64.9	105**	-	-	-	-
Mitomycin C	0.2	-	-	64.3	81**	-	-
Mitomycin C	5	-	-	66.8	45**	-	-
Griseofulvin	5	-	-	-	-	-	-
Cyclophosphamide	5	-	-	-	-	91.4	47**

% RS: percentage of relative survival/negative control; MMNC: micronucleated mononucleated cells; MNC: mononucleated cells;

Threshold of statistical significance as compared with the negative control using the CHI2 test;

* $p < 0.05$.

** $p < 0.01$.

flavors and low cost when compared to raw meats (Chikhi and Bencharif, 2016). Thus, it is very important to assure that processed meat products sold in popular supermarkets do not contain substances which might cause risk to consumers' health. In this regard, a conceivable risk is the formation of mutagenic and genotoxic substances during the industrial processing of meats. Screening studies are useful to check that the processes used by meat industry are sound and appropriate from this point of view (Omoruyi and Pohjanvirta, 2014). This study was performed to ascertain the mutagenic and genotoxic potential of industrially processed meat products. For this intention, both the Ames' test and the *in vitro* micronucleus test were carried out to get an overall idea concerning the effects of these products. Interestingly, this combination of complementary assays allows covering genetic events possibly leading to genotoxicity, i.e. gene mutation and structural and numerical chromosomal aberrations.

With regard to the Ames test, our study shows that the majority of the processed meat samples analyzed was non-mutagenic in standard plate incorporation assay in the presence and absence of metabolic activation using four *S. typhimurium* strains TA1537, TA98, TA100 and TA102. The scarce significant increases in the number of colonies obtained with some extracts (methanol extract of imported corned-beef, salami and chicken chawarma; hexane extract of K-chir) are not actually relevant in

terms of mutagenicity as no such effect occurred when using the treat and wash methodology. Hence, their initial positive results were probably due to a localized release of histidine, peptides or proteins from sample extracts which lead to false-positive results (Khandoudi et al., 2009; Thompson et al., 2005).

The negative results obtained from smoked roast beef and smoked roast chicken with Ames test may be considered as unexpected. Indeed, it is well-established that the polycyclic aromatic hydrocarbons and the heterocyclic amines are the principal mutagens formed in processed meat during smoking and roasting (Jägerstad and Skog, 2005). A possible explanation for these results is in the processing methods used by the industry such as cooking at low temperatures for short periods of time that can decrease or prevent the formation of mutagens (Knize et al., 1994). Omoruyi et al. (2014) have been investigated the mutagenicity of industrially processed foods, including processed meat, using a standard Ames assay, treat and wash and methylcellulose overlay assays. They concluded that the true mutagenic potential of pepper salami remains unclear because this product exhibited mutagenic activity when examined in standard plate incorporation assay using TA100 strain, however, it was found mutagenic only in methylcellulose overlay assay, but not in treat and wash assay. In return, they reported that smoked chicken extract was mutagenic in all three assays (standard Ames assay,

Table 6

In vitro micronucleus assay results in TK6 human lymphoblastoid cells following treatment with hexane extracts of processed meat.

Hexane extracts	Doses µg/mL	Without S9-mix				With S9-mix	
		3 h short treatment with a 24 h recovery period		27 h continuous treatment without recovery period		3 h short treatment with a 24 h recovery period	
		% RS	MMNC/ 2000 MNC	% RS	MMNC/ 2000 MNC	% RS	MMNC/ 2000 MNC
Corned-beef made in Algeria	0	100	8	100	10	100	14
	25	92.2	8	95	9	92.8	5*
	50	90.8	1*	96.3	10	92.2	10
	100	93.7	11	97.2	20	103.4	12
Imported corned-beef	0	100	8	100	10	100	14
	25	86	4	96.8	11	98.7	9
	50	93.5	13	103.2	10	104	10
	100	91.8	11	109.1	11	108	8
Salami	0	100	8	100	10	100	14
	25	84.5	13	97.6	10	102.4	7
	50	89.8	9	98.8	10	104.8	11
	100	90.2	6	107.8	6	110.9	11
K-chir	0	100	8	100	10	100	14
	25	89.2	4	89.9	8	105	6
	50	88.2	7	91.9	12	102.4	4*
	100	94	8	94.3	10	116.3	5*
Smoked roast chicken	0	100	5	100	7	100	6
	25	104.1	7	98.2	8	94.5	2
	50	102.4	7	95.4	9	99	5
	100	102.7	10	95.5	9	97.2	3
Smoked roast beef	0	100	5	100	7	100	6
	25	99.5	10	101	11	103.5	4
	50	89	8	96.2	13	100	3
	100	104.5	10	90.5	13	105.1	3
Chicken chawarma	0	100	5	100	7	100	6
	25	95.7	4	96.6	3	102	1
	50	96.1	4	96.6	8	103.2	12
	100	104.3	2	97.9	8	99	2
Beef jambon	0	100	5	100	7	100	6
	25	98.9	6	104.8	5	103.5	2
	50	92	5	97.6	3	85.7	2
	100	100.3	6	95.9	4	102	7
Mitomycin C	0.5	60.6	87**	–	–	–	–
Mitomycin C	0.2	–	–	64.7	68**	–	–
Griseofulvin	5	–	–	67.4	82**	–	–
Cyclophosphamide	5	–	–	–	–	85.5	39**

% RS: percentage of relative survival/negative control; MMNC: micronucleated mononucleated cells; MNC: mononucleated cells;

Threshold of statistical significance as compared with the negative control using the CHI2 test;

* $p < 0.05$.

** $p < 0.01$.

treat and wash and methylcellulose overlay assays) with the TA100 strain (with and without metabolic activation). In addition, a mutagenic activity has been found in corned-beef and canned roast beef (Krone and Iwaoka, 1984). In contrast to our outcome, the corned-beef, salami, smoked roast beef and smoked roast chicken were non-mutagenic. This difference in the results may be due to the difference in the ingredients and the processing methods of these products on one hand and the difference in the extraction methods and the range of concentrations assayed on the other hand.

As no single assay is capable to detect all types of potential human mutations with 100% prediction or accuracy (Pathak et al., 2018), the complementary *in vitro* micronucleus assay was carried out. Indeed, Kirkland et al. (2011) concluded that the *in vitro* genotoxicity battery including only two tests "Ames and micronucleus" is sufficient to detect all relevant *in vivo* genotoxins and *in vivo* carcinogens. Moreover, the implementation of these 2 complementary tests is in line with the recommendations of EFSA for food and feed safety assessment (EFSA Scientific Committee, 2011). In the present work, most of the products analyzed (87.5%) induced no chromosomal aberration in the presence or absence of S9-mix as indicated in the *in vitro* micronucleus assay performed on human lymphoblastoid TK6 cells. In return, this investigation shows that the non-polar extract of corned-beef made in Algeria

produces a weak genotoxic effect. Due to the complexity of this extract, no exact identification of the agent(s) responsible for the genotoxic activity can be made at the present time, and the source of the genotoxicity will require further investigation. In the case of industrially processed meat products, no more data are available so far about their genotoxicity especially by using the micronucleus test. To the best of our knowledge, this is the first investigation on genotoxicity of these products using *in vitro* micronucleus assay on TK6 human lymphoblastoid cells.

Overall, our results showed that no mutagenic potential was found whatever the industrially processed meat products tested except for one of these products that induced a weak genotoxic effect. Consequently, the present study demonstrates the importance of performing dietary monitoring of processed foods using genotoxicity tests to evaluate their potential harmful effects on consumers. However, further *in vitro* investigations regarding the genotoxic effect of processed meat could be implemented on gastro-intestinal tract target cells (e.g., Human colon T84 or Caco-2 cells). Moreover, more investigations need to be performed with an accurate analytical approach to clear up the exact identity of the chemical compound(s) from complex mixture responsible for genotoxic activity. This task will be necessary to determine the sources of toxic contaminants.

Funding

This work was supported by Institut Pasteur de Lille –France.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgement

We thank Séverine Heumel, Eric Vercauteren and Florent Tiberghien for their technical assistance.

References

- Ames, B.N., McCann, J., Yamasaki, E., 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(75\)90046-1](https://doi.org/10.1016/0165-1161(75)90046-1).
- Bjeldanes, L.F., Morris, M.M., Timourian, H., Hatch, F.T., 1983. Effects of meat composition and cooking conditions on mutagen formation in fried ground beef. *J. Agric. Food Chem.* <https://doi.org/10.1021/jf00115a005>.
- Borenfreund, E., Babich, H., Martin-Alguacil, N., 1988. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays—the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicol. in Vitro.* [https://doi.org/10.1016/0887-2333\(88\)90030-6](https://doi.org/10.1016/0887-2333(88)90030-6).
- Chikhi, K., Bencharif, A., 2016. La consommation de produits carnés en Méditerranée: quelles perspectives pour l'Algérie? Options Méditerranéennes. Ser. A Mediterr. Semin.
- Commoner, B., Vithayathil, A.J., Dolara, P., Nair, S., Madyastha, P., Cuca, G.C., 1978. Formation of mutagens in beef and beef extract during cooking. *Science.* <https://doi.org/10.1126/science.567374> (80).
- Cross, A.J., Leitzmann, M.F., Gail, M.H., Hollenbeck, A.R., Schatzkin, A., Sinha, R., 2007. A prospective study of red and processed meat intake in relation to cancer risk. *PLoS Med.* <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040325>.
- Deoula, M.S., El Kinany, K., Huybrechts, I., Gunter, M.J., Hatime, Z., Boudouaya, H.A., Benslimane, A., Nejari, C., El Abkari, M., Badre, W., El Feydi, A.E., Afkir, S., Abda, N., El Rhazi, K., 2019. Consumption of meat, traditional and modern processed meat and colorectal cancer risk among the Moroccan population: a large-scale case-control study. *Int. J. Cancer.* <https://doi.org/10.1002/ijc.32689>.
- Domingo, J.L., Nadal, M., 2016. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat: what about environmental contaminants? *Environ. Res.* <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.11.031>.
- EFSA Scientific Committee, 2011. Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. *EFSA J.* <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2379>.
- Honma, M., 2005. Generation of loss of heterozygosity and its dependency on p53 status in human lymphoblastoid cells. *Environ. Mol. Mutagen.* <https://doi.org/10.1002/em.20113>.
- IARC, 2018. Red Meat and Processed Meat. IARC Working Group on the evaluation of carcinogenic risks to Humans International Agency for Research on Cancer, IARC Monographs. <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.86.012307>.
- Jägerstad, M., Skog, K., 2005. Genotoxicity of heat-processed foods. In: *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.01.030>.
- Khandoudi, N., Porte, P., Chtourou, S., Nesslany, F., Marzin, D., Le Curieux, F., 2009. The presence of arginine may be a source of false positive results in the Ames test. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.03.010>.
- Kirkland, D., Reeve, L., Gatehouse, D., Vanparys, P., 2011. A core in vitro genotoxicity battery comprising the Ames test plus the in vitro micronucleus test is sufficient to detect rodent carcinogens and in vivo genotoxins. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.12.015>.
- Knize, M.G., Dolbear, F.A., Carroll, K.L., Moore, D.H., Felton, J.S., 1994. Effect of cooking time and temperature on the heterocyclic amine content of fried beef patties. *Food Chem. Toxicol.* [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(94\)90002-7](https://doi.org/10.1016/0278-6915(94)90002-7).
- Krone, C.A., Iwaoka, W.T., 1984. Occurrence of mutagens in canned foods. *Mutat. Res. Lett.* [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(84\)90084-8](https://doi.org/10.1016/0165-7992(84)90084-8).
- Krone, C.A., Iwaoka, W.T., 1987. Commercial food processing operations and mutagen formation. *J. Food Prot.* <https://doi.org/10.4315/0362-028x-50.2.167>.
- Liber, H.L., Thilly, W.G., 1982. Mutation assay at the thymidine kinase locus in diploid human lymphoblasts. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(82\)90308-6](https://doi.org/10.1016/0027-5107(82)90308-6).
- Lippi, G., Mattiuzzi, C., Cervellini, G., 2016. Meat consumption and cancer risk: a critical review of published meta-analyses. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.11.008>.
- Mahon, G.A.T., Middleton, B., Robinson, W.D., Green, M.H.L., Mitchell, I.D.G., Tweats, D.J., 1989. Analysis of data from microbial colony assays. In: Kirkland, D.J. (Ed.), *UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report: Part III Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data.* Cambridge University Press, Cambridge, New York, pp. 26–65.
- Maron, D.M., Ames, B.N., 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.* [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9).
- McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., Ames, B.N., 1975. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* <https://doi.org/10.1073/pnas.72.12.5135>.
- Miller, B.M., Pujadas, E., Gocke, E., 1995. Evaluation of the micronucleus test in vitro using chinese hamster cells: results of four chemicals weakly positive in the in vivo micronucleus test. *Environ. Mol. Mutagen.* <https://doi.org/10.1002/em.2850260309>.
- Mortelmans, K., Zeiger, E., 2000. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00064-6](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00064-6).
- Nagao, M., Honda, M., Seino, Y., Yahagi, T., Sugimura, T., 1977. Mutagenicities of smoke condensates and the charred surface of fish and meat. *Cancer Lett.* [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(77\)80025-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(77)80025-6).
- Nepalia, A., Singh, A., Mathur, N., Kamath, R., Pareek, S., 2018. Assessment of mutagenicity caused by popular baby foods and baby plastic-ware products: an imperative study using microbial bioassays and migration analysis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.002>.
- Nesslany, F., Marzin, D., 1999. A micromethod for the in vitro micronucleus assay. *Mutagenesis.* <https://doi.org/10.1093/mutage/14.4.403>.
- OECD, 1997. *Guideline for the Testing of Chemicals No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test.*
- Omoruyi, I.M., Pohjanvirta, R., 2014. Genotoxicity of processed food items and ready-to-eat snacks in Finland. *Food Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.055>.
- Omoruyi, I.M., Ahamioje, D., Pohjanvirta, R., 2014. Dietary exposure of Nigerians to mutagens and estrogen-like chemicals. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* <https://doi.org/10.3390/ijerph110808347>.
- Pariza, M.W., Ashoor, S.H., Chu, F.S., Lund, D.B., 1979. Effects of temperature and time on mutagen formation in pan-fried hamburger. *Cancer Lett.* [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(79\)80097-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(79)80097-X).
- Pathak, M.P., Policegoudra, R.S., Goyary, D., Das, A., Mandal, S., Chakraborti, S., Bora, N.S., Islam, J., Patowary, P., Raju, P.S., Chattopadhyay, P., 2018. Safety evaluation of an oat grain alkaloid gramine by genotoxicity assays. *Drug Chem. Toxicol.* <https://doi.org/10.1080/01480545.2017.1322605>.
- Ruan, E.D., Juárez, M., Thacker, R., Yang, X., Dugan, M.E.R., Aalhus, J.L., 2014. Dietary vitamin E effects on the formation of heterocyclic amines in grilled lean beef. *Meat Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.09.016>.
- Sanz-Serrano, J., López de Cerain, A., Garayoa, R., Azqueta, A., Vettorazzi, A., 2020. Genotoxicity evaluation of fried meat: a comprehensive review. *Food Chem. Toxicol.* <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110943>.
- Sharif, R., Ghazali, A.R., Rajab, N.F., Haron, H., Osman, F., 2008. Toxicological evaluation of some Malaysian locally processed raw food products. *Food Chem. Toxicol.* <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.08.010>.
- Skopek, T.R., Liber, H.L., Penman, B.W., Thilly, W.G., 1978. Isolation of a human lymphoblastoid line heterozygous at the thymidine kinase locus: possibility for a rapid human cell mutation assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(78\)90185-7](https://doi.org/10.1016/0006-291X(78)90185-7).
- Takahashi, Y., Nagao, M., Fujino, T., Ziro, Yamaizumim, Sugimura, T., 1979. Mutagens in Japanese pickle identified as flavonoids. *Mutat. Res. Toxicol.* [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(79\)90139-3](https://doi.org/10.1016/0165-1218(79)90139-3).
- Thompson, C., Morley, P., Kirkland, D., Proudlock, R., 2005. Modified bacterial mutation test procedures for evaluation of peptides and amino acid-containing material. *Mutagenesis.* <https://doi.org/10.1093/mutage/14.4.403>.

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université 8 Mai 1945 Guelma



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

LE DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ORGANISE



Le Premier Séminaire International sur L'Agroalimentaire

« SIA 2018 »

Attestation de participation

Le président du Premier Séminaire International sur L'Agroalimentaire « SIA 2018 »

organisé le 16 - 17 Octobre 2018, atteste que Mlle/Mm/Mr. : **CHAMLAL Naima** a présenté une

communication Affichée intitulée : **Effets mutagénique et génotoxique des viandes transformés: cas du corned-boeuf**

Co-auteurs: KHALLEF Messaouda, BOUNAR Choayb, LAHIOUEL Yassamine, GUERROUI Imane,

BENOUARETH Djamel Eddine

PRÉSIDENT DU SÉMINAIRE





Democratic and People's Republic of Algeria
Ministry of Higher Education and Scientific Research
University Abderrahmane Mira of Bejaia
Faculty of Nature and Life Sciences



Laboratory of Applied Biochemistry

Certificate of attendance

Awarded to

Prof./Dr./Mr./Mrs. Naima CHAMLAAL
University of Guelma

For her worthy poster presentation on

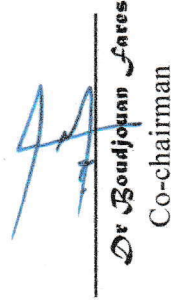
Evaluation of Mutagenic Potential of roasted chicken by Ames Test.
at the International Conference "SINAAN19" on

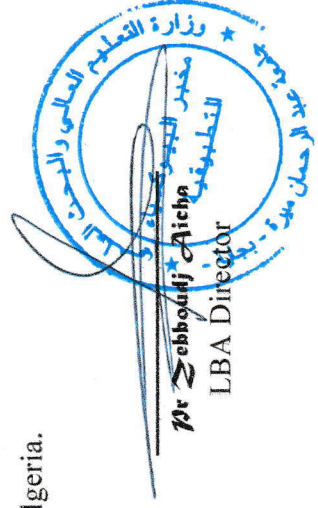
" Progress in Natural Antioxidants: sources, mechanisms of actions and valorization in health "

16-17 October 2019 University of Bejaia, Algeria.

Nour Atmani


Dr Atmani-Lilani Dina
Co-chairman


Dr Boudjouan Fares
Co-chairman





Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université 20 Aout 1955 Skikda
Faculté des Sciences
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

ATTESTATION DE PARTICIPATION



Séminaire National de Biodiversité, Biologie Médicale et Ecotoxicologie Environnementale
Skikda le 30_31 octobre 2019

Le Président du Séminaire National de Biodiversité, Biologie Médicale et Ecotoxicologie Environnementale, atteste que:

Mme.: **CHAMLAL NAIMA**

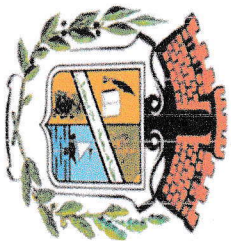
A présentée une communication *Affichée* intitulée

ASSESSMENT OF THE CYTOTOXIC AND GENOTOXIC POTENTIAL OF PROCESSED MEAT "CACHIR" BY IN VITRO

MICRONUCLEUS ASSAY.

Co-auteurs: **BENOUARETH D., KHALLEF2 M. & NESSLANY F.**

Université 20 Aout-1955- Skikda
Faculté des Sciences
Département **Président du SNBBMEE**
Séminaire National de Biodiversité, Biologie Médicale
Et Ecotoxicologie Environnementale
SSNBBMEE 2019
Dr. LAIB Mess.



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ MOHAMED SEDDIK BEN YAHIA-JIJEL
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de Microbiologie Appliquée et Sciences Alimentaires

Attestation de Participation

Nous soussignons que M^{me}, M^{lle}, M. CHAMIAL Naima participé au premier Séminaire National sur la Microbiologie et les Sciences Alimentaires, qui s'est déroulé à l'université de Jijel

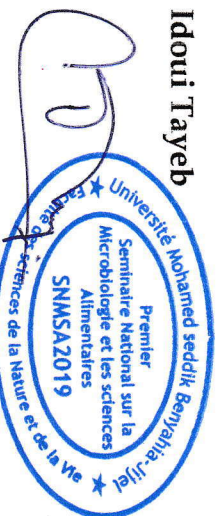
Le 06 et 07 Novembre 2019 avec une communication affichée intitulée :

Evaluation de l'effet mutagène de salami fabriqué en Algérie en utilisant le test d'Ames

Co-auteurs : KHALLEF Messaouda, NESSLANY Fabrice and BENOUARETH Djamel Eddine

Président du séminaire

Idoui Tayeb



Président du comité d'organisation

Boubezari Mohammed Tahar

Résumé

Les viandes transformées sont des sources présumées d'exposition humaine aux composés mutagènes et génotoxiques. Plusieurs études épidémiologiques ont rapporté que les apports élevés de ces produits ont un lien positif avec l'incidence du cancer. En Algérie, les produits carnés transformés industriellement sont largement consommés en raison de leur disponibilité en différentes saveurs et de leur faible coût par rapport aux viandes fraîches. La protection du consommateur contre le risque que présente les produits carnés devient nécessaire et les tests de la toxicologie génétique occupent une place primordiale dans cette filière. Dans ce contexte, nous avons évalué la mutagénicité et la génotoxicité de huit produits carnés transformés commercialisés en Algérie.

Des extraits à partir des échantillons sont obtenus par macération en utilisant un solvant non-polaire (*n*-hexane) et un solvant polaire (méthanol). La mutagénicité des extraits est d'abord évaluée par le test d'Ames standard, en utilisant quatre souches de *Salmonella typhimurium* (TA1537, TA98, TA100 et TA102) en présence et en absence d'activation métabolique, puis par le test d'Ames modifié « *treat and wash assay* » pour les extraits présentant des résultats biologiquement significatifs. Tandis que, la génotoxicité est évaluée par le test du micronoyau *in vitro* en microméthode sur des cellules lymphoblastoïdes humaines TK6 en présence et en absence d'activation métabolique et le test des comètes *in vitro* sur des cellules intestinales humaines Caco-2 seulement en absence d'activation métabolique.

Les résultats du test d'Ames ont montré que tous les extraits de viandes transformées analysés sont non mutagènes avec l'ensemble des souches de *S. typhimurium* testées et ceci en présence et en absence du système d'activation métabolique. Concernant le test du micronoyau, seul l'extrait hénanique du corned-beef fabriqué en Algérie qui montre un faible effet génotoxique dans le traitement long en absence d'activation métabolique. Par ailleurs, 5 produits de viandes sur 8 analysés ont montré un effet génotoxique avec le test des comètes.

Les résultats de la présente étude confirment que les produits de viandes transformées industriellement contiennent des composés génotoxiques, qui présentent donc un risque majeur pour la santé humaine. Ainsi, ces tests doivent être promulgués pour une meilleure surveillance et une efficace protection du consommateur.

Mots clé : Viande transformée, Test d'Ames, Test du micronoyau, Test des comètes, Génotoxicité-mutagénèse.

Abstract

Processed meats are suspected sources of human exposure to mutagenic and genotoxic compounds. Several epidemiological studies have reported that high intakes of these products have a positive link with the incidence of cancer. In Algeria, industrially processed meat products are widely consumed because of their availability in different flavors and their low cost compared to raw meats. In order to protect consumers, the safety of these products must be strictly assessed, in which genetic toxicology plays a vital role. In this context, we evaluated the mutagenicity and genotoxicity of eight processed meat products marketed in Algeria.

Extracts from the samples were obtained by maceration using a non-polar solvent (n-hexane) and a polar solvent (methanol). The mutagenic potential of the meat extracts was first determined by the standard plate incorporation assay (Ames test), using four strains of *Salmonella typhimurium* (TA1537, TA98, TA100 et TA102) in the presence and absence of metabolic activation, and subsequently by a modified Ames test “treat-and-wash assay” for extracts showing biologically significant results. Whereas, the genotoxicity was assessed by the *in vitro* micronucleus test in micromethod on human lymphoblastoid TK6 cells in the presence and absence of metabolic activation and the *in vitro* comet test on human intestinal Caco-2 cells only in the absence of metabolic activation.

The results of the Ames test showed that all the processed meat extracts analyzed were non-mutagenic with all *S. typhimurium* strains tested, both in the absence and in the presence of metabolic activation. Regarding the micronucleus test, only the hexane extract of corned-beef produced in Algeria, which shows a weak genotoxic effect in the long treatment in the absence of metabolic activation. In addition, 5 out of 8 meat products analyzed showed a genotoxic effect in the comet test.

The outcome of the present study confirms that industrially processed meat products contain genotoxic compounds, which therefore present a major risk to human health. Thus, these tests must be promulgated for better monitoring and effective consumer protection.

Keywords: Processed meat, Ames test, Micronucleus test, Comet test, Genotoxicity-mutagenesis.

الملخص

تعتبر اللحوم المصنعة من بين المصادر المحتملة لتعرض الإنسان للمركبات المسببة للطفرات والسمية الجينية. أفادت العديد من الدراسات الوبائية أن تناول كميات كبيرة من هذه المنتجات له علاقة إيجابية بالإصابة بالسرطان. في الجزائر، تُستهلك منتجات اللحوم المصنعة على نطاق واسع بسبب توفرها بنكهات مختلفة وتكلفتها المنخفضة مقارنة باللحوم النيئة. لذا أصبحت حماية المستهلك من الخطر الذي تشكله هذه المنتجات ضرورية، وتحللت اختبارات السمية الجينية مكانة هامة في هذا المجال. وفي هذا السياق، قمنا بتقييم الطفرات والسمية الجينية لثمانية منتجات لحوم مصنعة يتم تسويقها في الجزائر.

تم الحصول على المستخلصات من العينات عن طريق النقع باستخدام مذيب غير قطبي (الهكسان) ومذيب قطبي (ميثانول). وتم تقييم الطفرات الجينية للمستخلصات أولاً عن طريق اختبار أميس، باستخدام أربع سلالات من السالمونيلا تيفيموريوم (TA1537, TA98, TA100 et TA102) في وجود وفي غياب التنشيط الأيضي، ثم بواسطة اختبار أميس المعدل «*treat and wash assay*» للمستخلصات التي تظهر نتائج ذات دلالة بيولوجية. في حين تم تقييم السمية الجينية وذلك باستعمال اختبار النواة الدقيقة على الخلايا اللعابية البشرية TK6 في وجود وغياب التنشيط الأيضي وأيضاً باستعمال اختبار المذنب على الخلايا المعوية البشرية Caco-2 فقط في غياب التنشيط الأيضي.

أظهرت نتائج اختبار أميس أن جميع مستخلصات اللحوم المصنعة التي تم تحليلها كانت غير مطفرة مع جميع سلالات السالمونيلا تيفيموريوم المختبرة، في وجود وغياب نظام التنشيط الأيضي. فيما يتعلق باختبار النواة الدقيقة، فقط مستخلص الهكسان من *corned-beef* المصنوع في الجزائر الذي أظهر تأثيراً ضعيفاً في السمية الجينية في العلاج طويل المدى في غياب التنشيط الأيضي. بالإضافة إلى ذلك، أظهر 5 من أصل 8 منتجات اللحوم التي تم تحليلها تأثيراً ساماً للجينات مع اختبار المذنب.

تؤكد نتائج هذه الدراسة أن منتجات اللحوم المصنعة تحتوي على مركبات سامة للجينات، والتي تشكل خطراً كبيراً على صحة الإنسان. وبالتالي، يجب اعتماد هذه الاختبارات من أجل مراقبة أفضل وحماية فعالة للمستهلك.

الكلمات المفتاحية: اللحوم المصنعة، اختبار أميس، اختبار النواة الدقيقة، اختبار المذنب، السمية الجينية.