

Rapport du groupe de travail

« Impacts sur les cancers colorectaux de l'apport d'additifs nitrés (nitrates, nitrites, sel nitrité) dans les charcuteries »



SOMMAIRE

SOMMAIRE	2
1. Lettre de mission	5
2. Constitution du groupe de travail	7
3. Résumé	8
4. Introduction	11
5. Historique de la question	11
Les rapports d'expertises	11
Les publications	12
6. Données technologiques liées à l'apport d'additif nitrites	13
Quelques définitions	13
Préserver la qualité microbiologique des produits de charcuterie	14
Jouer le rôle d'anti-oxydant	15
Chercher à limiter la formation de nitrosamines	16
Réglementation	17
7. Données toxicologiques	18
Généralités : notions essentielles.....	18
Du danger et du risque	18
De l'évaluation du risque.....	18
De la cancérogenèse.....	19
Toxines botuliques et botulisme	20
Les toxines botuliques	20
Botulisme alimentaire	20
Toxicité des additifs alimentaires E 249 et E 250 autorisés comme conservateurs	21
Réévaluation des nitrites de sodium (E249) et potassium (E250) par l'EFSA en 2017	22
Les nitrosamines néoformées ou d'origine endogène	25
L'hème nitrosylé néoformé ou d'origine endogène.....	27
Produits de peroxydation lipidique	32
Conclusion	32
8. Données d'expologie	33
France	33
Les études de l'alimentation totale.....	33
Exposition aux nitrites E249 et E 250 selon EAT2	34

Europe	34
Exposition aux additifs nitrites E249 et E250 selon l'EFSA (2017)	35
Exposition aux nitrosamines.....	35
9. Données épidémiologiques	36
Incidence du botulisme alimentaire.....	36
Cancer colorectal et nitrites de sodium (E249) et de potassium (E250).....	39
Méthodes en épidémiologie nutritionnelle	40
Manque de précision des enquêtes alimentaires	40
Des résultats des études épidémiologiques disparates, difficiles à comparer et à interpréter....	44
10. Autres effets des nitrates, nitrites et de l'oxyde nitrique	49
11. Conclusion générale	50
12. Annexes	54
Annexe 1 - Le classement des agents examinés par le CIRC	54
Définition des degrés d'indications de cancérogénicité d'un agent pour les études portant sur l'homme	56
Annexe 2 - Notions de base en toxicologie alimentaire.....	57
Du danger et du risque	57
De l'analyse du risque	57
Des principes et contraintes régissant l'évaluation du risque chimique en sécurité alimentaire	57
Du processus d'évaluation du risque toxicologique.....	58
Agences et organismes en charge de l'évaluation du risque chimique en sécurité alimentaire ..	60
Annexe 3 - <i>Clostridium botulinum</i>	61
Annexe 4 - Nitrates (E251, E252) : Réévaluation de l'EFSA (2017b)	61
Toxicologie.....	61
Expologie	63
Annexe 5 - Cancérogénicité des nitrosamines potentiellement présentes dans la viande transformée (EFSA 2017b)	65
Annexe 6 – Cancérogénicité de l'Hème	66
Annexe 7 - Directive 2006/52/CE du parlement européen et du conseil du 5 juillet 2006	67
Annexe 8 – Déclaration d'intérêt des membres du groupe de travail.....	70
13. Références bibliographiques	71
Historique	71
Données technologiques.....	72
Données toxicologiques	73
Données d'expologie.....	78

Données épidémiologiques	79
Données sur les effets bénéfiques	81

1. LETTRE DE MISSION



Paris, le 07 février 2020

Mr Gérard Pascal.
Membre émérite

Le Secrétaire perpétuel

Objet : Groupe de travail « Nitrites »

Cher confrère,

A l'automne 2019, plusieurs députés ont déposé un projet d'amendement ayant pour objet la taxation des produits de charcuterie renfermant des additifs « nitrés » (nitrates, nitrites, sel nitrité), au prétexte que leur consommation augmenterait le risque de développer un cancer colorectal.

L'amendement, repoussé par l'Assemblée Nationale, a cependant relancé le débat sur les effets des nitrates/nitrites sur la base de deux documents scientifiques, aux conclusions contradictoires : une évaluation du Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) de 2015 et une opinion scientifique de l'« European food safety authority » (EFSA) de 2017. Pour le CIRC, les viandes transformées, dont les produits de charcuterie, étaient considérées comme « cancérogènes pour l'homme » ; pour l'EFSA, la consommation de ces produits renfermant des additifs « nitrés » utilisés dans le respect de la réglementation, ne présente aucun risque.

Des associations, dont la Ligue contre le cancer, ont immédiatement réclamé l'interdiction des nitrates/nitrites à grand renfort médiatique. Les députés auteurs de l'amendement précité, ont obtenu la création d'une mission d'information parlementaire sur la question en février 2020.

Aujourd'hui sur la place publique, la question complexe de la sécurité sanitaire des produits de charcuterie renfermant des additifs conservateurs nitrates/nitrites, demande une mise au point tenant compte des derniers développements scientifiques intervenus depuis la publication des documents de base évoqués ci-dessus.

Les compétences existantes au sein de notre Compagnie justifient la création du groupe de travail Nitrites, pluridisciplinaire, intersections, qui s'attachera à :

- Réaliser une étude comparative des avis du CIRC et de l'EFSA, qui n'ont manifestement pas répondu aux mêmes questions : effets des produits de viande transformés renfermant ou pas des additifs nitrés par le CIRC, effets des nitrates/nitrites utilisés comme additifs alimentaires pour l'EFSA. Cette étude devra en particulier clairement distinguer ce qui relève de la caractérisation des dangers de ce qui concerne l'évaluation de risques ;
- Résumer les conclusions des nombreuses méta-analyses des études épidémiologiques ainsi que d'autres études cliniques récentes réalisées sur le sujet ;
- Recenser les études, animales ou utilisant d'autres modèles, qui ont pour objet de proposer une explication mécanistique des effets observés.

Le groupe de travail confié à Gérard Pascal mènera les auditions nécessaires de tous les acteurs compétents et représentant les différentes sensibilités scientifiques qui se sont exprimées sur le sujet. Il veillera à ne pas laisser penser qu'il se substitue aux évaluations des agences spécialisées dans l'évaluation des risques, en précisant que son objectif consiste à collecter et analyser les données actuelles disponibles et à présenter les différents points de vue scientifiques exprimés.

Le rapport, résultat des travaux du groupe, est attendu pour fin 1^{er} trimestre 2021.

Je vous prie de croire, chers confrères, en l'assurance de mes sentiments les meilleurs.

le Secrétaire perpétuel



2. CONSTITUTION DU GROUPE DE TRAVAIL

Les différentes sections de l'Académie d'Agriculture de France (AAF) ont pris connaissance de la lettre de mission émise par son Secrétaire perpétuel et ont sollicité leurs membres, afin que ceux qui se sentaient intéressés et en mesure d'apporter leur contribution à un travail collectif se fassent connaître.

Une première réunion des académiciens intéressés a été organisée le 11 mars 2020, au cours de laquelle le président du groupe de travail a rappelé les articles 31, 32, 33 du règlement intérieur de l'Académie d'Agriculture de France, quant à **la transparence, à l'impartialité et à la collégialité** de ses travaux. En application de l'article 33, il est demandé aux académiciens intéressés de faire parvenir au président du groupe de travail une déclaration écrite des liens qu'il ou elle a pu avoir avec les professionnels impliqués dans l'utilisation des nitrates/nitrites dans les produits de viandes transformées au cours des trois dernières années, ainsi qu'avec les associations qui se sont exprimées sur le sujet.

Les membres qui ont alors constitué le groupe de travail auteur de ce rapport ont décidé de s'adjoindre un Professeur honoraire de Toxicologie, spécialiste de la cancérogénèse et un membre de l'Académie des Technologies, en raison de leurs compétences¹.

La composition du groupe de travail était la suivante :

- Jean-Marie BOURRE, Directeur de recherches émérite à l'INSERM, Membre émérite de l'AAF ;
- Pierre FEILLET, Directeur de recherches émérite à l'INRAE, Membre émérite de l'AAF ;
- Léon GUEGUEN, Directeur de recherches honoraire à l'INRAE, Membre émérite de l'AAF ;
- Jean de KERVASDOUE, Professeur émérite au Conservatoire National des Arts et Métiers, Membre de l'Académie des Technologies ;
- Philippe KIM-BONBLED, Inspecteur Général de Santé Publique Vétérinaire, Directeur du développement et de la communication de l'AAF ;
- Jean-Paul LALLES ; Directeur de recherches à l'INRAE, Membre correspondant de l'AAF ;
- Daniel MARZIN, Professeur honoraire de Toxicologie (Faculté de Pharmacie/Institut Pasteur de Lille) spécialiste de mutagenèse-cancérogénèse ;
- Dominique PARENT-MASSIN, Professeure honoraire de Toxicologie, Membre de l'AAF ;
- Gérard PASCAL, Directeur de recherches honoraire à l'INRAE, Membre émérite de l'AAF ;
- Philippe STOOP, Directeur recherche et innovation chez ITK, Membre correspondant de l'AAF ;

¹ Voir les déclarations d'intérêt des membres du groupe de travail en annexe 8

- Hervé THIS, Physico-chimiste INRAE, Professeur consultant à AgroParisTech, Membre de l'AAF.

Le groupe de travail a tenu 10 réunions de mars à octobre 2020. Il a auditionné en vidéoconférence :

- Le 8 avril, Gilles NASSY, représentant de l'IFIP (Institut de Porc) et Thierry GREGORI, représentant de la FICT (Fédération Française des Industriels Charcutiers, Traiteurs, Transformateurs de Viande) ;
- Le 6 mai, Fabrice PIERRE, directeur de recherches à l'INRAE, responsable de l'équipe « Prévention et promotion de la cancérogenèse par l'alimentation » de l'unité « Toxalim » à Toulouse ;
- Le 12 juin, Joël MAUVIGNEY, Président de la CNCT (Confédération Nationale des Charcutiers Traiteurs et Traiteurs).

Le Groupe de travail a également proposé une audition en vidéoconférence aux associations Foodwatch et Yuka, qui n'ont pas répondu ou n'ont pas voulu répondre, « en raison du confinement ».

3. RESUME²

Ce rapport est un état des lieux, à partir des données scientifiques disponibles en toxicologie, en expologie (science de l'évaluation des expositions) et en épidémiologie, sur le rôle éventuel, dans la survenue de cancer colorectal, des nitrites de sodium (E249) et de potassium (E250) utilisés exclusivement comme additifs alimentaires. Ce document n'a pas pour ambition de se substituer aux évaluations des agences spécialisées dans l'évaluation des risques.

Il a été rédigé par un groupe de travail mis en place par le Secrétaire perpétuel de l'Académie d'agriculture de France. Le Bureau de l'Académie d'agriculture de France a donné son accord pour sa diffusion le 3 novembre 2020.

La polémique sur la relation entre l'utilisation des nitrites en tant qu'additifs alimentaires et le cancer colorectal a commencé dans les années 1990 ; elle a fait l'objet de nombreux travaux de recherche, rapports de comités scientifiques et d'études épidémiologiques qui sont décrits et analysés dans ce rapport.

Depuis des siècles, les nitrites sont des ingrédients utilisés pour la préservation des charcuteries, d'abord sous la forme de leurs précurseurs que sont les nitrates (les charcuteries étaient plongées dans des bains de salpêtre, c'est-à-dire de nitrate de potassium impur), puis directement depuis les années 1965 en mélange avec le sel de table (NaCl). Actuellement la directive européenne 2006/52/CE autorise comme conservateurs les additifs alimentaires nitrite de sodium (E250) et nitrite de potassium (E249) et les nitrates de sodium (E251) et (E 252) dans les charcuteries pour préserver leur qualité microbiologique. Leur présence empêche les bactéries du genre *Clostridium botulinum* de se développer et de sécréter la toxine botulique, laquelle est la toxine connue la plus dangereuse au monde. Ils peuvent aussi être actifs sur d'autres bactéries telles que *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* et *Salmonella*, avec une efficacité moindre. Accessoirement l'ajout de ces

² Ce rapport n'engage que la responsabilité des membres du groupe de travail.

additifs induit une coloration rouge/rose des jambons due à la formation de nitrosylmyoglobine (un pigment rouge) au cours de la fabrication, mais ces additifs ne font pas partie des colorants autorisés par la réglementation européenne, contrairement à l'opinion de certains consommateurs. Comme les nitrates de sodium (E251) et de potassium (E 252) sont transformés lors du procédé technologique en nitrites dans les aliments auxquels ils sont ajoutés, ce rapport est essentiellement consacré aux nitrites.

Les bactéries telles que *Clostridium botulinum* trouvent dans la viande destinée à la charcuterie un milieu idéal pour leur développement. La maîtrise des facteurs de fabrication (respect de la chaîne du froid, niveau initial de contamination microbiologique, pH, activité de l'eau, oxygène résiduel du conditionnement, dates limites de conservation, barèmes de cuisson pour les produits cuits) peut éventuellement suffire pour se prémunir contre ces contaminations. Cependant l'addition de 50 à 150 mg de nitrite de sodium ou de potassium par kg de denrée dans un produit carné est une assurance de sécurité, car elle empêche la prolifération des bactéries. Le mécanisme d'action des nitrites est connu : ils agissent *via* leurs transformations successives en monoxyde d'azote (NO), puis en acide peroxy-nitrique et son ion peroxy-nitrite, des oxydants puissants qui pénètrent au sein des bactéries anaérobies, dont ils altèrent l'ADN.

Comme tous les additifs autorisés au sein de l'Union européenne, les nitrites ont fait l'objet en 2017, par l'Autorité européenne de sécurité alimentaire (EFSA), d'une réévaluation du risque induit par leur utilisation. Comme aucun de ces deux additifs n'a montré d'effets cancérogènes dans les études réglementaires de toxicologie chez les rongeurs, il leur a été attribué une valeur toxicologique de référence, une dose journalière admissible (DJA), égale à la dose sans effet toxique chez l'animal divisée par 100 : c'est la quantité qu'un individu peut ingérer tous les jours de sa vie sans courir de risque pour sa santé. Cette DJA, exprimée en masse d'ions nitrite/kg de poids corporel par jour, a été fixée à 0,07 mg, soit 4,9 mg par jour pour un adulte de 70 kg. L'exposition estimée des consommateurs européens aux additifs nitrites de sodium ou de potassium est faible, toujours inférieure à la DJA, à l'exception d'un léger dépassement chez les enfants de 3 à 9 ans de la catégorie des forts consommateurs. Toutefois, cette mesure est considérée par l'EFSA comme surestimée : l'EFSA a conclu que ces additifs ne font pas courir de risque aux consommateurs. L'exposition mesurée des consommateurs français aux additifs nitrites est très faible, de l'ordre de quelques microgrammes (mille fois moins qu'1 mg) par kg de poids corporel par jour, donc bien inférieure à la DJA.

Des auteurs d'études mécanistiques en toxicologie expérimentale ont émis l'hypothèse qu'un produit néoformé, l'hème Fe²⁺ nitrosylé, apparaissant au cours de la fabrication des charcuteries à partir d'oxyde nitrique et du fer de l'hème de la myoglobine contenue dans la viande, pourrait avoir un effet cancérogène promoteur. Cependant les modèles animaux utilisés dans ces études sont difficilement transposables à l'Homme³ et peu réalistes. S'il s'agit d'un effet cancérogène promoteur, donc dose-dépendant, une dose sans effet cancérogène existe. La difficulté réside alors dans l'identification de la dose sans effet de ce produit néoformé, ce qui nécessite une étude de cancérogenèse réglementaire et une

³ Le groupe de travail a décidé de mettre une majuscule à Homme pour signifier qu'il parlait du genre humain (homme et femme) et éviter toute confusion.

évaluation de la contamination des jambons traités par ce produit néoformé. Cette étude n'ayant pas été réalisée, aucune conclusion claire ne peut donc être tirée de ces études.

Par ailleurs, de nombreuses autres études mécanistiques en toxicologie expérimentale sur des modèles différents n'ont pas confirmé cette hypothèse, ni montré que des produits néoformés issus de la peroxydation lipidique pouvaient être responsables de la survenue de cancer colorectal.

Des nitrosamines, puissants cancérogènes, formées à partir de molécules portant des groupes amines réagissant chimiquement par N-nitrosation avec les nitrites, pourraient aussi se former en cours de fabrication. Cependant les données de la littérature montrent que dans les produits de charcuterie traitée aux nitrites aux doses autorisées par la réglementation ces nitrosamines soit ne sont pas présentes, soit sont présentes en infimes quantités mesurables, (aux limites inférieures des méthodes analytiques les plus sensibles). L'exposition des consommateurs européens aux nitrosamines présentes dans les viandes transformées est très faible, de l'ordre du nanogramme (soit un million de fois moins qu'un milligramme).

Les nombreuses études épidémiologiques disponibles sont souvent disparates et difficiles à comparer. Très peu d'études épidémiologiques ont tenté d'étudier spécifiquement le lien entre la consommation d'aliments contenant les additifs nitrites et la survenue du cancer colorectal. Elles ne permettent de tirer aucune conclusion, en raison de l'imprécision de l'enquête alimentaire (nature et quantités des charcuteries consommées), de l'évaluation de l'exposition aux nitrites et de la fragilité de la signification statistique (qui disparaît souvent avec certaines des méthodes de traitement des données employées) des effets lorsqu'ils semblent exister. Il ressort d'une analyse critique et exhaustive de la littérature scientifique que l'utilisation des nitrites comme additifs dans les charcuteries a contribué à protéger le consommateur de cas de botulisme et d'autres intoxications par des toxines bactériennes en France. Le groupe de travail n'a trouvé aucune publication scientifique, tant toxicologique qu'épidémiologique, établissant formellement un lien significatif entre la consommation d'aliments contenant les additifs nitrites de sodium et de potassium et la survenue de cancer colorectal.

En conclusion :

- Le risque soupçonné d'augmentation du cancer colorectal lié à l'utilisation des nitrites comme additifs dans les charcuteries aux doses autorisées par la réglementation n'est pas scientifiquement établi par les études toxicologiques et épidémiologiques disponibles à ce jour.
- L'autorisation d'utilisation des nitrites dans les charcuteries repose sur une analyse bénéfice risque.
- Les risques liés à la présence de *Clostridium botulinum* sont bien connus et graves puisque parfois mortels
- Face aux controverses concernant l'utilisation des nitrites comme additifs alimentaires les professionnels français de la charcuterie (industriels et artisans) ont déjà réduit jusqu'à 40 % les doses utilisées, tout en garantissant, sur la base d'études expérimentales, la sécurité microbiologique des produits.

- Toutefois, les industriels cherchent à mettre au point de nouvelles techniques de conservation, indépendantes de l'usage des nitrites, et qui élimineraient le risque de la présence de *Clostridium botulinum* dans les charcuteries.

En attendant l'évaluation microbiologique et toxicologique de ces nouvelles pratiques, le groupe de travail de l'Académie d'Agriculture de France considère que la priorité est toujours d'éviter tout risque de réapparition d'intoxication mortelle par la toxine botulique.

4. INTRODUCTION

Les nitrites de sodium et de potassium sont utilisés comme additifs pour préserver la sécurité microbiologique des produits de charcuterie, notamment vis-à-vis de bactéries pathogènes comme *Clostridium botulinum* (en particulier du groupe II type B), *Listeria monocytogenes* et *Salmonella*, productrices de toxines extrêmement dangereuses pour l'Homme, particulièrement *Clostridium botulinum*, qui produit les toxines botuliques, toxines connues les plus dangereuses au monde, mortelles pour l'Homme à très faible dose.

L'utilisation d'additifs alimentaires comme les nitrates de sodium et potassium (E251 et E252) et les nitrites de sodium et potassium (E249, E250) comme conservateurs pour empêcher le développement de bactéries pathogènes, a été précédée, pendant des siècles, par l'utilisation de bains de salpêtre, riches en nitrate de potassium impur, dans lesquels les charcuteries étaient plongées.

Cependant, depuis les années 1990, une inquiétude quant à une relation possible entre les nitrites et la survenue de cancer colorectal alimente les discussions scientifiques. De surcroît, l'hypothèse de la formation de nitrosamines, composés dont certains sont cancérigènes, à partir de nitrite exogène et/ou endogène, renforce l'inquiétude des consommateurs.

Le but de ce rapport est de faire un état des lieux, à partir des données scientifiques disponibles en toxicologie, en expologie et en épidémiologie, sur le rôle, dans la survenue de cancer, des nitrites de sodium (E249) et de potassium (E250) utilisés en charcuterie exclusivement comme conservateurs. Ce document n'a pas pour ambition de se substituer aux évaluations des agences spécialisées dans l'évaluation des risques.

5. HISTORIQUE DE LA QUESTION

La relation entre la consommation de produits de charcuterie (renfermant ou non des nitrites) et les risques de cancer colorectal n'est pas une problématique récente. En effet, depuis les années 1990, un certain nombre de rapports de comités d'experts et de publications scientifiques en épidémiologie ont traité de cette question (voir annexe I).

LES RAPPORTS D'EXPERTISES

1995 : Le *Joint WHO/FAO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) et le *Scientific Committee for Food* (SCF, EU), comités d'experts totalement indépendants l'un de l'autre, ont considéré que les risques liés à la formation de composés N-nitrosés n'étaient pas suffisamment pertinents pour être pris en compte dans l'évaluation du risque. Ils ont établi

pour les nitrites une DJA⁴ identique, égale à 0,06 mg/kg de poids corporel par jour exprimée en ion nitrite, sur la base de leurs effets toxiques.

2002 : Le JECFA modifie légèrement la DJA et la fixe à 0,07 mg/kg de poids corporel par jour exprimée en ions nitrite.

2007 : Le rapport de la *World Cancer Research Fund* (WCRF) conclut « Le comité considère que la preuve qui concerne la viande rouge ou la viande transformée est plus forte qu'au milieu des années 1990... La preuve scientifique que les viandes rouges et transformées sont une cause de cancer colorectal est convaincante ».

2010 : L'IARC (OMS) conclut : « L'ingestion de nitrates ou de nitrites dans des conditions qui favorisent la nitrosation endogène est probablement cancérigène chez l'Homme (Groupe 2A) ». Cependant, les *limited evidences* chez l'Homme, qui justifiaient ce classement, ne portaient que sur le cancer de l'estomac et non sur le cancer colo-rectal. **Il s'agit là d'une évaluation des nitrates et nitrites per se.**

2015 : *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human* : la conclusion a évolué et devient « La consommation de viande transformée est cancérigène pour l'homme (Groupe I) ».

2017 : l'Autorité Européenne de Sécurité Alimentaire (EFSA), à la demande de la Commission européenne, ré-évalue les additifs nitrite de sodium (E 250) et nitrite de potassium (E 249). Au vu des études toxicologiques, elle confirme la valeur de DJA de 0,07 mg/kg de poids corporel par jour. Une revue exhaustive de la littérature des études épidémiologiques disponibles sur la présence de **nitrites sous forme d'additif alimentaire** et la survenue de cancer de tous les types n'a pas mis en évidence un lien entre ces deux occurrences. Cependant quelques indications permettent de relier les **nitrites per se** issus de l'alimentation et les cancers de l'estomac, une combinaison nitrites + nitrates issus de viande transformée et le cancer colorectal (CCR), et une preuve scientifique entre le cancer colorectal (CCR) et la diméthylnitrosamine.

LES PUBLICATIONS

1996 : « Alimentation et Cancer » (TEC et DOC Lavoisier, 500 pages). La conclusion du chapitre consacré au cancer du côlon et du rectum : toutes ces hypothèses scientifiques (des mécanismes impliqués) font l'objet de recherches qui n'ont, pour le moment, fourni aucune réponse définitive sur les mécanismes de cancérogenèse colique en relation avec l'alimentation.

2005 : Nora *et al.*: étude épidémiologique prospective réalisée sur près de 480 000 personnes dans 10 pays européens qui conclut : « Nos résultats confirment que le risque de CCR est associé positivement à la consommation de viande rouge ou de viande transformée... », sans préciser si ces viandes transformées contiennent ou non des nitrites.

2018 : Diallo *et al.* dont la conclusion est : "La consommation de viande transformée n'est pas, dans cette étude, associée au risque de CCR".

2019 : Crowe *et al.* concluent que « la majorité des études rapportent que la consommation de viandes transformées renfermant des nitrites est associée à un risque accru de CCR. Seules deux des études citées dans cette synthèse affichent l'intention d'évaluer

⁴ Dose Journalière Admissible, voir la définition dans le chapitre 6, Données toxicologiques

spécifiquement le rôle des nitrites dans l'apparition des CCR et n'observent aucune relation. Aucune de ces deux études n'apporte de données quantitatives de la présence de nitrites, pas plus d'ailleurs que les autres études citées.

2019 : Un dossier spécial est publié dans *Annals of Internal Medicine* (2019) qui contient plusieurs articles sur le sujet. L'éditorial de cette revue (Carroll et Doherty, 2019) souligne que « *Le domaine de l'épidémiologie nutritionnelle est miné par des études observationnelles qui ont mené des analyses inappropriées, accompagnées de conclusions probablement erronées* ». Vernooij *et al.*, concluent : « *Aucune variation statistiquement significative n'a été trouvée pour des consommations réduites de viande rouge ou transformée pour l'incidence de cancer du sein, du côlon, de l'endomètre, du foie, de l'ovaire, du pancréas, de la prostate, de l'estomac et du cancer utérin* ». Han *et al.* (2019) concluent : « L'ampleur de l'effet de la viande rouge sur le cancer au cours d'une vie d'exposition était, cependant, très faible, et la certitude globale des preuves était faible ou très faible ». Ce dossier se termine par des recommandations formulées par 14 scientifiques appartenant à 7 pays (Canada, Angleterre, Allemagne, Nouvelle-Zélande, Pologne, Espagne, et Etats-Unis) et de nombreuses universités, qui suggèrent que « ... les adultes continuent à consommer la même quantité de viande et de viande transformée que celle qu'ils consomment actuellement, à moins qu'ils souhaitent d'eux-mêmes en changer » (Johnston *et al.*).

En résumé

Depuis le début des années 1990, les études des relations entre la consommation de viandes transformées, essentiellement des charcuteries, traitées ou non aux nitrites, et le risque d'apparition de cancer colorectal se sont multipliées. Leurs résultats sont souvent contradictoires, selon qu'il s'agit d'identification de danger ou d'évaluation de risques et selon la qualité des enquêtes alimentaires.

6. DONNEES TECHNOLOGIQUES LIEES A L'APPORT D'ADDITIF NITRITES

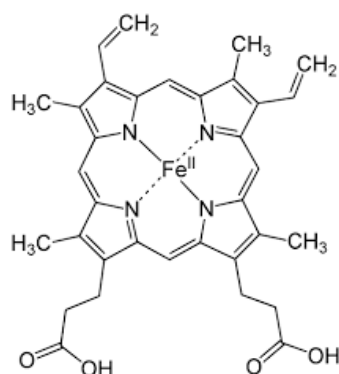
Le dioxyde d'azote (NO_2) et ses sels que sont le nitrite de sodium (E250) et le nitrite de potassium (E249) sont des ingrédients traditionnels des charcuteries, utilisés pour leurs propriétés de préservation depuis des siècles sous la forme des précurseurs de nitrites que sont les nitrates, puis, directement depuis les années 1960, en mélange avec le sel. Cette transformation des nitrates en nitrites dans les aliments auxquels ils sont ajoutés ou dans l'organisme est la raison pour laquelle ce rapport est essentiellement consacré aux nitrites, en tant qu'additifs alimentaires.

QUELQUES DEFINITIONS

Le monoxyde d'azote ($\text{NO}\cdot$) est une molécule composée d'un atome d'oxygène et d'un atome d'azote.

L'acide peroxy nitreux et son ion peroxy nitrite ($\text{ONOOH}/\text{ONOO}^-$) sont issus de l'oxydation des nitrites.

L'hème est un groupe moléculaire constitué d'une porphyrine dont le cœur est occupé par un atome de fer divalent (Fe^{2+}), forme sous laquelle il est transporteur d'oxygène.



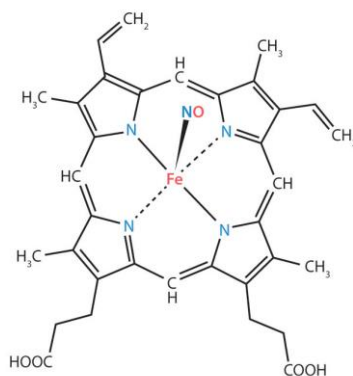
Le terme « fer héminique (Fe-H) » désigne le fer contenu dans un groupe hème, par opposition à du fer libre.

La myoglobine (Mb) est une métalloprotéine, contenant un atome de fer héminique, qui est présente dans les muscles des mammifères. Elle est composée d'une protéine, la globine, associée à un groupe hème.

La metmyoglobine (MbFe³⁺) est la forme oxydée de la myoglobine, où le fer est trivalent (Fe³⁺), ce qui la rend impropre à fixer l'oxygène.

Les composés N-nitrosés (NOCs) comprennent, selon Habermeyer *et al.* (2015), les nitrosamines et les nitrosamides. Cependant le groupe de travail a noté que certains auteurs incluent également le fer nitrosylé dans les NOCs, entraînant ainsi une certaine confusion dans les résultats des études toxicologiques. Quand une ambiguïté existera selon les membres du groupe de travail, un astérisque sera ajouté à NOCs*.

La nitrosylmyoglobine (ou pigment héminique nitrosylé) est un complexe Fe-NO, appelé fer nitrosylé, issu d'une réaction dite de nitrosylation résultant de la réaction de NO avec le fer de l'hème de la myoglobine. La nitrosylmyoglobine devient alors incapable de fixer l'oxygène.



PRESERVER LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE DES PRODUITS DE CHARCUTERIE

Les viandes sont des matrices idéales pour la croissance des bactéries ; or l'innocuité des produits carnés et leur conservation sont un impératif absolu. Les nitrites de sodium et de potassium sont utilisés comme additifs pour préserver la qualité microbiologique des produits de charcuterie, notamment vis-à-vis de bactéries (ou formes sporulées) pathogènes

de *Clostridium botulinum* (en particulier du groupe II type B), *Listeria monocytogenes* et *Salmonella*.

Cette maîtrise dépend notamment des concentrations inhibitrices en nitrite et en sel (chlorure de sodium, NaCl) qui agissent en synergie et qui doivent atteindre le cœur du produit. L'emploi de nitrite permet ainsi de réduire la quantité de sel ajoutée. Cependant elle dépend également d'autres facteurs dont les rôles sont plus ou moins imbriqués, tels le respect de la chaîne du froid, le niveau de contamination microbiologique initiale, y compris à cœur, le pH, l'activité de l'eau⁵, l'ajout éventuel d'ascorbate ou d'érythorbate de sodium, en tant qu'agents anti-oxydants, l'oxygène résiduel du conditionnement et de conservation, les dates limites de conservation (DLC), ainsi que les barèmes de cuisson pour les produits cuits. La maîtrise de ces paramètres au sein des ateliers de fabrication est garantie par le système qualité incluant : le déploiement de l'HACCP⁶, le plan de maîtrise sanitaire, la formation des opérateurs (technologie et hygiène).

L'addition de 50 à 150 mg de nitrite par kg de denrée dans un produit carné empêche la prolifération des bactéries telles que de *C. botulinum*. Le nitrite agit *via* la formation, par le NO, de l'acide peroxy-nitrique/ion peroxy-nitrite, oxydants puissants qui pénètrent au sein des bactéries anaérobies et altèrent l'acide désoxyribonucléique (ADN) (Majou et Christiaens, 2018 ; Nassy, 2020). Lebrun *et al.* (2020) montrent que, dans des conditions expérimentales, l'incorporation de plus de 30 mg/kg de nitrite de sodium empêche la prolifération de *C. botulinum* (Groupe II type B) et la synthèse de toxine botulique dans un modèle de jambon cuisiné, quelles que soient les concentrations en NaCl testées. En revanche, l'absence totale de nitrite permet le développement de *C. botulinum* et la production de toxine pendant le stockage.

Le nitrite est également efficace pour éviter la croissance des bactéries sporulées, en particulier de la famille des sulfitoréductrices, comme *C. perfringens* et d'autres sporulées comme *Bacillus cereus*. En revanche, NO₂ a un effet limité sur les formes végétatives de certaines bactéries. En synergie avec le sel, il est cependant efficace pour allonger le temps de latence de *Listeria monocytogenes* dans les charcuteries cuites. Dans les salaisons, les nitrites peuvent permettre une diminution de la contamination par de *Salmonella*.

JOUER LE ROLE D'ANTI-OXYDANT

Dans la viande fraîchement coupée, le pigment de surface est une forme oxygénée, rouge vif, de la myoglobine, l'oxymyoglobine MbFe²⁺O₂, alors qu'une couche de couleur brune de la forme oxydée, la metmyoglobine MbFe³⁺H₂O, existe à une certaine profondeur. Au cœur de la viande, dans des conditions faiblement acides et anaérobies, l'oxygène quitte l'hème (MbFe²⁺) ce qui conduit à la désoxymyoglobine (MbFe²⁺) réduite (Møller *et al.*, 2006). La désoxymyoglobine (MbFe²⁺ ou Fe (II)) est la forme réduite (non oxydée) et désoxygénée (absence de molécules d'oxygène) qui présente une couleur rouge pourpre. Pour maintenir cette coloration, une très faible pression d'oxygène (< 1,4 mm Hg) est nécessaire.

⁵ L'activité de l'eau représente la pression de vapeur d'eau d'un produit humide divisée par la pression de vapeur saturante à la même température. Ce paramètre traduit les interactions de l'eau avec la matrice de l'aliment.

⁶ HACCP : = Hazard Analysis Critical Control Point (en français : = analyse des dangers - points critiques pour leur maîtrise).

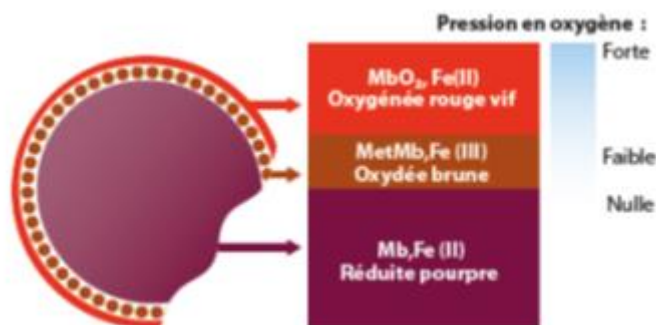
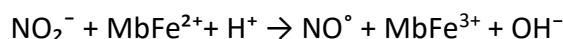
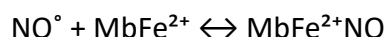


Figure 1 – Les différentes formes de la myoglobine dans une viande fraîchement découpée (FICT, 2018).

En présence d'ion nitrite (NO_2^-) dans la matrice où le potentiel redox⁷ est maîtrisé, NO_2^- réagit pour former du monoxyde d'azote et de la metmyoglobine MbFe^{3+} (Shiva *et al.*, 2007). Le nitrite ajouté se transforme spontanément en oxyde d'azote (NO), qui présente une très forte affinité pour le fer situé au centre de l'hème de la myoglobine musculaire. Sa réactivité pour le fer de l'hème est aussi importante que celle de l'oxygène :



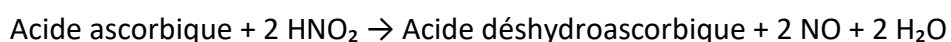
Une molécule NO° se fixe sur l'ion ferreux d'une molécule MbFe^{2+} pour former la nitrosylmyoglobine, qui est le pigment héminique nitrosylé qui donne la couleur rose aux viandes (Andersen *et al.*, 1990 ; Majou et Christieans, 2018) :



Dans les charcuteries, NO° stabilise le fer héminique sous forme ferreux en hème nitrosylé et l'empêche de réagir sous forme ferrique (MbFe^{3+}) avec les lipides. $\text{MbFe}^{2+}\text{NO}$ permet ainsi d'éviter la réaction de peroxydation des lipides jusqu'à la formation d'aldéhydes de type malondialdéhyde (MDA), dont certains sont cytotoxiques et mutagènes. NO° joue ainsi un rôle d'antioxydant au sein de la matrice viande (Kagan *et al.*, 2001).

CHERCHER A LIMITER LA FORMATION DE NITROSAMINES

Selon Mirvish (1977), la vitesse de formation des nitrosamines est proportionnelle à la concentration en amines et au carré de la concentration en nitrites ; le pH le plus favorable est 3,4, ce qui correspond au pK_a de l'acide nitreux. La réaction peut être modifiée par divers composés organiques : ainsi l'ascorbate de sodium est inhibiteur si le rapport molaire entre lui-même et le nitrite est supérieur ou égal à 1 (Saint Blanquat, 1980). Le mécanisme par lequel l'acide ascorbique réagit est de nature chimique et entraîne la formation de NO et d'acide déshydroascorbique. Ainsi les additifs antioxydants autorisés en charcuterie (arrêté du 23 juillet 2010) contribuent à réduire la N-nitrosation : ascorbate de sodium, acide érythorbique et ses sels, E 300, E301, E302, érythorbate de sodium E316. Ces anti-oxydants réduisent l'acide nitreux en oxyde d'azote et limitent ainsi la production d'acide nitreux libre disponible susceptible de réagir avec les amines secondaires (Fiddler *et al.*, 1973 ; 1978) :



⁷ Mesure qui indique le degré auquel une substance peut oxyder ou réduire une autre substance.

REGLEMENTATION

L'utilisation des additifs E249 et E250 est régie par la Directive 2006/52/CE du Parlement européen et du Conseil du 5 juillet 2006 (voir détails en annexe 6) :

« Sur la base d'un avis de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) du 26 novembre 2003, des modifications sont apportées aux autorisations actuelles afin de limiter, autant que possible, la teneur en nitrosamines en abaissant les doses de nitrates et de nitrites ajoutés aux denrées alimentaires tout en préservant la sécurité microbiologique des produits alimentaires. L'EFSA recommande que les doses de nitrates et de nitrites soient définies dans la législation en tant que « doses d'adjonction ». L'EFSA estime que c'est la dose de nitrites ajoutée, plutôt que la dose résiduelle, qui contribue à l'activité inhibitrice exercée sur le *C. botulinum*. Les dispositions actuelles devraient être modifiées pour que, comme l'a recommandé l'EFSA, les doses maximales autorisées pour les produits à base de viande non traités thermiquement ou traités thermiquement, pour le fromage et pour le poisson, soient définies en tant que doses d'adjonction. Toutefois, à titre d'exception, des doses résiduelles maximales devraient être fixées pour certains produits à base de viande traditionnels, à condition que ces produits soient définis et identifiés comme il se doit. Les doses fixées devraient permettre d'assurer que la dose journalière admissible (DJA) fixée en 1990 par le comité scientifique de l'alimentation humaine n'est pas dépassée. Les produits qui ne sont pas nommément désignés dans la présente directive, mais qui sont produits traditionnellement de manière similaire (c'est-à-dire les produits similaires), peuvent, si besoin est, être classés conformément aux articles 5 et 6 de la directive 95/2/CE. »

De plus, un **code des usages** établi par la Fédération française des industriels charcutiers, traiteurs et transformateurs de viande⁸ (FICT) précise les bonnes pratiques de la profession :

- Selon la FICT, qui représente les entreprises de charcuterie-traiteurs (310 établissements répartis sur toute la France, dont 90 % de PME, avec 60 % des entreprises employant moins de 50 salariés), seule en Europe et probablement au Monde, la charcuterie française (y compris artisanale représentée par la CNCT et ses 2000 artisans membres) possède un code des usages qui définit les 450 produits du patrimoine gastronomique, en mentionnant entre autres la liste (réduite par rapport à celle autorisée par la réglementation) des additifs utiles à la fabrication de chaque produit en prévoyant souvent des doses inférieures à celles fixées par la réglementation (exemples : polyphosphates, nitrites, etc.). Le contenu et le respect de ce Code sont contrôlés par la DGCCRF⁹.
- Le code des usages 2020 (en cours de validation) propose une diminution de 20 % des doses utilisées : pièces cuites (jambon, épaule, etc.) : 90 mg/kg ; rillettes (80 mg/kg) ; pâtés, produits de têtes, saucisses cuites, andouilles, andouillettes : 100 mg/kg ; salaisons crues (saucissons secs, jambons crus, saucisses à cuire, lardons, demi-sel) : 120 mg/kg.

⁸ Audition du 8 avril 2020.

⁹ Direction générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des fraudes.

En résumé

Les additifs alimentaires que sont le nitrite de sodium (E250) et le nitrite de potassium (E249) sont autorisés en Europe dans les charcuteries selon la Directive 2006/52/CE comme conservateurs pour préserver la qualité microbiologique des produits, et plus particulièrement pour empêcher la bactérie *Clostridium botulinum* de se développer et de sécréter la toxine botulique. Accessoirement une coloration rouge/rose est induite par la formation de nitrosylmyoglobine, pigment rouge, lors du procédé technologique ; mais en aucun cas, ces additifs ne sont autorisés en tant que colorants alimentaires.

7. DONNEES TOXICOLOGIQUES

GENERALITES : NOTIONS ESSENTIELLES¹⁰

Du danger et du risque

Le danger n'est pas synonyme de risque : ces deux notions doivent être clairement distinguées. Le danger est, en toxicologie alimentaire, la propriété d'une substance contenue dans un aliment de présenter un effet toxique potentiel.

Le risque est la probabilité d'être exposé à une substance dangereuse, *via* la consommation d'un aliment qui la contient à une dose suffisamment élevée pour être toxique compte tenu de l'exposition. Pour évaluer le risque d'une substance pour les consommateurs, il faut donc pouvoir disposer des informations sur les dangers présentés par celle-ci et sur le niveau d'exposition du consommateur à cette molécule.

Le Centre international de recherche sur le cancer identifie les dangers, les agences de sécurité sanitaire des aliments comme l'EFSA évaluent le risque.

De l'évaluation du risque

Toutes les substances introduites intentionnellement dans un aliment sont soumises à autorisation par les autorités en charge de la gestion du risque. Elles font l'objet au préalable d'une évaluation du risque toxicologique. Au cours de cette évaluation, la caractérisation du danger aboutit à la fixation d'une valeur toxicologique de référence, la DJA.

La DJA est la quantité maximale d'une substance qu'un individu peut consommer tous les jours de sa vie sans courir de risque pour sa santé. Elle est déterminée à partir de la dose sans effet (DSE) dans l'étude et dans l'espèce la plus sensible affectée *a priori* de deux facteurs de sécurité. Le premier, égal à 10, tient compte de la variabilité inter-espèce et repose sur le postulat que l'Homme est 10 fois plus sensible que l'espèce animale la plus sensible. Le second, également égal à 10, tient compte de la variabilité intra-spécifique (la population humaine est hétérogène, alors que les lots des animaux utilisés sont très homogènes). La DJA sera donc égale à la DSE divisée par 100, et sera exprimée en mg ou en µg par kg de poids corporel par jour. Dans certains cas, un facteur de sécurité supérieur à 100 peut être utilisé si l'on connaît la plus grande susceptibilité de l'Homme à un effet toxique ou en cas d'un effet toxique particulier.

¹⁰ Voir l'annexe 2.

De la cancérogenèse

La cancérogenèse est un phénomène multiphasique, multifactoriel et multi-factuel.

Multiphasique parce qu'il a été identifié de nombreuses étapes que l'on regroupe habituellement en 4 phases intitulées : initiation, promotion, progression et invasion. Chaque phase peut elle-même comporter plusieurs événements biologiques.

Multifactoriel parce que ce sont des facteurs différents qui induisent les phases :

- Des facteurs de prédisposition individuelle liés à la génétique de chaque sujet ;
- Des agents physiques (rayonnements), chimiques ou biologiques peuvent induire la phase d'initiation ;
- Des agents biologiques (virus, bactéries ou parasites) ou chimiques peuvent induire la phase de promotion ;
- Des agents qui induisent les phases de progression et d'invasion moins bien connus : parmi eux, on connaît certains virus et vraisemblablement des agents chimiques.

Multi-factuel parce que les événements cellulaires lors de chacune des phases sont différents :

- Lors de la phase d'initiation, la cible cellulaire est l'ADN. Les dommages peuvent être des mutations ponctuelles, des cassures de l'ADN ou des anomalies de nombre de chromosomes. On parle alors de génotoxicité, qui conduit à des surexpressions de gènes tels que les proto-oncogènes ou à l'altération de l'expression de gènes tels que les gènes suppresseurs de tumeurs. Contrairement au principe émis par Paracelse : *Sola dosis fecit venenum*, seule la dose fait le poison, on considère que l'effet génotoxique est généralement indépendant de la dose. Une très petite dose d'un génotoxique répétée très souvent peut être aussi délétère, voire plus, qu'une dose unique plus élevée. En conséquence, lors de l'évaluation du risque d'une substance introduite intentionnellement dans les aliments, si celle-ci est génotoxique *in vivo*, elle ne sera jamais autorisée. Les agents génotoxiques peuvent altérer l'ADN de cellules de tout l'organisme sans spécificité d'organe. Les cellules qui ont subi une modification de leur ADN ou de leurs chromosomes sont appelées cellules initiées ;
- La phase de promotion intervient obligatoirement après la phase d'initiation. Cependant le laps de temps entre l'initiation, qui est irréversible, et la promotion peut être long, voire très long, allant jusqu'à plusieurs dizaines d'années. La phase de promotion n'aura de conséquence en termes d'effet cancérogène que sur des cellules préalablement initiées. Contrairement aux agents génotoxiques, les promoteurs présentent généralement une spécificité d'organe. Les promoteurs obéissent à la règle de Paracelse puisqu'il est possible d'identifier des doses sans effet cancérogène promoteur et des doses avec effet au-delà d'une dose seuil, l'effet étant alors lié à la dose. Au cours de la phase de promotion, des fonctions cellulaires essentielles sont perturbées, induisant ainsi l'apparition de lésions pré-cancéreuses. On parle d'événement épigénétique quand l'expression des gènes est modifiée sous l'action de l'environnement sans modification préalable de la

structure de l'ADN ;

- La phase de progression concerne l'apparition de la tumeur cancéreuse proprement dite. Elle est caractérisée par une instabilité génomique. Elle n'est pas induite par des agents chimiques, mais le rôle de virus dans certains types de cancer est évoqué ;
- La phase d'invasion consiste en l'apparition de métastases, dues à la migration de cellules cancéreuses de la tumeur primaire vers d'autres organes, où elles parviennent à être tolérées.

Les deux dernières phases n'étant pas induites par des produits chimiques, elles ne relèvent pas de la toxicologie prédictive ou *a posteriori*. Le rôle des toxicologues est donc de détecter et d'identifier des agents génotoxiques ou des promoteurs.

TOXINES BOTULIQUES ET BOTULISME

Les toxines botuliques

Il existe 7 types différents de toxines botuliques, qui sont secrétées chacune par un type de bactérie du type *Clostridium botulinum* (cf. plus bas dans cette partie) présente dans l'aliment. Les toxines botuliques font partie des substances les plus toxiques pour l'Homme connues. Elles bloquent la transmission neuromusculaire en empêchant la libération de l'acétylcholine par exocytose au niveau de la terminaison synaptique. La neurotoxine botulique ingérée ou produite dans la lumière intestinale lors de la toxi-infection traverse la muqueuse intestinale par transcytose, sans causer de lésions. Les neurotoxines botuliques sont thermolabiles. Elles sont détruites par un chauffage à 85 °C pendant 5 minutes.

Selon l'ANSES (2019), la toxine botulique A est la plus active. La dose létale¹¹ chez un homme adulte est estimée être comprise entre 0,1 et 1 µg par voie parentérale, et 70 µg par voie orale (1 µg par kg de poids corporel). La consommation de quelques grammes d'aliment contaminé est suffisante pour provoquer un botulisme. Les effets toxiques sont fonction de la concentration en toxine ou de la teneur en bactéries/spores de *C. botulinum* dans l'aliment. La maladie apparaît d'autant plus rapidement et est d'autant plus sévère que la quantité de toxine ingérée est élevée.

Botulisme alimentaire

Le botulisme alimentaire est dû à l'ingestion de toxine botulique produite par une bactérie, toxine préformée dans un aliment. L'incubation est variable, généralement de 12 à 36 h, avec des extrêmes de 5 h à 8 j. Les premiers symptômes apparaissent généralement quelques heures après l'ingestion de nourriture contaminée. Ce sont des symptômes gastro-intestinaux, nausées, vomissements, diarrhée ou constipation. Une paralysie s'installe ensuite, d'abord une paralysie des nerfs crâniens et une paralysie musculaire descendante et symétrique des muscles autonomes et volontaires. La maladie évolue ensuite vers une paralysie bilatérale. Des troubles de la vue apparaissent, puis une paralysie des muscles buccaux et faciaux entraînant sécheresse buccale, trouble de la mastication, difficulté à déglutir, enrouement, difficulté à articuler, relâchement des muscles du visage, faiblesse du cou. Dans les cas les plus graves, la paralysie peut toucher les muscles des membres puis les muscles respiratoires intercostaux et le diaphragme, ce qui provoque une détresse respiratoire et peut entraîner le décès par insuffisance respiratoire (Perrin, 2018).

¹¹ Qui provoque la mort de l'individu.

Sur les sept types de botulisme connus aujourd'hui (types A à G), quatre (les types A, B, E et, plus rarement, F) affectent l'Homme ; chaque toxine est produite par une bactérie *Clostridium botulinum* spécifique. Le botulisme de type A (sérotypage pathogène pour l'Homme et rarement certains animaux), le plus grave pour l'Homme, est lié aux conserves de légumes et aux produits laitiers. Le botulisme de type B (sérotypage pathogène pour l'Homme), moins grave, lié aux conserves de viande et aux charcuteries, dominant en France et en Europe centrale. Le botulisme de type E (sérotypage pathogène pour l'Homme et pour certains animaux), avec une augmentation préoccupante en France en élevage avicole depuis 1997, normalement lié aux poissons et aux fruits de mer. Il existe aussi le botulisme de type F qui est rare ; c'est un sérotypage pathogène pour l'Homme et certains animaux. Chaque type peut être neutralisé par un sérum spécifique (Perrin, 2018).

Le botulisme infantile provoque chez le nouveau-né une anorexie, une altération des cris et une perte du contrôle de la tête, une constipation, puis une paralysie et une insuffisance respiratoire dans les formes graves. Cette forme de botulisme est due, chez le jeune enfant, à la colonisation de l'intestin par *C. botulinum*, tandis que le botulisme alimentaire de l'adulte résulte d'ingestion de toxine botulique préformée dans l'aliment. Le miel, mais aussi l'ingestion de poussières contenant des spores de *C. botulinum*, ont été reconnus responsables de ce botulisme, qui peut aussi se rencontrer chez l'adulte (ANSES, 2019). Les données sur la fréquence du botulisme sont présentées dans le chapitre « Données épidémiologiques ».

Les données épidémiologiques sur le botulisme sont présentées dans le chapitre 9.

TOXICITE DES ADDITIFS ALIMENTAIRES E 249 ET E 250 AUTORISES COMME CONSERVATEURS

Sur le plan toxicologique, il convient de bien distinguer les risques potentiellement induits par la présence de résidus de nitrites dans la charcuterie telle que consommée des risques potentiellement induits par des substances formées à partir de nitrite lors du procédé technologique ou formées dans l'organisme de manière endogène, comme des nitrosamines, de l'hème nitrosylé ou des produits de peroxydation lipidique. Les questions qui se posent sont les suivantes :

- Question 1 : Les résidus de nitrites présents dans la charcuterie telle que consommée font-ils courir des risques aux consommateurs ? Sont-ils cancérogènes ? Génèrent-ils lors de la digestion des nitrosamines endogènes cancérogènes ou des aldéhydes dus à la peroxydation lipidique potentiellement cancérogènes ?
- Question 2 : Des produits néoformés en présence de nitrites lors du procédé technologique, donc présents dans le produit fini, sont-ils cancérogènes, soit l'hème nitrosylé, des nitrosamines ou des produits issus de la peroxydation lipidique ?

Pour répondre à la question 1, on dispose de la réévaluation par l'EFSA du risque induit par l'utilisation de nitrites comme conservateurs, ainsi que de travaux de recherche en toxicologie mécanistique.

Pour répondre à la question 2, on dispose de la revue des données scientifiques réalisée par l'EFSA quant à la quantité de nitrosamines présentes dans les viandes traitées aux nitrites ainsi que de travaux de recherche en toxicologie mécanistique.

Réévaluation des nitrites de sodium (E249) et potassium (E250) par l'EFSA en 2017

La Commission européenne avait demandé à l'EFSA de réévaluer, avant 2020, tous les additifs ayant été autorisés avant le 20 janvier 2009. Dans ce cadre, l'EFSA a réévalué en 2017 la sécurité de la plupart des additifs autorisés en charcuterie dont les nitrites de potassium et de sodium (E249, E250) et les nitrates de sodium et de potassium (E251 et E252)¹². Considérant que l'évaluation du JECFA en 2003 couvrait toutes les études disponibles avant 2002, l'EFSA a limité la recherche bibliographique aux publications et études disponibles depuis 2002.

La partie toxicologique de l'avis de l'EFSA est complexe et peu accessible aux non-spécialistes. Cependant il est possible d'en dégager les éléments les plus importants suivants :

- **Toxicocinétique** : chez l'animal et chez l'Homme le nitrite de sodium est absorbé pratiquement totalement au niveau gastro-intestinal et la principale voie métabolique des nitrites est la conversion quasi totale en nitrates, ensuite excrétés dans l'urine. Les autres métabolites des nitrites formés au cours du métabolisme sont le monoxyde d'azote (ou oxyde nitrique, NO) et les espèces réactives de l'oxygène qui sont aussi formées lors de la conversion des nitrites en métabolites mineurs (Figure 2). La plus importante source de nitrites provient de la consommation d'aliments (surtout les légumes) et d'eau contenant des nitrates et de la conversion des ions nitrates en ions nitrites dans la salive par des bactéries réductrices de la flore buccale (Witter et Balish, 1979 ; JECFA, 2003). Cette conversion est estimée entre 5 % et 36 % (Wagner *et al.*, 1983 ; Bartholomew et Hill, 1984 ; Spiegelhalter *et al.*, 1976 ; Bos *et al.*, 1988 ; Granli *et al.*, 1989 ; Shapiro *et al.*, 1991 ; Jin *et al.*, 2013 ; Bondonno *et al.*, 2015 ; Woessner *et al.*, 2016 ; Hohensinn *et al.*, 2016 ; Montenegro *et al.*, 2016).

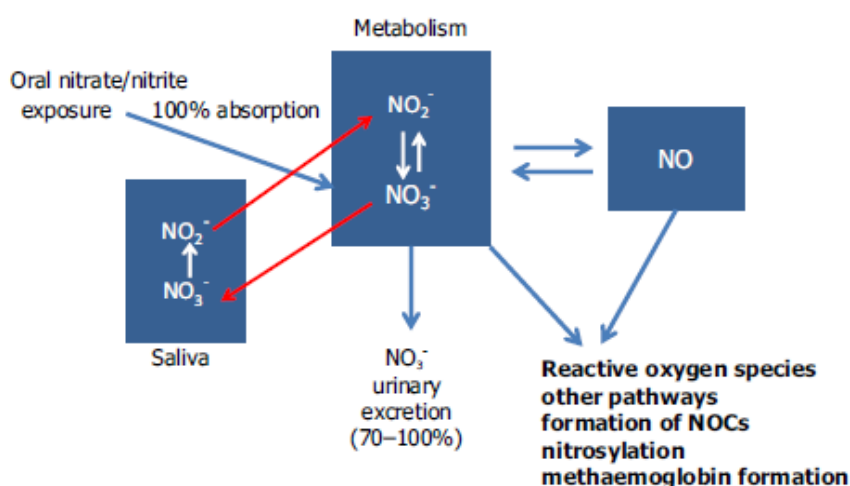


Figure 2 - Devenir des nitrites et des nitrates dans l'organisme selon l'EFSA (2017a) ; NOCs désigne les N-nitrosamines et les N-nitrosamides.

¹² La réévaluation par l'EFSA des additifs E251, nitrate de sodium, et E252 nitrate de potassium, est présentée en annexe 4.

- Génotoxicité :

a) Les tests *in vitro* de mutations géniques sur bactéries et les tests d'induction d'aberrations de structures chromosomiques, de mutations génétiques, d'aneuploïdie¹³ et de transformation cellulaire dans les cellules de mammifères sont positifs.

b) Les études *in vivo* n'ont pas établi de potentiel génotoxique dans des essais du micronoyaux chez le rat et la souris quand les nitrites ont été administrés par voie intrapéritonéale à des doses allant respectivement jusqu'à 250 et 200 mg/kg poids corporel/ jour pendant 3 jours et par addition dans l'eau de boisson à des doses allant jusqu'à 125 mg/kg de poids corporel/ jour chez la souris pendant 14 semaines (NTP, 2001). Aucune augmentation de la 8-hydroxydésoxyguanosine (marqueur des lésions oxydatives de l'ADN) n'a été démontrée au niveau du pré-estomac chez le rat après exposition aiguë et subchronique de 12 semaines par addition dans l'eau de boisson. Une étude du test des comètes¹⁴ au niveau de l'estomac, du côlon, du foie, des reins, de la vessie, des poumons, du cerveau et de la moelle osseuse chez la souris, réalisée 3 et 24 h après le traitement, n'a mis en évidence aucun effet génotoxique (Okazaki *et al.*, 2006). Enfin, une étude non évaluée par l'EFSA (Tomoyasu *et al.*, 2010) n'a pas permis de mettre en évidence de lésions primaires de l'ADN au niveau de l'estomac glandulaire chez la souris par le test des comètes *in vivo* ni d'augmentation de la 8-hydroxydésoxyguanosine dans l'ADN de l'estomac.

- Toxicité à court terme, toxicités subchronique et chronique : chez le rat et la souris exposés par voie orale à du nitrite de sodium ou du nitrite de potassium, l'effet toxique principal est la transformation de l'hémoglobine (Fe^{2+}) en méthémoglobine (Fe^{3+}), diminuant ainsi la capacité des globules rouges à transporter de l'oxygène vers les différents tissus de l'organisme, induisant ainsi une hypoxie de ces tissus (Mensinga *et al.*, 2003). Le taux normal de méthémoglobine dans le sang est compris entre 1 % et 3 % de l'hémoglobine totale. Les signes cliniques de la méthémoglobinémie (taux de méthémoglobine > 20 %) sont cyanose et hypoxie, ainsi que léthargie, dyspnée, maux de tête et tachycardie. Un taux de méthémoglobinémie supérieur à 50 % provoque des lésions majeures et la mort (Mensinga *et al.*, 2003). Il est également rapporté une diminution de la pression artérielle, des troubles cardiaques et respiratoires chez le rat, ainsi qu'une diminution de la pression artérielle et une vasodilatation chez l'Homme.
- Cancérogenèse : les études de cancérogenèse, réalisées chez le rat et la souris, n'ont pas mis en évidence d'effet cancérogène significatif induit par le nitrite de sodium. Il a été observé chez la souris, par addition dans l'eau de boisson jusqu'à 3000 mg de nitrite de sodium/L pendant 104 semaines, une augmentation

¹³ L'aneuploïdie caractérise une cellule qui possède un nombre anormal de chromosomes.

¹⁴ Le test des comètes (Comet assay, en anglais) est une technique d'électrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose, qui permet de mesurer les cassures de l'ADN induites par les agents génotoxiques.

statistiquement significative de l'incidence de tumeurs du pré-estomac (organe absent chez l'Homme, chez lequel la présence d'induction de tumeurs n'est pas transposable pour un produit non mutagène *in vivo*) et d'adénome ou de carcinome du poumon chez la souris femelle, mais ces tumeurs ne sont pas invasives et ne donnent pas lieu à des métastases. Les auteurs de l'étude (NTP¹⁵ 2001), ainsi que l'EFSA (2017a), ne considèrent pas que ces observations permettent de suspecter un potentiel cancérigène du nitrite de sodium pour l'Homme. Une étude de cancérogenèse a été réalisée chez le rat, le nitrite de sodium étant administré pendant 2 ans via l'eau de boisson. Aucune augmentation de l'incidence de tumeurs n'a été observée jusqu'à une dose de 125 mg/kg de poids corporel par jour (Maekawa *et al.*, 1982).

- Reproduction : Une étude de toxicité vis-à-vis des fonctions de reproduction sur une génération n'a révélé aucune toxicité chez la souris, à des doses allant jusqu'à 430 mg/kg de poids corporel par jour (NTP, 1990). Aucun effet sur le développement des fœtus n'a été observé sur des femelles gestantes de souris, rat, hamster et lapin exposées à des doses de nitrite de sodium allant respectivement jusqu'à 23, 10, 32 et 23 mg/kg de poids corporel par jour (FDA, 1972 a, b).
- Des études chez l'Homme ont confirmé que l'exposition aux nitrites induit la formation de méthémoglobine (Kortboyer *et al.*, 1997 ; Chui *et al.*, 2005 ; Bryk *et al.*, 2007 ; Hunault *et al.*, 2009 ; Harvey *et al.*, 2010).

¹⁵ Le NTP ou *National Toxicology Program* (Programme national de toxicologie en français) est un programme fédéral des États-Unis inter-agences au service de la santé publique pour coordonner, évaluer et diffuser les travaux réalisés par différentes agences d'État en matière de toxicologie.

En résumé

L'EFSA a conclu que les études de cancérogenèse chez la souris et le rat étant négatives ou non extrapolables à l'Homme, une DJA pouvait être fixée pour les nitrites à partir des études toxicologiques disponibles chez l'animal. La méthémoglobinémie est l'effet toxique observé dans toutes les études, chez l'animal et chez l'Homme. Si des effets génotoxiques ont été démontrés *in vitro*, ceux-ci n'ont pas été confirmés *in vivo* au niveau de plusieurs organes chez le rat et la souris dans plusieurs études indépendantes.

Le Panel a donc considéré qu'un taux de méthémoglobine élevé qui n'est pas compensé par les systèmes physiologiques de réduction de la méthémoglobine, qui la convertissent en hémoglobine, est l'effet toxique sur lequel doit être basée la détermination de la DJA par une approche Benchmark Dose¹⁶ (BMD ; dose repère, en français) à partir des résultats de l'étude réalisée par le NTP (2001). A partir de la modélisation des résultats obtenus au bout de 14 semaines, une BMD de 9,63 mg/kg de poids corporel par jour a été déterminée.

En appliquant un facteur de sécurité de 100, une DJA de 0,1 mg/kg de poids corporel est obtenue pour le nitrite de sodium, soit 0,07 mg d'ions nitrites/kg de poids corporel par jour.

Les nitrosamines néoformées ou d'origine endogène

Toxicité

Les N-nitrosamines, ou composés nitrosés, sont des substances qui peuvent se former par une réaction de nitrosation (addition d'un radical nitroso) à partir de précurseurs comme des amines primaires ou secondaires¹⁷, ou des sels d'ammonium quaternaire des dérivés amide N-substitué, avec des agents nitrosants comme le nitrite (NO_2^-) ou les oxydes d'azote (NO_x) (ANSES, 2012).

Pour exercer leurs effets toxiques, les nitrosamines nécessitent une activation métabolique essentiellement par oxydation par les cytochromes P450 2E1 et 2B1 (Chowdhury *et al.*, 2012) pour former des ions méthylcarbonium très instables et électrophiles, donc très réactifs. Ce sont ces molécules hautement réactives, génotoxiques, qui provoquent des lésions primaires de l'ADN et des mutations et peuvent contribuer à l'induction de cancers. Les adduits à l'ADN formés à la suite d'une exposition à la diméthylnitrosamine (NDMA) sont principalement la N7-méthylguanine et l'O6-méthylguanine. Les métabolites de ces nitrosamines réagissent aussi avec les protéines, ce qui peut provoquer, à fortes doses, des nécroses du foie qui est l'organe principal de métabolisation des nitrosamines.

Un certain nombre de nitrosamines sont donc de puissants cancérogènes, ce qui a conduit le IARC/CIRC (2010) à en classer certaines en groupe 2A ou 2B, c'est-à-dire probablement ou

¹⁶ Bench Mark Dose (BMD) : La dose minimum d'une substance qui produit un effet net, présentant un risque peu élevé sur la santé, généralement de l'ordre de 1 à 10 % de modification pour un effet toxique spécifique, comme l'induction d'un cancer (Efsa, *glossary*).

¹⁷ Une amine est un composé organique dérivé de l'ammoniaque dont au moins un atome d'hydrogène a été remplacé par un groupe carboné. Les amines sont classées en amines primaires RNH_2 , secondaires R_2NH , tertiaires R_3N et ammoniums quaternaires R_4N^+

possiblement cancérigène pour l'homme (voir tableau en annexe 1). En revanche, quelques nitrosamines ne sont ni mutagènes ni cancérigènes ; certaines n'ont pas été classées, d'autres classées en groupe 3. Environ 90 % des 300 nitrosamines testées ont présenté un potentiel effet cancérigène dans les essais *in vitro* et/ou *in vivo* chez l'animal.

La NDMA est considérée comme étant la plus dangereuse. Après exposition aiguë par voie orale chez le rat, la DL50 est de 23 à 40 mg/kg de poids corporel par jour. Après exposition orale répétée à court terme (3 semaines à 1 mois), des effets hépatotoxiques, souvent associés à une diminution de la durée de vie, ont été observés chez le rat, la souris, le hamster, le cobaye et le singe, ainsi qu'une « congestion » au niveau de divers organes (reins, poumons, rate et myocarde) chez le rat, et des hémorragies gastro-intestinales. La NDMA est cancérigène *in vitro* et *in vivo* ; elle augmente l'incidence de tumeurs hépatiques et des cellules de Leydig chez le rat et la souris après ingestion *via* l'eau de boisson (5 mg/L) ou la nourriture (10 mg/kg de poids corporel). Chez la souris, des tumeurs hépatiques, pulmonaires et rénales ont été observées après administration *via* l'eau de boisson (0,01 – 5 mg/L). De plus, dans certaines études, la période d'exposition était relativement courte (par exemple 3 semaines).

Prévalence des nitrosamines néoformées

Les nitrosamines peuvent se former dans des conditions de température élevée comme lors de la cuisson de certains aliments (par exemple friture).

Selon l'EFSA (2017a), des nitrosamines peuvent théoriquement se former dans certains produits de charcuterie (voir tableau 1). Dans certaines conditions (pH et concentration en substrats), le nitrite peut former des nitrosamines avec des constituants des aliments.

L'EFSA (2017a) a réalisé une revue systématique de la littérature scientifique des études sur la nature des nitrosamines, ainsi que leurs quantités présentes dans les denrées alimentaires européennes auxquelles étaient ajoutées des nitrites (De Mey *et al.*, 2009, 2014 ; Herrmann *et al.*, 2015 ; Drabik-Markiewicz *et al.*, 2010, 2011 ; Shahidi *et al.*, 1994). La formation de N-nitrosamines dans les produits de viande dépend de différents paramètres associés aux conditions de préparation (type de viande, température, pH, additifs et matières premières), stockage, et température lors de la préparation culinaire (cuisson, grillade, friture). La présence de certains substrats pour une réaction de nitrosation (acides aminés libres, amines biogènes) peut aussi avoir un impact sur la formation des nitrosamines. Les études dans lesquelles seule la quantité de nitrites était modifiée ont montré une relation positive entre la quantité de nitrites présents et la quantité de nitrosamines formées.

Quand des nitrites sont ajoutés à la quantité autorisée par la réglementation, les nitrosamines volatiles NDMA et NDEA (qui sont les plus préoccupantes sur le plan toxicologique) n'ont jamais été détectées ou leur niveau était proche de la LOQ (limite de quantification). Elles ont aussi été détectées à ces niveaux en l'absence de nitrites ajoutés (EFSA, 2017a).

Des nitrosamines volatiles ont été plus fréquemment détectées à des concentrations supérieures dans les produits de viande traités à températures élevées et quand des nitrites sont ajoutés à des quantités supérieures à celles autorisées (voir Expologie).

A partir de ces données, 8 nitrosamines volatiles et 10 nitrosamines non volatiles ont été identifiées dans les viandes transformées (EFSA, 2017a) :

Nitrosamines volatiles	Nitrosamines non volatiles
<i>N</i> -nitrosodiméthylamine (NMDA)	<i>N</i> -nitrosohydroxyproline (NHPRO)
<i>N</i> -nitrosomorpholine (NMOR)	<i>N</i> -nitrosoproline (NPRO)
<i>N</i> -nitrosométhyléthylamine (NMEA)	<i>N</i> -nitrososarcosine (NSAR)
<i>N</i> -nitrosopyrrolidine (NPYR)	<i>N</i> -nitrosométhylaniline (NMA)
<i>N</i> -nitrosododiéthylamine (NDEA)	
<i>N</i> -nitrosopipéridine (NPIP)	<i>N</i> -nitrosodiisobutylamine (NDiBA)
<i>N</i> -nitrosodibutylamine (NDBA)	<i>N</i> -nitrosodibenzylamine (NDBzA)
<i>N</i> -nitroso-di- <i>n</i> -propylamine (NDPA)	Acide <i>N</i> -nitroso-2-hydroxyméthyl-thiazolidine-4-carboxylique (NHMTCA)
	Acide <i>N</i> -nitroso thiazolidine-4-carboxylique (NTCA)
	Acide <i>N</i> -nitroso-2-méthyl- thiazolidine-4-carboxylique (NMTCA)
	Acide <i>N</i> -nitrosopipécolique (NPIC)

Tableau 1- Liste des nitrosamines pouvant apparaître lors du traitement de viandes (selon l'EFSA, 2017a)

Prévalence des nitrosamines endogènes

Des NOCs (composés N-nitrosés) sont aussi formés à la suite de réactions chimiques de nitrosation entre les groupes réactifs des peptides ou des acides aminés, présents en concentration élevée dans le tube digestif lors de la digestion et les espèces réactives également présentes dans la lumière du tube digestif. Les nitrosamines et les nitrosamides sont en général formées dans l'estomac, à pH acide (inférieur à 3,5), alors que, dans le côlon, en raison du pH neutre, les réactions de nitrosylation, comme la formation d'hème nitrosylé sont favorisées. Les composés NOC peuvent aussi être produits dans le côlon indirectement par l'action du microbiote (Kobayashi, 2018).

L'hème nitrosylé néoformé ou d'origine endogène

Travaux de l'UMR Toxalim de l'INRAE

L'équipe « Prévention, Promotion de la Cancérogénèse par les Aliments » de l'UMR Toxalim de l'INRAE de Toulouse, dirigée par Fabrice Pierre, a mené différents travaux ayant pour objectif de comprendre comment la consommation de viande rouge ou de charcuteries favorise la cancérogénèse colorectale.

D'après l'audition par visioconférence de Fabrice Pierre, le 6 mai 2020, par le groupe de travail de l'Académie d'Agriculture de France, complétée par différentes publications de son équipe, on note que les travaux sur modèles animaux ont été réalisés :

- Sur des rats chez qui des cellules précancéreuses ont été chimio-induites par l'azoxyméthane (AOM) ou la 1,2-diméthylhydrazine (DMH), c'est-à-dire des rats

ayant été exposés préalablement à une molécule génotoxique (AMO ou DMH) ayant induit l'initiation de certaines cellules.

- Sur des souris Min (*Multiple Intestinal Neoplasia*) possédant une délétion du codon 850 du gène suppresseur de tumeur APC¹⁸ obtenue par un traitement à l'éthylnitroso-urée. Les souris portant cette mutation présentent spontanément des adénomes (tumeur bénigne) évoluant en adénocarcinomes (tumeur maligne) (Bastide *et al.*, 2015).

Ces études montrent une augmentation de la fréquence d'apparition de lésions précancéreuses sous forme de foyers de cryptes aberrantes (ACF) et/ou de foyers déplétés en mucine (MDF) au niveau du côlon après consommation de viande traitée aux nitrites comparée aux mêmes critères après consommation de viande non traitée. Les auteurs émettent l'hypothèse que les NOC* sont responsables de cet effet, et plus particulièrement l'hème nitrosylé (Santarelli *et al.*, 2010). Cependant Bastide *et al.* (2015) administrent des nitrates + nitrites dans l'eau de boisson des animaux et concluent que les NOC* n'ont pas d'effet sur la cancérogenèse chez le rat. Ces résultats sont à nuancer compte tenu des protocoles expérimentaux. La charcuterie nitritée, cuite à environ 70 °C (épaule/jambon), aurait un rôle promoteur sur des cellules prénéoplasiques. Cependant, les doses alimentaires utilisées chez l'animal sont de 5 à 10 fois supérieures à celles des doses maximales lors de l'exposition alimentaire humaine. Il n'existe donc pas de démonstration d'un effet promoteur aux niveaux d'exposition correspondant aux quantités normalement apportées par l'alimentation humaine.

L'hypothèse mécanistique de F. Pierre et ses collaborateurs est résumée Figure 3 (Pierre, 2019) :

¹⁸ Adenomatous polyposis coli (protéine)

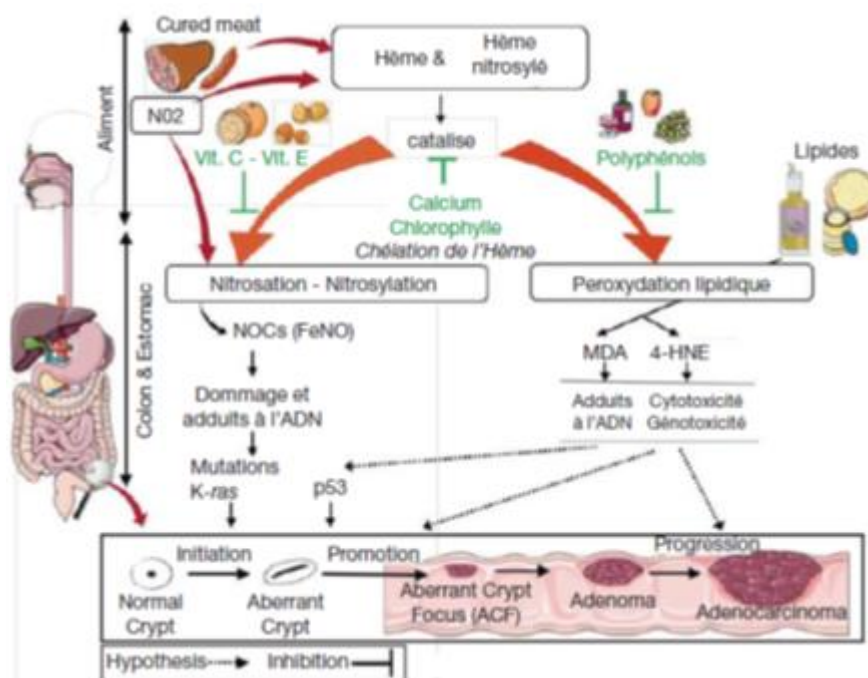


Figure 3 – Effet de la consommation de charcuteries sur la carcinogénèse¹⁹ colorectale. Rôle des produits néoformés issus de la nitrosylation et de la peroxydation catalysées par le fer héminique dans le risque et prévention du risque par la maîtrise de la formation des NOCs et aldéhydes (Pierre, 2019).

Le pouvoir potentiel cancérigène de l'hème nitrosylé n'est pas actuellement totalement élucidé pour l'équipe Toxalim. Une augmentation des lésions précancéreuses dans le côlon de rats femelles, porteuses des cellules précancéreuses chimio-induites à l'AOM, nourries avec un régime alimentaire à base de lard a été observée (Parnaud *et al.*, 1998). En revanche, un régime à base de bacon, cru ou cuit au four à 180-185 °C pendant 15 min, a augmenté de 10 à 20 fois le niveau de NOC* fécal. Cependant la présence intestinale de NOC* due aux régimes à base de bacon a induit, dans trois études indépendantes, une diminution de l'incidence des foyers de cryptes aberrantes au niveau du côlon chez le rat. Dans l'ensemble, les données ne soutiennent pas l'hypothèse selon laquelle le niveau de NOC* pourrait expliquer l'association de la consommation de viande contenant des nitrites avec le risque de cancer du côlon (Parnaud *et al.*, 2000). L'absence de relation entre les NOC* et le nombre de MDF (qui sont des cellules précancéreuses du côlon) ne confirme pas le rôle des NOC* dans la promotion de la carcinogénèse du côlon par la viande rouge traitée par les nitrites. Il n'existe pas de lien de causalité entre les effets des promoteurs des MDF et le fer nitrosylé. Toutefois la viande cuite traitée au nitrite et oxydée par exposition à l'air a augmenté de manière significative la concentration fécale des composés N-nitroso totaux apparents (ATNC) et le nombre de MDF par côlon par rapport au régime témoin sans viande. Cette viande séchée traitée aux nitrites et oxydée augmentait spécifiquement le nombre de MDF par rapport à une viande similaire non traitée aux nitrites et à une viande similaire non oxydée. Dans cette étude, la viande traitée aux nitrites a été salée avec du sel (NaCl) contenant 0,6 g de nitrite de sodium / 100 g de sel, tandis que la viande non traitée au nitrite

¹⁹ Le terme carcinogénèse est employé par l'auteur dans ce schéma, le groupe de travail préfère le terme cancérogénèse

a été salée avec du sel ordinaire sans nitrite de sodium. La charcuterie cuite contenait 2 g de sel nitrité / 100 g de viande, ce qui représente 120 mg de nitrite par kg de viande.

Ces études ont été menées pour éclairer les résultats contradictoires des études épidémiologiques sur des facteurs initiateurs ou promoteurs de la cancérogenèse colorectale. L'implication de la consommation excessive de fer, en particulier de fer héminique, est confirmée dans des situations inflammatoires. Cependant l'implication des nitrites dans les charcuteries nitritées n'est pas clairement démontrée expérimentalement.

La consommation de viande traitée au nitrite, cuite et riche en hème oxydé provenant de porc ou de charcuterie (*cured meat : hot dog*), entraîne aussi une excrétion fécale accrue de NOCs* endogènes chez le rat (Santarelli *et al.*, 2010 ; 2013).

Etudes expérimentales chez l'Homme

A) Consommation de viande rouge et NOCs*

Plusieurs études chez l'Homme du début des années 2000, ont montré que seule la viande rouge (mais pas la viande blanche, ni du fer inorganique, ni un régime végétarien) induit la formation de NOCs* détectés dans les selles (NOCs* totaux apparents : ATNC), cela de manière proportionnelle aux quantités de viande rouge consommée (Seiwert *et al.*, 2020). Par exemple, dans l'étude de Lewin *et al.* (2006), la consommation de viande rouge faisait croître la concentration en NOCs* endogènes des selles (ATNC), ainsi que celle de l'adduit O⁶-CMG (O⁶-carboxyméthylguanine) dans des cellules coliques exfoliées, cela proportionnellement aux quantités de viande consommée ; les concentrations d'ATNC et d'O⁶-CMG étaient corrélées positivement. Dans une autre étude, la même équipe rapporte que la consommation de viande rouge (essentiellement de bœuf) conduisait à des concentrations fécales relatives (dans le mélange d'ATNC) plus élevées de fer nitrosylé, et moins de composés nitrosothiols et autres NOCs*, qu'avec de la viande transformée (bacon, jambon fumé, charcuterie à sandwich) (consommations d'environ 400 g de viande/j) (Joosen *et al.*, 2009). Ces différences ne se traduisaient pas par des différences du nombre de cassures d'ADN induites par les eaux fécales correspondantes, et la présence de nitrite n'avait aucun effet sur les résultats (Joosen *et al.*, 2009).

B) Réactions chimiques dans le tube digestif supérieur (estomac + intestin grêle)

Une étude conduite chez des patients iléostomisés a permis de montrer que des NOCs* (ATNC) se forment aussi dans le tube digestif proximal, avant la jonction iléo-caecale. Ils étaient en concentrations supérieures lorsque les patients consommaient de la viande transformée (240 g/j : bacon, jambon, corned beef) par rapport à de la viande rouge (240 g/j ; bœuf) (Lunn *et al.*, 2007). Les auteurs ont conclu que l'hème favorise la formation de NOCs* dans le tube digestif supérieur, en l'absence de flore colique. Cela confirme les résultats des études conduites en digesteurs artificiels rapportées ci-dessous.

C) Importance du transit digestif sur la variation des réponses individuelles à la consommation de viande « rouge ».

Deux études indiquent l'importance du transit digestif dans les réponses individuelles de formation de NOCs* consécutives à la consommation de viandes rouges ou transformées :

- Une étude anglaise portant sur les viandes avait montré que la concentration fécale de NOCs* (mesurés en ATNC) était proportionnelle au temps de transit des aliments dans le tube digestif (Hughes *et al.*, 2001), suggérant ainsi que les

individus à transit lent étaient les plus exposés à la formation de NOCs*.

- Dans une autre étude, le temps de transit total était plus faible avec la viande rouge par rapport à la viande transformée (44 et 70 heures, en moyenne) (Joosen *et al.*, 2009) ; seules les concentrations fécales de fer nitrosylé ou des autres NOCs* (mais pas celles de nitrosothiols) corrélaient avec le temps de transit.

Etudes en digesteurs artificiels

Les digesteurs artificiels sont des modèles *in vitro* qui miment de façon statique ou dynamique les étapes de la digestion humaine. Une équipe belge a récemment détecté près d'une centaine de produits d'oxydation des lipides ou d'alkylation de la viande au cours de la digestion dans un digesteur artificiel (Hemeryck *et al.*, 2018). Trois études de cette équipe ont été conduites dans des digesteurs artificiels, dont le compartiment colique a étéensemencé par des inocula fécaux humains, afin d'évaluer quantitativement les réactions d'oxydation des lipides et de formation de NOCs* selon le compartiment digestif, cela en relation avec le type de viande et de traitement (avec ou sans nitrite), ou encore la teneur en lipides (van den Bussche *et al.* 2014 ; van Hecke *et al.*, 2014 ; 2015 ; Hemeryck *et al.*, 2017, 2018).

Concernant les sites de formation de ces composés, ces études ont montré notamment que le MDA est formé principalement lors de la digestion dans le compartiment « intestin grêle », alors que les réactions d'alkylation et la formation d'adduits de l'ADN ont lieu essentiellement dans le compartiment colique (Van den Bussche *et al.*, 2014). Dans cette étude, la concentration de MDA était corrélée à la teneur en hème des viandes, et la concentration de l'adduit O⁶-CMG ; (produit d'alkylation de la guanine en position O-6) était plus élevée avec les viandes dites « rouges » (bœuf, porc) qu'avec une viande blanche (poulet). L'ajout de myoglobine à des doses variables dans le digesteur s'est traduit par une augmentation proportionnelle de la concentration colique de MDA et de l'O⁶-CMG (Van den Bussche *et al.*, 2014). Les auteurs ont conclu qu'au cours de la digestion, le fer héminique est impliqué dans les deux voies métaboliques : l'oxydation des lipides et la formation des NOCs*.

Dans une autre étude en digesteurs, van Hecke *et al.* (2015) ont observé que la viande de porc traitée à la plus haute température (90 °C-30 min, vs. 65 °C-15 min) résultait en une plus grande peroxydation lipidique (et protéique). Le fait de traiter la viande au nitrite a eu un effet antioxydant, observable avec la viande traitée à 65 °C, mais qui disparaissait avec le traitement thermique le plus fort ; la concentration de 4-HNE dans le milieu de digestion était alors jusqu'à 9 fois plus élevée par rapport à la viande nitritée et cuite à 65 °C (van Hecke *et al.*, 2015). La concentration en O⁶-CMG était la plus élevée avec le traitement thermique à haute température, cela indépendamment du traitement aux nitrites. Les auteurs ont conclu que c'est avec une température excessive de cuisson que le risque de formation d'adduits dans le côlon et l'influence des nitrites sont les plus élevés.

Afin d'étudier le rôle du microbiote, dans les études conduites dans un digesteur artificiel, le compartiment colique avait été préalablementensemencé par des inocula fécaux humains. Les résultats ont montré que l'oxydation des lipides et la formation d'adduits étaient extrêmement variables selon l'individu ayant fourni l'inoculum, illustrant ainsi l'importance du microbiote digestif dans ces processus (Van den Bussche *et al.*, 2014 ; van Hecke *et al.*, 2015). Durant les dernières années, de nombreuses études se sont intéressées au microbiote dans le cadre des cancers colorectaux, mais les relations de causalité restent à

démontrer (Song *et al.*, 2020).

Produits de peroxydation lipidique

Selon les travaux de Pierre et ses collaborateurs, l'hème et l'hème nitrosylé induisent une peroxydation lipidique (voir figure 3). Cependant les nitrites et l'hème nitrosylé sont connus comme ayant une activité antioxydante. Des chercheurs ont montré que l'augmentation de la teneur en lipides ajoutés à la viande conduisait à une augmentation de l'oxydation des lipides (et des protéines), à la fois dans l'intestin grêle et dans le côlon, et favorisait la formation d'O⁶-CMG dans le compartiment colique (van Hecke *et al.*, 2014). Le fait de traiter la viande aux nitrites réduisait la peroxydation lipidique (et protéique) dans le produit et au cours de sa digestion dans le digesteur. Les auteurs ont conclu que les matières grasses alimentaires favorisent la peroxydation et la formation d'adduits dérivés des NOCs. L'effet antioxydant des nitrites sur la peroxydation lipidique a également été observé *in vivo*, car le taux de formation d'aldéhydes est plus important en absence de nitrite. Ainsi la concentration de 80 mg nitrite/kg de charcuterie a permis de diminuer les NOC* d'un facteur 1,2, dont d'hème nitrosylé, sans augmentation de peroxydation lipidique par rapport à la concentration de 150 mg/kg (Martin, 2015, Martin *et al.*, 2018). Sans les nitrites, l'induction de la peroxydation lipidique par le fer est accrue, ce qui augmente la production de différentes molécules toxiques.

Conclusion

Dans leur revue récente, Kruger et Zhou (2018) indiquent que : « ... pour apporter des preuves [de l'implication de causalité des dérivés N-nitrosylés dans l'apparition du cancer colorectal], il est nécessaire d'étudier séparément les effets de chacun des composés chimiques identifiés. Les données *in vitro* ont été obtenues le plus souvent dans des conditions expérimentales qui ne sont pas nécessairement proches/représentatives d'un régime alimentaire « normal » et, de ce fait, n'apportent pas la preuve que l'exposition à l'hème dans le cadre de la consommation normale de viande rouge augmenterait le risque d'apparition d'un cancer colorectal. Les études conduites chez l'animal reposent sur des modèles testant la promotion de conditions pré-néoplasiques et ont utilisé des régimes pauvres en calcium et riches en matières grasses, combinés à des expositions exagérées en hème et qui, dans de nombreux cas, correspondaient à des niveaux dépassant de plusieurs fois les consommations « normales » de viande rouge. Finalement, les preuves cliniques disponibles suggèrent que les NOCs* formés après l'ingestion de viande rouge chez l'Homme consistent principalement en fer nitrosylé et nitrosothiols, des produits qui ont une chimie profondément différente de celles de certaines espèces N-nitroso pour lesquelles les effets cancérogènes à travers la formation d'adduits d'ADN ont été documentés expérimentalement. En conclusion, les méthodologies employées dans les études des effets de l'hème sur l'apparition des CRC n'ont pas suffisamment démontré que les mécanismes étudiés contribueraient à l'augmentation du risque de promotion de la pré-néoplasie du cancer colique à des niveaux habituels de consommation de viande rouge dans le contexte d'un régime normal. »

Les facteurs impliqués dans la survenue de cancers colorectaux sont multiples, ce qui rend les études mécanistiques difficiles à conduire, cela d'autant plus que les modèles utilisés ont d'importantes limites, et qui rend leurs résultats difficiles à interpréter. On peut toutefois conclure que l'apport de nitrites par les viandes transformées n'apparaît vraisemblablement pas comme étant un facteur prépondérant des mécanismes impliqués dans la survenue de cancers colorectaux chez l'Homme. Cependant, si les hypothèses de l'équipe de Toxalim (Pierre *et al.*) sont justes, ce ne sont pas les nitrites qui seraient cancérogènes, mais un produit néo-formé lors du procédé technologique ou de façon endogène, dans l'organisme, l'hème nitrosylé Fe²⁺. De plus, selon la même équipe, il s'agirait d'un effet cancérogène promoteur, donc dose-dépendant. La difficulté réside alors dans l'identification de la dose sans effet de ce produit néoformé, qui nécessiterait une étude de cancérogenèse réglementaire (2 ans) chez les rongeurs.

En résumé

La toxine botulique synthétisée par *Clostridium botulinum* est une des toxines les plus dangereuses pouvant entraîner la mort du consommateur peu de temps après l'ingestion.

Les additifs alimentaires « nitrite de sodium » (E250) et « de potassium » (E249) ne sont pas cancérogènes seuls au vu des études réglementaires. Leur DJA, basée sur l'effet méthémoglobinisant, a été fixée à 0,07 mg exprimée en ion nitrite/kg de poids corporel, soit pour un adulte de 70 kg, 4,9 mg par jour.

Les études mécanistiques en toxicologie n'ont pas mis en évidence d'effet cancérogène de produits néoformés à partir de nitrites dans les viandes transformées.

Certaines nitrosamines, formées à partir de substances portant des groupes amines et éventuellement des nitrites, sont de puissants cancérogènes. Elles n'ont pas été retrouvées à des concentrations toxicologiquement significatives dans la charcuterie traitée aux nitrites aux doses autorisées par la réglementation.

8. DONNEES D'EXPOLOGIE

L'exposition totale des consommateurs est calculée en faisant la somme de l'exposition induite par la consommation de chaque denrée, elle-même calculée en multipliant la dose par la quantité consommée de la denrée concernée.

FRANCE

Les études de l'alimentation totale

Les études de l'alimentation totale (EAT) menées par l'AFSSA et l'ANSES sont des études nationales de surveillance des expositions alimentaires aux substances chimiques. Elles reposent sur une méthode standardisée et recommandée depuis de nombreuses années par l'OMS. Elles consistent en une collecte d'échantillons alimentaires représentatifs de la consommation de la population, la préparation de ces aliments « tels que consommés », leur analyse, l'évaluation de l'exposition de la population aux substances ciblées et l'évaluation

du risque concernant celles pour lesquelles des valeurs de référence existent. Ces études permettent d'estimer la composition et la contamination des aliments « **tels que consommés** » et de calculer l'exposition des individus via les quantités d'aliments consommés, ce qui aide à mettre en place des politiques de santé publique. L'ANSES a déjà réalisé deux études de l'alimentation totale de l'adulte (publiées en 2004 et 2011) et une EAT infantile, ciblée sur les enfants de moins de 3 ans (2016). La première EAT, réalisée entre 2000 et 2004, a permis de dresser un bilan du niveau d'exposition de la population française de plus de 3 ans aux mycotoxines ainsi qu'aux éléments traces et aux minéraux (Leblanc *et al.*, 2005).

La seconde EAT, mise en œuvre de 2006 à 2011, a évalué l'exposition alimentaire de cette même population en ciblant de nombreuses substances, dont les résidus de produits phytosanitaires et les additifs alimentaires (ANSES, 2011). L'étude EAT2 a conduit à la collecte de 20 000 produits alimentaires représentant 212 types d'aliments, pour lesquels 445 substances ont été recherchées. L'exposition moyenne journalière et celle de forts consommateurs (95^{ème} percentile) a été estimée pour des hypothèses basses et des hypothèses hautes.

Exposition aux nitrites E249 et E 250 selon EAT2

L'exposition moyenne journalière aux nitrites (E249, E250) pour les hypothèses basse et haute est estimée respectivement à :

- 0,8 µg/kg de poids corporel (pc)/j et 2 µg/kg pc/jour (j) chez les adultes,
- 1,4 µg/kg et 4 µg/kg pc/j chez les enfants,

Chez les forts consommateurs, l'exposition aux nitrites (E249, E250) pour les hypothèses basse et haute est estimée respectivement à :

- 2 µg/kg pc/j et 7 µg/kg pc/j chez les adultes,
- 4 µg/kg pc/j et 12 µg/kg pc/j chez les enfants.

Les contributeurs majoritaires sont similaires, quelles que soient l'hypothèse prise en compte et la population étudiée (adultes ou enfants). Les charcuteries sont les premières contributrices (58 % chez les adultes et 52 % chez les enfants). Viennent ensuite les plats composés (27 % chez les adultes et 38 % chez les enfants) puis les sandwiches et les casse-croûtes (13 % chez les adultes et 10 % chez les enfants).

L'ANSES (2011) conclut : « Aucun dépassement de la DJA n'est observé dans la population française. Le 95^{ème} percentile de l'exposition pour l'hypothèse haute représente 11,1 % de la DJA chez les adultes (9,4 %-13,6 %) et 19,6 % de la DJA chez les enfants (16 %-26,6 %). Le risque lié à l'apport de nitrites ne constitue donc pas un problème de santé publique. »

EUROPE

L'évaluation de l'exposition des consommateurs européens aux additifs repose sur une approche différente des EAT, parce que tous les pays européens ne disposent pas de ces études.

L'approche européenne repose sur les données de consommation de chaque pays membre, consultable dans la base de données disponible sur le site de l'EFSA (*EFSA Comprehensive European Food Consumption Database*²⁰).

Les doses d'additifs prises en considération pour calculer l'exposition sont d'une part les doses maximales autorisées par la réglementation européenne dans les denrées pour lesquelles l'usage de l'additif concerné est autorisé. D'autre part, afin d'affiner cette exposition qui est très maximaliste, l'EFSA dispose de données analytiques provenant de plans de surveillance des Etats membres et/ou de données fiables des industriels. En effet, on constate que les doses utilisées par les industriels sont dans certains cas inférieures aux doses maximales autorisées, et que les additifs ne sont pas utilisés dans un certain nombre de denrées.

Exposition aux additifs nitrites E249 et E250 selon l'EFSA (2017)

L'EFSA a estimé que l'exposition la plus réaliste est celle réalisée selon le second scénario.

L'exposition moyenne aux nitrites E249 and E250 (exprimée en ion nitrite) est comprise entre :

- 10 µg/kg de poids corporel par jour chez les nourrissons, les enfants, les adolescents et les personnes âgées ;
- 30 µg/kg de poids corporel par jour chez les enfants de moins de 3 ans.

Chez les forts consommateurs (95^{ème} percentile), l'exposition est comprise entre

- 10 µg/kg de poids corporel par jour chez les nourrissons ;
- 80 µg/kg de poids corporel par jour chez les enfants.

Exposition aux nitrosamines

a. Selon l'EFSA (2017)

L'exposition alimentaire moyenne à la NDMA dans des viandes transformées dans lesquelles les nitrites sont autorisés en tant qu'additifs alimentaires est :

- 0,2 ng/ kg de poids corporel par jour chez les nourrissons ;
- 2,6 ng/kg de poids corporel par jour chez les enfants de 1 à 3 ans.

Chez les forts consommateurs, cette exposition est :

- 0,4 ng/kg de poids corporel par jour chez les nourrissons ;
- 6,2 ng/kg de poids corporel par jour chez les enfants de 1 à 3 ans.

L'exposition alimentaire moyenne à la NDEA dans des viandes transformées dans lesquelles les nitrites sont autorisés en tant qu'additifs alimentaires est :

- 0,03 ng/ kg de poids corporel par jour chez les nourrissons ;
- 0,4 ng/kg de poids corporel par jour chez les enfants de 1 à 3 ans.

Chez les forts consommateurs, cette exposition est :

- 0,2 ng/kg de poids corporel par jour chez les nourrissons ;

²⁰ www.efsa.europa.eu/fr/food-consumption/comprehensive-database

- 1 ng/kg de poids corporel par jour chez les enfants de 1 à 3 ans.

L'exposition alimentaire moyenne à la somme des nitrosamines volatiles (NDMA+ NDEA) dans des viandes transformées dans lesquelles les nitrites sont autorisés en tant qu'additifs alimentaires est :

- 0,2 ng/ kg de poids corporel par jour chez les nourrissons ;
- 3,5 ng/kg de poids corporel par jour chez les enfants de 1 à 3 ans.

Chez les forts consommateurs, cette exposition est :

- 0,5 ng/kg de poids corporel par jour chez les nourrissons ;
- 8,3 ng/kg de poids corporel par jour chez les enfants de 1 à 3 ans.

L'EFSA note que la NDMA représente 90 % de cette exposition.

b. Données de la littérature

Selon Herrmann *et al.* (2015a), l'exposition moyenne aux nitrosamines volatiles dans 3 pays européens (Finlande, Pays-Bas et Allemagne), était de 1 ng/kg de poids corporel par jour (NDMA seule) à 12 ng/kg de poids corporel par jour (somme de NDMA, NPYR, NPIP).

Selon Herrmann *et al.* (2015 b, c), Reink *et al.* (2007) et Campillo *et al.* (2011), l'exposition induite par la consommation de viande transformée au Danemark, en Allemagne, en Estonie et en Espagne était de 0,13 à 2,1 ng/kg de poids corporel par jour chez les adultes et de 0,45 à 3,2 ng/kg de poids corporel par jour chez les enfants.

En résumé

L'exposition mesurée du consommateur français aux additifs nitrite de sodium (E250) et nitrite de potassium (E249) est très faible, et très inférieure à la DJA, de l'ordre de quelques microgrammes par kg de poids corporel par jour.

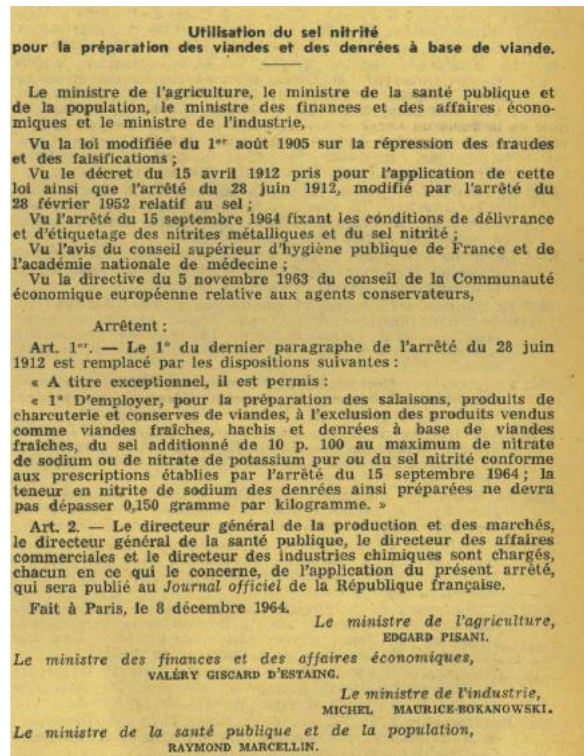
L'exposition estimée des consommateurs européens aux additifs nitrite de sodium (E250) et nitrite de potassium (E249) est faible, toujours inférieure à la DJA, à l'exception des enfants de 3 à 9 ans appartenant à la catégorie des forts consommateurs.

L'exposition des consommateurs européens aux nitrosamines présentes dans les viandes transformées est très faible, de l'ordre du nanogramme.

9. DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES

INCIDENCE DU BOTULISME ALIMENTAIRE

Le sel nitrité a été autorisé officiellement en France par l'arrêté du 8 décembre 1964, publié au Journal Officiel de la République Française des 4 et 5 Janvier 1965 sur avis du Conseil supérieur d'hygiène publique de France et de l'Académie nationale de médecine et le botulisme humain est soumis à déclaration obligatoire en France seulement depuis 1986.



Mazuet *et al.*, (2018) et Rasetti-Escargueil *et al.*, (2020) recensent les cas de botulisme en France depuis 1875 jusqu'en 2016.

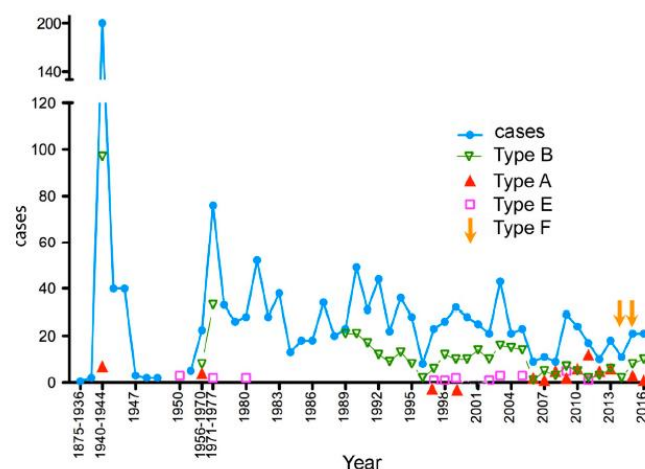


Figure 4 Nombre de cas et de foyers de botulisme humain en France par an, 1875-2016 (Mazuet *et al.*, 2018)

Années	Nombre de cas	Décès	Décès (%)
1956 - 1970	337	17	5,0
1971 - 1980	621	16	2,6
1981 - 1990	293	12	4,1
1991 - 2000	278	5	1,8
2001 - 2016	317	3	0,9

Tableau 2- Mortalité due au botulisme entre 1956 et 2016 en France (Rasetti-Escargueil et al, 2020)

Mazuet *et al.* (2018) font le bilan des cas de botulisme d'origine alimentaire en France depuis 2013 : on observe une forte augmentation du nombre de foyers en 2016 (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Ils recensent également les produits à l'origine des foyers et les produits charcutiers y sont largement majoritaires (Tableau 4).

Année	Nombre de cas/foyer	Nombre de foyers
2013	4	2
2014	3	7
2015	2	10
2016	1	23

Tableau 3-Taille des foyers de botulisme humain en France 2013 – 2016 (N = 42)

Aliment	Type de toxine	Titre en toxine (DLS/g) ^a	Identification de <i>C. Botulinum</i>	Foyer (malades)	Année
Jambon	B	20 000	<i>C. Botulinum</i> B4	1 (2)	2013
Jambon	B	20 000	<i>C. Botulinum</i> B4	1 (3)	2013
Chorizo, saucisse (origine Portugal)	B	<16	Souche non isolée	1 (2)	2013
Jambon	B	40	<i>C. Botulinum</i> B4	1 (4)	2014
Terrine de porc (origine Pologne)	B	20 000	<i>C. Botulinum</i> B4	1 (1)	2015
Steak haché (sauce bolognaise) ^b	F	0	<i>C. Buratii</i> F7	1 (3)	2015
Jambon	B	4 à 1 000 ^c	<i>C. Botulinum</i> A1	1 (2)	2015
Pâté de faisan	A	1600	<i>C. Botulinum</i> B4	1 (3)	2015
Jambon blanc commercial	B	<10	<i>C. Botulinum</i> B4	1 (1)	2015
Chorizo (Portugal) ^d	B		<i>C. Botulinum</i> B4	1 (1)	2015
Jambon	B	40 000	<i>C. Botulinum</i> B4	1 (3)	2016
Jambon	B	40	<i>C. Botulinum</i> B4	1 (2)	2016
Jambon	B	2 000	<i>C. Botulinum</i> B4	1 (4)	2016
Jambon	B	10 000	<i>C. Botulinum</i> B4	1 (3)	2016
Charcuteries portugaises			<i>C. Botulinum</i> B4 ^e	1 (1)	2016

^a DLS : Dose létale souris.

^b La sauce bolognaise préparée avec le steak haché n'était plus disponible pour analyse.

^c Quatre échantillons de jambon avaient des titres en toxine de 4, 8, <4 et 1 000 DLS/g.

^d La contamination du chorizo et des foyers associés ont été déterminés au Portugal. Aucun échantillon de chorizo n'a été adressé au CNR.

^e Souche isolée des selles du malade, aucun reste de charcuterie n'était disponible pour analyse.

Tableau 4 - Aliments identifiés à l'origine du botulisme alimentaire, France 2013 - 2016

Ces données épidémiologiques montrent que l'utilisation de sels nitrités a contribué à protéger le consommateur du botulisme en France.

CANCER COLORECTAL ET NITRITES DE SODIUM (E249) ET DE POTASSIUM (E250)

Il ne saurait être question de faire une analyse exhaustive des très nombreux travaux d'épidémiologie menés dans le domaine des relations entre consommation de viande transformée et risques de cancer ou d'adénome colo-rectal. L'objectif de ce rapport consiste à évaluer spécifiquement le risque de consommation de viandes transformées traitées aux

nitrites, en nous limitant aux données qui permettent cette évaluation. L'influence des nitrates et celle des nitrites étant parfois traitées sans distinction, les données disponibles qui concernent ces deux catégories d'additifs sont abordées ci-après.

Quelques publications, dont certaines de synthèse et des évaluations de risques réalisées par des collectifs scientifiques, évoquées dans l'introduction de ce rapport, ont servi de base à cette analyse. Plutôt que de se livrer à une étude de chacun des différents documents disponibles, leurs points faibles communs qui rendent leurs conclusions fragiles ont été identifiés. Ils sont regroupés ci-après.

Méthodes en épidémiologie nutritionnelle

Les études qui alimentent ce chapitre sont essentiellement de deux types :

- Des études de cohorte, observationnelles prospectives, dans lesquelles un groupe d'individus est suivi dans le temps. Certains sont exposés à un facteur de risque et d'autres non. On compare les fréquences de survenue de la maladie après un certain temps dans le groupe exposé et celui non exposé ;
- Des études cas/témoins. Ce sont des études observationnelles rétrospectives utilisées pour mettre en évidence des facteurs qui peuvent contribuer à l'apparition d'une maladie en comparant des sujets qui ont cette maladie (les cas) avec des sujets qui n'ont pas la maladie (les témoins), mais qui sont similaires par ailleurs sur certains critères (âge, sexe par exemple) assez peu nombreux cependant.

Dans le traitement des études épidémiologiques on retrouve au moins l'un des trois indicateurs suivants :

- Le risque relatif (RR) d'un événement qui est le rapport entre la probabilité de l'événement chez les exposés et la probabilité de l'événement chez les non exposés ;
- L'*odd ratio* (OR) qui est le rapport des cotes d'exposition, la notion de cote étant identique à celle utilisée pour les paris sportifs. L'OR est proche du RR lorsque le nombre d'événements est faible ;
- Le *Hazard Ratio* (HR) est proche du RR avec une dimension temporelle supplémentaire qui intègre des temps d'événement inconnus en raison des durées de suivi différentes selon les patients.
- Le p trend est la valeur de p pour la tendance.

Le RR est le plus facile à interpréter, OR et HR étant plus difficiles, mais restant très populaires, car associés aux modèles permettant un ajustement sur les facteurs de confusion (régression logistique et modèle de Cox). Les résultats sont exprimés par la valeur de l'indicateur accompagnée de son intervalle de confiance (IC 95 %). Par exemple, si l'OR est < 1, le facteur étudié est protecteur, si l'OR est égal à 1, le facteur n'a pas d'effet, s'il est > 1 le facteur est un facteur de risque. L'intervalle de confiance (95 %) permet de savoir si cela n'est pas le fait du hasard : s'il contient la valeur 1, on ne peut pas conclure.

Ces éléments d'information statistique sont empruntés à Kohler (2013) et à Le Borgne (2019).

Manque de précision des enquêtes alimentaires

Notre préoccupation concerne les relations entre la consommation de viande transformée traitée aux nitrates/nitrites et le risque d'apparition de cancer ou d'adénome colo-rectal, ce qui suppose que nous puissions disposer de données épidémiologiques évaluant la consommation de ces types de viandes. Malheureusement il est bien difficile de trouver des informations précises à ce sujet dans les études disponibles :

- L'étude de Norat *et al.* (2005) repose sur une enquête alimentaire sérieuse, par questionnaires auto-administrés (l'individu sondé complète le questionnaire de manière autonome et sans assistance) concernant de 88 à 260 types d'aliments selon les pays concernés. La validité des méthodes employées a été établie par des analyses préliminaires d'échantillons d'urines de 24 h et de sang comme sources de biomarqueurs de consommation (Kaaks and Riboli, 1997). Les résultats de l'étude distinguent les viandes rouges des viandes transformées. Ces dernières « sont essentiellement du porc et du bœuf, conservées par des méthodes autres que la congélation, comme le salage (*avec ou sans nitrites*), le fumage, la marinade, le séchage à l'air ou le chauffage (jambon, bacon, saucisses, boudins, pâté de foie, salami, « *meat cuts* », « *bologna* », des viandes en conserve, du *corned beef*, des « *luncheon meats* » et autres ... ». Les auteurs soulignent que « les méthodes de l'épidémiologie nutritionnelle sont connues comme conduisant à des estimations imprécises des consommations alimentaires. Ainsi les méthodes de préparation des viandes transformées varient à travers l'Europe et ont évolué avec le temps. Les ingrédients employés dans ces produits sont le sel, les phosphates, les nitrites et les nitrates, l'eau, le sucre les graisses et les épices. Les nitrites et les nitrates ajoutés aux viandes pour les conserver peuvent accroître l'exposition aux nitrosamines exogènes, à d'autres composés n-nitrosés et à leurs précurseurs, mais toutes les viandes transformées ne contiennent pas de nitrites ajoutés, telles la plupart des saucisses ou le jambon séché à l'air ». Au total, les auteurs ne peuvent pas trouver de mécanismes biologiques qui puissent expliquer que l'association entre viandes transformées et risque de CCR soit plus forte qu'avec la viande rouge ;
- La monographie n°114 du CIRC (2015) passe en revue de nombreuses études épidémiologiques prospectives et cas-témoin en précisant, lorsque c'est possible, la nature des produits de viandes transformées pris en compte. Il n'est cependant jamais précisé si ces produits ont été ou non traités aux nitrates/nitrites et à quelle dose, sauf dans un cas, celui de la cohorte IWHs (*Iowa Women's Health Study*), dans laquelle la consommation de viandes transformées (*nitrate meat, includes : bacon, hot dogs and processed meats*) est prise en compte pour calculer l'exposition aux nitrates, considérant que la totalité de ces viandes sont traitées, sans préciser la teneur en nitrates retenue pour cette évaluation (Sellers *et al.*, 1998). Les consommations alimentaires sont évaluées au travers d'un questionnaire semi-quantitatif de fréquence de consommation (et non des quantités consommées), similaire à celui élaboré par Willett *et al.* (1990) ;
- La publication de Bastide *et al.* (2016) : ces auteurs ont adopté une approche originale pour évaluer la consommation de fer héminique de plus 17 300 femmes constituant la partie de la cohorte française E3N (appartenant à la grande étude européennes EPIC) enrôlée dans une étude des relations entre la consommation de fer héminique, nitrosylé ou non, et le risque d'adénome colo rectal. Leur

consommation alimentaire a été évaluée à partir d'un questionnaire de fréquence. Le contenu en fer héminique de chaque produit de viande, transformée ou non, a été obtenu en multipliant le contenu en fer (en mg/kg) disponible dans les tables de composition alimentaire, par le pourcentage en fer héminique de chaque type de produit (65 %, 39 % et 26 % pour respectivement le bœuf cuit, le porc et le poulet). Enfin, le contenu en fer héminique nitrosylé des viandes transformées a été calculé en multipliant le contenu de chaque produit de viande en fer héminique par 0,67, coefficient fourni par l'Institut Français du Porc (intitulé retenu par les auteurs, qui correspond au Centre technique de la Salaison, de la Charcuterie et des Conserves de Viande) (Boutten *et al.*, 2006). Les chiffres fournis dans cette publication, qui concernent le jambon cuit supérieur, sont en fait les suivants : fer héminique en fin de procédé technologique : 70 % du fer total ; fer héminique nitrosylé : 65 % du fer héminique. Cette approche suppose que tous les produits de viande transformée sont traités aux nitrites, et le sont aux mêmes doses ;

L'EFSA, dans sa réévaluation des additifs nitrates (E251, E252) et nitrites (E249, E250) de 2017, n'a pas rediscuté les données épidémiologiques concernant les relations entre consommation de viandes transformées et risque de CCR prises en compte dans la monographie n° 114 du CIRC, c'est-à-dire les études publiées jusqu'à 2006. Elle a analysé en détail celles publiées depuis cette date et a retenu quatre études de cohorte et trois études cas-témoins permettant de prendre en compte les expositions alimentaires aux nitrates/nitrites en excluant l'apport par l'eau de boisson pour ce qui concerne les expositions aux nitrates (voir encadré ci-dessous).

Les études de cohorte

L'étude finlandaise de Knekt *et al.* (1999) a évalué les expositions à partir de banques de composition des aliments essentiellement finlandaises ou d'autres régions d'Europe du nord. Il s'agit d'une évaluation qui permet aux auteurs de calculer que les nitrates sont à 92 % apportés par les légumes alors que les nitrites le sont majoritairement (94 %) par les charcuteries (*cured meats*) et les saucisses.

Dans l'étude de Cross *et al.* (2010), l'ingestion des nitrates et nitrites des viandes transformées est spécifiquement évaluée à partir d'une banque de données analytiques qui contient les teneurs en nitrates et en nitrites de 10 types de viandes transformées qui représentent 90 % de celles consommées aux Etats-Unis (Sinha *et al.*, 2005).

Ferrucci *et al.* (2012) ont utilisé la même banque de données pour évaluer les expositions aux nitrates et nitrites dans l'étude américaine PLCO (*Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial*).

Enfin, DellaValle *et al.* (2014) évaluent les consommations alimentaires des femmes incluses dans la *Shanghai Women's Health Study* à l'aide d'un questionnaire de fréquence. Les expositions aux nitrates et nitrites sont calculées séparément pour les sources d'aliments végétaux, animaux et de viandes transformées (6 catégories, correspondant aux consommations chinoises), à partir de banques de données analytiques chinoises, asiatiques ou occidentales selon la disponibilité.

Les études cas-témoins

Ward *et al.* (2007), dans une étude conduite au *National Naval Medical Center* à Bethesda (Maryland, Etats-Unis), évaluent les teneurs en nitrates/nitrites des viandes transformées par deux approches : l'une fondée sur des banques de données analytiques publiées par Panalaks *et al.* (1973 ; 1974), l'autre sur celle de Sinha *et al.* (2005) déjà évoquée. Ces deux types d'évaluation donnent des résultats comparables.

Miller *et al.* (2013), qui travaillent sur une population américaine originaire de Pennsylvanie, définissent précisément ce qu'ils entendent par viandes transformées et utilisent un questionnaire de fréquence, développé par le *US-National Cancer Institute* (NCI). Les données qui concernent la taille des portions, associées à celles du questionnaire de fréquence, permettent de générer des estimations des quantités de nitrates et nitrites auxquelles sont exposés les consommateurs de viandes transformées en s'appuyant toujours sur la banque de données du NCI (Sinha *et al.*, 2005).

Zhu *et al.* (2014) s'intéressent à des populations de deux provinces canadiennes (Terre-Neuve-et-Labrador et Ontario). Ils évaluent les expositions aux nitrates et nitrites selon une méthode mise au point par Howe *et al.* (1986) qui ont retenu 31 aliments ou groupes d'aliments qui couvriraient plus de 76 % de l'exposition alimentaire aux nitrates et de 61 % aux nitrites.

A la date de 2017, l'ensemble des études mentionnées ci-dessus, retenues par l'EFSA, constituaient, avec la publication de Bastide *et al.* (2016), l'essentiel des données en relation avec les expositions aux nitrates/nitrites présents dans les viandes transformées.

Depuis l'étude de l'EFSA, il faut mentionner la publication de Crowe *et al.* (2019) dont le titre indique clairement son objectif : étudier le rôle de l'exposition aux nitrites provenant des viandes transformées dans le développement du CCR. Cependant, les auteurs soulignent

que seulement deux études ont été menées avec l'intention d'étudier spécifiquement le rôle des nitrites : l'étude de Knekt *et al.* (1999) qui a déjà été analysée précédemment ; celle de Dales *et al.* (1979) qui considèrent que les viandes transformées contenant des nitrites sont : le bacon, le jambon, le corned beef, le pastrami, les saucisses de Francfort, les « lunch meats », même si l'on retrouve aussi tous ces produits sous les rubriques « toutes viandes » ou « Bœuf ». Aucune approche quantitative n'est faite, mais seulement des données de fréquence de consommation.

Deux études de cohorte citées dans la publication de Crowe *et al.* (2019) feraient apparaître un effet des nitrites. A-t-on dans ces deux études une évaluation de l'exposition aux nitrites ? Une analyse de ces publications fait ressortir les points suivants :

- English *et al.* (2004) listent les viandes transformées comme : salami, saucisses de Francfort, saucisses « continentales », bacon, jambon dont *prosciutto*, *corned beef* et « *luncheon meats* ». Les auteurs de l'article de *Nutrients* (Crowe *et al.*, 2019) considèrent qu'elles renferment des nitrites par définition. Ainsi l'exposition des sujets de la *Melbourne Collaborative Cohort Study* aux viandes transformées, donc aux nitrites, est évaluée en termes de fréquence de consommation et non quantitativement.
- Wu *et al.* (2006), dans l'étude prospective américaine de cohorte *Health Professionals Follow-up*, utilisent des questionnaires de fréquence de consommation et de méthodes de cuisson de produits de viande dont du bacon frit et des hamburgers poêlés, en relation avec le risque d'adénome du côlon distal. Ils s'intéressent aux amines hétérocycliques et à l'activité mutagène globale des produits de viande cuits. La présence de nitrates/nitrites dans les produits objets de l'étude n'est pas évoquée dans l'article !

Ainsi les données quantitatives d'exposition aux nitrates/nitrites des personnes objets des études épidémiologiques consacrées à l'étude des relations entre consommation de produits de viandes transformées et risques de CCR sont **extrêmement rares**. Les analyses réalisées par l'EFSA dans ses rapports de réévaluation des nitrates et des nitrites de 2017, ainsi que les données de deux publications récentes (Bastide *et al.*, 2016, Mehta *et al.*, 2020) apparaissent comme les plus à même de permettre de juger des risques liés à la consommation de viandes transformées traitées aux nitrates ou aux nitrites,

Des résultats des études épidémiologiques disparates, difficiles à comparer et à interpréter

Il est nécessaire de rappeler une nouvelle fois l'objectif de ce rapport : évaluer le rôle du traitement des charcuteries aux nitrates/nitrites dans le risque d'apparition de CCR. Le chapitre précédent a identifié les articles qui permettent d'aborder la question car les auteurs se sont livrés à une évaluation semi-quantitative de l'exposition des sujets objets des études épidémiologiques aux nitrates/nitrites utilisés pour le traitement des viandes transformées. Une approche des relations entre consommation de viandes transformées et CCR en général, outre qu'elle représenterait une tâche considérable, nous éloignerait de notre sujet. Nous ne reprendrons donc qu'une partie des résultats épidémiologiques présentés dans les articles cités dans la partie 1) de ce chapitre :

*La publication de Bastide *et al.* (2016)*

Il est montré, dans cette étude prospective de cohorte, que l'association entre le fer héminique et le risque d'adénome CR dépend du site dans le côlon, de la nitrosation ou non

du fer héminique et de la capacité antioxydante non enzymatique de la ration alimentaire. Les auteurs soulignent que l'on dispose de peu de données sur la proportion de fer héminique nitrosylé dans les différentes viandes transformées. Ils précisent qu'ils ont calculé ces valeurs en utilisant celles du contenu en fer héminique total les plus précises possible de Balder *et al.* (2016) et en leur appliquant le coefficient 0,67.

Dans ces conditions, les femmes des deux premiers quartiles et une partie du troisième quartile de consommation de fer héminique, qui représentent près de 65 % des cas d'adénome colorectal, consomment moins que les recommandations de Santé publique France (500 g de viande rouge et 150 g de charcuterie par semaine). Par ailleurs, il existe une augmentation significative du risque d'adénome CR chez les femmes du 4^{ème} quartile qui consomment la plus grande quantité de fer héminique nitrosylé (HR 1,29 CI 95 % : 1,02-1,62 ; *p-trend* : 0,01) et la plus faible quantité d'antioxydants alimentaires. Les différences en fonction du niveau d'exposition au fer héminique nitrosylé ne sont plus significatives chez les femmes ayant un apport vitaminique suffisant.

Enfin, plus le nombre de facteurs de confusion pris en compte augmente, plus la signification statistique des différences dues à l'exposition au fer héminique nitrosylé diminue, même si elle reste très faiblement significative pour le 4^{ème} quartile (le HR passe de 1,25 (1,08-1,45) à 1,18 (1,00-1,39)).

En conclusion de ce travail, les auteurs constatent que le fer de l'hème non nitrosylé est associé au risque d'adénome du côlon distal alors que le fer de l'hème nitrosylé est associé au risque d'adénomes du côlon proximal. L'intensité des effets sur l'apparition des adénomes avancés de l'hème non nitrosylé est du même ordre que celui de l'hème nitrosylé, même si les zones affectées du côlon sont différentes.

Les travaux cités par l'EFSA (2017)

Les études de cohorte

a) Knekt *et al.* (1999) étudient la relation entre l'ingestion de nitrates, nitrites et NDMA et le risque de cancer du tractus gastro-intestinal (CTGI, incluant l'estomac et l'intestin grêle) dans une cohorte de près de 10 000 Finlandais des deux sexes, suivis pendant 24 ans. Ils n'observent pas d'association entre l'exposition aux nitrates (en provenance à plus de 91 % des légumes) ou aux nitrites (en provenance à plus de 94 % de la viande transformée) et le risque de CTGI. Au sein des diverses sources de composés N-nitrosés, la consommation de poisson salé et séché est liée à l'apparition de CCR ; celle de viande transformée ne l'est pas.

b) Cross *et al.* (2010) ont suivi, pendant 7 ans, une cohorte de plus de 300 000 Américains des deux sexes. Ils évaluent les effets du fer héminique et total, des nitrates et nitrites en provenance de la viande transformée ainsi que des nitrates et des nitrites totaux, de même que des amines hétérocycliques et du benzopyrène, sur le risque d'apparition de CCR. Alors que l'ingestion de nitrates en provenance des viandes transformées est associée au risque de CCR (RR : 1,16 ; IC 95 % : 1,02-1,32), celle de nitrites ne l'est pas (RR : 1,11 ; IC 95 % : 0,97-1,25). Certaines amines hétérocycliques présentent aussi une relation positive avec le CCR. Au total, les auteurs concluent cependant que les viandes rouges et transformées sont associées positivement au CCR, le fer héminique, les nitrates/nitrites et les amines hétérocycliques de la viande pouvant expliquer cette association ;

c) Ferrucci *et al.* (2012), se sont intéressés au risque d'adénome du côlon en relation avec la consommation de viande rouge et de viande transformée dans une cohorte de près de 150

000 Américains des deux sexes. Trois des auteurs étaient signataires de l'article de Cross *et al.* (2010) évoqué ci-dessus. Les cohortes sont cependant différentes. Les données présentées ne démontrent aucun effet statistiquement significatif de la consommation de viande transformée ou de nitrates et de nitrites (tableau 1 et tableau 3 de la publication de Ferrucci *et al.*) provenant exclusivement de la viande (les autres sources alimentaires et l'eau de boisson ne sont pas prises en compte).

d) DellaValle *et al.* (2014) ont exploité la cohorte « Shanghai Women Health Study » de plus de 73 000 femmes âgées de 40 à 70 ans résidant à Shanghai. Les apports de nitrates et de nitrites sont évalués selon leur origine, animale, végétale ou par les conserves. Les auteurs n'observent aucune association entre l'exposition aux nitrites et le risque de CCR, quel que soit le niveau d'ingestion de vitamine C. Ils enregistrent une augmentation du risque de CCR lorsque les expositions aux nitrates vont croissant chez les femmes qui ont un apport de vitamine C inférieur à la moyenne. Il s'agit là d'une exposition aux nitrates totaux, essentiellement d'origine végétale et nettement plus élevée que dans des populations occidentales (de l'ordre de 3 fois plus importante).

Les études cas-témoins

a) Ward *et al.* (2007) ont réalisé une étude cas-témoins sur 146 cas d'adénomes CR et 228 cas témoins au Centre national de médecine navale de Bethesda (Maryland) aux Etats-Unis. Ils ont calculé des « *odd ratios* », le RR, selon les auteurs, pouvant difficilement être calculé dans les études cas-témoins. Ils ont étudié à la fois la relation avec la consommation de viande transformée et celle de nitrates et nitrites. Ils trouvent une association positive avec la consommation de viande transformée (bacon, saucisses pour petit-déjeuner, hot dogs/autres saucisses, jambon, salami ...) : OR Quartile 4 vs Quartile 1,7 (IC 95 % : 1,0-4,0 ; pas de tendance significative). Il n'y a pas d'association entre les adénomes CR et la consommation de nitrites des viandes (OR Q4 vs Q1 1,7 ; IC : 0,9-3,2, pas *p trend*²¹ significative). De plus, si l'on ajuste l'analyse en prenant en compte, en plus des autres facteurs de confusion, l'amine hétérocyclique MeIQx, l'association n'est plus significative : QR 1,6 ; IC : 0,8-3,2, les autres amines hétérocycliques et les hydrocarbures hétérocycliques n'ayant pas d'influence. On ne connaît pas dans cette étude, les expositions aux nitrites et nitrates totaux des aliments, pas plus que les apports de nitrates par l'eau.

b) Miller *et al.* (2013) comparent 989 cas de CCR à 1033 témoins habitant en Pennsylvanie, population plus grosse consommatrice de viande rouge et de viande transformée que la population moyenne des Etats-Unis. Ce que les auteurs entendent par viande transformée est bien défini (bacon, saucisses, jambon, salami, *pepperoni*, *corned beef*, hot dogs...). D'assez nombreux ajustements statistiques sont réalisés : âge, sexe, énergie totale, IMC, fruits et légumes, utilisation régulière d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens. Outre des relations entre le CCR et les amines hétérocycliques MeIQx et DiMiQx, une association positive est établie entre les nitrates et les nitrites évalués ensemble et le cancer de l'intestin proximal (OR 1,57 IC 1,06-2,34 *p-trend* 0,023). En revanche, aucune relation significative n'est établie avec le CCR (OR 1,19 ; IC 0,87-1,61 *p-trend* 0,189). Aucune donnée concernant l'apport en nitrates de l'eau de boisson, pas plus que celui, individualisé, des nitrates et des nitrites de la viande transformée n'est pas documentée dans cette étude.

²¹ P trend : probabilité de tendance

c) Zhu et al. (2014) ont comparé 1760 cas de CCR à 2481 témoins appartenant à une population des provinces canadiennes de Terre-Neuve-et-Labrador et de l'Ontario. Les associations entre les CCR et les NOC (fer héminique nitrosylé, nitrosothiols, nitrosamines) ainsi qu'avec les nitrates ou les nitrites sont recherchées. Les évaluations des expositions journalières moyennes aux nitrates et aux nitrites alimentaires sont respectivement de 124,8 mg et 1,12 mg. Une augmentation significative du risque de CCR est observée pour les 4^{ème} (OR 1,32 ; IC 1,08-1,61) et 5^{ème} quintiles (OR 1,50 IC 1,22-1,83) d'exposition aux nitrites après ajustement seulement pour l'âge et la province de résidence, mais elle n'est plus significative après ajustement multivariés (énergie totale, IMC, tabac, alcool, activité physique, niveau d'éducation, pouvoir d'achat, procédure d'examen du côlon, prise d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens, suppléments multi-vitaminiques, suppléments d'acide folique et province de résidence). Aucune association n'est observée entre CCR et nitrates dans le modèle multivarié.

En résumé

L'EFSA (2017) conclut de son analyse qu'il n'existe pas de preuve suffisante pour établir un lien entre le cancer du côlon et l'exposition aux nitrites de l'alimentation ; qu'il y a un certain niveau de preuve pour lier nitrates plus nitrites des viandes transformées au CCR et qu'il est prouvé que l'exposition estimée à la N-nitrosodiméthylamine préformée est associée à une augmentation du risque de CCR dans ses différentes localisations.

La publication de Crowe et al. (2019) :

Cette publication est souvent citée par les opposants à l'utilisation des nitrites dans les viandes transformées, car elle affiche dans son titre l'intention des auteurs de passer en revue les travaux d'expérimentation animale et ceux de nature épidémiologique ayant pour objectif d'évaluer, dans le développement du CCR, le rôle de l'exposition aux nitrites provenant de la consommation de viande transformée. Un examen attentif de cette publication montre que ses auteurs séparent bien les publications qui évalueraient la présence de nitrites dans les viandes transformées (5 études de cohorte, 12 études cas-témoins) de celles qui ne permettent pas de savoir si et combien il y a de nitrites dans ces viandes (23 études de cohorte, 26 études cas-témoins).

Seules 2 des 5 études de cohorte sensées évaluer l'exposition aux nitrites montrent une augmentation significative du risque de CCR, celles de English *et al.* (2004) et de Wu *et al.* (2006). L'examen de ces deux articles n'apprend cependant rien sur le niveau d'exposition aux nitrites des sujets appartenant aux cohortes. Il est à peine question des nitrites chez English *et al.* et pas du tout chez Wu *et al.* qui ne s'intéressent qu'aux amines hétérocycliques et au pouvoir mutagène global des viandes.

Une seule de ces 5 études, celle de Knekt *et al.* (1999), est aussi citée par l'EFSA. Elle apparaît en fait pour Crowe *et al.* (2019), comme l'une des deux seules études citées dans leur revue, réalisée dans l'intention de rechercher spécifiquement le rôle des nitrites dans l'apparition du CCR. Comme les deux autres études de cohorte, elle ne montre aucun effet de la consommation de viandes transformées sur le risque de CCR.

La seconde est une étude cas-témoins, celle de Dales *et al.* (1979). Elle ne met en évidence aucune action spécifique des viandes transformées traitées aux nitrites par rapport aux viandes en général, et ne manifeste aucun effet significatif sur le risque relatif de CCR.

Sept autres études cas-témoins montrent un effet des nitrites aggravant le risque de CCR, deux donnent des résultats ambigus, deux aucun effet et une un effet protecteur. Cependant toutes ces études partent du principe que les produits de viande transformée renferment des nitrites par définition et ne se proposent pas de faire une évaluation d'exposition aux nitrates plus précise.

Les auteurs de cette revue de 2019 (Crowe *et al.*) notent dans la discussion « *Beaucoup des études épidémiologiques démontrant un rôle des viandes transformées dans la pathologie des CCR souffrent de limites méthodologiques* ». L'article est très équilibré, évoquant même les effets positifs des nitrites. Les auteurs soulèvent un point particulièrement important : « *Il est difficile de déterminer la proportion de saucisses renfermant des nitrites, réellement consommées par les populations* ».

Travaux de Mehta et al. (2020)

Il est enfin difficile de ne pas évoquer une publication récente qui a fait l'objet de beaucoup de commentaires, celle de Mehta *et al.* (2020). Il s'agit d'une étude prospective concernant les relations entre la consommation de viande rouge ou transformée et le CCR chez des femmes américaines ayant une sœur qui a souffert d'un cancer du sein. Les auteurs définissent ce qu'ils entendent par viande transformée (*cured*) : saucisses de Frankfort, saucisses, bacon, corned beef, jambon cru et *luncheon meat* à base de bœuf, de porc ou de volaille.

Les conclusions de ce travail sont que la consommation de viande transformée, bacon et saucisses pour petit déjeuner, est associée à un risque accru de CCR chez des femmes américaines. Des produits spécifiques de viande rouge non transformée comme des hamburgers et des steaks grillés ou cuits au barbecue sont aussi associés à une augmentation du risque de CCR.

Outre le fait que l'on ne sache pas quels sont les produits de viande transformée traités aux nitrates/nitrites et à quelle dose, une ambiguïté permanente subsiste tout au long de l'article : des charcuteries nitritées fortement cuites/frites/grillées (bacon, lardons, *frankfurters*, hot dogs) associant comme facteurs de risque, dans certains cas, des nitrosamines et des amines hétérocycliques et des hydrocarbures aromatiques polycycliques rendent difficiles les conclusions concernant les causes des effets observés.

Cette publication ne peut donc en aucun cas nous aider à répondre à la question posée dans ce rapport qui concerne le risque de l'utilisation des nitrites dans les produits de viande transformée.

Deux autres publications récentes

Enfin deux publications récentes de l'*International Journal of Epidemiology* (Bradbury *et al.* 2020; Knuppel *et al.* 2020) relatent les résultats d'études prospectives réalisées sur près de 500 000 participants britanniques recrutés dans les années 2000 ; elles ne permettent pas non plus d'individualiser la responsabilité des nitrites dans les effets observés ; les effets des viandes rouges et des viandes transformées n'apparaissant pas très différents.

Conclusion

Les données qui concernent les conséquences de la consommation de viande rouge ou de viande transformée sur le risque de CCR sont nombreuses et celles qui concernent la viande transformée semblent majoritairement conduire à suspecter une augmentation du risque de CCR lorsque leur niveau de consommation est excessif.

Les données qui démontreraient que la consommation de viandes transformées traitées aux nitrites seraient plus influentes sur ce risque que les viandes transformées non traitées sont peu convaincantes, ambiguës, voire inexistantes. La significativité des différences lorsqu'elles apparaissent en prenant en compte un nombre restreint de facteurs de correction disparaît souvent lorsque ce nombre de facteurs est plus important. Norat *et al.* l'avaient déjà parfaitement montré dès 2005.

Les données d'exposition des participants aux études épidémiologiques aux nitrates/nitrites, lorsque l'on en dispose, sont le plus souvent semi-quantitatives, les viandes transformées répondent souvent à des définitions différentes et ne sont donc pas composées des mêmes produits. Les produits alimentaires concernés, lorsqu'ils disposent de la même appellation, n'ont pas partout dans le monde la même composition et ne subissent pas les mêmes traitements technologiques et culinaires. Les traitements thermiques en particulier ont une importance particulière sur la présence de substances, en dehors des NOCs, dont certaines sont cancérogènes.

Pour toutes ces raisons, il est scientifiquement injustifié de conclure que la consommation de viandes transformées traitées aux nitrites a des effets différents de celui des viandes transformées non traitées sur le risque de CCR, à consommation quantitativement équivalente. Il n'est pas dans le propos de ce rapport de juger du risque cancérogène des viandes transformées, risque potentiel qui mérite cependant une étude sérieuse qui relève d'une évaluation du risque et pas seulement d'une identification du danger comme réalisée par le CIRC.

10. AUTRES EFFETS DES NITRATES, NITRITES ET DE L'OXYDE NITRIQUE

Si l'effet bactéricide des nitrites provenant des nitrates est bien connu, d'autres effets bénéfiques pour la santé, plus récemment mis en évidence, le sont moins. Ils reposent directement sur la relation entre nitrate, nitrite et monoxyde d'azote ou oxyde nitrique (NO), la découverte du rôle de NO (dans le cadre cardio-vasculaire) ayant été couronnée par le prix Nobel de physiologie et de médecine en 1998 à Furchgott, Ignarro et Murad ; Etats-Unis (Dinh-Xuan, 1998). L'omniprésence de NO et sa grande réactivité résultent d'une production permanente par l'organisme, selon deux mécanismes bien distincts. L'un implique le métabolisme de la L-arginine, dont le rendement est variable avec l'âge et l'état de santé. Alors que l'autre, mis en valeur ces dernières années, est particulièrement lié aux réserves en nitrite et aux apports alimentaires de nitrate. Non seulement l'innocuité des nitrates alimentaires est bien documentée depuis plusieurs décennies (voir L'Hirondel *et al.*, 1993), mais leurs nombreuses fonctions physiologiques décrites par Bryan *et al.* (2007) sont aussi

maintenant bien établies. La plupart de ces fonctions ont comme étape intermédiaire la formation de monoxyde d'azote et son effet vasodilatateur.

NO est impliqué dans la régulation de la circulation sanguine et la prévention des maladies cardio-vasculaires avec, notamment, la lutte contre l'hypertension, la vasodilatation et le maintien de l'élasticité des artères, la prévention de l'athérosclérose et des thromboses, et par conséquent des risques d'infarctus et de pathologies vasculaires cérébrales, et même de syndrome métabolique. NO n'agit que sur les fibres musculaires lisses, en particulier celles des parois vasculaires, plus particulièrement celles des coronaires et des bronchioles. Ces propriétés lui ont valu des applications thérapeutiques qui viennent d'être décrits dans une excellente revue exhaustive (Kapil *et al.*, 2020).

Ces effets bénéfiques ont été confirmés par l'exploitation des données de la grande étude épidémiologique américaine NHANES (Mendy, 2018) montrant que l'excrétion urinaire de nitrates (reflet de leur ingestion) est fortement associée à une plus faible prévalence de l'hypertension, des accidents cardiovasculaires et de la mortalité, sans relation avec la prévalence des cancers. NO contribue à l'amélioration des performances physiques et sportives, observée sur l'endurance, la puissance physique, la moindre consommation d'oxygène et la capacité de récupération après l'effort. Enfin la physiologie rénale implique la présence de NO qui permet d'entraîner une vasodilatation et donc d'augmenter le débit sanguin rénal.

Les nitrites ont aussi un effet antioxydant sur la peroxydation lipidique, car le taux de formation d'aldéhydes est plus important sans nitrite.

Plusieurs auteurs ont mis l'accent sur ce rôle favorable des nitrates, allant jusqu'à les classer dans la catégorie des nutriments (Archer, 2002 ; Katan, 2009 ; Hord *et al.*, 2009 ; Bourre *et al.*, 2011 ; Bryan et Ivy, 2015). Ces rôles bénéfiques des nitrates, précurseurs des nitrites et de NO, font toujours l'objet de recherches actives au Karolinska Institute de Suède (Lundberg *et al.*, 2018 ; Carlström *et al.*, 2018). En fait, la consommation de légumes (qui apportent en moyenne près de 80 % des nitrates ingérés) est systématiquement recommandée pour la prévention de diverses pathologies par les nutritionnistes, les instances sanitaires internationales comme l'EFSA et d'autres structures gouvernementales.

11. CONCLUSION GENERALE

Le groupe de travail de l'AAF a fait un état des lieux, à partir des données scientifiques disponibles en toxicologie, en expologie et en épidémiologie, sur le rôle éventuel, dans la survenue de cancer colorectal, des nitrites de sodium (E249) et de potassium (E250) utilisés exclusivement comme additifs alimentaires dans les viandes transformées,

La polémique sur la relation entre l'utilisation des nitrites en tant qu'additifs alimentaires et cancer colorectal a débuté dans les années 90 et fait l'objet de nombreux travaux de recherche, rapports de comités scientifiques et d'études épidémiologiques qui sont décrites et analysées dans ce rapport.

Depuis les 4-5 janvier 1965 (date de publication au J.O. de l'arrêté du 8 décembre 1964), l'utilisation du sel nitrité est autorisée en tant qu'additif alimentaire en France après un avis favorable du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France et de l'Académie Nationale de Médecine, pour garantir la sécurité microbiologique des salaisons, produits de charcuterie et

conserves de viande et plus particulièrement lutter contre le botulisme. Cette autorisation a permis également à l'époque de contrôler les quantités de nitrites utilisées dans ces produits, le sel limitant pour des raisons organoleptiques l'exposition aux nitrites ajoutés. C'était un progrès indiscutable par rapport à la pratique ancestrale qui consistait à utiliser des bains de salpêtre, c'est-à-dire de nitrate de potassium, source de nitrite, sans que la quantité de nitrite produite puisse être contrôlée précisément. Les nitrites ont pour fonction essentielle d'inhiber la prolifération de bactéries, principalement *Clostridium botulinum*, et donc l'apparition des neurotoxines qu'elles secrètent, les toxines botuliques, les plus dangereuses connues puisque la dose létale pour l'homme adulte est comprise entre 0,1 et 1 microgramme par kg de poids corporel (de 7 à 70 microgrammes pour un adulte de 70 kg). Le mécanisme d'action des nitrites est connu : ils agissent *via* leurs transformations successives en monoxyde d'azote (NO) puis en acides peroxynitriques et son ion peroxynitrite, des oxydants puissants qui pénètrent au sein des bactéries anaérobies comme *Clostridium botulinum* dont ils altèrent l'ADN.

Depuis la première directive européenne 95/2/CE (concernant les additifs alimentaires autres que les colorants et les édulcorants), c'est au niveau européen que les autorisations d'utilisation d'additifs alimentaires sont régies et donc celle des nitrites de sodium (E249) et de potassium (E250) dans les produits de viande transformée. La dose maximale autorisée lors du procédé de transformation est par exemple de 150 mg/kg de jambon. Il est important de rappeler que l'utilisation de ces additifs induit une coloration rouge/rose des jambons due à la formation de nitrosylmyoglobine (un pigment rouge) au cours de la fabrication, mais ces additifs ne sont en aucun cas autorisés en tant que colorants alimentaires par la réglementation européenne, contrairement aux croyances de certains consommateurs.

En France, le code des usages de la charcuterie recommande des teneurs inférieures qui ont été réduites au cours du temps, passant de 150 mg/kg à 120 mg/kg en 2018 puis bientôt (sans doute en 2020) à 90 mg/kg, sur la base d'études expérimentales d'efficacité d'inhibition de la croissance bactérienne, en fonction des produits concernés.

La maîtrise de la sécurité hygiénique des produits dépend cependant aussi de nombreux autres facteurs que les nitrites, comme notamment, la qualité de la viande utilisée et sa charge microbienne initiale, son pH, ou encore le déploiement de la démarche HACCP par des opérateurs formés aux technologies de transformation et à l'hygiène, cela dans des locaux adaptés.

Les questions qui se posent en matière de toxicologie sont les suivantes :

1. Les résidus de nitrites présents dans la charcuterie telle que consommée font-ils courir des risques aux consommateurs ? Sont-ils cancérogènes ? Génèrent-ils lors de la digestion des nitrosamines endogènes cancérogènes ou des aldéhydes dus à la peroxydation lipidique potentiellement cancérogènes ?
2. Des produits néoformés en présence de nitrites lors du procédé technologique en charcuterie, donc présents dans le produit fini, sont-ils cancérogènes, comme le fer héminique nitrosylé, des nitrosamines ou des produits issus de la peroxydation lipidique ?

On trouve les réponses aux premières questions dans les études réglementaires rapportées par l'EFSA dans la réévaluation réalisée en 2017. En effet, l'étude de cancérogenèse du NTP

chez le rat est négative. On peut donc considérer que ni les résidus de nitrites présents, ni d'éventuelles nitrosamines endogènes ou aldéhydes dus à la peroxydation lipidique n'ont d'effet cancérigène chez le rat à des doses beaucoup plus importantes que celles auxquelles l'Homme est exposé. La DJA exprimée en ion nitrite/kg de poids corporel par jour a été confirmée à 0,07 mg, soit 4,9 mg par jour pour un adulte de 70 kg. L'exposition des consommateurs français et européens est inférieure à cette DJA. L'EFSA conclut que ces additifs alimentaires ne font pas courir de risque aux consommateurs. Cependant, les études réglementaires ne concernent que l'additif lui-même, et non les produits de charcuterie traités aux nitrites au sein desquels des produits néoformés cancérigènes auraient pu se former.

Parmi les produits néoformés nitrosés (NOCs), les nitrosamines, puissants cancérigènes, formées à partir de molécules portant des groupements amines réagissant chimiquement par N-nitrosation avec les nitrites, pourraient se former lors du procédé technologique. Les nitrosamines volatiles les plus préoccupantes sur le plan toxicologique sont la N-nitrosodiméthylamine (NMDA) et la N-nitrosodiéthylamine (NDEA). Les données de la littérature montrent que ces nitrosamines ne sont pas présentes, ou alors en infimes quantités, parfois détectables mais aux limites inférieures des méthodes analytiques, dans les produits de charcuterie traitée aux nitrites aux doses autorisées par la réglementation. L'exposition des consommateurs européens aux nitrosamines présentes dans les viandes transformées est très faible, de l'ordre du nanogramme (1000 fois moins qu'1 microgramme) /kg/jour.

L'hème L'hème nitrosylé Fe^{2+} , produit nitrosylé néoformé, qui apparaît au cours du procédé technologique à partir d'oxyde nitrique et de l'hème de la myoglobine contenu dans la viande, pourrait peut-être avoir un effet cancérigène promoteur. Les nombreux travaux de l'équipe dirigée par F. Pierre (INRAE) visant à démontrer le rôle promoteur de l'hème nitrosylé Fe^{2+} , n'ont pas définitivement élucidé le mécanisme impliqué comme ayant pour origine la consommation de viande nitritée, d'autant plus que les modèles utilisés chez le rat et la souris sont complexes et éloignés des conditions physiologiques humaines et les doses administrées sont très supérieures à celles auxquelles le consommateur est exposé. En conséquence, ces études sont difficilement transposables à l'Homme. S'il s'agissait d'un effet cancérigène promoteur, donc dose-dépendant, une dose sans effet cancérigène existerait. La difficulté réside alors dans l'identification de la dose sans effet de ce produit néoformé, qui nécessiterait une étude de cancérogenèse réglementaire et une évaluation de la contamination des jambons traités par ce produit néoformé pour réaliser une évaluation du risque pour le consommateur.

D'autre part, de nombreuses autres études mécanistiques en toxicologie expérimentale sur des modèles différents n'ont pas confirmé cette hypothèse.

L'hypothèse selon laquelle des produits néoformés issus de la peroxydation lipidique pourraient être à l'origine d'effets cancérigènes n'a pas été confirmée par les études en digesteurs, chez l'animal et chez l'Homme.

D'une façon générale, l'interprétation des études d'épidémiologie nutritionnelle dans ce domaine d'intérêt est difficile en raison (i) de la fragilité des données d'enquêtes alimentaires, (ii) de l'absence de données sur les pratiques culinaires dont certaines favorisent la production des substances cancérigènes comme les amines hétérocycliques et les hydrocarbures aromatiques polycycliques, et enfin (iii) du fait du manque de précision

dans la description même des produits carnés considérés et des traitements dont ils ont fait l'objet.

La nature des produits alimentaires inclus dans les viandes transformées, dont la liste est différente selon les études et dont les traitements diffèrent aussi selon les pays, impose une analyse très rigoureuse des travaux disponibles. De plus, le fait que, souvent, la prise en compte légitime d'un plus grand nombre de facteurs de confusion, en particulier de nature nutritionnelle, dans le traitement statistique des données entraîne fréquemment la disparition des différences significatives observées avec un nombre plus limité de facteurs de confusion, pose un réel problème d'interprétation biologique.

Parmi les très nombreux travaux d'épidémiologie nutritionnelle réalisés, bien peu sont de nature à aider à répondre à la question posée dans ce rapport, à savoir, le traitement aux nitrites des viandes transformées est-il de nature à augmenter le risque d'apparition de cancer colorectal lié à la consommation de ce type d'aliment.

Le CIRC, dans l'évaluation de 2015, a pratiqué une identification du danger de la consommation de viandes transformées sans se livrer à une évaluation de risque de ce type de produits et sans distinguer ceux traités aux nitrites de ceux non traités.

L'EFSA, dans la réévaluation des nitrites en 2017, souhaitait évaluer spécifiquement le risque des produits traités aux nitrites, mais n'a pas pu trouver d'études permettant d'appréhender ce risque tant les évaluations de l'exposition aux nitrites des sujets impliqués manquaient de bases expérimentales.

Une seule étude publiée en 2016 a fait un réel effort pour apprécier l'exposition aux nitrites des sujets consommant des viandes transformées traitées et les risques liés à cette consommation sans obtenir de résultat convaincant, les risques des produits traités ou non étant équivalents.

Enfin, sur le plan de la connaissance scientifique, il est important de signaler des effets bénéfiques moins connus des nitrites sur la santé. Ainsi le monoxyde d'azote (NO), formé lors du métabolisme des nitrites, intervient favorablement dans la régulation de la circulation sanguine, dans la lutte contre l'hypertension, les thromboses et l'athérosclérose, et par conséquent dans les pathologies cardiovasculaires et cérébrales.

Au total, les nitrites, employés comme additifs alimentaires en tant que conservateurs dans les produits de viande transformée, protègent le consommateur vis-à-vis du risque botulinique. Face à cela, les risques de cancer colorectal induits par la présence de nitrites aux doses autorisées par la réglementation ne sont pas prouvés. Aucune preuve convaincante relevant de l'expérimentation animale, de l'épidémiologie ou des études mécanistiques n'est aujourd'hui disponible pour démontrer que le traitement aux nitrites des salaisons, charcuteries et conserves de viande accroît le risque d'apparition de CCR, par rapport à la consommation des mêmes denrées non traitées.

Face aux controverses concernant l'utilisation des nitrites comme additifs alimentaires, les professionnels français de la charcuterie (industriels et artisans) ont déjà réduit jusqu'à 40 % les doses utilisées, tout en garantissant, sur la base d'études expérimentales, la sécurité microbiologique des produits. Toutefois, les industriels cherchent à mettre au point de nouvelles techniques de conservation, indépendantes de l'usage des nitrites, et qui élimineraient le risque de la présence de *Clostridium botulinum* dans les charcuteries.

En attendant l'évaluation microbiologique et toxicologique de ces nouvelles pratiques, il paraît important au groupe de travail de l'Académie d'Agriculture de France d'éviter tout risque de réapparition d'intoxication mortelle par la toxine botulique.

12. ANNEXES

ANNEXE 1 - LE CLASSEMENT DES AGENTS EXAMINES PAR LE CIRC

(<https://www.cancer-environnement.fr/478-Classification-des-substances-cancerogenes.ce.aspx>)

Le CIRC examine la cancérogénicité éventuelle de produits chimiques, de mélanges complexes de substances, d'expositions professionnelles, d'agents physiques et biologiques et de facteurs comportementaux. On utilise le terme d'agent pour désigner l'ensemble.

Depuis 1971, plus de 1000 agents ont ainsi été évalués parmi lesquels 500 ont été classés comme étant cancérogènes ou potentiellement cancérogènes pour l'être humain.

Il s'agit de produits chimiques, de mélanges complexes, d'expositions professionnelles, d'agents physiques et biologiques, et de facteurs comportementaux. Le CIRC définit 4 groupes (de 1 à 4) correspondant à des degrés d'indication de cancérogénicité pour l'être humain. Le deuxième est subdivisé en groupe 2A et 2B.

Ces groupes sont les suivants :

- Groupe 1 : agent cancérogène (parfois appelé cancérogène avéré ou cancérogène certain),
- Groupe 2A : agent probablement cancérogène,
- Groupe 2B : agent peut-être cancérogène (parfois appelé cancérogène possible),
- Groupe 3 : agent inclassable quant à sa cancérogénicité,
- Groupe 4 : agent probablement pas cancérogène.

Le Tableau 5ci-dessous résume les principes qui guident ce classement des agents par degré d'indication du risque et précise leur nombre actuel dans chacun des groupes.

Classe d'agents	Critères de détermination du degré d'indication de risque pour l'homme et pour l'animal de laboratoire : principes généraux et particuliers de classement de l'agent dans le groupe	Nombre d'agents classés (au 26 Juin 2020)
Agent cancérogène pour l'homme (groupe 1)	Principe général : Indications suffisantes de cancérogénicité pour l'homme. Exception : Indications pas tout à fait suffisantes pour l'homme associées à des indications suffisantes pour l'animal et à de fortes présomptions envers un mécanisme de	120 agents

Classe d'agents	Critères de détermination du degré d'indication de risque pour l'homme et pour l'animal de laboratoire : principes généraux et particuliers de classement de l'agent dans le groupe	Nombre d'agents classés (au 26 Juin 2020)
	cancérogénicité reconnu.	
Agent probablement cancérogène pour l'homme (groupe 2A)	Principe général : Indications limitées de cancérogénicité chez l'homme et suffisantes chez l'animal. Cas particulier : Indications insuffisantes pour l'homme et suffisantes pour l'animal associés à de fortes présomptions pour une cancérogénèse selon un mécanisme identique chez l'homme. Exceptions : - Seule base des indications limitées de cancérogénicité pour l'homme. - Appartenance de l'agent à une catégorie d'agents dont un ou plusieurs membres ont été classés dans le groupe 1 ou 2A.	88 agents
Agent peut-être cancérogène pour l'homme (groupe 2B)	Principe général (2 formes) : Forme 1 : Indications limitées de cancérogénicité chez l'homme et insuffisantes chez l'animal. Forme 2 : Indications insuffisantes chez l'homme et suffisantes chez l'animal. Cas particuliers : - Indications insuffisantes pour l'homme et insuffisantes pour l'animal cependant corroborées par des données sur les mécanismes notamment. - Seule base d'indications solides provenant de données sur les mécanismes.	313 agents
Agent inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'homme (groupe 3)	Principe général : Indications insuffisantes chez l'homme et insuffisantes ou limitées chez l'animal Exception : Indications insuffisantes pour l'homme et suffisantes chez l'animal associés à de fortes présomptions pour un mécanisme de cancérogénicité chez l'animal ne fonctionnant pas chez l'homme.	499 agents
Agent n'est probablement pas cancérogène pour	Principe général : Indications suggérant une absence de cancérogénicité chez l'homme et chez l'animal de laboratoire.	1 agent (caprolactame)

Classe d'agents	Critères de détermination du degré d'indication de risque pour l'homme et pour l'animal de laboratoire : principes généraux et particuliers de classement de l'agent dans le groupe	Nombre d'agents classés (au 26 Juin 2020)
l'homme (groupe 4)	Cas particulier : Indications insuffisantes pour l'homme associés à des indications suggérant une absence de cancérogénicité pour l'animal et fortement corroborées par des données mécanistiques et d'autres données pertinentes.	

Tableau 5 - Les critères de classement des agents selon le degré d'indication de cancérogénicité.

Définition des degrés d'indications de cancérogénicité d'un agent pour les études portant sur l'homme

Les indications de cancérogénicité provenant d'études portant sur l'homme sont classées en 4 degrés d'appréciation : suffisantes, limitées, insuffisantes ou absence de cancérogénicité. Ces catégories renvoient au fait qu'on a établi ou non une relation causale entre l'agent considéré et le cancer chez l'homme, qu'il n'a pas été possible d'établir ou d'écarter cette relation causale ou bien encore que celle-ci comporte des limites. La catégorie des indications insuffisantes de cancérogénicité correspond à deux situations possibles d'indisponibilité des études ou des données.

Les quatre degrés d'appréciation sont les suivants :

- Indications de cancérogénicité suffisantes : une relation positive a été établie entre l'exposition et la survenue de cancers, dans le cadre d'études où les effets du hasard, de biais et de facteurs de confusion ont pu être exclus avec suffisamment de certitude. Une telle déclaration est suivie d'une phase séparée permettant d'identifier le ou les organes ou tissus cibles où un risque accru de cancer a été observée chez l'homme. L'identification d'un organe ou de tissus cibles n'empêche pas que l'agent puisse provoquer le cancer sur d'autres localisations.
- Indications de cancérogénicité limitées : une association positive a été établie entre l'exposition à l'agent considéré et la survenue de cancers, mais il n'a pas été possible d'exclure avec suffisamment de certitude que le hasard, des biais ou des facteurs de confusion aient pu jouer un rôle.
- Indications de cancérogénicité insuffisantes : les études sont insuffisantes pour conclure à l'existence ou non d'une relation de cause à effet entre l'exposition à l'agent et le cancer, ou les données sur le cancer chez l'homme sont indisponibles.
- Indications d'une absence de cancérogénicité : les études sont suffisantes et concordantes et ne font pas ressortir d'association positive entre l'exposition à l'agent et le cancer étudié, quel que soit le niveau d'exposition examiné. Cette indication ne peut s'appliquer qu'aux seules localisations tumorales, modalités d'expositions et durée d'observation considérées dans les études disponibles.

L'éventualité de l'existence d'un risque très faible aux niveaux d'exposition étudiés ne peut jamais être exclue.

ANNEXE 2 - NOTIONS DE BASE EN TOXICOLOGIE ALIMENTAIRE

Du danger et du risque

Le danger n'est pas synonyme de risque : ces deux notions doivent être clairement distinguées. Le danger est, en toxicologie alimentaire, la propriété d'une substance contenue dans un aliment de présenter un effet toxique potentiel. Le risque est la probabilité d'être exposé à une substance dangereuse, via la consommation d'un aliment qui contient une substance dangereuse, à une dose suffisamment élevée pour être toxique compte tenu de l'exposition. Pour évaluer le risque d'une substance pour les consommateurs, il faut donc pouvoir disposer des informations sur les dangers présentés par cette substance et sur le niveau d'exposition du consommateur à cette substance.

De l'analyse du risque

L'analyse du risque se subdivise en l'évaluation du risque, la gestion du risque et la communication du risque, indépendantes les unes des autres.

L'évaluation du risque consiste à évaluer la probabilité pour qu'un effet indésirable survienne dans une population après exposition au danger, ainsi qu'à évaluer sa sévérité. Au cours d'une évaluation du risque, il est nécessaire d'identifier le danger, de le caractériser en identifiant les doses toxiques, mais surtout les doses non toxiques, d'en estimer le niveau d'exposition due à la consommation de l'aliment soumis à l'expertise et éventuellement à d'autres sources potentielles, et d'établir la relation entre la dose d'exposition et la dose considérée comme non toxique pour l'Homme. Réalisée par des comités d'experts indépendants au sein des agences de sécurité alimentaire, cette évaluation est communiquée aux gestionnaires du risque qui prennent alors les décisions.

La gestion du risque consiste à prendre les décisions d'autorisations de mise sur le marché ou d'interdiction, de fixer les limites d'utilisation et de prévoir les mesures d'accompagnement et de contrôle nécessaires en arbitrant les choix possibles. Elle relève de la responsabilité des ministres concernés en France (agriculture et alimentation principalement) et de la Commission européenne dans l'UE.

La communication du risque consiste en des échanges interactifs d'information et d'opinions sur les risques entre les évaluateurs du risque, les gestionnaires du risque, les consommateurs, les industriels et toutes autres parties intéressées.

Des principes et contraintes régissant l'évaluation du risque chimique en sécurité alimentaire

Pour évaluer le risque, on considère que le consommateur sera exposé tous les jours de sa vie à la substance. Aucun effet indésirable n'est acceptable, contrairement aux médicaments pour lesquels des effets secondaires peuvent être tolérés. Pour des raisons éthiques, l'expérimentation humaine n'est pas autorisée. Les études toxicologiques doivent donc être réalisées sur des modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo* sur des animaux de laboratoire et couvrir tous les effets toxiques potentiels. L'extrapolation des données d'innocuité ou de toxicité à l'homme nécessite l'utilisation de facteurs de sécurité.

Du processus d'évaluation du risque toxicologique

Toutes les substances introduites intentionnellement dans un aliment sont soumises à autorisation par les gestionnaires du risque. Elles font l'objet au préalable d'une évaluation du risque toxicologique qui se divise en 4 étapes :

- L'identification du danger consiste à déterminer les effets toxiques pouvant être induits par la substance considérée. Dans le cas des substances soumises à autorisation, on recherche principalement des structures chimiques d'alerte comme la présence de groupements chimiques à risque dans la substance. Il est possible d'envisager une approche à l'aide de logiciels appropriés.
- La caractérisation du danger permet d'identifier les doses induisant les effets toxiques et surtout les doses sans effet toxique. Cette étape permet de définir une valeur toxicologique de référence, la dose journalière admissible (DJA) à partir des études toxicologiques. Elles doivent obligatoirement être réalisées dans des centres de toxicologie expérimentale accrédités (en France par le Cofrac), selon les règlements des bonnes pratiques de laboratoire et selon des protocoles expérimentaux très stricts, reconnus sur le plan international et publiés par l'OCDE. Les études listées dans l'encart suivant doivent être menées et fournies aux agences d'évaluation du risque :

Etudes devant être fournies aux agences d'évaluation des risques

a) Des études de toxicité subchronique par voie orale, via l'alimentation ou la boisson, dont la durée porte sur 1/10^e de la durée de vie de l'animal, soit 90 jours chez les rongeurs (études dites subchroniques). Toute anomalie, observée chez les animaux traités et non chez les témoins, dans le comportement des animaux, le bilan sanguin ou urinaire ou constatée lors des examens histopathologiques lors de l'autopsie doit être considérée. A la fin de l'étude, on doit connaître la dose toxique, les organes cibles de ou des effets toxiques mais surtout la dose qui est sans effet toxique dans chaque sexe, appelée Dose Sans Effet (DSE).

b) Des études de toxicité chronique par voie orale dont la durée porte sur la durée de vie entière de l'animal (études dites chroniques), sont également menées avec la même rigueur. Cependant, afin d'éviter des confusions et des erreurs dues à des différences de métabolisme et les pathologies spontanées liées à l'âge, ces études sont limitées dans le temps, 2 ans chez le rat et la souris.

c) Afin de détecter l'induction de lésions de l'ADN (effet génotoxique) qui pourraient conduire à l'apparition de mutations puis de tumeurs cancéreuses, des études de génotoxicité *in vitro* et *in vivo* sont tout d'abord réalisées. Dans le cas de démonstration d'un effet génotoxique *in vivo*, les agences d'évaluation considèrent que la substance fait courir des risques aux consommateurs. Ces substances ne bénéficient donc pas de l'attribution d'une DJA et ne sont pas autorisées par les gestionnaires du risque, sauf si l'on peut démontrer qu'il existe une dose seuil sans effet génotoxique.

d) Des études de cancérogenèse qui consistent à suivre l'apparition de tumeurs chez des animaux exposés par voie orale pendant 24 mois doivent être réalisées.

e) Des études de toxicité vis-à-vis des fonctions de reproduction doivent être réalisées sur plusieurs générations pour identifier un éventuel effet toxique comme l'induction d'une hypofertilité ou d'une stérilité, d'effet sur la mère et/ou le fœtus pendant la gestation, sur la

mise-bas ou sur la lactation et la survie et le comportement post-natal. Les animaux sont exposés avant et après copulation à des doses croissantes suivant les lots de la substance via l'alimentation ou la boisson. Des études sont également menées sur les femelles en gestation afin de détecter toute malformation chez les petits (effet tératogène).

f) C'est par des méthodes indirectes, par exemple en comparant des structures primaires des protéines, qu'un éventuel effet allergène est recherché car il n'existe pas à ce jour de méthode fiable et sûre permettant de mettre en évidence un risque d'allergie par voie orale (ou alimentaire) chez les animaux dont les résultats soient transposables à l'Homme.

En fonction des données obtenues dans les études requises dans tous les cas ou selon la classe chimique, des études complémentaires sont réalisées afin d'affiner l'évaluation des effets toxiques : neurotoxicité, effets perturbateur endocrinien, effets immunologiques...

La Dose Sans Effet ou DSE est déterminée en identifiant dans chaque étude toxicologique requise, pour chaque sexe, la plus forte dose qui n'a pas démontré d'effet toxique. Parmi ces doses, celle dont la valeur est la plus basse est choisie, considérant que l'effet, l'animal et le sexe considérés sont les plus protecteurs pour l'extrapolation à l'Homme.

La DJA est la quantité qu'un individu peut consommer tous les jours de sa vie sans courir de risque pour sa santé. Elle est déterminée à partir de la DSE affectée *a priori* de 2 facteurs de sécurité. Le premier, égal à 10, tient compte de la variabilité inter espèce et repose sur le postulat que l'Homme est 10 fois plus sensible que l'animal le plus sensible. Le second, également égal à 10, tient compte de la variabilité intra-spécifique (la population humaine est hétérogène, alors que les lots des animaux utilisés sont très homogènes). La DJA sera donc égale à la DSE divisée par 100, et sera exprimée en mg ou µg/kg poids corporel par jour. Dans certains cas, un facteur de sécurité supérieur à 100 peut être utilisé si on connaît la plus grande susceptibilité de l'Homme à un effet toxique ou en cas d'un effet toxique particulier.

Si les valeurs VTR sont traditionnellement construites à partir de la DSE (approche déterministe, correspondant à la dose maximale sans effet néfaste observé, choisie parmi les seules doses testées), depuis quelques années les Agences recommandent d'utiliser une nouvelle dose critique, il s'agit de la Benchmark Dose ou (BMD), basée sur une approche probabiliste. La Benchmark Dose est une dose produisant un effet non nul, correspondant à une modification du niveau de réponse par rapport à un groupe témoin. Le plus souvent, ce n'est pas directement la Benchmark Dose qui est utilisée, mais la limite inférieure de son intervalle de confiance à 95 % (BMDL). Le principe de cette approche repose sur une modélisation des données expérimentales prenant en compte l'ensemble de la relation dose réponse.

Dans certains cas, quand aucun effet toxique n'a été détecté lors des études correctement menées, une DJA n'est pas fixée, les experts considérant que cette substance ne présente pas de danger pour le consommateur au vu de l'absence totale d'effet toxique. Parfois, la DJA s'applique à plusieurs substances de la même famille chimique, on parle alors de DJA de groupe. Enfin une DJA n'est jamais fixée définitivement : elle est révisée régulièrement, soit à la demande des autorités de gestion du risque, soit en raison de la publication de nouvelles données toxicologiques.

Les DJA de tous les additifs alimentaires autorisés en Europe sont actuellement en cours de révision à la demande de la Commission Européenne, conduisant suivant les cas à une diminution, une augmentation, une annulation ou un maintien de la DJA existante.

- L'évaluation de l'exposition du consommateur à des substances chimiques *via* l'alimentation nécessite de disposer de deux types de données : la concentration de substance présente dans les denrées alimentaires concernées et les quantités consommées des denrées concernées. Dans le cas des substances soumises à autorisation, la concentration est la dose autorisée (Limite Maximale de Résidus pour les pesticides, dose résiduelle sur le produit fini pour les additifs). Pour la consommation, deux niveaux doivent être pris en compte : la moyenne des consommations de chaque denrée et la consommation des forts consommateurs (95^{ème} percentile). Il est également important de tenir compte de la consommation de groupes d'individus particuliers comme les enfants. Les données les plus utilisées en France par l'ANSES sont celles issues des enquêtes de consommation. L'EFSA a réuni l'ensemble des données de consommation européenne disponibles pour constituer une base de données régulièrement actualisée, accessible via son site web. L'exposition totale du consommateur est calculée en faisant la somme de l'exposition induite par la consommation de chaque denrée, elle-même calculée en multipliant la dose par la consommation de la denrée concernée.
- La caractérisation du risque : l'exposition du consommateur, toutes autorisations confondues, est comparée à la DJA. Si l'exposition est inférieure à la DJA, la substance sera considérée comme ne faisant pas courir de risque au consommateur et pourra être autorisée par les gestionnaires du risque aux doses demandées dans les denrées sollicitées. Dans le cas contraire, la substance évaluée sera considérée comme pouvant faire courir des risques aux consommateurs ; le gestionnaire du risque devra alors envisager soit une diminution des doses utilisées, soit une diminution des denrées alimentaires dans l'utilisation de la substance, soit un refus ou un retrait d'autorisation.

Agences et organismes en charge de l'évaluation du risque chimique en sécurité alimentaire

L'évaluation de la sécurité alimentaire des substances chimiques se fait au niveau national, européen et international par des comités d'experts constitués de scientifiques possédant des compétences complémentaires, nommés à titre personnel et qui ne doivent représenter ni les intérêts de groupes professionnels ni ceux de l'État. Pour des raisons de complémentarité des compétences, mais aussi d'impartialité, les expertises sont toujours collectives et non individuelles.

En France, c'est l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) qui est en charge de ces évaluations. Au niveau de l'Union Européenne et depuis 2003, il s'agit de l'EFSA (*European Food Safety Authority*), aux Etats-Unis, c'est la *Food and Drug Administration* (FDA). Au niveau international, le JECFA (*Joint Expert Committee on Food Additives*) est un comité mixte dépendant à la fois de la FAO et de l'OMS. Ces différents comités sont consultatifs et ne prennent donc pas de décisions, mais ils fournissent des avis aux gestionnaires du risque et aux décideurs politiques.

ANNEXE 3 - *CLOSTRIDIUM BOTULINUM*

Clostridium botulinum est un bacille à Gram positif, anaérobie strict, ce qui signifie qu'il ne peut se développer qu'en l'absence d'oxygène. Le botulisme alimentaire intervient lorsque cette bactérie se multiplie et produit des toxines dans des aliments avant leur consommation. *C. botulinum* produit aussi des spores, qui se propagent largement dans l'environnement, y compris les sols, les cours d'eau et les mers. Les spores de *C. botulinum* du groupe I sont particulièrement thermorésistantes. Leur valeur D à 121 °C (temps nécessaire pour tuer 90 % des bactéries exposées) a été évaluée à 0,21 minutes.

L'espèce de *C. botulinum* est très hétérogène, ainsi elle est divisée en 4 groupes génétiquement distincts :

- Groupe I : *C. botulinum* protéolytique (comprenant le sérotype A, B et F)
- Groupe II : *C. botulinum* non-protéolytique (comprenant le sérotype E, B et F)
- Groupe III : *C. botulinum* comprenant le sérotype C et D
- Groupe IV : *C. botulinum* comprenant le sérotype G parfois reconnu comme une espèce à part nommée *C. argentinense*

Chaque souche produit un seul type de toxine botulique.

La croissance de la bactérie et la formation de la toxine s'opèrent dans des produits ayant une faible teneur en oxygène, et pour certaines combinaisons des paramètres que sont la température de stockage et les conditions de conservation. Dans la plupart des cas, il s'agit d'aliments semi-préservés ou transformés de manière inadéquate ou encore de conserves familiales. *C. botulinum* ne se développe pas en conditions acides (pH inférieur à 4,6) et ne produit donc pas de toxine dans des aliments acides ; cependant, un pH faible ne dégrade pas une toxine préexistante. On joue aussi sur des combinaisons faible température de stockage/forte teneur en sel et/ou faible pH pour prévenir la croissance de la bactérie ou la formation de la toxine.

ANNEXE 4 - NITRATES (E251, E252) : REEVALUATION DE L'EFSA (2017B)

L'EFSA a réévalué en 2017 l'innocuité des nitrates de sodium et de potassium en tant qu'additifs alimentaires. Considérant, que l'évaluation du JECFA en 2003 couvrait toutes les études disponibles avant 2002, l'EFSA a limité la recherche bibliographique sur les nitrates aux publications et études disponibles depuis 2002, tout en prenant en compte les évaluations précédentes.

Toxicologie

La partie toxicologique de l'avis de l'EFSA est complexe, et peu accessible aux non-spécialistes. Cependant, Il est possible d'en dégager les éléments les plus importants suivants :

- Toxicocinétique : chez l'Homme, la totalité des nitrates est absorbée au niveau du tractus gastro-intestinal, puis 20 à 25 % de la dose ingérée est excrétée dans la salive et 5 à 36 % de ces nitrates salivaires sont convertis en nitrites par les bactéries buccales, nitrites qui à leur tour sont absorbés et ensuite convertis en nitrates. La presque totalité des nitrates est excrétée dans l'urine.
- Génotoxicité : les tests *in vitro* de mutations géniques sur bactéries et les tests

d'aberrations chromosomiques sur cellules de mammifères sont négatifs. Aucune indication d'un potentiel génotoxique sur cellule somatique ou germinale *in vivo* n'a été mise en évidence chez des rats et des souris exposés par voie orale. Bien que la base de données soit limitée, l'EFSA conclut que les nitrates de sodium et de potassium ne présentent pas de potentiel génotoxique.

- Toxicité aiguë, à court terme et subchronique : chez le rat jusqu'à des doses de 4500 mg/kg de poids corporel par jour, mélangées à la nourriture, aucun effet toxique n'a été observé. A des doses supérieures, les animaux montrent des signes de méthémoglobinémie.
- Toxicité chronique et de cancérogenèse : des études ont été réalisées chez la souris, le rat. Chez la souris, aucun effet toxique n'a été observé. Chez le rat et le porc, des modifications des paramètres hématologiques, des concentrations plasmatiques d'hormones thyroïdiennes, ou des effets sur la thyroïde ont été observés (Boink *et al.*, 1995, 1996 ; JECFA, 1996 ; Zaki *et al.*, 2004 ; Mukhopadhyay *et al.*, 2005 ; Azeez *et al.*, 2011). L'absence d'augmentation de l'incidence de tumeurs chez le rat et la souris exposés a permis de conclure à l'absence d'effet cancérogène du nitrate de sodium et du nitrate de potassium jusqu'à 7500 mg/kg de poids corporel /jour chez la souris et 2500 mg/kg de poids corporel /jour chez le rat.
- Reproduction : Une étude de toxicité vis-à-vis des fonctions de reproduction sur une génération réalisée chez des rats exposés au nitrate de potassium par gavage n'a révélé aucune toxicité à des doses allant jusqu'à 1500 mg/kg de poids corporel par jour. Dans une étude de reproduction chez la souris exposée via la boisson au nitrate de potassium, des effets sur le nombre de spermatozoïdes et des enzymes testiculaires, ainsi que des malformations des spermatozoïdes ont été observées à forte dose. La dose sans effet de cette étude est égale à 122 mg de nitrate de potassium /kg de poids corporel par jour. L'EFSA note que la durée de cette étude est courte et qu'aucun de ces effets n'est retrouvé à la plus forte dose dans les études de reproduction chez le rat, menées selon les protocoles réglementaires.
- Développement embryonnaire : aucun effet sur le développement des fœtus n'a été observé sur des femelles gestantes de souris, de rat, de hamster, et de lapin, exposées à des doses de nitrate de sodium allant respectivement jusqu'à 400, 1980, 280 ou 206 mg/kg de poids corporel par jour.
- Chez l'Homme : des effets indésirables, non cancéreux, ont été observés sur la thyroïde dans plusieurs études, suggérant que l'exposition aux nitrates altère la fonction thyroïdienne inhibant l'incorporation d'iode par la thyroïde. Une étude réalisée sur une large cohorte d'individus (n = 21977 femmes) montre que l'augmentation de l'ingestion de nitrates issus de différentes sources est associée à une augmentation de l'incidence d'hypothyroïdie (Ward *et al.*, 2010). D'autres études montrent qu'aucun effet n'apparaît dans les mêmes conditions. Ces observations chez l'Homme montrent une relation évidente entre l'exposition aux nitrates et le développement d'hypertrophie thyroïdienne, de goitre et d'hypothyroïdie. L'EFSA note que ces effets apparaissent aux mêmes doses que celles qui induisent une méthémoglobinémie chez l'Homme après exposition aux

nitrate, qui sont convertis au niveau endogène en nitrite.

L'EFSA a considéré que la meilleure méthode pour attribuer une DJA aux nitrates de sodium et de potassium serait de retenir comme effet toxique pertinent la méthémoglobinémie, induite par les nitrites formés à partir des nitrates ingérés et excrétés dans la salive une fois absorbés. Cependant, les études donnant des informations sur la quantité de nitrates excrétée, qui sont anciennes, estiment le taux de nitrates excrétés dans la salive entre 20 et 25 % de la dose ingérée (Spiegelhalder *et al.*, 1976 ; Bartholomew et Hill, 1984). Le taux de conversion des nitrates en nitrites dans la bouche est estimé se situer entre 5 et 36 % (Spiegelhalder *et al.*, 1976 ; Wagner *et al.*, 1983 ; Bartholomew et Hill, 1984 ; Bos *et al.*, 1988 ; Granli *et al.*, 1989 ; Shapiro *et al.*, 1991 ; Jin *et al.*, 2013 ; Bondonno *et al.*, 2015 ; Hohensin *et al.*, 2016 ; Montenegro *et al.*, 2016). Considérant ces deux éléments, l'EFSA conclut que le taux de conversion des nitrates ingérés en nitrites au niveau de la bouche est compris entre 1 % et 9 % de la dose totale ingérée et que la DJA des nitrates serait comprise entre 1,05 et 9,4 mg/kg de poids corporel par jour, compte tenu du fait que celle des nitrites est égale à 0,07 mg/kg de poids corporel par jour. L'EFSA compare ces données à la DJA fixée par le SCF (*Scientific Committee for Food*) en 1997 qui est égale à **3,7 mg/kg de poids corporel par jour**, et a considéré qu'il n'y avait pas lieu de la modifier.

Mode de calcul de DJA des nitrates à partir de la DJA des nitrites selon l'EFSA (2017b) :

- Soit une excrétion de nitrates ingérés dans la salive de 20 à 25 % ;
- Soit une transformation de ces nitrates en nitrites dans la bouche de 5 à 36 % ;
- En conséquence, le taux de conversion des nitrates ingérés en nitrites au niveau de la bouche est donc de 0,05 (pour 5 %) x 0,20 (pour 20 %) = 0,01 (soit 1 %) à 0,25 (pour 25 %) x 0,36 (pour 36 %) = 0,09 (soit 9 %), soit de 1 à 9 %.
- Soit la DJA des nitrites qui est de 0,07 mg/kg de poids corporel par jour, exprimée en ions nitrites.
- Soit le rapport de 62 (NO₃) /46 (NO₂) = 1,34 entre les poids moléculaires des deux ions.
- Compte tenu des taux de conversion :
 - 1 % de conversion : 0,07 x 1,34 x 100 = 9,38 (arrondi à 9,4) ;
 - 9 % de conversion : 0,07 x 1,34 x 100/9 = 1,04

La DJA des nitrates doit donc être comprise entre 1,05 à 9,4 exprimée en ion nitrate.

L'EFSA considère donc qu'il n'est pas nécessaire de modifier la DJA actuelle de 3,7 mg/kg de poids corporel par jour, attribuée par le SCF puisqu'elle est comprise entre 1,05 et 9,4 mg/kg de poids corporel par jour.

Expologie

Exposition aux nitrates

- a. Exposition des consommateurs européens aux additifs nitrate de sodium (E251) et nitrate de potassium (E252) (EFSA 2017b) :

L'exposition moyenne aux nitrates (exprimée en ion nitrate) à partir de l'utilisation des additifs alimentaires E251 et E252 est comprise entre 10 µg/kg de poids corporel par jour chez les enfants et 90 µg/kg de pc par jour chez les petits enfants de 1 à 3 ans.

Pour les forts consommateurs, l'exposition est comprise entre 50 µg/kg de poids corporel par jour chez les personnes âgées à 200 µg/kg de poids corporel par jour chez les petits enfants de 1 à 3 ans.

Les contributeurs principaux sont les produits à base de viandes (saucisses et viande transformée) et les fromages.

ANNEXE 5 - CANCEROGENICITE DES NITROSAMINES POTENTIELLEMENT PRESENTES DANS LA VIANDE TRANSFORMEE (EFSA 2017b)

Table 12: Carcinogenicity and genotoxicity of nitrosamines generated in cured meat

Substance	CAS no.	Carcinogenicity			Genotoxicity ^(d)
		IARC Group ^(a)	BMDL ₁₀ ^(b) (mg/kg bw per day)	EPA Prediction ^(c)	
Volatile nitrosamines					
NDMA (<i>N</i> -nitrosodimethylamine)	62-75-9	2A (probably carcinogenic to humans)	0.027	Highly likely to be a potent carcinogen	Genotoxic <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>
NMOR (<i>N</i> -nitrosomorpholine)	58-89-2	2B (possibly carcinogenic to humans)	0.7	Highly likely to be a moderately active carcinogen	Genotoxic <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>
NMEA (<i>N</i> -nitrosomethylethylamine)	10595-95-6	2B	–	Highly likely to be a moderately active carcinogen	Positive <i>in vitro</i> (DNA binding)
NPYR (<i>N</i> -nitrosopyrrolidine)	930-55-2	2B	0.16	Likely to be a moderately active carcinogen	Genotoxic <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>
NDEA (<i>N</i> -nitrosodiethylamine)	55-18-5	2A	0.018	Highly likely to be a potent carcinogen	Genotoxic <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>
NPIP (<i>N</i> -nitrosopiperidine)	100-75-4	2B	–	Highly likely to be a moderately active carcinogen	Genotoxic <i>in vitro</i>
NDPA (<i>N</i> -nitrosodi- <i>n</i> -propylamine)	621-64-7	2B	–	Highly likely to be a potent carcinogen	Genotoxic <i>in vitro</i>
Non-volatile nitrosamines					
NHPRO (<i>N</i> -nitrosohydroxyproline)	30310-80-6	3 (not classifiable as to its carcinogenicity to humans)	–	Unlikely to be carcinogenic	No data
NPRO (<i>N</i> -nitrosoproline)	7519-36-0	3	–	Unlikely to be carcinogenic	Limited negative data (Ames test)
NSAR (<i>N</i> -nitrososarcosine)	13256-22-9	2B	–	Likely to be weakly carcinogenic	Limited negative data (host-mediated assay)
NMA (<i>N</i> -nitrosomethylaniline)	614-00-6	–	–	Not applicable	Limited positive data <i>in vitro</i> (Ames test)
NDBA (<i>N</i> -nitrosodibutylamine)	924-16-3	2B	–	Highly likely to be a moderately active carcinogen	Genotoxic <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> (Ames test, V79/hprt, <i>in vivo</i> comet and SCE)
NDiBA (<i>N</i> -nitrosodiisobutylamine)	997-95-5	–	–	Not available	Limited positive data <i>in vitro</i> (Ames, V79/hprt)

Substance	CAS no.	Carcinogenicity			Genotoxicity ^(d)
		IARC Group ^(a)	BMDL ₁₀ ^(b) (mg/kg bw per day)	EPA Prediction ^(c)	
NDBzA (<i>N</i> -nitrosodibenzylamine)	5336-53-8	–	–	Likely to be weakly carcinogenic	Limited positive data <i>in vitro</i> (Ames test)
NHMTCA (<i>N</i> -nitroso-2-hydroxymethyl-thiazolidine-4-carboxylic acid)	99452-46-7	–	–	Unlikely to be carcinogenic	No data
NTCA (<i>N</i> -Nitroso-thiazolidine-4-carboxylic acid)	88381-44-6	–	–	Unlikely to be carcinogenic	No data
NMTCA (<i>N</i> -Nitroso-2-methyl-thiazolidine 4-carboxylic acid)	103659-08-1	–	–	Unlikely to be carcinogenic	No data
NPIC (<i>N</i> -nitrosopipercolic acid)	4515-18-8	–	–	Not applicable	No data

(a): IARC Monographs supplement 7, 1987 (<http://www.iarc.fr/en/publications/list/monographs/index.php>).

(b): SCCS, 2012 Opinion on Nitrosamines and Secondary Amines in Cosmetic Products (http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_072.pdf).

(c): According to EPA expert system OncoLogic™ 8.0 (2015).

(d): Hazardous Substances Data Bank (<http://toxnet.nlm.nih.gov/newtoxnet/hsdb.htm>).

ANNEXE 6 – CANCEROGENICITE DE L’HEME

Les travaux de l’équipe dirigée par F. Pierre ont permis de montrer que le fer héminique, apporté par la consommation de produits carnés en excès, a présenté un effet proposé comme étant promoteur vis-à-vis de la cancérogenèse colique dans les deux modèles utilisés (Bastide *et al.*, 2015 ; Pierre, 2016).

Le fer héminique, dérivé de l'hémoglobine et de la myoglobine d'origine animale (viande, fruits de mer, volaille), est la forme de fer la plus facilement absorbable (20 % à 30 % de l’apport en fer chez l’Homme). Le fer héminique provoque une peroxydation des lipides consommés en même temps que la viande rouge, en particulier des acides gras polyinsaturés de la série omega-6, et la formation d’aldéhydes, en particulier le 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), avec deux types d’action sur les cellules épithéliales coliques : un effet cytotoxique sur les entérocytes sains, en favorisant par sélection la prolifération des cellules précancéreuses dans le côlon, formées par l’AOM (Surya *et al.*, 2016) et un effet génotoxique qui fait évoluer les cellules vers l’état cancéreux (adduits covalents entre 4-HNE et ADN) (Bastide *et al.*, 2015 ; Guéraud *et al.*, 2015). Cette peroxydation lipidique est luminale (Pierre *et al.*, 2008). Il n’y aurait pas d’entrée de fer héminique dans les entérocytes des animaux des deux modèles (rat, souris). Cependant, on peut se poser la question du rôle promoteur unique du fer héminique puisque les produits d’oxydation des acides gras sont des agents génotoxiques, ce qui ne permet pas d’assurer qu’il existe une dose seuil (Eckl et Bresgen, 2017).

ANNEXE 7 - DIRECTIVE 2006/52/CE DU PARLEMENT EUROPEEN ET DU CONSEIL DU 5 JUILLET 2006

26.7.2006

FR

Journal officiel de l'Union européenne

L 204/15

c) dans la partie C, le tableau relatif aux additifs E 249, E 250, E 251 et E 252 est remplacé par le texte suivant:

«N° E	Nom	Dénrées alimentaires	Dose maximale pouvant être ajoutée durant la fabrication (exprimée en NaNO ₂)	Dose résiduelle maximale (exprimée en NaNO ₂)
E 249	Nitrite de potassium ⁽⁶⁾	Produits à base de viande	150 mg/kg	
E 250	Nitrite de sodium ⁽⁶⁾	Produits à base de viande stérilisés (Fo > 3,00) ⁽⁷⁾	100 mg/kg	
		Produits à base de viande traditionnels, saumurés par immersion (1): <i>Wiltshire bacon</i> (1.1); <i>Entremeada, entrecosto, chispe, orelheira et cabeça (salgados), toucinho fumado</i> (1.2); et produits similaires		175 mg/kg
		<i>Wiltshire ham</i> (1.1); et produits similaires		100 mg/kg
		<i>Rohschinken nassgepökelt</i> (1.6); et produits similaires		50 mg/kg
		<i>Cured tongue</i> (1.3)		
		Produits à base de viande traditionnels, traités en salaison sèche (2): <i>Dry cured bacon</i> (2.1); et produits similaires		175 mg/kg
		<i>Dry cured ham</i> (2.1); <i>Jamón curado, paleta curada, lomo embuchado y cecina</i> (2.2); <i>Presunto, Presunto da Pá et Paio do Lombo</i> (2.3); et produits similaires		100 mg/kg
		<i>Rohschinken trocken-gepökelt</i> (2.5); et produits similaires		50 mg/kg
		Autres produits à base de viande saumurés de manière traditionnelle (3): <i>Vysočina</i> <i>Selský salám</i> <i>Turistický trvanlivý salám</i> <i>Poličan</i> <i>Herkules</i> <i>Lovecký salám</i> <i>Dunajská klobása</i> <i>Paprikás</i> (3.5); et produits similaires	180 mg/kg	
		<i>Rohschinken, trocken-/nassgepökelt</i> (3.1); et produits similaires <i>Jellied veal et brisket</i> (3.2)		50 mg/kg

[illegible]

N° E	Nom	Denrées alimentaires	Dose maximale pouvant être ajoutée durant la fabrication (exprimée en NaNO ₂)	Dose résiduelle maximale (exprimée en NaNO ₂)
		Fromage à pâte dure, semi-dure et semi-molle	150 mg/kg dans le lait de fromagerie ou dose équivalente si l'ajout est opéré après retrait du lactosérum et ajout d'eau	
		Succédané de fromage à base de produits laitiers		
		Harengs au vinaigre et sprats	500 mg/kg	

(⁶) Lorsqu'il est étiqueté "pour usage alimentaire", le nitrite peut uniquement être vendu en mélange avec du sel ou un substitut du sel.

(⁷) La valeur Fo 3 équivaut à un traitement thermique de 3 min à 121 °C (réduction de la charge bactérienne d'un milliard de spores dans 1 000 conserves à une spore dans 1 000 conserves).

(⁸) Des nitrates peuvent être présents dans certains produits à base de viande traités thermiquement, en raison de la conversion naturelle des nitrites en nitrates dans un milieu de faible acidité.

1. Les produits à base de viande sont immergés dans une saumure contenant des nitrites et/ou des nitrates, du sel et d'autres composants. Les produits à base de viande peuvent être soumis à d'autres traitements, par exemple le fumage.

1.1. Une saumure est injectée dans la viande qui est ensuite immergée dans la saumure pendant 3 à 10 jours. La saumure contient aussi des cultures microbiologiques à usage de levain.

1.2. Immersion dans la saumure pendant 3 à 5 jours. Les produits ne subissent pas de traitement thermique et présentent une activité de l'eau (aW) élevée.

1.3. Immersion dans la saumure pendant au moins 4 jours et pré cuisson.

1.4. Une saumure est injectée dans la viande qui est ensuite immergée dans la saumure. Le saumurage dure de 14 à 21 jours et est suivi d'une maturation avec fumage à froid pendant 4 à 5 semaines.

1.5. Le produit est immergé dans la saumure pendant 4 à 5 jours à une température de 5 à 7 °C, soumis à une maturation habituellement pendant 24 à 40 heures à une température de 22 °C, éventuellement fumé pendant 24 heures à une température de 20 à 25 °C et entreposé pendant 3 à 6 semaines à une température de 12 à 14 °C.

1.6. La durée de saumurage dépend de la forme et du poids des morceaux de viande et s'élève approximativement à 2 jours/kg; vient ensuite la stabilisation/maturation.

2. Le processus de salaison à sec consiste en l'application à sec d'un mélange de saumure contenant des nitrites et/ou des nitrates, du sel et d'autres composants à la surface de la viande, puis en une période de stabilisation/maturation. Les produits à base de viande peuvent être soumis à d'autres traitements, par exemple le fumage.

2.1. Salaison à sec suivie d'une maturation pendant au moins 4 jours.

2.2. Salaison à sec suivie d'une période de stabilisation d'au moins 10 jours et d'une période de maturation supérieure à 45 jours.

2.3. Salaison à sec pendant 10 à 15 jours suivie d'une période de stabilisation de 30 à 45 jours et d'une période de maturation d'au moins 2 mois.

2.4. Salaison à sec pendant 3 jours + 1 jour/kg suivie d'une semaine de post-salaison et d'une période de maturation/affinage de 45 jours à 18 mois.

2.5. La durée de salaison dépend de la forme et du poids des morceaux de viande et elle est approximativement de 10 à 14 jours; vient ensuite la stabilisation/maturation.

3. Processus de salaison par immersion ou à sec utilisés en combinaison ou lorsque les nitrites et/ou les nitrates sont contenus dans un produit composé ou lorsque la saumure est injectée dans le produit avant la cuisson. Les produits peuvent être soumis à d'autres traitements, par exemple le fumage.

3.1. Salaisons à sec et par immersion utilisées en combinaison (sans injection de saumure). La durée de salaison dépend de la forme et du poids des morceaux de viande et elle est approximativement de 14 à 35 jours; vient ensuite la stabilisation/maturation.

3.2. Une saumure est injectée dans la viande qui, après une période minimale de 2 jours, est cuite dans de l'eau bouillante pendant 3 heures au maximum.

3.3. Le produit a une période minimale de maturation de 4 semaines et un rapport eau/protéines de moins de 1,7.

3.4. Période de maturation d'au moins 30 jours.

3.5. Cuisson du produit sec à 70 °C, suivie d'un processus de séchage et de fumage de 8 à 12 jours. Les produits fermentés sont soumis à un processus de fermentation en trois étapes de 14 à 30 jours, suivi du fumage.

3.6. Saucissons sans ajout de nitrites, crus, fermentés et séchés. Le produit fermente à une température de 18 à 22 °C ou inférieure (10 à 12 °C) et a une période de maturation/affinage d'au moins 3 semaines. Le produit a un rapport eau/protéines inférieur à 1,7.»

ANNEXE 8 – DECLARATION D'INTERET DES MEMBRES DU GROUPE DE TRAVAIL

Le président du groupe de travail a demandé aux académiciens intéressés, une déclaration écrite (par mail) des liens qu'il- elle a pu avoir avec les professionnels impliqués dans l'utilisation des nitrates/nitrites dans les produits de viandes transformées au cours des 3 dernières années, ainsi qu'avec les associations qui se sont exprimées sur le sujet.

- Jean-Marie BOURRE, *Pour ma part, étant jeune depuis plus longtemps que d'autres, j'ai présidé le cs de la Fict il y a... 25 ans, mail du 2/04/20.*
- Pierre FEILLET, *aucun conflit d'intérêt dans le domaine de la charcuterie et des nitrites, mail du 2/04/20.*
- Léon GUEGUEN, *Je n'ai pas et je n'ai jamais eu de lien d'intérêt avec l'industrie sur le sujet des nitrates et nitrites dans la charcuterie ou ailleurs, mail du 2/04/20.*
- Jean de KERVASDOUE, *Je n'ai aucun lien d'intérêt avec un quelconque acteur de ce domaine, mail du 2/04/20.*
- Philippe KIM-BONBLED, *Aucun lien d'intérêt de mon côté sur le sujet des nitrites dans l'alimentation, mail du 2/04/2020.*
- Jean-Paul LALLES, *Pour ma part, je n'ai JAMAIS eu de liens quelconques avec les professionnels utilisateurs de nitrites et n'ai jamais travaillé sur ce sujet, mail du 2/04/20.*
- Daniel MARZIN, *je n'ai eu pendant ces 3 dernières années aucun contact avec des industriels ou des agences françaises ou européennes sur le sujet des nitrates et nitrites, mail du 2/04/20.*
- Dominique PARENT-MASSIN, *membre du Panel ANS de l'EFSA, co-auteur de l'opinion sur les nitrites ...et sur les nitrates..., auteur à titre gracieux d'un article intitulé "Les additifs alimentaires autorisés en « charcuterie » font-ils courir des risques aux consommateurs ? (2019) xx, S1-S6, mail du 2/04/20.*
- Gérard PASCAL : *Je soussigné Gérard PASCAL, certifie n'avoir aucun lien d'intérêt avec les professionnels de la charcuterie et de la viande, et ce depuis au moins cinq ans. Saint Alyre d'Arlanc, le 03 avril 2020*
- Philippe STOOP, *Aucun lien d'intérêt de mon côté sur le sujet des nitrites dans l'alimentation, mail du 2/04/20.*
- Hervé THIS, *j'ai fait un jour ... une conférence gracieusement pour la FICT, je contribue de toutes mes forces à la CNCT, mais entièrement gracieusement, mail du 2/04/20.*

13. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

HISTORIQUE

Alimentation et cancer : évaluation des données scientifiques, 1996 CNERNA-CNRS, 534 pp.

Carroll A.E. and Doherty T.S., 2019, Meat consumption and health: Food for thought. *Ann Intern Med*, 171, 767-769.

Crowe W., Elliott C.T. and Green B.D., 2019. A review of the in vivo evidence investigating the role of nitrite exposure from processed meat consumption in the development of colorectal cancer. *Nutrients*, 11, 2673-2690.

Diallo A, Deschasaux M, Latino-Martel P, Hercberg S, Galan P, Fassier P, Allès B, Guéraud F, Pierre FH, Touvier M, 2018. Red and processed meat intake and cancer risk: result from the prospective NutriNet -Santé cohort study. *Int J Cancer*, 142, 230-237.

EFSA ANS Panel, 2017. Scientific Opinion on the re-evaluation of potassium nitrite (E 249) and sodium nitrite (E 250) as food additives. *EFSA Journal* 2017, 15, 4786, 157 pp.

Han MA, Zeraatkar D, Guyatt GH, Vernooij RWM, El Dib R, Zhang Y, Algarni A, Leung G, Storman D, Valli C, Rabassa M, Rehman N, Parvizian MK, Zworth M, Bartoszko JJ, Lopes LC, Sit D, Bala MM, Alonso-Coello P, Johnston BC, 2019. Reduction of red and processed meat intake and cancer mortality and incidence, *Ann Intern Med*, 171,711-724.

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Cancer, Volume 94, 2010. Ingested Nitrates and Nitrites and Cyanobacterial Peptide Toxins, 454pp.

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Cancer, Volume 114, 2015. Red Meat and Processed Meat, 497pp.

JECFA, WHO food additives series: 35, 1996, Safety evaluation of certain food additives: nitrite.

JECFA, WHO food additives series: 50, 2003, Safety evaluation of certain food additives: nitrite.

Norat T, Bingham S, Ferrari P, Slimani N, Jenab M, Mazuir M, Overvad K, Olsen A, Tjønneland A, Clavel F, Boutron-Ruault MC, Kesse E, Boeing H, Bergmann MM, Nieters A, Linseisen J, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Tountas Y, Berrino F, Palli D, Panico S, Tumino R, Vineis P, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Engeset D, Lund E, Skeie G, Ardanaz E, González C, Navarro C, Quirós JR, Sanchez MJ, Berglund G, Mattisson I, Hallmans G, Palmqvist R, Day NE, Khaw KT, Key TJ, San Joaquin M, Hémon B, Saracci R, Kaaks R, Riboli E, 2005. Meat, fish, and colorectal cancer risk: The European prospective investigation into cancer and nutrition. *J Natl Cancer Inst*, 97, 906-916.

Scientific Committee for Food, Thirty-eighth Series (1997). Opinions on: Nitrate and nitrite (Opinion expressed on 22 September 1995).

Vernooij RWM, Zeraatkar D, Han MA, El Dib R, Zworth M, Milio K, Sit D, Lee Y, Gomaa H, Valli C, Swierz MJ, Chang Y, Hanna SE, Brauer PM, Sievenpiper J, de Souza R, Alonso-Coello P, Bala MM, Guyatt GH, Johnston BC, 2019. Patterns of red and processed meat consumption and risk for cardiometabolic and cancer outcomes. *Ann Intern Med*, 171, 732-742.

World Research Cancer Fund International and American Institute for Cancer Research, 2007, Food, Nutrition, Physical Activity and the Prevention of Cancer, 517pp.

DONNÉES TECHNOLOGIQUES

Andersen HJ, Johansen HS, Shek CK, Skibsted LH, 1990. Nitric oxide exchange in nitrosylmyoglobin. *Z lebensm Unters Forsch.*, 1991, 293-298.

Fiddler W, Pensabene JW, Piotrowski EG, Doerr RC, Wasserman AE, 1973. Use of sodium ascorbate or erythorbate to inhibit formation of N-nitrosodimethylamine in frankfurters. *J Food Sci*, 38, 1084.

Fiddler W, Pensabene JW, Piotrowski EG, Phillips JG, Keating J, Mergens WJ, Newmark HL, 1978. Inhibition of formation of volatile nitrosamines in fried bacon by the use of cure-solubilized alpha-tocopherol. *J Agric Food Chem*, 26, 653-656.

IFIP, 2018. Oxydation et qualité, In *Mémento viandes et charcuteries*, <https://www.ifip.asso.fr/fr/content/oxydation-et-qualit%C3%A9-des-viandes-et-produits-carn%C3%A9s-mise-%C3%A0-jour-2018-du-m%C3%A9mento-viandes-et>

Kagan VE, Kozlov AV, Tyurina YY, Shvedova AA, Yalowich JC, 2001. Antioxidant mechanisms of nitric oxide against iron-catalyzed oxidative stress in cells. *Antioxid Redox Signal*, 3, 189-202.

Lebrun S, Van Nieuwenhuysen, Crèvecoeur, Vanleyssem R, Thimister J, Denayer S, Jeuge S, Fremaux B, 2020. Influence of reduced levels or suppression of sodium nitrite on the outgrowth and toxinogenesis of psychrotrophic *Clostridium botulinum* Group II type B in cooked ham, *Intern J Food Microbiol*, 334, 108853

Majou D, Christieans S, 2018. Mechanisms of the bactericidal effects of nitrate and nitrite in cured meats. *Meat Sci*, 145, 273-284.

Mirvish S, 1977. N-nitroso compounds: Their chemical and *in vivo* formation and possible importance as environmental carcinogens, *J Toxicol Environ Health*, 2, 1267-1277.

Møller J, Skibsted L, 2006. Myoglobins-the link between discoloration and lipid oxidation in muscle and meat. *Química Nova*, 29, 1270-1278.

Nassy G, 2020. Rôles et intérêt des nitrites dans la charcuterie. *Pratiques en nutrition*, 61, 32-37.

Saint Blanquat de G, 1980. Aspects toxicologiques et nutritionnels des nitrates et des nitrites. *Ann Nutr Alim*, 34, 827-864.

Shiva S, Huang Z, Grubina R, Sun J, Ringwood LA, MacArthur PH, Xu X, Murphy E, Darley-Usmar VM, Gladwin MT, 2007. Deoxymyoglobin is a nitrite reductase that generates nitric oxide and regulates mitochondrial respiration. *Circulation Res*, 100, 654-661.

DONNEES TOXICOLOGIQUES

ANSES, 2012 Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : *Clostridium botulinum*, *Clostridium* neurotoxigènes Saisine n°2016-SA-0074 9.

ANSES, 2019. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : *Clostridium botulinum*, *Clostridium* neurotoxigènes Saisine n°2016-SA-0074 Mise à jour : Août 2019

Azeez OH, Mahmood MB and Hassan JS, 2011. Effect of nitrate poisoning on some biochemical parameters in rats. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 25, 47–50.

Bartholomew B, Hill MJ, 1984. The pharmacology of dietary nitrate and the origin of urinary nitrate. *Food Chem Toxicol*, 22, 789–795.

Bastide N, Chenni F, Audebert M, Santarelli R, Tach S, Naud N, Baradat M, Jouanin I, Surya R, Hobbs D, Kuhnle G, Raymond-Letron I, Gueraud F, Corpet D, Pierre F 2015. A Central Role for Heme Iron in Colon Carcinogenesis Associated with Red Meat Intake. *Cancer Res*, 75, 870–879. Bondonno CP, Liu AH, Croft KD, Ward NC, Puddey IB, Woodman RJ, Hodgson JM, 2015. Short-term effects of a high nitrate diet on nitrate metabolism in healthy individuals. *Nutrients*, 7, 1906–1915.

Boink B, Dormans J, Speijers G, 1995. The role of nitrite and/or nitrate in the etiology of the hypertrophy of the adrenal zona glomerulosa of rats. Health aspects of nitrates and its metabolites (particularly nitrite). *Proceedings International Workshop*. Bilthoven, Netherlands, 8–10 November 1994. Council of Europe Press, Bilthoven, The Netherlands, pp. 213–227.

Boink B, Beekhof P, Dormans J and Speijers G, 1996. On the etiology of nitrite-induced hypertrophy of the zona glomerulosa of rats: I. The possible role of nitrate. Report No. 235802003 of the National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, Netherlands, pp. 1–19, as referred to in JECFA,

Bos PMJ, Van Den Brandt PA, Wedel M, Ockhuizen T, 1988. The reproducibility of the conversion of nitrate to nitrite in human saliva after a nitrate load. *Food Chem Toxicol*, 26, 93–97.

Bryk T, Zalstein E, Lifshitz M, 2007. Methemoglobinemia induced by refrigerated vegetable puree in conjunction with supraventricular tachycardia. *Acta Paediatr*, 92, 1214–1215.

Chui JSW, Poon WT, Chan KC, Chan AYW, Buckley TA, 2005. Case Report. Nitrite-induced methaemoglobinaemia – aetiology, diagnosis and treatment. *Anaesthesia*, 60, 496–500.

- Chowdhury G, Calcutt MW, Nagy LD, Guengerich FP, 2012. Oxidation of methyl and ethyl nitrosamines by cytochromes P450 2E1 and 2B1. *Biochem*, 51, 9995–10007.
- De Mey E, Drabik-Markiewicz G, Peeters C, Derdelinckx G, Paelinck H, Impens S, 2009. Impact of cadaverine in volatile N-nitrosamine formation during the heating of a lean meat model. In *Communications in agricultural and applied biological sciences (Universiteit Gent.)*, 4, pp. 127-132.
- De Mey E, De Maere H, Goemaere O, Steen L, Peeters MC, Derdelinckx G, Paelinck H, Fraeye I, 2014. Evaluation of N-nitrosopiperidine formation from biogenic amines during the production of dry fermented sausages. *Food Bioprocess Technol*, 7, 1269–1280.
- Drabik-Markiewicz G, Dejaegher B, De Mey E, Impens S, Kowalska T, Paelinck H, Vander Heyden Y, 2010. Evaluation of the influence of proline, hydroxyproline or pyrrolidine in the presence of sodium nitrite on N-nitrosamine formation when heating cured meat. *Anal Chim Acta*, 657, 123–130.
- Drabik-Markiewicz G, Dejaegher B, De Mey E, Kowalska T, Paelinck H, Vander Heyden Y, 2011. Influence of putrescine, cadaverine, spermidine or spermine on the formation of N-nitrosamine in heated cured pork meat. *Food chem*, 126, 1539–1545.
- Eckl PM, Bresgen N, 2017. Genotoxicity of lipid oxidation compounds. *Free Radic Biol Med*, 111, 244-252.
- EFSA ANS Panel, 2017a. Scientific Opinion on the re-evaluation of potassium nitrite (E 249) and sodium nitrite (E 250) as food additives. *EFSA Journal* 2017; 15(6):4786, 157 pp.
- EFSA ANS Panel, 2017b Scientific Opinion on the re-evaluation of sodium nitrate (E 251) and potassium nitrate (E 252) as food additives. *EFSA Journal* 2017;15(6):4787, 123 pp.
- FDA (Food and Drug Administration), 1972a. Teratologic evaluation of FDA 71-9 (sodium nitrite). Report nr. FDABF-GRAS-061. Maspeth, NY: Food and Drug Research Laboratories, Inc.
- FDA (Food and Drug Administration), 1972b. Teratologic evaluation of FDA 71-10 (potassium nitrite). Report nr. FDABF-GRAS-065. Maspeth, NY: Food and Drug Research Laboratories, Inc.
- Granli T, Dahl R, Brodin P, Bockman OC, 1989. Nitrate and nitrite concentrations in human saliva: variations with salivary flow-rate. *Food Chem Toxicol*, 27, 675–680.
- Guéraud F, Taché S, Steghens JP, Milkovic L, Borovic-Sunjic S, Zarkovic N, Gaultier E, Naud N, Héliers-Toussaint C, Pierre F, Priymenko N, 2015. Dietary polyunsaturated fatty acids and heme iron induce oxidative stress biomarkers and a cancer promoting environment in the colon of rats. *Free Radic Biol Med*, 83, 192-200.
- Harvey M, Cave G, Chanwai G, 2010. Fatal methaemoglobinaemia induced by self-poisoning with sodium nitrite. *Emerg Med Australas*, 22, 463–465.

Hemeryck LY, Rombouts C, De Paepe E, Vanhaecke L, 2018. DNA adduct profiling of in vitro colonic meat digests to map red vs. white meat genotoxicity. *Food Chem Toxicol*, 115, 73-87.

Hemeryck LY, Van Hecke T, Vossen E, De Smet S, Vanhaecke L, 2017. DNA adductomics to study the genotoxic effects of red meat consumption with and without added animal fat in rats. *Food Chem*, 230, 378-387.

Hughes R, Cross AJ, Pollock JR, Bingham S, 2001. Dose-dependent effect of dietary meat on endogenous colonic N-nitrosation. *Carcinogenesis*, 22, 199-202.

Hohensinn B, Haselgrübler R, Müller U, Stadlbauer V, Lanzerstorfer P, Lirk G, Höglinger O, Weghuber J, 2016. Sustaining elevated levels of nitrite in the oral cavity through consumption of nitrate-rich beetroot juice in young healthy adults reduces salivary pH. *Nitric Oxide*, 60, 10–15.

Hunault CC, van Velzen AG, Sips AJ, Schothorst RC, Meulenbelt J, 2009. Bioavailability of sodium nitrite from an aqueous solution in healthy adults. *Toxicol Letters*, 190, 48–53.

JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), 2003. Nitrite (and potential endogenous formation of N-nitroso compounds). WHO Food Additives Series, No. 50

Jin L, Qin L, Xia D, Liu X, Fan Z, Zhang C, Gu L, He J, Ambudkar I, Deng D, Wang S, 2013. Active secretion and protective effect of salivary nitrate against stress in human volunteers and rats. *Free Radic Biol Med*, 57, 61–67.

Kobayashi J. 2018. Effect of diet and gut environment on the gastrointestinal formation of N-nitroso compounds: A review. *Nitric Oxide*, 73, 66-73.

Kortboyer JM, Olling M, Zeilmaker MJ, Slob W, Boink ABTJ, Schothorst RC, 1997. The oral bioavailability of sodium nitrite investigated in healthy adult volunteers. Report No. 235802007 from the National Institute of Public Health and Environment (RIVM), Bilthoven, The Netherlands.

Kruger C, Zhou Y. 2018, Red meat and colon cancer: A review of mechanistic evidence for heme in the context of risk assessment methodology. *Food Chem Toxicol*, 118, 131-153.

Lewin MH, Bailey N, Bandaletova T, Bowman R, Cross AJ, Pollock J, Shuker DE, Bingham SA, 2006. Red meat enhances the colonic formation of the DNA adduct O6-carboxymethyl guanine: implications for colorectal cancer risk. *Cancer Res*, 66, 1859-1865.

Lunn JC, Kuhnle G, Mai V, Frankenfeld C, Shuker DE, Glen RC, Goodman JM, Pollock JR, Bingham SA, 2007. The effect of haem in red and processed meat on the endogenous formation of N-nitroso compounds in the upper gastrointestinal tract. *Carcinogenesis*, 28, 685-90.

Joosen AM, Kuhnle GG, Aspinall SM, Barrow TM, Lecommandeur E, Azqueta A, Collins AR, Bingham SA, 2009. Effect of processed and red meat on endogenous nitrosation and DNA damage. *Carcinogenesis*, 30, 1402-1407.

- Maekawa A, Ogiu T, Onodera H, Furuta K, Matsuoka C and Ohno Y, 1982. Carcinogenicity studies of sodium nitrite and sodium nitrate in F-344 rats. *Food Chem Toxicol*, 20, 25–33.
- Martin O, 2015. Promotion de la cancérogenèse colorectale par le fer héminique des viandes : prévention nutritionnelle, rôle du microbiote et de l'inflammation. <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00003002/01/martin.pdf>
- Martin OCB, Naud N, Taché S, Debrauwer L, Chevolleau S, Dupuy J, Chantelauze C, Durand D, Pujos-Guillot E, Blas-Y-Estrada F, Urbano C, Kuhnle GGC, Santé-Lhoutellier V, Sayd T, Viala D, Blot A, Meunier N, Schlich P, Attaix D, Guéraud F, Scislawski V, Corpet DE, Pierre FHF, 2018. Targeting Colon Luminal Lipid Peroxidation Limits Colon Carcinogenesis Associated with Red Meat Consumption. *Cancer Prev Res (Phila)*, 11, 569-580.
- Mensinga TT, Speijers GJA, Meulenbelt J, 2003. Health implications of exposure to environmental nitrogenous compounds. *Toxicol Rev*, 22, 41–51.
- Montenegro MF, Sundqvist ML, Nihlén C, Hezel M, Carlström M, Weitzberg E, Lundberg JO, 2016. Profound differences between humans and rodents in the ability to concentrate salivary nitrate: implications for translational research. *Redox Biol*, 10, 206–210.
- Mukhopadhyay S, Ghosh D, Chatterjee A, Sinha S, Tripathy S and Chandra AK, 2005. Evaluation of possible goitrogenic and anti-thyroidal effect of nitrate, a potential environmental pollutant. *Indian J Physiol Pharmacol*, 49, 284–288.
- NTP (National Toxicology Program), 1990. Final report on the reproductive toxicity of sodium nitrite (CAS NO.7632-00-0) in CD-1-Swiss mice.
- NTP (National Toxicology Program), 2001. NTP Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of Sodium Nitrite (CAS No. 7632-00-0) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (drinking water studies).
- Okazaki K, Ishii Y, Kitamura Y, Maruyama S, Umemura T, Miyauchi M and Nakazawa H, 2006. Dose-dependent promotion of rat forestomach carcinogenesis by combined treatment with sodium nitrite and ascorbic acid after initiation with N-methyl-N0-nitro-N-nitrosoguanidine: possible contribution of nitric oxide-associated oxidative DNA damage. *Cancer Sci*, 97, 175–182.
- Parnaud G, Peiffer G, Taché, Corpet DE. 1998. Effect of meat (beef, chicken, and bacon) on rat colon carcinogenesis. *Nutr Cancer*, 32, 165-173.
- Parnaud G, Pignatelli B, Peiffer G, Taché S, Corpet D, 2000. Endogenous N-nitroso compounds, and their precursors, present in bacon, do not initiate or promote aberrant crypt foci in the colon of rats. *Nutr Cancer*, 38, 74-80.
- Perrin A, 2018, La Toxine Botulique : d'un agent infectieux mortel vers une utilisation pharmacologique, Thèse Faculté de Pharmacie, Lille, 118 pages.
- Pierre F, Santarelli R, Taché S, Guéraud F, Corpet DE, 2008. Beef meat promotion of dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis biomarkers is suppressed by dietary calcium. *Br J Nutr*, 99, 1000-1006.

- Pierre F. 2016 Produits carnés et risque de cancer : rôle du fer héminique et de la peroxydation lipidique, *Viandes & Produits carnés*, 32, 4-5.
- Pierre F, 2019. Consommation de charcuteries et risque de cancer colorectal : état des lieux et définition d'une prévention nutritionnelle. *Cahiers Nutr Diet*, 54, 5541-5547.
- Tomoyasu T, Hirotaka S, Fumiyo T, Yuya D, Shuichi M, Naohide K, 2010. Induction effect of coadministration of soybean isoflavones and sodium nitrite on DNA damage in mouse stomach. *Food Chem Toxicol*, 48, 2585–2591.
- SCF (Scientific Committee for Food), 1992. Food – science and techniques. Reports of the Scientific Committee for Food (Twenty-sixth series). Nitrates and nitrites (opinion expressed on 19th October 1990).
- Santarelli RL, Vendeuvre JL, Naud N, Taché S, Guéraud F, Viau M, Genot C, Corpet DE, Pierre FH, 2010. Meat processing and colon carcinogenesis: cooked, nitrite-treated, and oxidized high-heme cured meat promotes mucin-depleted foci in rats. *Cancer Prev Res (Phila)*, 3, 852-64.
- Santarelli RL, Naud N, Taché S, Guéraud F, Vendeuvre JL, Zhou L, Anwar M, Mirvish M, Corpet D, Pierre F, 2013. Calcium inhibits promotion by hot dog of 1,2-dimethylhydrazine-induced mucin depleted foci in rat colon. *Int J Cancer*, 133, 2533-2544.
- Seiwert N, Heylmann D, Hasselwander S, Fahrer J, 2020. Mechanism of colorectal carcinogenesis triggered by heme iron from red meat. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 1873, 188334.
- Shahidi F, Pegg RB, Sen NP, 1994. Absence of volatile N-nitrosamines in cooked nitrite-free cured muscle foods. *Meat Sci*, 37, 327–336.
- Shapiro KB, Hotchkiss JH, Roe DA, 1991. Quantitative relationship between oral nitrate-reducing activity and the endogenous formation of N-nitrosoamino acids in humans. *Food Chem Toxicol*, 29, 751–755.
- Song M, Chan AT, Sun J, 2020. Influence of the gut microbiome, diet, and environment on risk of colorectal cancer. *Gastroenterology*, 158, 322-340.
- Spiegelhalter B, Eisenbrand G, Preussmann R, 1976. Influence of dietary nitrate on nitrite content of human saliva: possible relevance to in vivo formation of N-nitroso compounds. *Food Cosmet Toxicol*, 14, 545–548.
- Surya R, Héliès-Toussaint C, Martin OC, Gauthier T, Guéraud F, Taché S, Naud N, Jouanin I, Chantelauze C, Durand D, Joly C, Pujos-Guillot E, Pierre FH, Huc L, 2016. Red meat and colorectal cancer: Nrf2-dependent antioxidant response contributes to the resistance of preneoplastic colon cells to fecal water of hemoglobin- and beef-fed rats. *Carcinogenesis*, 37, 635-645.
- Van den Bussche J, Hemeryck LY, Van Hecke T, Kuhnle GG, Pasmans F, Moore SA, Van de Wiele T, De Smet S, Vanhaecke L, 2014. O⁶-carboxymethylguanine DNA adduct formation

and lipid peroxidation upon in vitro gastrointestinal digestion of haem-rich meat. *Mol Nutr Food Res*, 58, 1883-96.

Van Hecke T, Vossen E, Hemeryck LY, Vanden Bussche J, Vanhaecke L, De Smet S, 2015. Increased oxidative and nitrosative reactions during digestion could contribute to the association between well-done red meat consumption and colorectal cancer. *Food Chem*, 187, 29-36.

Van Hecke T, Vossen E, Vanden Bussche J, Raes K, Vanhaecke L, De Smet S, 2014. Fat content and nitrite-curing influence the formation of oxidation products and NOC-specific DNA adducts during in vitro digestion of meat. *PLoS One*, 9, e101122.

Wagner DA, Schultz DS, Deen WM, Young VR, Tannenbaum SR, 1983. Metabolic fate of an oral dose of 15N-labeled nitrate in humans: effect of diet supplementation with ascorbic acid. *Cancer Res*, 43, 1921–1925.

Witter JP and Balish E, 1979. Distribution and metabolism of ingested NO₃ and NO₂ in germ free and conventional-flora rats. *Appl. Environ. Microbiol*, 38, 861–869.

Woessner M, Smoliga JM, Tarzia B, Stabler T, Van Bruggen M, Allen JD, 2016. A stepwise reduction in plasma and salivary nitrite with increasing strengths of mouthwash following a dietary nitrate load. *Nitric Oxide*, 54, 1–7.

Zaki A, Ait Chaoui A, Talibi A, Derouiche AF, Aboussaouira T, Zarrouck K, Chait A and Himmi T, 2004. Impact of nitrate intake in drinking water on the thyroid gland activity in male rat. *Toxicol Letters*, 147, 27–33.

DONNEES D'EXPOLOGIE

ANSES, 2011. Étude de l'alimentation totale française 2 (EAT 2), Tome 2, Résidus de pesticides, additifs, acrylamide, hydrocarbures aromatiques polycycliques, pp 190-191. <https://www.anses.fr/fr/content/etude-de-l%E2%80%99alimentation-totale-eat-2-l%E2%80%99anses-met-%C3%A0-disposition-les-donn%C3%A9es-de-son-analyse>

Campillo N, Viñas 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. *J Chromatog A*, 1218, 1815–1821.

Herrmann SS, Duedahl-Olesen L and Granby K, 2015a. Occurrence of volatile and non-volatile N-nitrosamines in processed meat products and the role of heat treatment. *Food Control*, 48, 163–169.

Herrmann SS, Duedahl-Olesen L, Christensen T, Olesen PT and Granby K, 2015b. Dietary exposure to volatile and non-volatile N-nitrosamines from processed meat products in Denmark. *Food and Chemical Toxicology*, 80, 137–143.

Herrmann SS, Granby K and Duedahl-Olesen L, 2015c. Formation and mitigation of N-nitrosamines in nitrite preserved cooked sausages. *Food Chemistry*, 174, 516–526.

Leblanc JC, Tard A, Volatier JL, Verger P. 2005. Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from the first French Total Diet Study. *Food Addit Contam*, 22, 652-672.

Reink M, 2007. Nitrates, nitrites, N-nitrosamines and polycyclic aromatic hydrocarbons in food: analytical methods, occurrence and dietary intake. *Dissertationes chimicae universitatis tartuensis*, 172 pages.

DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES

Bastide N, Morois S, Cadeau C, Kangas S, Serafini M, Gusto G, Dossus L, Pierre FH, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, 2016. Heme iron intake, dietary antioxidant capacity, and risk of colorectal adenomas in a large cohort study of French women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 25, 640-647.

Boutten B, Guillard AS, Grondin C, Petit S, 2006. La fabrication du jambon cuit supérieur comme modèle pour étudier l'impact des procédés sur les caractéristiques nutritionnelles des aliments, *Bulletin du CTSCCV*, 15, 3-8.

Bradbury KE, Murphy N, Key TJ, 2020. Diet and colorectal cancer in UK Biobank: a prospective study. *Int J Epidemiol*, 246-258.

Cross AJ, Ferrucci LM, Risch A, Graubard BI, Ward MH, Park Y, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Sinha R, 2010. A large prospective study of meat consumption and colorectal cancer risk: an investigation of potential mechanisms underlying this association. *Cancer Res*, 70, 2406-2414.

Crowe W, Elliott CT, Green B D, 2019. A review of the in vivo evidence investigating the role of nitrite exposure from processed meat consumption in the development of colorectal cancer. *Nutrients*, 11, 2673-2690.

Dales LG, Friedman GD, Ury HK, Grossman S, Williams SR, **1979**. A case-control study of relationships of diet and other traits to colorectal cancer in American blacks. *Am J Epidemiol*, 109, 132-144.

DellaValle CT, Xiao Q, Yang G, Shu XO, Aschebrook-Kilfoy B, Zheng W, Lan Li H, Ji BT, Rothman N, Chow WH, Gao YT, Ward MH, 2014. Dietary nitrate and nitrite intake and risk of colorectal cancer in the Shanghai women's health study. *Int J Cancer*, 134, 2917-2926.

EFSA ANS Panel, 2017, Scientific Opinion on the re-evaluation of potassium nitrite (E 249) and sodium nitrite (E 250) as food additives. *EFSA Journal*, 15, 4786, 157 pp.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4786>

English DR, MacInnis RJ, Hodge AM, Hopper JL, Haydon AM, Giles GG, 2004, Red meat, chicken and fish consumption and risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*, 13, 1509-1514.

Ferrucci LM, Sinha R, Huang WY, Berndt SI, Katki HA, Schoen RE, Hayes RB, Cross AJ, 2012. Meat consumption and the risk of incident distal colon and rectal adenoma. *Br J Cancer*, 106, 608-616.

Howe GR, Harrison I, Jain M, 1986. A short diet history for assessing dietary exposure to N-nitrosamines in epidemiology studies. *Am J Epidemiol*, 124, 595-602.

IARC (Centre International de Recherches sur le Cancer), 2007. Smokeless tobacco and some tobacco-specific N-Nitrosamines. IARC Monographs on The Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 89, 641 pp.

IARC (Centre International de Recherches sur le Cancer), 2015, Read meat and processed meat, IARC monographs nn°114, 503 pp.

Kaaks R and Riboli E, 1997. Validation and calibration of dietary intake measurement in the EPICproject : methodological consideration. *Int J Epidemiol*, 26, suppl. 1, S15-S25.

Knekt P, Järvinen R, Dich J, Hakulinen T, 1999. Risk of colorectal and other gastro-intestinal cancers after exposure to nitrate, nitrite and nitroso compounds: a follow-up study, *Int J Cancer*, 80, 852-856.

Knuppel A, Papier K, Fensom GK, Appleby PN, Schmidt JA, Tong TYN, Travis RC, Key TJ, Perez-Cornago A, 2020. Meat intake and cancer risk: prospective analysis in UK Biobank. *Int J Epidemiol*, Aug 20:dyaa142.

Kohler F, 2013. Statistiques et essais cliniques. *Hegel*, 3, 21-26.

Le Borgne F, 2019. Odds ratio, hazard ratio et risque relatif : quelle différence ? *Actualités et blog du LabCom (Université de Nantes)*, Articles de blog, 1-3.

Mazuet C, Jourdan Da Silva N, Legeay C, Sautereau J, Popoff MR, 2018. Le botulisme humain en France, 2013-2016. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, 2018, 46-54.

Mehta SS, Arroyave WD, Lunn RM, Park YM, Boyd WA, Sandler DP, 2020. A prospective analysis of red and processed meat consumption and risk of colorectal cancer in women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 29,141-150.

Miller PE, Lazarus P, Lesko SM, Cross AJ, Sinha R, Laio J, Zhu J, Harper G, Muscat JE, Hartman TJ, 2013. Meat-related compounds and colorectal cancer risk by anatomical subsite. *Nutr Cancer*, 65, 202-226.

Norat T, Bingham S, Ferrari P, Slimani N, Jenab M, Mazuir M, Overvad K, Olsen A, Tjønneland A, Clavel F, Boutron-Ruault MC, Kesse E, Boeing H, Bergmann MM, Nieters A, Linseisen J, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Tountas Y, Berrino F, Palli D, Panico S, Tumino R, Vineis P, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Engeset D, Lund E, Skeie G, Ardanaz E, González C, Navarro C, Quirós JR, Sanchez MJ, Berglund G, Mattisson I, Hallmans G, Palmqvist R, Day NE, Khaw KT, Key TJ, San Joaquin M, Hémon B, Saracci R, Kaaks R, Riboli E, 2005. Meat, fish, and colorectal cancer risk: The European prospective investigation into cancer and nutrition. *J Natl Cancer Inst*, 97, 906-916.

Rasetti-Escargueil C, Lemichez E, Popo M, 2020. Human botulism in France, 1875–2016. *Toxins (Basel)*, 12, 338.

Sinha R, Cross A, Curtin J, Zimmerman T, McNutt S, Risch A, Holden J, 2005, Development of a food frequency questionnaire module and databases for compounds in cooked and processed meats. *Mol Nutr Food Res*, 49, 648-655.

Ward MH, Cross AJ, Divan H, Kulldorff M, Nowell-Kadlubar S, Kadlubar FF, Sinha R, 2007. Processed meat intake, CYT2A6 activity and risk of colorectal adenoma. *Carcinogenesis*, 28, 1210-1216.

Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE, 1990. Relation of meat, fat and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Engl J Med*, 323, 1664-1672.

Zhu Y, Wang PP, Zhao J, Green R, Sun Z, Roebathan B, Squires J, Buehler S, Dicks E, Zhao J, Cotterchio M, Campbell PT, Jain M, Parfrey PS, McLaughlin JR, 2014. Dietary N-nitroso compounds and risk of colorectal cancer a case control study in Newfoundland and Labrador and Ontario, Canada. *Br J Nutr*, 111, 1109-1117.

Wu K, Giovannucci E, Byrne C, Platz EA, Fuchs C, Willett WC, Sinha R, 2006. Meat mutagens and risk of distal colon adenoma in a cohort of U.S. men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15, 1120-1125.

DONNÉES SUR LES EFFETS BÉNÉFIQUES

Archer DL, 2002. Evidence that ingested nitrate and nitrite are beneficial to health. *J Food Prot*, 65, 872-875.

Bourre JM, Buson C, L'Hirondel JL, 2011. Nitrates, nitrites, oxyde nitrique (NO) : nouvelles perspectives pour la santé. *Med Nutr*, 47, 43-50.

Bryan NS, Calvert JW, Elrod JW, Gundewar S, Yong Ji S, Lefer DJ, 2007. Dietary nitrite supplementation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104, 19144-19149.

Bryan NS, Ivy JL, 2015. Inorganic nitrite and nitrate: evidence to support consideration as dietary nutrients. *Nutr Res*, 35, 643-654.

Carlström M, Lundberg JO, Weitzberg E, 2018. Mechanism underlying blood pressure reduction by dietary inorganic nitrate. *Acta Physiol (Oxf)*, 224:e13080.

Dinh-Xuan AT, 1998. Nobel 1998 : la part belle au NO. *Med Sci* 14, 1297-1300.

Hord NG, Tang Y, Bryan N, 2009. Food sources of nitrates and nitrites: the physiological context for potential health benefits. *Am J Clin Nutr*, 90, 1-10.

Kapil V, Khambata RS, Jones DA, Rathod K, Primus C, Massimo G, Fukuto JM, Ahluwalia A, 2020. The noncanonical pathway for in vivo nitric oxide generation: the nitrate-nitrite nitric oxide pathway. *Pharmacol Rev*, 72, 692-766.

Katan MB, 2009. Nitrate in foods: harmful or healthy? *Am J Clin Nutr*, 90, 1-2.

L'Hirondel J, 1993. Le métabolisme des nitrates et des nitrites chez l'homme. Cah Nutr Diétét, 28, 341-349.

Lundberg JO, Carlström M, Weitzberg E, 2018. Metabolic effects of dietary nitrate in health and disease. Cell Metab, 28, 9-22.

Martin O, 2015. Promotion de la cancérogenèse colorectale par le fer héminique des viandes : prévention nutritionnelle, rôle du microbiote et de l'inflammation. <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00003002/01/martin.pdf>

Mendy A, 2018. Association of urinary nitrate with lower prevalence of hypertension and stroke and with reduced risk of cardiovascular mortality. Circulation, 137, 2295-2297.