

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ BADJI MOKHTAR – جامعة باجي مختار

ANNABA عنابة



FACULTÉ DES SCIENCES
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE DE TOXICOLOGIE CELLULAIRE

Thèse En vue de l'obtention d'un Diplôme de Doctorat

Domaine : SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie Animale

Intitulé

**Impact toxique d'additifs alimentaires (nanoparticules)
utilisés par l'industrie agro-alimentaires sur plusieurs
modèles biologiques.**

Présentée par : **CHERNINE Saoussene**

Directrice de thèse : Pr. BENSOLTANE-DJEKOUN Samira

(Université Badji Mokhtar – Annaba)

Devant un jury composé de :

Pr. Houria BERREBAH-DJEBAR	Présidente	Université Badji-Mokhtar Annaba
Pr. Leila KIRANE-AMRANI	Examinatrice	Université Badji-Mokhtar Annaba
Pr. Radia DJELLOUL	Examinatrice	Université Chadli Bendjedid El Tarf
Pr. Lynda SOUIKI-SOUMATI	Examinatrice	Université du 08 mai 1945 Guelma
Dr. Yassine GUEROUI	Examineur	Université du 08 mai 1945 Guelma

Année universitaire : 2023/2024

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ BADJI MOKHTAR – جامعة باجي مختار

ANNABA عنابة



FACULTÉ DES SCIENCES
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE DE TOXICOLOGIE CELLULAIRE

Thèse En vue de l'obtention d'un Diplôme de Doctorat

Domaine : SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie Animale

Intitulé

**Impact toxique d'additifs alimentaires (nanoparticules)
utilisés par l'industrie agro-alimentaires sur plusieurs
modèles biologiques.**

Présentée par : **CHERNINE Saoussene**

Directrice de thèse : Pr. BENSOLTANE-DJEKOUN Samira

(Université Badji Mokhtar – Annaba)

Devant un jury composé de :

Pr. Houria BERREBAH-DJEBAR	Présidente	Université Badji-Mokhtar Annaba
Pr. Leila KIRANE-AMRANI	Examinatrice	Université Badji-Mokhtar Annaba
Pr. Radia DJELLOUL	Examinatrice	Université Chadli Bendjedid El Tarf
Pr. Lynda SOUIKI-SOUMATI	Examinatrice	Université du 08 mai 1945 Guelma
Dr. Yassine GUEROUI	Examineur	Université du 08 mai 1945 Guelma

Année universitaire : 2023/2024

TABLE DES MATIERES

Remerciements

Dédicaces

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

ملخص

Abstract

Résumé

Introduction générale 1

CHAPITRE 1: ÉTAT DE L'ART

1. Additifs alimentaires	5
1.1. Définition.....	5
1.2. Origine.....	6
1.2.1. Additifs naturels	6
1.2.2. Additifs issus de la transformation des substances naturelles.....	6
1.2.3. Additifs de synthèse	6
1.3. Classification	7
1.3.1. Classification algérienne	7
1.3.2. Classification européenne	8
1.4. Codification.....	9
1.5. Encadrement réglementaire	10
1.5.1. Réglementation algérienne.....	10
1.5.2. Réglementation européenne	11
1.6. Toxicité et impact sur la santé des consommateurs.....	11
2. Nanoparticules dans l'industrie agroalimentaire	12
2.1. Nano-additifs alimentaires.....	12
2.2. Nanoparticules dans les emballages alimentaires.....	13
2.3. Toxicité des nanoparticules pour l'Homme	13
2.3.1. Mécanismes d'action des nanoparticules	13
2.3.2. Toxicocinétique des nanoparticules après administration par voie orale.....	15
2.3.3. Paramètres influençant la toxicité	17
2.4. Impact toxicologique de quelques nanoparticules sur la santé.....	17
2.4.1. Dioxyde de titane	18
2.4.2. Dioxyde de silicium	20
2.4.3. Argent.....	20

3. Interactions Nano-additifs alimentaires – Bactéries	22
3.1. Bactéries de la cavité bucco-dentaire	22
3.2. Bactéries de la flore intestinale.....	25
3.3. Caractérisation de la toxicité de quelques nanoparticules sur les bactéries de l’Homme	26
3.3.1. Interaction NPs TiO ₂ – Bactéries	26
3.3.2. Interaction Nps Ag – Bactéries	27

CHAPITRE 2: ENQUÊTE SUR LES ADDITIFS ALIMENTAIRES

1. Déroulement de l’enquête	29
1.1. Choix des sites et durée de l’enquête	29
1.2. Protocole.....	29
2. Résultats	30
2.1. En fonction des catégories.....	31
2.2. Classification des additifs en fonction de leur toxicité.....	50
3. Discussion	55
4. Conclusion	70

CHAPITRE 3: EFFET DES NANOPARTICULES SUR LES BACTÉRIES

1. Matériel et méthodes	74
1.1. Matériel biologique	74
1.1.1. Genre <i>Staphylococcus</i> / ATCC25923	74
1.1.2. Genre <i>Streptococcus</i> / ATCC ^R 22	75
1.1.3. Genre <i>Escherichia</i> / ATCC25922	76
1.2. Matériel chimique.....	78
1.3. Echantillonnage	78
1.3.1. Cavité bucco-dentaire.....	78
1.3.2. Tube digestif.....	79
1.4. Recherche et identification des souches cliniques.....	79
1.5. Dilution des NPs et ensemencement des souches sur gélose traitée	81
1.5.1. Préparation de la solution mère.....	81
1.5.2. Technique de dilution semi-logarithmique	82
2. Résultats et discussion	84
2.1. Souches d’ <i>E coli</i> , Staphylocoques et Streptocoques sur gélose non traitée aux NPs.....	85
2.2. Souches de Staphylocoques et Streptocoques sur gélose traitée aux NPs TiO ₂	87
2.3. Souches de Staphylocoques et streptocoques sur gélose traitée aux NPs SiO ₂	96
2.4. Etude comparative de la toxicité des NPs TiO ₂ et NPs SiO ₂ sur les bactéries de la cavité bucco-dentaire	100
2.5. Souches <i>E. coli</i> sur gélose non traitée aux NPs Ag.....	102
2.6. Souches <i>E. coli</i> sur Hecktoen traitée aux NPs Ag.....	103
2.7. Effets des deux mixtures de NPs TiO ₂ /Ag et SiO ₂ /Ag sur les bactéries <i>E. coli</i>	117
2.7.1. Observations macroscopique et microscopique d’ <i>E. coli</i> témoins.....	117
2.7.2. Effets des deux mixtures de NPs TiO ₂ /Ag et SiO ₂ /Ag sur <i>E. coli</i> à l’état frais	118

2.7.3. Effets des deux mixtures de NPs TiO ₂ /Ag et SiO ₂ /Ag sur <i>E. coli</i> après coloration de GRAM.....	122
3. Conclusion	126
Conclusion générale et perspectives	127
Références bibliographiques	

Remerciements

Le plus grand merci à Allah, le tout puissant qui a le seul le pouvoir de nous guider durant notre vie et qui m'a permis de voir ce jour tant attendu.

Un grand MERCI à ma directrice de thèse Dr **BENSOLTANE-DJEKOUN Samira**, Professeure à la faculté de médecine de Annaba, qui a accepté de m'encadrer je tiens à la remercier pour sa disponibilité, ses conseils, ses orientations, ses réflexions et surtout sa patience pendant toutes ses années.

C'est avec une profonde sincérité, que j'adresse mes remerciements à la présidente de jury Dr **BERREBBAH Houria**, professeure au Département de Biologie de l'UBMA et Directrice du LTC, qui a accepté de présider ce jury. Vous êtes la maman de tous les enseignants de Toxicologie, merci de m'avoir ouvert les portes du laboratoire, merci pour votre écoute, votre disponibilité et vos conseils.

Mon respect et mes remerciements vont aux membres de jury :

Dr **KIRANE-AMRANI Leila**, professeure au département de Biologie de l'UBMA, qui a accepté de juger ce travail et participer à ce jury. Merci pour l'intérêt et l'attention que vous accordez à ce travail.

Dr **DJELLOUL Radia**, Professeure à l'Université Chadli Bendjedid El Tarf, pour avoir accepté d'évaluer ce travail malgré ses occupations professionnelles.

Dr **SOUIKI Lynda**, Professeure à l'Université du 08 mai 1945 Guelma, pour avoir accepté d'examiner ce travail afin de pouvoir enrichir le débat, merci de m'avoir consacré de votre temps pour examiner le travail.

Dr **GUEROUI Yassine**, M.C.A à l'Université du 08 mai 1945 Guelma, pour l'intérêt que vous avez exprimé pour ce travail et d'avoir accepté de faire partie du jury.

Je serai honorée de votre présence.

Je tiens à remercier l'ex-Directeur du LTC, Professeur **DJEBAR Mohamed Réda**, actuellement Directeur adjoint du CRE de m'avoir intégrée dans le laboratoire, son écoute, ses précieux conseils et pour ses encouragements permanents.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à tous les responsables de notre Université pour leur gentillesse et soutien moral permanent.

Je remercie Dr **ATTIA Yahia**, médecin microbiologiste pour les souches cliniques qui ont fait l'objet de notre étude et ses conseils.

Merci au Professeure **BOUSLAMA Zihed**, Directrice du CRE, de m'a permis de replonger dans le monde moléculaire et faire la formation du dépistage de la Covid-19 en pleine période de pandémie, pour ses encouragements et son soutien.

Dédicaces

A la mémoire de mon cher grand père maternel, mon premier papa, sache que tu es toujours là avec moi, je te sens présent avec moi là où je vais, je te parle tous les jours et je te raconte tout, même si c'est à travers ta photo mais je suis certaine que tu m'écoutes. Ce travail a vu le jour pour que tu sois fier de moi comme tu l'as toujours été, tu m'a quitté trop tôt et ta disparition a laissé et laissera toujours un vide en moi que personne ne peut remplacer.

Ce travail a été réalisé et achevé grâce à la contribution de plusieurs personnes, il serait primordial de ma part de les remercier, de leur exprimer ma gratitude et de le leur dédier:

Mes chers enfants **Aymen** et **Nélia**, je vous dédie ce travail et je vous remercie d'être patients, malgré votre jeune âge, vous avez su gérer la situation et supporter mon absence parfois longue surtout en période de stage, vous avez supporté mes cris et mes colères, vous suivez avec moi l'évolution de mon travail comme des grands. MERCI MES CHERS, maman vous adore ! et j'espère que vous serez fiers de moi !

A mon mari, ma famille et ma belle famille, vous m'avez toujours soutenu et encouragé pour que ce travail puisse enfin voir le jour. Votre soutien moral m'a beaucoup aidé à continuer et aller vers l'avant surtout dans les moments difficiles.

Tous mes amis et collègues d'être toujours présents et disponibles pour moi, je tiens à citer les plus exceptionnels d'entre vous :

Dr **BOUDJELIDA Hamid**, Professeur à l'UBMA et Directeur du laboratoire d'excellence LBAA, pour ses encouragements permanents et d'avoir toujours cru en mes capacités.

Dr **HABBACHI Wafa**, Professeure à l'UBMA, Responsable du domaine SNV, qui malgré ses engagements professionnels, était toujours disponible et à l'écoute et n'hésitait pas à donner ses conseils.

Dr **ZERARI Labiba**, MCB à l'UBMA, une sœur et pas uniquement collègue, toujours disponible pour moi malgré ses charges familiales et professionnelles, merci beaucoup.

Dr **KLECHE Meriem**, MCA à l'UBMA, une deuxième sœur, au secours et dans les moments les plus difficiles elle était toujours présente. Merci meryouma.

Pr **BOUCHEKER Abdennour**, Dr **BRINIS Amir**, Dr **TATA Tahar**, Dr **SLIMANI Abderrachid**, Dr **HASSAINE Amina**, Dr **CHAKER Amina**, Pr **SBARTAI Hana** et Pr **SBARTAI Ibtissem**, Dr **TREA Saliha**, Dr **BOUKHEDIR Sameh**. Merci pour tous vos efforts, vos encouragements et vos sourires !

Enfin, Dr **DJEKOUN Mohamed**, Professeur à l'université du 08 mai 1945 Guelma, j'aurai aimé que vous soyez l'un des membres de jury, j'aurai aimé que vous soyez parmi nous ce jour mais le destin a voulu autrement, je n'oublierai jamais vos conseils judicieux, vous avez toujours pris le temps de suivre l'évolution de mon travail, Rabi yarhmek.

Liste des figures

N°	Titre	Pages
1	Additifs alimentaires	06
2	Mécanismes d'action des nanoparticules (NPs) manufacturées, en particulier métallique	15
3	Schéma des différents environnements et processus physiologique rencontrés par des nanoparticules manufacturées solides au cours de la digestion	16
4	Nanoparticules de dioxyde de titane	19
5	Nanoparticules de dioxyde de silicium	20
6	Nanoparticules d'argent	21
7	Répartition des Streptocoques dans la cavité buccale selon l'espèce	24
8	Répartition des agents de texture dans les laits locaux et importés	32
9	Répartition des colorants dans les yaourts locaux et importés	33
10	Répartition des amidons modifiés dans les yaourts locaux et importés	33
11	Répartition des colorants (A) et conservateurs (B) dans les fromages locaux et importés	34
12	Répartition des acidifiants (A) et fourre-tout (B) dans les fromages locaux et importés	34
13	Répartition des agents de texture dans les fromages locaux et importés	35
14	Répartition des conservateurs (A) et antioxydants (B) dans les beurres et margarines locaux et importés	36
15	Répartition des agents de texture dans les beurres locaux et importés	37
16	Répartition des additifs alimentaires non communs incorporés dans les crèmes fraîches locales et importées	38
17	Répartition des additifs alimentaires non communs (colorants, conservateurs et antioxydants) incorporés dans les gâteaux et biscuits locaux et importés	40
18	Répartition des additifs alimentaires non communs (agents de texture, fourre-tout et amidons modifiés) incorporés dans les gâteaux et biscuits locaux et importés	40

19	Répartition des additifs non communs (colorants, antioxydants et agents de textures) incorporés aux chocolats locaux et importés	41
20	Répartition des additifs non communs (fourre tout, gaz d'emballage, enzyme alimentaires et amidons modifiés) incorporés aux chocolats locaux et importés	41
21	Répartition des colorants non communs incorporés aux bonbons locaux et importés	42
22	Répartition des additifs non communs (antioxydants, acidifiants, agents de texture et fourre tout) incorporés aux bonbons locaux et importés	42
23	Répartition des additifs non communs (agents de texture édulcorants et amidons modifiés) incorporés aux bonbons locaux et importés	43
24	Répartition des additifs non communs incorporés dans les boissons gazeuses locales et importées.	46
25	Répartition des additifs non communs incorporés dans les jus locaux et importés.	47
26	Répartition des additifs non communs (colorants, conservateurs, antioxydants et acidifiants) incorporés dans les conserves d'origine animale locales et importées.	49
27	Répartition des additifs non communs (agents de texture, exhausteurs de goûts et amidons modifiés) incorporés dans les conserves d'origine animale locales et importées	49
28	Répartition des additifs non communs incorporés dans les conserves d'origine végétale locales et importées	50
29	Additifs alimentaires présents dans le lait et ses dérivés en fonction du degré de toxicité	51
30	Additifs alimentaires présents dans les matières grasses en fonction du degré de toxicité	52
31	Additifs alimentaires présents dans les confiseries en fonction du degré de toxicité	53
32	Additifs alimentaires présents dans les boissons en fonction du degré de toxicité	54
33	Additifs alimentaires présents dans les conserves en fonction du degré de toxicité	55

34	Rôles et déséquilibres du microbiote intestinal dans la santé de l'hôte	72
35	Observation microscopique des 3 souches de référence étudiées	74
36	Morphologie de la bactérie <i>Staphylococcus aureus</i>	75
37	Colonisation des sites buccaux par les Streptocoques	76
38	Structure de la bactérie <i>E. coli</i>	77
39	Etapes d'enrichissement	79
40	Préparation des solutions mère	81
41	Dilutions semi-logarithmique des Nps	82
42	Préparation de l'Heckton traité à la mixture de NPs Ag/NPs TiO ₂	83
43	Préparation de solution des NPs utilisées pour l'essai (Mixture AgSiO ₂ et AgTiO ₂)	83
44	Souches cliniques <i>E.coli</i> (a), <i>Staphylococcus aureus</i> (b) et <i>Streptococcus sp.</i> (c)	84
45	Identification biochimique par galerie API20E des souches <i>E. coli</i> cliniques	85
46	Nombre de colonies des souches cliniques et de référence <i>S.aureus</i> en fonction des dilutions de NPs TiO ₂	88
47	Nombre de colonies des souches cliniques et de référence <i>Streptococcus sp.</i> en fonction des dilutions de NPs TiO ₂	88
48	Observation microscopique des <i>Cocci</i> en grappe de raisin GRAM ⁺ à l'objectif x100.	94
49	Coloration de GRAM des souches C et R des dilutions 2 et 10	95
50	Nombre de colonies des souches cliniques et de référence <i>S.aureus</i> en fonction des dilutions de NPs SiO ₂	96
51	Nombre de colonies des souches cliniques et de référence <i>Streptococcus sp.</i> en fonction des dilutions de NPs SiO ₂	97
52	Nombre de colonies des souches cliniques et de référence <i>Escherichia coli.</i> en fonction des dilutions de NPs SiO ₂	105
53	Souche Témoin clinique (a), Souche Témoin de référence (b)	107
54	Coloration de GRAM d' <i>E.coli</i> (Témoin clinique et de référence) à l'objectif (x100).	113
55	Coloration de GRAM d' <i>E.coli</i> de la dilution 3 après traitement avec le NpAg à l'objectif (x100).	113

56	Coloration de GRAM de <i>E.coli</i> de la dilution 4 après traitement avec le NpAg à l'objectif (x100).	113
57	Coloration de GRAM de <i>E.coli</i> de la dilution 5 après traitement avec le NpAg à l'objectif (x100).	114
58	Coloration de GRAM de <i>E.coli</i> de la dilution 9 après traitement avec le NpAg à l'objectif (x100).	114
59	Coloration de GRAM d' <i>E.coli</i> de la dilution 11 après traitement avec le NpAg à l'objectif (x100).	114
60	Coloration de GRAM d' <i>Escherichia coli</i> de la dilution 12 après traitement avec le NpAg à l'objectif (x100).	115
61	Coloration de GRAM d' <i>Escherichia coli</i> de la dilution 13 après traitement avec le NpAg à l'objectif (x100).	115
62	Coloration de GRAM d' <i>Escherichia coli</i> de la dilution 14 après traitement avec le NpAg à l'objectif (x100).	115
63	Observation macroscopique des souches <i>E.coli</i> témoins	117

Liste des tableaux

N°	Titre	Pages
1	Classification des additifs alimentaires selon la réglementation algérienne	08
2	Principales catégories d’additifs utilisés dans l’union européenne	08
3	Localisation et pathologies liées aux bactéries du genre Streptocoque	23
4	Classification, localisation et troubles sanitaires liés aux bactéries du genre Staphylocoque	25
5	Nombre de produits inventoriés locaux et importés en fonction des classes alimentaires	30
6	Additifs alimentaires communs présents dans le lait et ses dérivés	31
7	Pourcentage des additifs alimentaires communs présent dans la matière grasse	36
8	Pourcentage des additifs alimentaires communs présent dans les confiseries	38
9	Répartition des additifs alimentaires communs incorporés dans les boissons locales et importées en fonction de leur catégorie	44
10	Pourcentage des additifs alimentaires communs présents dans les conserves animales et végétales, locales et importées	48
11	Souches cliniques et souches de référence testées	74
12	Classification des <i>Staphylococcus aureus</i>	75
13	Classification d’ <i>Escherichia coli</i>	77
14	Différentes nanoparticules utilisées dans l’étude	78
15	Nombre de colonies des souches de référence et cliniques ensemencées sur gélose non traitée aux NPs	85
16	Aspect macroscopique des colonies des souches de référence et clinique	86
17	Observation microscopique des souches cliniques à l’état frais	87
18	Dénombrement des colonies des souches témoins	87
19	Caractères morphologiques des colonies <i>S. aureus</i> sur gélose traitée aux NPs TiO ₂	89

20	Caractères morphologiques des colonies <i>Streptococcus sp.</i> sur gélose traitée aux NPs TiO ₂	90
21	Description des colonies de <i>S. aureus</i> et <i>Streptococcus sp.</i> à l'état frais	91
22	Etat frais des souches <i>S. aureus</i> (C et R) en fonction des dilutions de NPs TiO ₂	92
23	Etat frais des souches <i>Streptococcus</i> (C et R) en fonction des dilutions de NPs TiO ₂	93
24	Description des colonies du <i>S. aureus</i> et <i>Streptococcus sp.</i> après coloration de GRAM.	93
25	Coloration de GRAM des souches de <i>Streptococcus sp</i> (C et R) dans 2 dilutions.	95
26	Aspect macroscopique des souches <i>S. aureus</i> sur gélose traitée aux NPs SiO ₂	98
27	Aspect macroscopique des souches <i>Streptococcus sp.</i> sur gélose traitée aux NPs SiO ₂	98
28	Etat frais des souches <i>S. aureus</i> (C et R) en fonction des dilutions de NPs SiO ₂	99
29	Etat frais des souches <i>Streptococcus</i> (C et R) en fonction des dilutions de NPs SiO ₂	99
30	Coloration de GRAM des souches de <i>Streptococcus sp.</i>	100
31	Dénombrement des colonies des souches <i>E. coli</i> cliniques et de référence	103
32	Aspect macroscopique des colonies des souches <i>E. coli</i> cliniques et de référence	104
33	Caractère morphologique des souches <i>E. coli</i> à l'état frais et coloration de GRAM	104
34	Dénombrement des colonies des souches <i>E. coli</i> témoins	105
35	Description des colonies des souches <i>E. coli</i> témoins cliniques et de référence	107
36	Caractéristiques macroscopiques des souches <i>E. coli</i> cliniques et de référence	107
37	Etat frais des souches témoins cliniques et de référence	110
38	Etat frais des souches cliniques et de référence	110

39	Caractères cultureux des souches <i>E. coli</i> témoins sur Hektoen	117
40	Observation et caractéristiques microscopiques des souches <i>E. coli</i> témoins	118
41	Résultats de l'état frais des souches <i>E. coli</i> dans les deux mixtures	118
42	Observation microscopique d' <i>E. coli</i> traités aux mixtures de NPs TiO ₂ /Ag et SiO ₂ /Ag	122

Liste des abréviations

AFNOR : Association Française de NORmalisation

AFSSET : Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail

Ag : Argent

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail

ARTAC : Association pour la Recherche Thérapeutique Anti-Cancéreuse

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer

EFSA : Autorité Européenne de Sécurité des Aliments

FAO : (*Food and Agriculture Organization*) : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

FDA : (*Food and Drug Administration*) : Agence Fédérale Américaine des produits alimentaires et médicamenteux

JORA : Journal Officiel de la République Algérienne

NPs : Nanoparticules

SIN : Système International de Numérotation

SiO₂ : Dioxyde de silice

TiO₂ : Dioxyde de Titane

WHO : (*World Health Organization*) : Organisation Mondiale de la Santé

Résumés

ملخص

ركز عدد من الدراسات في السنوات الأخيرة على تأثير الإضافات الغذائية على صحة الإنسان. يشكل الاستخدام السيئ لهذه المركبات الكيميائية في بعض الأحيان مشكلة حقيقية، ولهذا السبب من المهم إجراء دراسات واستطلاعات أخرى لتحديد الخطر الحقيقي لهذه المواد وخليطها أو مزجها مع بعض. للقيام بذلك، قمنا بإجراء دراسة لمدة خمس سنوات في أربع ولايات (الجزائر العاصمة، سطيف، سكيكدة و عنابة) لتحديد وجود الإضافات الغذائية في المنتجات المحلية والمستوردة المطروحة في السوق الجزائرية. خلال هذا المسح، قمنا بتصنيف هذه المواد المضافة المختلفة حسب فئتها (ملونات، مواد حافظة، مواد ذات قوام ومضادات أكسدة وغيرها) ودرجة سميتها (سامة جداً، سامة، سامة بدرجة معتدلة، إلخ) من أجل تحديد العلاقة بين المواد المضافة والمشاكل الصحية. تكشف النتائج التي توصلنا إليها عن وجود إضافات غذائية من جميع الفئات وجميع درجات السمية التي وصفها الدستور الغذائي. توجد هذه الإضافات في جميع المنتجات التي تم جردها، سواء المحلية أو المستوردة، لجميع الأصناف التي تمت دراستها. وبناءً على نتائج المسح، تم اختيار نوعين من البكتيريا من تجويف الفم ونوع من الجهاز الهضمي كنماذج بيولوجية لاختبار سمية ثلاث جسيمات نانوية $NPsTiO_2$ SiO_2 Ag الموجودة في المنتجات المسوقة. تم تسجيل تعديل واضح في الصفات المظهرية للبكتيريا في بكتيريا *E.coli* المزروعة على أجار معالج بخليطين $NPsTiO_2/Ag$ و $NPsSiO_2/Ag$. كما لوحظت تغيرات في النمو والشكل في جميع السلالات المدروسة المزروعة على الأجار المعالج بـ $NPsTiO_2$ ، $NPsSiO_2$ و $NPsAg$ بشكل منفصل. وبالنظر إلى هذه النتائج، نستنتج أنه وبسبب التأثير السمي للجسيمات النانوية الموجودة في الغذاء على البكتيريا المتعايشة، يمكن أن يحدث اختلال في نظام توازن الكائنات الحية الدقيقة المعوية مما يلحق الضرر على صحة المستهلك.

الكلمات المفتاحية : الإضافات الغذائية ، الجسيمات النانوية ، بحث ، تسمم الصحة العمومية.

ABSTRACT

In recent years, several studies have focused on the impact of food additives on human health. Sometimes, the abusive use of these chemical compounds poses a real problem, hence the need for studies and other surveys to determine the real danger of these substances and their mixture. To achieve this, we carried out for five years in four wilayas (Algiers, Sétif, Skikda and Annaba) to record the presence of food additives in local and imported products on the Algerian market. During this survey, we classified these different additives according to their category (Dyes, preservatives, texture agents, antioxidants, etc.) and degree of toxicity (very toxic, toxic, moderately toxic, etc.) to determine the additive-health disorder relationship. Our results reveal the presence of food additives of all categories and all degrees of toxicity described by the *Codex Alimentarius*. These additives are found in all the products inventoried, both local and imported, for all the classes studied. Based on the survey results, two bacteria from the oral cavity and one from the digestive tract were chosen as biological models to test the toxicity of three nanoparticles (NPs TiO₂, SiO₂ and Ag) found in marketed products. Our results show a clear change in the phenotypic character of *E.coli* grown on agar treated with two mixtures, NPsTiO₂/Ag and NPsSiO₂/Ag. Changes in growth and shape were also observed in all strains studied grown on agar plates treated with NPsTiO₂, NPsSiO₂ and NPsAg separately. These results suggest a potential dysbiosis in consumers.

Mots clés : food additives, nanoparticles, survey, toxicity, public health.

RESUME

Ces dernières années, plusieurs études focalisent sur l'impact des additifs alimentaires sur la santé humaine. Ainsi, l'utilisation parfois abusive de ces composés chimiques pose un véritable problème d'où l'intérêt de mener des études et autres enquêtes en vue de rendre compte du danger réel de ces substances et de leur mixture. Pour cela, nous avons effectué durant cinq années et ce dans quatre wilayas (Alger, Sétif, Skikda et Annaba) afin de répertorier la présence d'additifs alimentaires dans les produits locaux et importés mis sur le marché algérien. Durant cette enquête, nous avons été amenés à classer ces différents additifs selon leur catégorie (colorants, conservateurs, agents de texture, antioxydants...etc) et par degré de toxicité (très toxique, toxique, modérément...etc) pour déterminer la relation additifs-troubles de santé. Nos résultats révèlent la présence des additifs alimentaires de toutes les catégories et de tous les degrés de toxicité décrit par le *Codex Alimentarius*, ces additifs sont retrouvés dans tous les produits inventoriés locaux et importés et ce pour toutes les classes étudiées. En se basant sur les résultats de l'enquête, deux bactéries de la cavité bucco-dentaire et une du tube digestif sont choisies comme modèles biologiques, afin de tester la toxicité de trois nanoparticules NPs (TiO_2 , SiO_2 et Ag) retrouvés dans les produits commercialisés. Nos résultats mettent en évidence, une nette modification dans le caractère phénotypique chez *E.coli* cultivée sur une gélose traitée avec deux mixtures $\text{NPsTiO}_2/\text{Ag}$ et $\text{NPsSiO}_2/\text{Ag}$. Des changements dans la croissance et la forme sont également observées chez toutes les souches étudiées cultivées sur des géloses traitées avec des NPsTiO_2 , NPsSiO_2 et NPsAg séparément. Ces résultats laissent suggérer une dysbiose potentielle chez les consommateurs.

Mots clés : Additifs alimentaires, nanoparticules, enquête, toxicité, santé publique.

Introduction générale

Les aliments sont des composés organiques de sources animales et végétales considérés comme l'une des principales exigences pour la survie de l'homme. Souvent, ces aliments nécessitent des traitements et des transformations technologiques (Reynal, 2009 ; Diogo *et al.*, 2013 ; ANSES, 2019). L'additif est défini comme toute substance chimique (non nutritive, nutritive, fabriquée par synthèse, ou isolée par extraction) dont l'apport dans l'alimentation ne peut et ne doit être qu'exceptionnel sous l'emprise de nécessité et sous réserve d'une autorisation administrative prise sur avis des assemblées d'Hygiène et de Médecine, dans les conditions fixées par ladite autorisation (Bourrier, 2006 ; Gouget, 2015).

D'après l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) *'un additif alimentaire est défini comme une substance dotée ou non d'une valeur nutritionnelle, ajoutée intentionnellement à un aliment dans un but technologique, sanitaire, organoleptique ou nutritionnel. Son emploi doit améliorer les qualités du produit fini sans présenter de danger pour la santé, aux doses utilisées'* (AFSSA, 2009 ; EFSA, 2017 ; ANSES, 2019).

Le *Codex Alimentarius* (2016) définit un additif alimentaire comme étant *'toute substance qui n'est pas normalement consommée en tant que denrée alimentaire, ni utilisée normalement comme ingrédient caractéristique d'une denrée alimentaire, qu'elle ait ou non une valeur nutritive, et dont l'addition intentionnelle à une denrée alimentaire dans un but technologique (y compris organoleptique) à une étape quelconque de la fabrication, de la transformation, de la préparation, du traitement, du conditionnement, de l'emballage, du transport ou de l'entreposage de ladite denrée entraîne, ou peut, selon toute vraisemblance, entraîner (directement ou indirectement) son incorporation ou celle de ses dérivés dans cette denrée ou en affecter d'une autre façon les caractéristiques. Cette expression ne s'applique ni aux contaminants, ni aux substances ajoutées aux denrées alimentaires pour en préserver ou en améliorer les propriétés nutritionnelles'*.

En Algérie, c'est le ministère du commerce qui est en charge de réglementer, l'ajout ou le retrait d'un additif alimentaire, sa dose, sa nomenclature...etc. ceci sera consigné en des lois notifiées dans le Journal Officiel de la République Algérienne (JORA). La réglementation en vigueur traite tous les additifs regroupés. Cette réglementation est sous formes de décrets et d'articles publiés dans le JORA. La définition des additifs, les conditions de leurs emplois,

leurs spécifications d'identités et de puretés ainsi que leurs étiquetages figurent dans le **décret exécutif numéro 92-25 du 13 janvier 1992** relatif aux conditions et aux modalités d'utilisation des additifs dans les denrées alimentaires ainsi que dans le journal officiel numéro 30 du 16 mai 2012. Il existe un certain vide juridique en ce qui concerne la législation spécifique régissant les colorants alimentaires. Selon l'article 4 du Décret exécutif n° 92-25 du 13 janvier 1992 relatif aux conditions et aux modalités d'utilisation des additifs dans les denrées alimentaires mis en annexe A, l'additif alimentaire ne peut être employé que s'il répond aux tests d'évaluations toxicologiques appropriés, or ces derniers ne sont spécifiés nulle part dans ce décret (**JORA, 2012**).

Le développement et les progrès enregistrés dans le domaine des industries agroalimentaires et les technologies agroalimentaires vers le 20^{ème} siècle ont eu un impact positif sur l'augmentation de l'utilisation des additifs alimentaires (**Pandey et Upadhyay, 2012 ; Silva et Lidon 2016 ; Dey et Nabagatu, 2022**). De plus, le succès économique de ces composés a encouragé d'avantage l'avènement des nouvelles technologies agroalimentaires, notamment l'utilisation des additifs sous forme de nanoparticule (**Reynal et al., 2009 ; Marano, 2016**). Malgré tous les avantages et apports bénéfiques, il existe un danger lié à ces composés et aux métabolites de leur dégradation (**Becker et al., 2009 ; Bouvier, 2017 ; Dutau et Lavaud, 2018 ; Gaouar, 2022**).

Ainsi, il est important de règlementer l'utilisation de ces composés dans les aliments. Ainsi, les industriels doivent veiller à respecter les seuils et les LMR d'utilisation des additifs alimentaires fixés par les organismes nationaux et internationaux pour s'assurer que la prise d'un même additif à partir de différentes sources alimentaires par un même individu ne dépasse pas sa dose journalière admissible (**OMS, 2023**).

Afin d'estimer la toxicité éventuelle des additifs alimentaires sur l'homme, la détermination de leur « DL50 » est effectuée et ce afin de définir la DJA (**Ben Marzouq, 2017**). Comme toute substance alimentaire, les additifs vont se retrouver dans le tractus gastro-intestinal ou ils vont subir l'action des sucs digestifs et de la flore intestinale. Ils vont être absorbés selon leurs propriétés Physico-chimiques (hydro/liposoluble, taille de la molécule). Les additifs alimentaires hydrosolubles sont éliminés sans être dégradés. Théoriquement, la polarité des molécules est un facteur-clé du passage entérocytaire, les composés très polaires ne sont donc que très peu absorbés (**Marano, 2013 ; Marano et Guadagnini, 2016**).

La toxicité des additifs s'exprime à partir d'une certaine quantité ingérée ou accumulée (toxicité aiguë ou à long terme). C'est pourquoi il est utile de déterminer une teneur limite en agents chimiques (additifs) dans les produits alimentaires. Le concept de la DJA a été créé à cet effet.

De plus, les additifs alimentaires, et plus particulièrement, les colorants constituent la principale cause des réactions d'intolérance (**Macioszek et Kononowicz, 2004 ; Mansour et Tlemcni, 2009**). Les symptômes rapportés sont : des réactions d'intolérance alimentaire se manifestent sur la peau et dans le tractus gastro-intestinal, les voies respiratoires et le système nerveux central (**Bourrier, 2006 ; Marano, 2013 ; Fernández-Bertólez et al., 2018**) ainsi que le système urinaire (**Saidani, 2013**). D'autres symptômes associés aux intolérances aux aliments et aux additifs alimentaires sont rapportés et comprennent le syndrome du côlon irritable, les céphalées, la migraine, la fatigue, les troubles comportementaux, l'asthme et l'urticaire (**Hayder et al., 2011 ; Linke et al., 2018**), ainsi que l'hyperactivité dans le comportement des enfants (**McCann et al., 2007 ; Diezi et al., 2011**).

Objectifs du travail

Face à l'utilisation exponentielle et l'exposition à large échelle aux faibles doses d'additifs alimentaires et surtout dans beaucoup de cas dans leur forme nanoparticulaire, nous nous sommes fixés comme objectif :

1. D'identifier et répertorier les additifs alimentaires incorporés dans la fabrication des produits alimentaires destinés à la consommation humaine ;
2. De classer ces additifs par catégories et degré de toxicité tracés par le *Codex Alimentarius* ;
3. D'évaluer l'effet séparé de trois nano-additifs utilisés dans la production d'aliments (NPsTiO₂, NpsSiO₂ et NpsAg) sur trois bactéries commensales du genre Staphylocoque et Streptocoque et *Escherichia*).
4. D'évaluer la toxicité de deux mixtures de nano-additifs alimentaires (NPs TiO₂ /Ag et Nps SiO₂ /Ag) sur *E.coli*.

Chapitre 1
Etat de l'art

Depuis la nuit des temps, l'homme a dû s'efforcer à conserver et protéger la nourriture qu'il avait bien souvent du mal à trouver ; L'utilisation de composés naturels pour la conservation des aliments, apparait dès la plus haute antiquité (**Brigand et al., 1998**) en utilisant des méthodes de conservation simples et basiques telles que : la salaison, la fumure, la conservation dans le sucre et la fermentation ; à cela s'ajoutaient quelques colorants d'origine végétale et animale (**Moll et Moll, 1998**), le sel de mer, la salpêtre (nitrate de potassium) et la fumée ont été employés aussi pour la conservation de la viande et du poisson (**Brigand et al., 1998 ; Cozien, 2012**).

Cependant à travers les siècles, dans de nombreuses régions du monde, un bon nombre de plantes ou d'aromates sont introduites dans les préparations culinaires pour préserver certaines denrées alimentaires ; Certaines épices et plantes servaient à améliorer la couleur et l'aspect des aliments, D'autres produits comme le jaune d'œuf ou encore l'amidon par exemple sont utilisés comme des émulsifiants et gélifiants (**Brigand et al., 1998**).

Ceci dit, au milieu du XIXème siècle, et avec la révolution industrielle, l'essor de la chimie a vu apparaître d'autres substances comprenant des conservateurs, des anticoagulants, des acidifiants et des neutralisants (**Moll et Moll, 1998 ; Jen et Chen, 2017**) ; des colorants sont industrialisés en Amérique du Nord, des émulsifiants, des levures et même des gélifiants sont découverts (**Fontana, 2013**). Par conséquent une liberté d'utilisation d'additifs alimentaires par les artisans, et fabricants d'aliments, et boissons destinés à la consommation humaine s'est développée, d'une manière exhaustive puisque aucune réglementation n'existait à l'époque (**Jacquot et al., 2012**).

A l'échelle internationale, plusieurs organismes se sont créés dans le souci majeur de sauvegarder la santé des consommateurs, il s'agit de :

- La **FAO** (*Food and Agriculture Organisation of United Nations*) : Créée le 16 octobre 1945 à Québec au Canada, l'objectif était de libérer l'humanité de la faim et de la malnutrition et de gérer les systèmes alimentaires de façon efficace au niveau mondial (**<http://www.fao.org>**).
- L'**OMS** (Organisation Mondiale de la Santé) ou **WHO** (*World Health Organisation of United Nations*): Entrée en vigueur le 7 avril 1948, son rôle est de diriger et de coordonner la santé internationale au sein du système des Nations Unies (**<http://www.who.int>**).
- La **CEE** (Communauté Economique Européenne) : Instaurée en 1957 et scindée en trois institutions : Commission Européenne, Parlement Européen et Conseil des ministres. La commission de l'union européenne a mis en place un comité d'experts européen appelé

CSAH (Comité Scientifique pour l'Alimentation Humaine) ayant un rôle équivalent à celui du JECFA (*Joint Expert Committee on Food Additives*) (Moll et Moll, 1998).

- Le *Codex Alimentarius* (Code alimentaire) : crée en 1963 par la FAO et l'OMS afin de mettre au point des normes alimentaires internationales harmonisées destinées à protéger la santé des consommateurs et à promouvoir des pratiques loyales en matière de commerce de denrées alimentaires (*Codex Alimentarius*, 2016).

1. Additifs alimentaires

1.1. Définition

Avant de définir le terme « additifs », il est indispensable de commencer par définir, en premier lieu le terme « aliment » auquel il est lié :

Le terme « aliment » désigne toute matière qui, par la voie de l'ingestion, sert à l'entretien et au développement de l'organisme ; Il s'agit généralement de produits naturels, de composition complexe.

Tandis que le terme « additif » désigne toute substance qui n'est pas un constituant normal des aliments et dont l'addition intentionnelle a un but qui peut être de type : (i) Organoleptique, (ii) Nutritionnel et (iii) Technologique. L'emploi des additifs alimentaires est limité à une concentration maximale de 1%, mis à part quelques exceptions (AFSSA, 2009 ; Jacquot *et al.*, 2012).

Or selon la directive européenne **89/107/CEE du conseil du 21 décembre 1988** : "*On entend par additif alimentaire : toute substance habituellement non consommée comme aliment en soi, habituellement non utilisée comme ingrédient caractéristique dans l'alimentation, possédant ou non une valeur nutritive. Son adjonction intentionnelle aux denrées alimentaires est faite dans un but technologique, au stade de leur fabrication, transformation, préparation, traitement, conditionnement, transport ou entreposage : elle a pour effet de devenir elle-même, ou ses dérivés, un composant des denrées alimentaires*" (**Règlement n°1333/2008 du parlement européen du 16/12/2008 ; JORA 2012**). Il ressort de cette définition quatre traits essentiels :

- Pour désigner un additif On ne parle pas de produit chimique, mais uniquement de "substance". Cette expression est plus générale, mais doit bien être distincte de la définition d'aliment ;
- L'additif est une substance ajoutée volontairement, donc connue en quantité et en qualité ;
- Il est employé dans un but déterminé, pour jouer un rôle reconnu utile ;
- Il demeure dans l'aliment, lui ou ses dérivés s'il se transforme (**Brigand *et al.*, 1998 ; Vierting, 2008 ; Gaffet, 2011**).

1.2. Origine

1.2.1. Additifs naturels

Il s'agit d'extraits de substances animales (Cochenille, jaune d'œuf, blanc d'œuf, la peau et les os de porc et/ou de bœuf, matière grasse) et/ou végétales (les extraits de graines, racines, rhizomes, tubercules, feuilles, fleurs, fruits et algues) s'ajoute à cela d'autres additifs d'origine fongique tel que la truffe ou encore d'origine minérale tel que les sels, existants dans la nature (Cozien, 2012).

1.2.2. Additifs issus de la transformation des substances naturelles

Cette catégorie d'additifs alimentaires obtenus par modification chimique d'un extrait naturel d'une substance animale et/ou végétale afin d'améliorer ses propriétés et caractéristiques. C'est le cas, par exemple des acides organiques dérivés d'huiles comestibles, des épaississants tels que la gélatine extraite de la peau et des os d'origine animale (Adeinat, 2018).

1.2.3. Additifs de synthèse

a) **Additifs identiques aux naturels** : obtenues par synthèse chimique, il s'agit de substances utilisées pour remplacer les additifs alimentaires naturels. Tel que de l'acide citrique (E330) utilisé comme acidifiant (Adeinat, 2018 ; Cozien, 2012).

b) **Additifs artificiels** : Ils sont intégralement artificiels, et n'ont aucun homologue à l'état naturel, il s'agit de produits chimiques obtenus par voie de synthèse. C'est le cas de certains antioxygènes (Adeinat, 2018 ; Cozien, 2012).

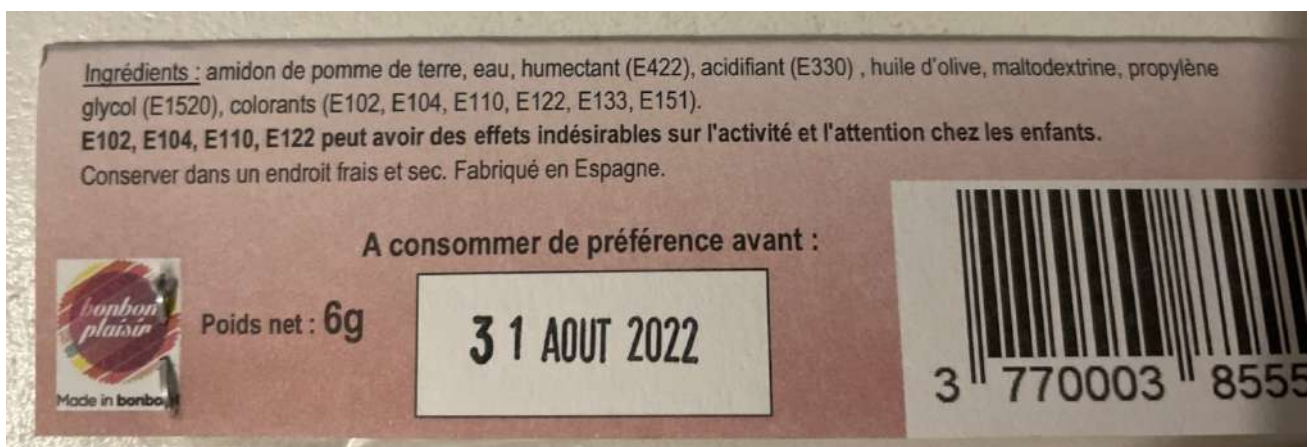


Figure 01. Additifs alimentaires (<https://culturesciences.chimie.ens.fr>)

1.3. Classification

Les additifs sont théoriquement classés selon leur catégorie, ceci dit la liste ne cesse de s'allonger d'une année à l'autre, du fait qu'un grand nombre d'additifs se retrouvent classés dans une nouvelle catégorie autre que celle de leurs premières fonctions. C'est le cas du sorbitol, un édulcorant, dans la catégorie E4XX (Crouzet, 2006 ; Etournaud, 2007).

1.3.1. Classification algérienne

Selon le ministère du commerce algérien les additifs alimentaires sont répertoriés en 3 grandes classes selon leur rôle technologique :

- **Additifs affectant les caractéristiques physiques ou physico-chimiques des aliments :** il s'agit d'affermissant, de régulateurs de l'acidité, d'anti moussants, d'agents de blanchiment, d'agents de charge, d'antiagglomérants, d'agents de traitement des farines, d'agents de carbonations, de gaz propulseurs les supports, d'émulsifiants, de sels émulsifiants, d'agents moussants, de gélifiants, d'agents d'enrobage, d'agents levants, et enfin de stabilisants et les épaississants.
- **Additifs préservant la fraîcheur et prévenant la dégradation des aliments :** cette classe comporte : les conservateurs et les gaz de conditionnement, les antioxydants, et les séquestrant.
- **Additifs augmentant ou améliorant les qualités sensorielles des aliments :** cette classe englobe les édulcorants, des exhausteurs de goût et des arômes, les humectant et bien sur les colorants, les agents de rétention de couleur (www.mincommerce.gov.dz).

Selon le décret exécutif N°92-25 de 1992, les additifs alimentaires sont classés en catégories dans le tableau (01) :

CHAPITRE 1 : Etat De L'Art Sur Les Additifs Alimentaires

Tableau 01. Classification des additifs alimentaires selon la réglementation algérienne (**Décret exécutif N° 92-25 de 1992**)

N°	Additifs	N°	Additifs
1	Edulcorants	11	Antiagglomérants
2	Colorants	12	Agents d'enrobage
3	Conservateurs	13	Poudre à lever
4	Antioxydants	14	Sels de fonte
5	Gélifiants	15	Arômes répartis en 4 catégories
6	Epaississants	15.1	Préparations aromatisantes
7	Acidifiants	15.2	Substances aromatisantes
8	Correcteurs d'acidité	15.3	Arômes de transformation
9	Emulsifiants	15.4	Arômes de fumée
10	Stabilisants		

1.3.2. Classification Européenne

La classification adoptée en France, à la communauté européenne et au *Codex Alimentarius* place les additifs alimentaires dans les catégories présentées au tableau (02) :

Tableau 02. Principales catégories d'additifs utilisés dans l'union européenne (**André, 2013**)

Codes	Catégories
E100 à E180	Colorants
E200 à E285	Conservateurs
E300 à E321	Antioxydants (antioxygène)
E325 à E380	Acidifiants/ Correcteurs d'acidité
E400 à E495	Agents de texture (épaississants, stabilisants, émulsifiants, gélifiants, texturants)
E500 à E585	Catégorie « fourre-tout » comprenant des poudres à lever, l'acide chlorhydrique, l'acide sulfurique, des phosphates, des correcteurs d'acidité
E620 à E650	Exhausteurs de goût
E900 à E914	Agents d'enrobage
E938 à E949	Gaz d'emballage/ gaz propulseurs
E950 à E968	Édulcorants
E1100 à E1105	Enzymes alimentaires
E1404 à E1451	Amidons modifiés

CHAPITRE 1 : Etat De L'Art Sur Les Additifs Alimentaires

Concernant la catégorie des arômes, naturels et/ou artificiels ils ne sont pas considérés comme des additifs alimentaires et doivent figurer en toutes lettres sur l'étiquette de l'emballage des aliments. Généralement, 6 grandes familles d'additifs alimentaires sont abondamment incorporées dans les denrées alimentaires, ce sont les :

- **Colorants (E100-E180)** : donne un aspect plus captivant et présentable à l'aliment. D'origine naturelle ou artificielle. Il s'agit de :
 - Des colorants d'origine végétale (Rouge de bettrave E162) ;
 - Des colorant d'origine animale (rouge de carmin) ;
 - Des colorants d'origine minérale (Oxyde de fer E172) ;
 - Des colorants de synthèse (Tartrazine E102) (**Becker et al., 2009**).
- **Conservateurs (E200-E285)** : appelés aussi agents de conservation, prévenant le développement des bactéries, des moisissures et des levures, les fermentations, ainsi que les putréfactions (**Bourrier, 2006**).
- **Antioxydants (E300-E321)** : empêchant les phénomènes d'oxydation qui pourraient altérer les aliments (rancissement des graisses par exemple). Utilisés en industrie alimentaire, en industrie pharmaceutique et en cosmétologie (**Becker et al., 2009**).
- **Agents de texture (E400-E495)** : ils englobent les émulsifiants, les stabilisants, les épaississants et les gélifiants. Ajoutés aux aliments dans le but d'améliorer et de stabiliser leur consistance (**Zamorano, 2006 ; Fontana, 2013**).
- **Exhausteurs de goût (E620-E650)** : ils n'ont pas de saveur propre prononcée, et ne changent pas le goût mais augmentent l'intensité de la perception olfacto-gustative d'une denrée alimentaire (**Bourrier, 2006 ; Deppenweiler, 2014**).
- **Edulcorants (E950-E968)** : principalement présentés par des composés synthétiques ou semi-synthétiques qui ont un pouvoir sucrant supérieur à celui du sucre de table (saccharose), avec une valeur nutritive nulle ou très faible (**Amoyal et Andreelli, 2012**).

1.4. Codification

Désignés par un code de 3 ou 4 chiffres qui leurs sont caractéristiques, les additifs alimentaires sont très nombreux, le code est toujours précédé par la lettre 'E' indiquant leur évaluation par l'union européenne et du bénéfice de leur autorisation (**Macioszek, 2004**). Ces codes sont ordinairement retrouvés dans la composition du produit (**André, 2013 ; Macioszek, 2004 ; Tighrine, 2019**).

Parallèlement le Système International de Numérotation pour les additifs alimentaires 'SIN' a été mis au point par le comité du codex sur les additifs alimentaires et les contaminants (CCFAC) en vue

d'établir une base numérique, internationalement reconnue, permettant l'identification des additifs alimentaires dans les listes d'ingrédients, en lieu et en place de la déclaration du nom spécifique qui est généralement long et d'une structure chimique complexe. Il s'est inspiré du système restreint déjà introduit avec succès dans la CEE (FAO, 2001).

1.5. Encadrement réglementaire

1.5.1. Réglementation algérienne

Le décret exécutif n 12-214 du 23 Jomada Ethaniya 1433 correspondant au 15 mai 2012 fixant les conditions et les modalités d'utilisation des additifs alimentaires dans les denrées alimentaires destinées à la consommation humaine (JORA, 2012). Le premier ministre, sur le rapport conjoint du ministre du commerce, du ministre de la santé, de la population et de la réforme hospitalière, du ministre de l'industrie, de la petite et moyenne entreprise et de la promotion de l'investissement et du ministre de l'agriculture et du développement rural, après approbation du président de la république : ils ont cité 20 articles détaillés dans le JORA 2012 dans l'annexe. Ces articles étaient décrits en vue de :

- **La loi n°85-05 du 16 février 1985**, modifiée et complétée, relative à la protection et la promotion de la santé ;
- **La loi n°87-17 du 1 août 1987**, relative à la protection phytosanitaire ;
- **La loi n°88-08 du 26 janvier 1988**, relative aux activités de médecine vétérinaire et à la protection de la santé animale ;
- **Décret exécutif n°90-367 du 10 novembre 1990**, modifiée et complétée, relatif à l'étiquetage et à la présentation des denrées alimentaires ;
- **Décret exécutif n°92-25 du 13 janvier 1992**, relatif aux conditions et aux modalités d'utilisation des additifs dans les denrées alimentaires ;
- **La loi n°04-04 du 23 juin 2004**, relative à la normalisation ;
- **Décret exécutif n°04-319 du 7 octobre 2004**, fixant les principes d'élaboration, d'adoption et de mise en œuvre des mesures sanitaires et phytosanitaires ;
- **Décret exécutif n°05-467 du 10 décembre 2005**, fixant les conditions et les modalités de contrôle aux frontières de la conformité des produits importés.
- **La loi n°09-03 du 25 février 2009**, relative à la protection du consommateur et à la répression des fraudes, notamment son article 8 ;

1.5.2. Règlementation européenne

Les additifs alimentaires sont autorisés au niveau de l'UE pour les 28 Etats membres. La législation communautaire sur les additifs directive cadre : directive 89/107/CEE du conseil du 21 décembre 1988 relative au rapprochement des législations des Etats membres concernant les additifs pouvant être employés dans les denrées alimentaires, modifiée par la directive 94/34/CE et trois directives spécifiques couvrant :

- Les colorants : **Directive 94/36/CE du parlement européen et du conseil du 30 juin 1994** sur les colorants pour l'utilisation dans les denrées alimentaires ;
- Les édulcorants : **Directive 94/35/CE du parlement européen et du conseil du 30 juin 1994** concernant les édulcorants destinés à être employés dans les denrées alimentaires, modifiée par la directive 96/83/CE ;
- Les autres additifs alimentaires : **Directive 95/2/CE du parlement européen et du conseil du 20 février 1995** concernant les additifs alimentaires autres que les colorants et les édulcorants modifiés par les directives 96/85/CE, 98/72/CE et 2001/5/CE.
- Le dernier règlement **n° 231/2012** du parlement européen du conseil du **9 mars 2012** établit les spécifications des additifs alimentaires énumérés aux annexes II et III du règlement (CE) **n°1333/2008** du Parlement européen et du Conseil. Ce règlement est décrit en vu du :
- **Règlement (CE) n°1333/2008** du Parlement européen et du Conseil du **16 décembre 2008** sur les additifs alimentaires, et notamment son article 14 et son article 30, paragraphe 4, et le règlement (CE) **n°1331/2008** du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 établissant une procédure d'autorisation uniforme pour les additifs, enzymes et arômes alimentaires et notamment son article 7, paragraphe 5.

1.6. Toxicité et impact sur la santé du consommateur

D'après le règlement européen, les additifs alimentaires sont classés par degré de toxicité en :

- Additifs alimentaires peu ou pas toxiques.
- Additifs alimentaires douteux.
- Additifs alimentaires modérément toxiques
- Additifs alimentaires toxiques.
- .Additifs alimentaires très toxiques.

Le contrôle des additifs alimentaires est accompli par les Etats membres du conseil du CSAH. La DJA est mesurée avec des évaluations de consommation "moyennes" et "extrêmes" dans la population générale et dans des sous-groupes particuliers de la population (**Eufic, 2006**).

D'autre part, en se référant aux définitions citées antérieurement, nous estimons qu'il est plutôt rassurant de lire que l'emploi des additifs est limité à la concentration maximale de 100% à l'exception de quelques cas isolés. Néanmoins une grande controverse tourne autour des additifs alimentaires du fait que beaucoup d'entre eux ont des effets douteux sur la santé et sont parfois remis en cause, sans pour autant les interdire. De plus, le consommateur les voit comme des produits chimiques, donc mauvais. N'oublions pas que certains d'entre eux ont été utilisés depuis des siècles (sel, salpêtre, épices) ou sont même parfois extraits de végétaux. Il existe malgré tout certains additifs comme la dulcine (édulcorant interdit il y a 59 ans) dont on est sûrs de la nocivité. Ainsi, comment ne pas craindre que d'autres additifs employés aujourd'hui soient reconnus comme nocifs dans les années à venir ? Il est d'ores et déjà possible de mettre en évidence les effets suspects associés à certains additifs (**Amouyal et Andreelli, 2012 ; Becker *et al.*, 2009**).

2. Nanoparticules dans l'industrie agro-alimentaire

2.1. Nano-additifs alimentaires

Les nanoparticules sont actuellement utilisées dans de nombreux produits de consommation courante dont les vêtements, les produits cosmétiques et de bien-être corporel et même dans le domaine médical. L'industrie agroalimentaire les a adoptées, sans toujours le déclarer clairement, car ils permettent une meilleure stabilité et une meilleure conservation des produits ; certaines nanoparticules (NPs) sont d'ailleurs utilisées depuis de nombreuses années (**Heringa et Albrecht, 2001 ; Marano, 2016**).

Dans le domaine de l'alimentation, les nanoparticules sont utilisées dans les emballages afin d'assurer une meilleure conservation des produits, comme senseurs pour le suivi de leur durée de vie. Dans le domaine des additifs alimentaires, des antiagglomérants par exemple dans le sel ou encore la farine tels que la silice colloïdale et comme clarifiants des jus de fruits. Les nano-émulsions, utilisées par l'industrie agroalimentaire pour encapsuler, protéger et délivrer des additifs tels que les caroténoïdes, des phytostérols, les vitamines liposolubles, sont aussi activement développées. Ces nanoparticules présentes dans les aliments vont donc être ingérées et passées dans l'appareil digestif. Celles qui se trouvent intégrées dans les emballages alimentaires peuvent également être libérées accidentellement et se retrouvent dans le tractus gastro-intestinal. Il est donc important de faire une évaluation du risque de ces nanoparticules pour le consommateur (**Marano et Guadagnini, 2013**).

2.2. Nanoparticules dans les emballages alimentaires

L'utilisation des NPs dans les emballages au contact des aliments permettent de donner des propriétés spécifiques : plus de résistance, de la transparence, une surface très hydrophobe, des capacités autonettoyantes et antimicrobiennes. Les propriétés antimicrobiennes de certaines NPs métalliques (argent, zinc, cuivre) sont particulièrement très intéressantes et déjà exploitées. Le nano argent semble être le plus fréquemment utilisé. Ces NPs sont directement intégrées dans les emballages (polymère, textile ou papier). Leurs propriétés biocides sont bien connues et s'avèrent principalement associées à la libération progressive d'ions Ag^+ capable de générer des radicaux libres et un stress oxydant (Garuglieri *et al.*, 2016).

Une meilleure conservation des denrées alimentaires est donc assurée par la présence de ces NPs dans les emballages, commercialisés sous forme de films transparents contenant des NPs d'argent depuis 2005, de même certains réfrigérateurs ont un revêtement intérieur contenant ces NPs. Le principal problème qui se pose ici est l'éventuel transfert de ces NPs de leur support initial vers les aliments et ainsi leur contamination.

Les matériaux « intelligents » font également partie de ces emballages qui contiennent des NPs. Il s'agit de bioindicateurs permettant de détecter rapidement dans l'aliment le développement de toxines ou d'agents pathogènes sans passer par un échantillonnage et une analyse en laboratoire. Ces nanomatériaux sont incorporés directement dans l'emballage et permettent ainsi de suivre son évolution pendant le transport et le stockage jusqu'à la consommation. Cette technologie représente sûrement un gain pour le consommateur car permettant une meilleure sécurité microbiologique d'une part mais d'une autre part un danger imminent (Marano et Guadagnini, 2013).

2.3. Toxicité des nanoparticules alimentaires pour l'Homme

L'Homme a toujours été exposé à des particules fines et ultrafines, parfois à des concentrations importantes. Les particules peuvent pénétrer dans l'organisme via les poumons, la peau ou encore la paroi intestinale, chacun présentant une barrière à cette pénétration. Nonobstant, ces barrières peuvent se révéler insuffisantes et certaines particules peuvent avoir des effets toxiques sur l'organisme (Afssa, 2019).

2.3.1. Mécanisme d'action des nanoparticules

Plusieurs publications au cours des dernières années ont concerné les mécanismes d'action de NPs manufacturées (Nano Ag, TiO_2 , ZnO , SiO_2 colloïdale). Ces études ont été généralement effectuées sur cultures cellulaires dont certaines sur les entérocytes de la barrière intestinale, en particulier en utilisant la lignée cellulaire $CaCO_2$ qui a la propriété de se différencier en culture ou les cellules M

CHAPITRE 1 : Etat De L'Art Sur Les Additifs Alimentaires

des plaques de Peyer. Elles ont mis en évidence l'existence de mécanismes communs mais avec des niveaux de réponses très variables selon le type cellulaire et les NPs testées.

Il faut noter que, la membrane cellulaire et les NPs n'interagissent d'une manière directe, mais plutôt à travers la 'corona' qui les entourent. L'entrée des NPs dans la cellule se fait généralement par un processus d'endocytose classique, ces dernières vont se retrouver dans le compartiment cellulaire sous forme de vésicules entourées d'une membrane. Toutefois, il a été montré que les NPs isolées pouvaient passer directement dans le cytoplasme à travers la bicouche lipidique et s'y retrouver libres. Les NPs pénètrent alors dans la cellule 'masquées' par les protéines et autres molécules biologiques qu'elles ont adsorbées et qu'elles transportent, c'est l'effet 'cheval de Troie'. Cette entrée déclenche une cascade d'événements moléculaires qui peut être à l'origine de la toxicité et de la mort cellulaire ou de réponses adaptatives telles que la réponse pro-inflammatoire, l'activation des enzymes antioxydants, les processus de réparation, les effets sur le contrôle du cycle cellulaire et la prolifération (**Marano et al., 2011**).

Ces événements sont directement ou indirectement liés à l'internalisation des NPs, leur persistance au niveau cellulaire, leur capacité à libérer des radicaux libres et d'induire un stress oxydant. En effet, une réponse qui est commune à un grand nombre de NPs manufacturées est la production directe ou indirecte de radicaux libres associée à la taille, à la composition chimique et à la réactivité de surface des NPs (**Nel et al., 2006**).

Quand elle n'est pas contrôlée par les systèmes de protection de la cellule, enzymes ou petites molécules antioxydantes, elle conduit au stress oxydant. Le niveau de production de radicaux libres serait à l'origine d'une réponse par étape. À un niveau mineur, la protection antioxydante est directement activée, ceci dit quand la production de radicaux libres atteint un niveau plus important elle induit une réponse inflammatoire avec un niveau très élevé des dommages cellulaires qui peuvent conduire à la mort par nécrose ou apoptose. Si cette hypothèse du rôle central du stress oxydant a trouvé une confirmation dans beaucoup de cas, il est certain qu'elle ne soit pas suffisante pour expliquer tous les effets biologiques des additifs alimentaires ((**Marano et al., 2011**). **Heringa et al., (2018)** explique ces réactions cellulaires par la présence de nombreuses NPs telles que TiO₂, CB, SiO₂, Ag, la magnétite.

En fait, récemment, d'autres effets spécifiques des NPs qui ne sont pas liées au stress oxydant ont été soulignés. Par exemple l'interaction des NPs avec des protéines cellulaires de surface telles que les récepteurs peuvent induire des réponses biologiques (**Nel et al., 2006**).

Selon **Marano et al., (2011)**, l'évaluation de la toxicité des nanoparticules doit prendre en compte le rôle des interactions entre les particules, les fluides biologiques et la matrice extracellulaire non seulement pour ce qui concerne l'internalisation, mais aussi pour l'induction d'une réponse spécifique via l'interaction avec des récepteurs spécifiques membranaires.

La figure (02) montre les mécanismes d'action des NPs, en particulier les NPs métalliques : Les NPs peuvent pénétrer à l'intérieur de la cellule par voie d'endocytose, générer des radicaux libres extracellulaires ou/et intracellulaires, activer des voies de signalisation et des facteurs de transcription, agir sur la transcription de divers gènes. Cela peut conduire à la synthèse d'enzymes antioxydantes et de protéines pro-inflammatoires. Le stress oxydant peut être à l'origine de dommages à l'ADN.

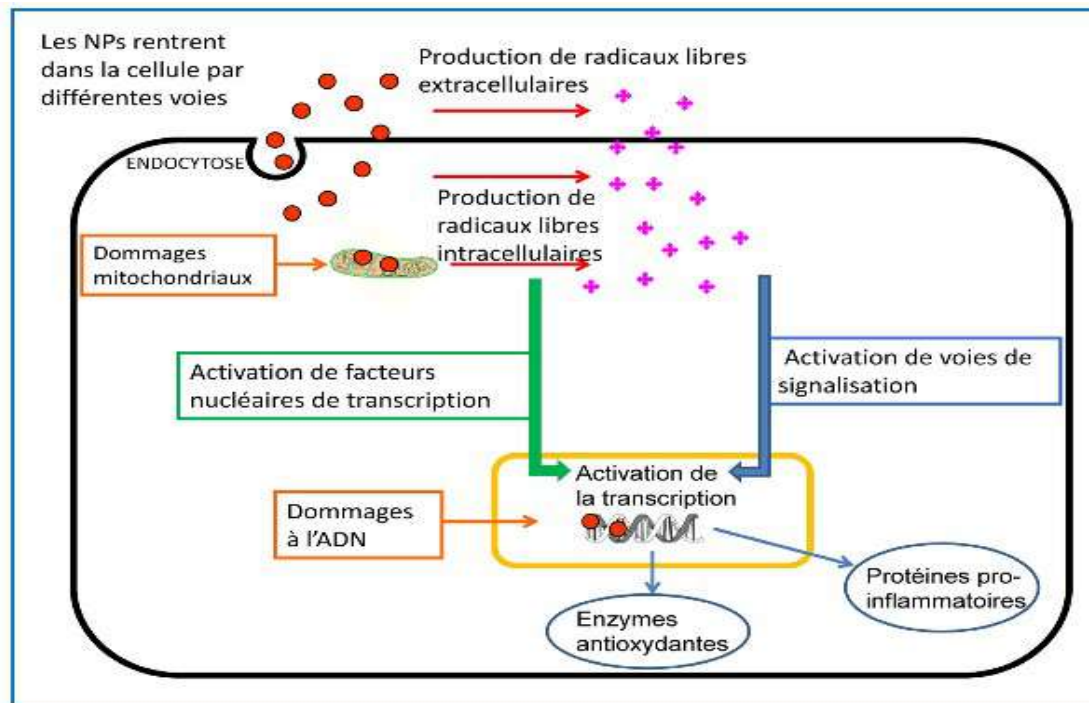


Figure 02. Mécanismes d'action des nanoparticules (NPs) manufacturées, en particulier métalliques
(**Marano et al., 2011**)

2.3.2. Toxicocinétique des nanoparticules après administration par voie orale

Jusqu'à aujourd'hui, il n'y a pas de méthode validée et applicable en routine permettant de détecter, quantifier et caractériser les nanoparticules dans les matrices alimentaires ni dans les liquides biologiques ou les tissus. On ne connaît pas précisément les modifications que subissent les nanoparticules dans le tube digestif, en particulier si elles restent libres ou si elles s'agrègent, si elles

adsorbent des biomolécules présentes dans la matrice alimentaire ou elles sont transformées par les enzymes digestifs. Ces modifications des nanoparticules peuvent influencer leur charge de surface, leur hydrophobicité ou leur lipophilie, leur diffusion dans le mucus et l'eau et leur transport cellulaire et paracellulaire. L'absorption des nanoparticules pourrait entraîner celles de biomolécules adsorbées à leur surface (Huang *et al.*, 2005 ; Heringa *et al.*, 2018).

Dans les liquides biologiques, l'interaction des nanoparticules avec les protéines pourrait favoriser le franchissement des membranes cellulaires et nucléaires. Certaines nanoparticules passent à travers la barrière digestive essentiellement par transcytose à travers les entérocytes ou les cellules M des plaques de Peyer, avec une vitesse inversement proportionnelle à leur taille. Des études suggèrent que les nanoparticules pourraient provoquer une inflammation du tractus digestif. La distribution des nanoparticules après ingestion orale, est très différente d'un modèle à l'autre et selon les nanoparticules. Après absorption digestive, certaines nanoparticules sont éliminées dans les fèces et dans l'urine (Reddy *et al.*, 2007) et d'autres pénétreraient dans la circulation portale et le foie ou dans le système lymphatique. Le foie et la rate seraient des organes cibles, mais certaines nanoparticules sont retrouvées dans les reins, le poumon, la moelle osseuse et le cerveau (Afssa, 2009).

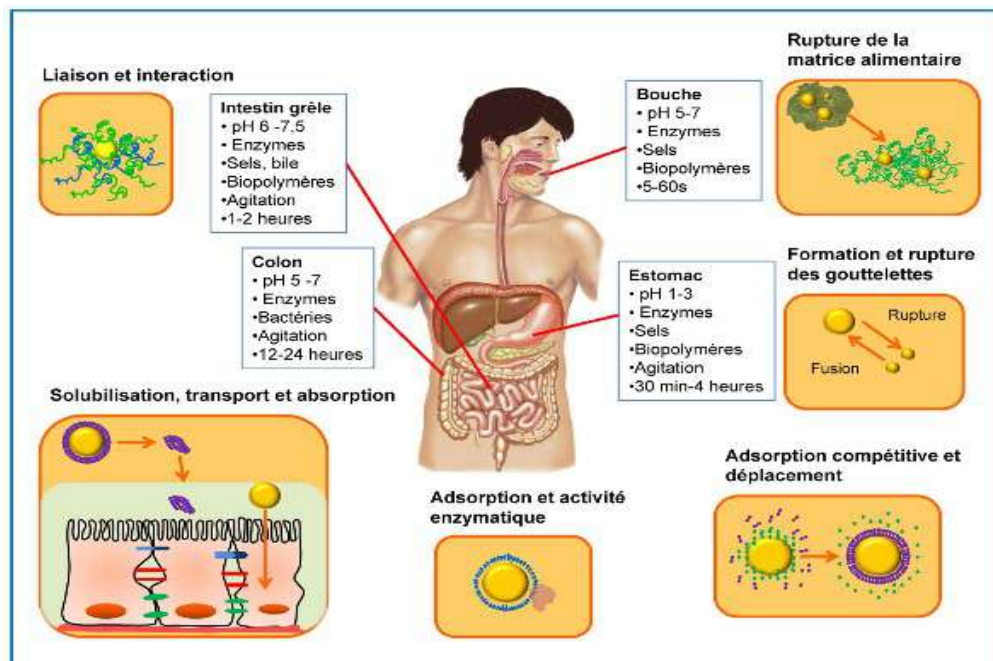


Figure 03. Schéma des différents environnements et processus physiologiques rencontrés par des nanoparticules manufacturées solides au cours de la digestion (Marano *et al.*, 2011)

2.3.3. Paramètres influençant la toxicité

Selon l'INERIS (2007), ces paramètres peuvent agir directement ou en modifiant les réactions chimiques.

Taille : La diminution de la taille peut entraîner une plus grande facilité à pénétrer dans l'organisme, à passer d'un système (pulmonaire, digestif, nerveux) à l'autre et à pénétrer dans les cellules. Les particules peuvent atteindre des parties éloignées du corps humain en traversant les barrières. Il a ainsi été montré chez le rat qu'elles arrivaient au cerveau en suivant le nerf olfactif. Elles traversent les membranes des muqueuses nasales et bronchiques, et si elles sont nombreuses, les mécanismes d'élimination au niveau des alvéoles pulmonaires ne se font plus. Il faut noter que ce n'est pas une simple question de géométrie, la taille intervient et les réactions peuvent être modifiées (**Huk et al., 2014**)

Effet d'échelle : Au niveau quantique, on travaille sur l'atome et non sur la matière ce qui génère de nouvelles réactions. Qu'il s'agisse du carbone, de l'or ou du dioxyde de titane, ces éléments connus pour être inertes acquièrent des propriétés différentes à l'échelle nanométrique. Très prisées lorsqu'il s'agit de les utiliser industriellement ces propriétés peuvent avoir un impact négatif sur le plan biologique.

Surface spécifique : L'énergie de surface croît avec la surface et la réactivité chimique est plus grande. Plus la taille des particules diminue plus le rapport surface/masse augmente. A masse égale, plus le nombre de particules augmente, plus la surface augmente.

Forme : Les particules sont sous forme de sphère, fibres, tubes ou feuilles. Des études ont montré que les fibres (amiante) étaient associées à un risque de fibrose pulmonaire et de cancer. Pour une même nature, la forme fibreuse est plus toxique que la forme sphérique. La composition chimique, la capacité à s'agglomérer, et le nombre des particules jouent aussi un rôle dans la toxicité.

Effet cheval de Troie : Certaines particules ont la propriété d'adsorber à leur surface des molécules présentes dans l'environnement qui peuvent être toxiques. Dans ces conditions, la toxicité ne relève pas de la particule elle-même mais des substances véhiculées à sa surface et qui peuvent ainsi pénétrer parfois plus facilement dans l'appareil respiratoire.

2.4. Impact toxicologique de quelques nanoparticules sur la santé

Le tractus digestif constitue une autre voie d'entrée des nanoparticules qui peuvent avoir deux origines : les premières qui peuvent être ingérées directement avec l'eau, les aliments ou les

médicaments, et les secondes qui sont éliminées de l'appareil respiratoire par l'escalier mucociliaire. Seulement quelques études ont été menées sur ce sujet et montrent que les nanoparticules sont éliminées rapidement avec peu de passage à travers la barrière intestinale. Cependant, il a été démontré que l'internalisation des nanoparticules par les cellules intestinales dépend de la nature et la taille des nanoparticules (**Bettini et Houdeau, 2014**).

Plusieurs travaux ont démontré des effets cancérigènes dus aux nanoparticules. En effet, il existerait un lien entre la présence de microparticules ou de nanoparticules dans l'organisme et le cancer du côlon ou la maladie de Crohn. Une étude *in vitro* a démontré que la viabilité des hépatocytes diminuait lorsqu'ils étaient incubés dans une solution contenant des quantum dots de sélénure de cadmium (CdSe). La cytotoxicité de ces quantum dots serait secondaire à une oxydation de leur surface et à la libération d'ions cadmium, reconnus cancérigènes pour l'homme. Cependant, les études sur l'Homme restent peu nombreuses et les moyens déployés en matière de nanotoxicité encore insuffisants, par conséquent, la connaissance des impacts des nanotechnologies sur la santé reste très restreinte (**Chatterjee et al., 2011**).

2.4.1. Dioxyde de Titane

Le TiO_2 est un oxyde métallique, et le 9^{ème} composant le plus abondant dans la croûte terrestre. Le dioxyde de titane représente 70% de la production mondiale de pigments avec 5000 tonnes par an et une croissance estimée à 60000 tonnes par an d'ici 2025. Au Niveau alimentaire, il est utilisé sous sa forme ultra fine comme colorant blanc (additif E171) dans les confiseries, les sauces et les pâtisseries. Même si la coloration blanche est plutôt le résultat de particules autour de 200 -300 nm, des nanoparticules (Taille inférieure à 100nm) se retrouvent dans la poudre au cours du procédé de fabrication, pour 17 à 36% d'entre elles selon la source commerciale de l'additif E171 (**Mercier-Bonin et al., 2016 ; Magdelaine, 2019**).

Le nano-dioxyde de titane (E171) : classé "cancérigène possible si inhalé" par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) sous sa forme classique, son caractère inflammatoire est souligné. Il a été détecté dans le sang, le foie, la rate, les reins, les poumons, le cœur et le cerveau d'animaux. Interdit en France depuis janvier 2020 (**EFSA, 2021**).

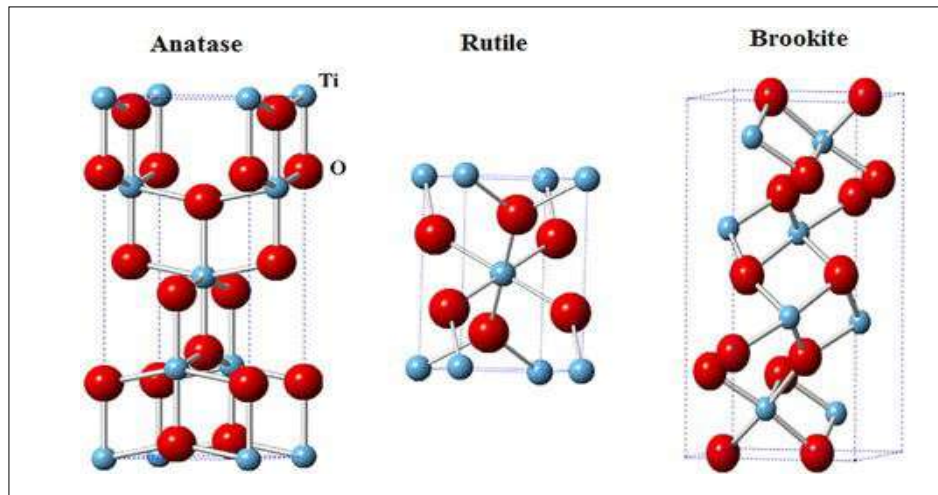


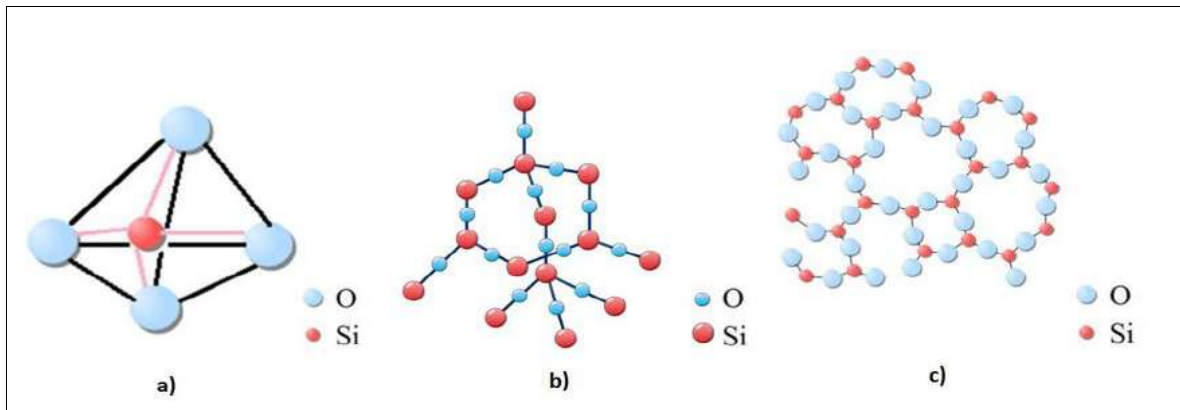
Figure 04. Nanoparticule du dioxyde de titane (Etacheri *et al.*, 2015)

Il a été prouvé qu'il provoquait un stress oxydatif, des réactions inflammatoires, qu'il pouvait endommager l'ADN et causer la mort des cellules. Des études suggèrent qu'il peut traverser la barrière hémato-encéphalique et la barrière placentaire. Une étude utilisant des souris en gestation a montré le transfert des nanoparticules de la mère à la progéniture avec les conséquences suivantes : dommages au cerveau, au système nerveux et une réduction de la production de sperme au sein de la progéniture mâle (Ringoot, 2016). En Comparaison avec d'autres types de nanoparticules, l'ingestion de nano-TiO₂ Via l'alimentation est élevée, les enfants étant les plus exposés, avec une consommation de TiO₂ variant entre 1 et 3mg/kg(p.c.)/jour.

Par ailleurs, l'utilisation quotidienne de pâte dentifrice après chaque repas major (où le TiO₂ apparaît aussi bien sous l'appellation d'additif E171 dans les produits alimentaires que sous l'ingrédient CL77891 dans la nomenclature INCI des produits cosmétiques), peut conduire à une sur-exposition orale au TiO₂. La synthèse de matériaux nanocomposites argent/TiO₂ a également été proposée pour des applications à visée antimicrobienne dans le secteur de l'emballage. Les informations disponibles à l'heure actuelle sur la détection du nano-TiO₂ dans l'aliment, son suivi dans l'organisme ainsi que ses effets potentiellement délétères chez l'hôte, ont fait l'objet de plusieurs études. Compte tenu des avancées déjà présentées dans cette revue sur les mécanismes de franchissement des barrières biologiques, dont l'épithélium intestinal, les aspects relatifs aux processus physico-chimiques de transformation du nano-TiO₂ dans le compartiment luminal de l'intestin, ainsi qu'à deux acteurs majeurs en santé digestive, le microbiote et le mucus, souvent négligés en toxicologie alimentaire et jamais abordés dans la problématique des nanoparticules (Mercier-Bonin *et al.*, 2016).

2.4.2. Dioxyde de silicium

Le silicium (Si) est un des éléments les plus abondants dans la croûte terrestre. Sous forme massive (Weimmerskirch-Aubatin, 2014). La silice ou le dioxyde de silicium est un solide minéral de formule brute SiO_2 . Le nano-dioxyde de silicium est connu en industrie alimentaire en tant qu'un antiagglomérant sous le code E551. Des études réalisées sur des animaux suggèrent qu'il peut être absorbé à partir du tractus gastro-intestinal, qu'il devient disponible de façon systémique et qu'il s'accumule dans les tissus. Certaines études montrent qu'il peut également traverser la barrière hémato-encéphalique et éventuellement la barrière placentaire. Il peut mener à un dysfonctionnement de la division cellulaire et perturber le métabolisme cellulaire et entraîner une hépatotoxicité. (Ricaud et Witschger, 2012 ; Talbot *et al.*, 2004 ; Warheit *et al.*, 2007).



a) Unité de base tétraédrique, b) Cristal de Silice, c) Réseau amorphe.

Figure 05. Nanoparticule du dioxyde du silicium (El khoury, 2017)

2.4.3. Argent

Le nano-argent est le nano-métal le plus largement utilisé en alimentation. Outre ses usages reposant sur son incorporation dans des surfaces fonctionnalisées en vue du contrôle antibactérien (réfrigérateurs, ustensiles de cuisine,...), des utilisations en tant que compléments alimentaires et en alimentation diététique existent également (Chen et Schluesener, 2008 ; Ge *et al.*, 2014 ; Panáček *et al.*, 2018). En industrie alimentaire, il est connu sous le code E174. De nombreuses études sont dédiées à la compréhension des mécanismes d'action des NPsAg sur les bactéries. En raison de leur complexité, ces mécanismes ne sont pas complètement élucidés à l'heure actuelle et dépendent du genre et de l'espèce du microorganisme considéré.

CHAPITRE 1 : Etat De L'Art Sur Les Additifs Alimentaires

Les nanoparticules d'argent s'attachent à la membrane cellulaire et pénètrent également à l'intérieur des bactéries. La libération d'ions d'argent dans les cellules bactériennes augmente leur activité bactéricide (Wijnhoven *et al.*, 2009 ; Liao *et al.*, 2017 ; Vernis, 2017). Leur mécanisme d'action est favorisé par leur interaction avec la paroi du microorganisme puis la pénétration dans la cellule rendue possible par «évitement» des mécanismes de défense observés dans le cas de particules de taille plus importante, et enfin par leur interaction avec les constituants cellulaires (ADN, protéines, enzymes) (Sondi et Salopek-Sondi, 2004). Selon une autre étude, l'action biocide des nanoparticules est liée à la présence de radicaux libres, générés en surface, qui endommagent la membrane lipidique des cellules (Kim *et al.*, 2007). Par ailleurs, Kampmann et ses collaborateurs déterminent que la fixation de l'argent sur les bactéries inhibe les protéines, provoque le détachement de la paroi cellulaire, la condensation de l'ADN et mène à la destruction de la bactérie (Kampmann *et al.*, 2008).

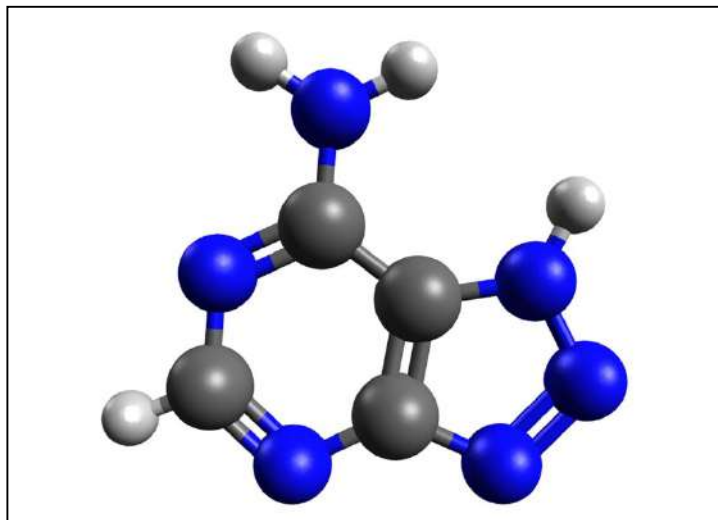


Figure 06. Nanoparticules d'argent (Harroun *et al.*, 2018)

Une autre étude a été réalisée par Holt et Bard (2005), pour voir la relation entre les ions Ag^+ et la chaîne respiratoire des bactéries, sur *E. coli* en suspension ou immobilisées sur une surface de verre. Ils ont constaté que les ions métalliques interagissent avec les enzymes de la chaîne respiratoire (ex: NADH déshydrogénase) et empêchent le transport des électrons d'un complexe à l'autre de cette chaîne. Enfin, les interactions entre les ions Ag^+ et les groupements chargés négativement présents sur les parois bactériennes provoquent des dommages structurels majeurs, notamment des trous. Ceci augmente la perméabilité membranaire et facilite la sortie des constituants cellulaires, ainsi que la

pénétration des ions Ag^+ dans la cellule. L'ensemble de ces phénomènes conduit à la mort de la bactérie (Martinez-Gastanon *et al.*, 2008).

Les nanoparticules d'argent ont le potentiel de se lier aux membranes des cellules et ainsi de leur causer de grands dommages. Il est possible qu'elles entrent dans les cellules et causent des dommages cellulaires pouvant même causer la mort de la cellule. On peut même envisager que les nanoparticules d'argent soient plus toxiques que l'ion libre Ag^+ car, contrairement à l'ion, si elles sont sans charge, elles seront potentiellement plus facilement capables de pénétrer la membrane cellulaire. Le mode d'action des NP_{Ag} n'est pas encore totalement compris mais l'hypothèse est qu'une fois à l'intérieur de la cellule elles se lient aux ligands contenant du sulfure permettant ainsi la dénaturation des protéines, ce qui causerait la mort de la cellule (Houdeau et Lamas, 2019).

3. Interactions nano additifs alimentaires – Bactéries

3.1. Bactéries de la cavité bucco-dentaire

La cavité bucco-dentaire est un milieu présentant des conditions physico-chimiques et nutritionnelles favorables à l'établissement et à la croissance d'une flore microbienne abondante, très polymorphe et hétérogène. Les tissus mous de la cavité buccale (la langue, les muqueuses, la gencive), les dents, la présence éventuelle d'une prothèse adjointe ainsi que la salive créent un écosystème complexe. Parmi les 700 espèces bactériennes recensées, une majorité est cultivable. Le reste a été identifié grâce à la biologie moléculaire, et notamment au séquençage de l'ADN.

Dans des conditions physiologiques normales, il existe une balance écologique entre la flore orale et l'hôte. Ces derniers vivent en harmonie avec une coévolution mutuellement bénéfique. La flore dite commensale, c'est-à-dire compatible avec la santé buccale, est une flore de barrière. Elle joue un rôle essentiel dans les mécanismes de défense naturelle de l'individu puisqu'elle s'oppose à l'installation et à la prolifération des bactéries pathogènes opportunistes par l'occupation de l'espace, l'utilisation des nutriments présents et par l'excrétion de divers facteurs. Mais tout désordre de l'état général ou local risque d'entraîner un déséquilibre, associé à des variations quantitatives et qualitatives de cette flore, avec apparition éventuelle de phénomènes inflammatoires et/ou infectieux (Vernis, 2017).

3.1.1. Genre *Streptococcus*

Les streptocoques oraux sont des bactéries commensales de la cavité buccale et participent à l'équilibre écologique de la flore buccale. Ils sont divisés en quatre groupes phylogéniques :

Tableau 03. Localisation et pathologies liées aux bactéries du genre streptocoque

(Chardin *et al.*, 2006).

Groupe <i>salivarius</i>	<i>S. salivarius</i> représente à peu près 20% de la flore buccale, présents dans les sillons gingivaux, la plaque supra gingivale, sur les muqueuses, et la salive. <i>Streptococcus salivarius</i> colonise essentiellement la salive, ainsi que la langue.
Groupe <i>mutans</i>	<i>Streptococcus. Mutans</i> et <i>S. Sobrinus</i> principalement responsable de l'initiation des lésions carieuses.
Groupe <i>anginosus</i>	<i>S. intermedius</i> et <i>S. anginosus</i> repérés dans les lésions péri-apicales.
Groupe <i>mitis</i>	<i>S. australis</i> , <i>S. sanguinis</i> , <i>S. gordonii</i> , <i>S. parasanguinis</i> , <i>S. oralis</i> : peuvent être à l'origine d'endocardites suite à des soins dentaires invasifs (détartrage, chirurgie. De même les streptocoques ont été isolés dans les nécroses pulpaire, les gingivites chroniques et les péri-implantites.

La présence des streptocoques dans la cavité buccale est dominante par rapport aux autres souches ils représentent plus de 20% de la flore buccale. ; Pratiquement il s'agit des premiers colonisateurs de la bouche, les deux jours qui suivent la naissance. Le genre *Streptococcus* est présent sur toutes les surfaces buccales, avec des spécificités selon les espèces (Figure 5). *S. salivarius* est majoritairement présent dans la salive (environ $1-4.10^7$ UFC/mL), sur les muqueuses, le dos de la langue (Figure 6) mais aussi dans le pharynx ou encore dans le tube digestif (Chardin *et al.*, 2006).

Remarque : *S. salivarius* est une bactérie orale dont la croissance dépend de l'environnement buccal, notamment de l'action de la salive sur les bactéries, mais également des paramètres physico-chimiques et de la disponibilité en nutriments au sein de la bouche.

Les espèces les plus présentes dans la bouche sont *S. salivarius*, *S. mitis* et *S. oralis* qui, à elles trois, représentent 83% des streptocoques identifiés (Figure 07).

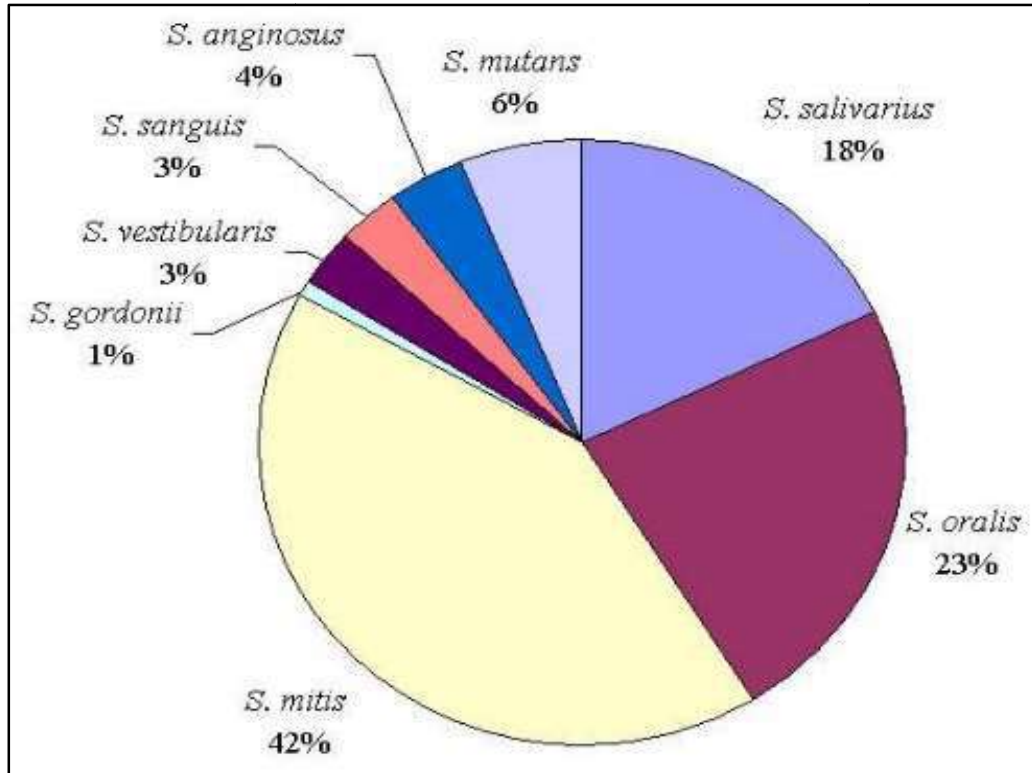


Figure 07. Répartition des Streptocoques dans la cavité buccale selon l'espèce (Roger, 2011).

Cette prédominance du genre *Streptococcus* s'explique tout d'abord par leur pouvoir d'inhibition sur d'autres microorganismes, grâce à la production d'acides organiques, d' H_2O_2 et de bactériocines. Leur taux de croissance très compétitif et la diversité des niches écologiques buccales qu'ils occupent sont également des atouts majeurs (Roger, 2011).

3.1.2. Genre *Staphylococcus*

Les staphylocoques ne font pas partie de la flore commensale orale, en revanche ils constituent une composante importante de la microflore de la peau et de la muqueuse nasale.

Ils ont été isolés dans la plaque prothétique, chez des sujets généralement immunodéprimés et dans de nombreuses infections orales (ostéites, infections parodontales).

Les staphylocoques appartiennent aux groupes de *Staphylococcus* des *Cocci* catalase +, ce sont des bactéries ubiquistes, très répandus dans la nature ; ils peuvent être saprophytes, commensaux ou pathogènes (tableau 04).

Tableau 04. Classification, localisation et troubles sanitaires liés aux bactéries du genre Staphylocoques (*Bergey's, 2001*)

Saprophytes	Retrouvés dans l'air, le sol, et l'eau
Commensaux	Retrouvés sur la peau et les muqueuses de nombreux mammifères, ils sont surtout localisés dans les cavités buccale et nasale, les plis cutanés, le périnée et le côlon
Pathogènes	Dans ce cas ils sont responsables d'infections diverses chez l'homme et les animaux : -Infections localisées : dermites, métrites, vaginites, arthrites, mammites... -Infection généralisées : septicémies, méningites...

3.2. Bactéries de la flore intestinale

Les entérobactéries sont des bacilles Gram négatif retrouvés partout dans le sol, l'eau et surtout dans l'intestin de l'homme et des animaux (**Liu *et al.*, 2010**). La famille des *Enterobacteriaceae* est née en 1937 lorsqu'Otto Rahn proposa le genre *Enterobacter* pour regrouper les microorganismes. Ce sont des bactéries commensales ou pathologiques du tube digestif de l'homme et des animaux. Elles sont très fréquentes en pathologie humaine, les espèces qui composent cette famille sont, en effet, soit parasites, soit commensales (*Escherichia coli*, *Klebsiella sp*) ou soit encore saprophytes (*Serratia sp*, *Enterobacter sp*) (**Nauciel et Vildé, 2005**).

3.2.1. Genre *Escherichia*

En 1885, l'allemand Theodor Escherich décrit pour la première fois la bactérie *Escherichia coli*, bactérie isolée à partir de selles de nourrissons, qu'il nomma tout d'abord *Bacterium coli commune* (Cowan *et al.*, 1954). *E. coli* est une bactérie appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, constitue une espèce bactérienne sous-dominante du microbiote. Il existe au sein du genre *Escherichia* cinq autres espèces : *E. albertii*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* et *E. vulneris* (**Avril *et al.*, 2016**).

Une bactérie du genre *Escherichia* est un bacille de longueur moyenne 1 à 2 µm et de diamètre d'environ 0,4 µm, à coloration de Gram négative, aérobie-anaérobie facultatif (AAF), possédant une nitrate réductase et une catalase, dépourvue d'oxydase et non halophile. *E. coli* est une bactérie immobile ou mobile avec une structure flagellaire péritriche et non-sporulée. Sa température optimale de croissance est de 37°C. Bactérie non exigeante, elle est capable de croître sur des milieux ordinaires tels que le milieu TSA (trypticase-caséine-soja). *E. coli* est capable de fermenter le lactose et de produire de l'indole et possède différentes enzymes telles que la lysine décarboxylase (LDC), l'ornithine décarboxylase (ODC) et la glucuronidase.

La majorité des souches fermentent le sorbitol. La plupart des caractéristiques biochimiques sont partagées par l'ensemble des *E. coli* en dehors du sérotype O157:H7 qui ne fermentent pas le sorbitol, à l'exception de certains mutants qui ont la capacité de fermenter ce sucre. Caractérisée par sa rapidité de culture (temps de génération de 20-30 min) et par un génome entièrement séquencé et bien connu (King *et al.*, 2016).

On trouve *E. coli* de façon commensale dans la flore intestinale et fécale, tant chez les humains que chez certains animaux. La flore intestinale est colonisée peu après la naissance. La bactérie et l'hôte coexistent sans impact sur leur santé respective. Cette coexistence entraîne des bénéfices mutuels (Kaper *et al.*, 2004). Elles peuvent leur fournir de la vitamine K2 et les protègent d'invasion par des bactéries pathogènes, c'est une bactérie versatile qui comprend, à la fois, des bactéries commensales du tube digestif, des bactéries pathogènes et des bactéries adaptées à l'environnement (Tenailon *et al.*, 2010).

3.3. Caractérisation de la toxicité de quelques nanoparticules sur les bactéries de l'Homme

De manière générale, les études relatives aux interrelations entre ingestion de nanoparticules, modulation du microbiote et impact sur la santé de l'hôte sont rares (Kim *et al.*, 2008 ; Mathelié-Guinelet, 2017).

3.3.1. Interaction NPsTiO₂ – Bactéries

Il existe des contradictions quant à l'effet joué par la taille des nanoparticules de TiO₂. Pour Adams *et al.*, (2006), et Verran *et al.*, (2007), elle n'a aucun effet, tandis que pour Qi *et al.*, (2006), la toxicité augmente lorsque la taille diminue. Ces différences proviennent probablement des différences de composition des nanoparticules et des conditions dans lesquelles les tests de toxicité ont été réalisés, les nanoparticules peuvent notamment avoir tendance à s'agréger (Verran *et al.*, 2007).

Les nanoparticules de TiO₂ présentent systématiquement un effet bactéricide qui, comme celui des nanoparticules de ZnO (Adams *et al.*, 2006), est accru sous l'effet d'une irradiation (Adams *et al.*, 2006 ; Kamar *et al.*, 2011). Les nanoparticules sont en général adsorbées sur la paroi cellulaire par des forces électrostatiques. La toxicité serait alors provoquée par la proximité des nanoparticules avec la membrane cellulaire et par la libération de ROS (espèces radicalaires). En effet, les ROS générées par l'oxydation des nanoparticules (TiO₂ et ZnO notamment) provoqueraient des réactions radicalaires en chaînes destructrices (peroxydation lipidique) dans la couche de lipopolysaccharides bactériens. Ces derniers résistent par ailleurs moins bien à l'irradiation en présence de TiO₂ que les peptidoglycanes (Kiwi et Nadtochenko, 2005). Sunada *et al.*, (2003), démontrent notamment une destruction de la membrane externe puis interne d'*E. coli* en présence de NPsTiO₂.

Concernant l'une exposition orale aux nano-TiO₂, aucune étude, ne confirme son impact sur les bactéries du microbiote. De plus, la capacité de piégeage/internalisation des nanoparticules par les bactéries, avec de possibles conséquences sur la croissance bactérienne et leur activité métabolique propre, reste peu décrite. Les travaux sur les interactions bactéries/TiO₂ se focalisent essentiellement sur la bactérie modèle *Escherichia coli*. (Liu, 2010 ; Zhukova, 2012) et les propriétés antibactériennes du nano-TiO₂.

Ces dernières sont généralement associées à des effets photo-catalytiques du composé, même s'il a été décrit chez *E. coli* des dommages à la membrane externe au niveau des lipopolysaccharides, ainsi qu'une diminution de la fluidité membranaire après traitement au TiO₂ seul et sans irradiation UV. (Liu, 2010). Il a également été montré que le nano-TiO₂ peut induire, chez *E. coli* et à l'abri de la lumière, à la fois un stress oxydant et des dommages à l'ADN (Kumar *et al.*, 2011).

3.3.2. Interaction NPsAg – Bactéries

De nombreuses études sont dédiées à la compréhension des mécanismes d'action des NPsAg sur les bactéries. En raison de leur complexité, ces mécanismes ne sont pas complètement élucidés à l'heure actuelle et dépendent du genre et de l'espèce du microorganisme considéré. Les nanoparticules d'argent s'attachent à la membrane cellulaire et pénètrent également à l'intérieur des bactéries. Les nanoparticules attaquent de préférence la chaîne respiratoire, la division cellulaire et provoquent par conséquence la nécrose cellulaire (Holt et Bard, 2005 ; Rai *et al.*, 2009). Leur mécanisme d'action est favorisé par leur interaction avec la paroi du microorganisme puis la pénétration dans la cellule rendue possible par «évitement» des mécanismes de défense observés dans le cas de particules de

taille plus importante, et enfin par leur interaction avec les constituants cellulaires (ADN, protéines, enzymes) (Sondi et Salopek-Sondi, 2004).

Selon Kim *et al.*, (2007), une autre étude, l'action biocide des nanoparticules est liée à la présence de radicaux libres, générés en surface, qui endommagent la membrane lipidique des cellules. Par ailleurs, Kampmann et ses collaborateurs (2008) déterminent que la fixation de l'argent sur les bactéries inhibe les protéines, provoque le détachement de la paroi cellulaire, la condensation de l'ADN et mène à la destruction de la bactérie.

Certains cas d'internalisation de nanoparticules d'argent (80 nm) sont observés chez des bactéries traitées aux antibiotiques. Celles-ci sont plus perméables aux nanoparticules que les bactéries non traitées (Xu *et al.*, 2004). Les nanoparticules d'argent s'agrègent dans les électrolytes forts. Par ajout d'albumine de sérum bovin (BSA) l'agrégation est évitée et l'activité bactéricide conservée (Lok *et al.*, 2007 ; Sondi et Salopek-Sondi, 2004), observent également que les nanoparticules d'argent métalliques sont toxiques uniquement lorsque le contact a lieu sur un milieu solide contrairement au milieu liquide où ils ne notent qu'un retard de croissance.

D'après ces auteurs, l'explication tient à l'agrégation des nanoparticules d'argent avec les composants intracellulaires des cellules mortes. Une fois les nanoparticules agrégées, elles ne sont plus bactéricides, ce qui permet aux autres bactéries du milieu de se développer normalement. A noter que la présence de peptides et protéines extracellulaires provoquent également la précipitation des nanoparticules (Moreau *et al.*, 2007).

Dans une étude, menée chez le rat après 13 semaines de gavage oral quotidien (2 fois/jour) à des nanoparticules d'argent de métrologies (10,75 et 110 nm) et doses (9,18 et 36 mg/kg (p.c.) /jour) différentes, les auteurs constatent une augmentation générale des bactéries à Gram Négatif dans l'iléon. Le traitement avec les nanoparticules de taille 10 nm provoque une diminution des *Firmicutes*, plus particulièrement du genre *Lactobacillus*. Toutefois, cet effet ne semble pas spécifique à la forme nanoparticulaire de l'argent car des tendances similaires ont été retrouvées avec de l'acétate d'argent. (Gill, 2006). Il faut ici souligner que l'essentiel des résultats décrits dans la littérature portent sur la composition du microbiote sans établir de lien fonctionnel avec l'activité métabolique de ce dernier. (Gill, 2006).

Chapitre 2

Enquête sur les
additifs alimentaires

Afin d'évaluer la toxicité des additifs alimentaires incorporés dans les produits destinés à la consommation humaine, nous avons réalisé une enquête sur les produits mis en vente sur le marché algérien. Le principal objectif de cette démarche est de recenser les additifs alimentaires incorporés dans les produits qu'ils soient locaux ou importés, les classer par catégorie et ensuite, déterminer leur degré de toxicité et conséquences sur la santé des consommateurs.

1. DEROULEMENT DE L'ENQUETE

1.1. Choix des sites et durée de l'enquête

Un grand nombre de produits alimentaires mis en vente sur les rayons de divers espaces commerciaux a été traité, l'équivalent d'un total de 722 produits a fait l'objet de ce travail. L'enquête a scruté différentes classes de produits alimentaires destinés à la consommation humaine, La démarche a été réalisée sur divers lieux de vente de produits alimentaires (petites et moyennes surfaces et les hypermarchés). Cette enquête a cerné 4 grandes villes d'Algérie : Alger, Sétif, Skikda et Annaba, ainsi que leurs agglomérations. L'enquête a touché le maximum de produits disponibles sur le marché algérien qu'ils soient locaux ou importés. Notre enquête s'est déroulée aux sites choisis pendant 5 ans en ajoutant à chaque fois les nouveaux produits mis sur le marché et vérifiant la liste des ingrédients des produits déjà existants.

1.2. Protocole

La démarche de notre enquête dans les lieux commerciaux enquêtés a été de les parcourir et les visualiser rayon par rayon et catégorie par catégorie de produit. Durant cette opération, une gamme de produits a été sélectionnée, enregistrée dans des fichiers propres pour chaque classe alimentaire et photographiée, en se focalisant sur les mentions suivantes :

- Le non commercial du produit
- Le lieu de fabrication (pays d'origine).
- La composition du produit (liste des ingrédients) : celle-ci nous permettra d'inventorier les additifs alimentaires incorporés dans les produits.

Les informations récoltées à partir des notes et photographies réalisées ont été enregistrées et traitées par fichier Excel qui nous a permis le calcul des données recherchées et de procéder au calcul de leurs valeurs en pourcentage.

D'abord, nous avons classé les produits alimentaires dans leurs classes alimentaires et chacune de ces classes était subdivisée en sous classes. Le détail de cette partie est illustré dans le tableau (05).

Tableau 05. Nombre de produits inventoriés locaux et importés en fonction des classes alimentaires.

Classe alimentaire	Sous-classes alimentaires	Nombre de produits locaux	Nombre de produits importés
Laits et dérivés	Laits	12	11
	Yaourts	88	10
	Fromages	80	25
		180	46
Matières grasses	Huiles	06	04
	Beurres et margarines	15	09
	Crèmes fraîches	06	05
		27	18
Confiseries	Gâteaux et Biscuits	64	37
	Chocolats	34	25
	Bonbons	20	31
		118	93
Boissons	Boissons gazeuses	34	19
	Jus	87	25
	Sirops	04	06
	Boissons sans sucre	06	03
		131	53
Conserves	Conserves d'origine animale	07	25
	Conserves d'origine végétale	16	08
		23	33
Total des produits inventoriés		479	243

Deux critères de classification ont fait l'objet de notre étude. Dans un premier temps, les additifs alimentaires incorporés dans les produits inventoriés sont classés en fonction de leurs catégories en se basant sur la réglementation UE et algérienne du décret exécutif N°12-214 du JORA 2012.

Dans un deuxième temps, ces additifs alimentaires sont classés en fonction de leurs degrés de toxicité en suivant le guide du *Codex alimentarius* ainsi que le travail de synthèse réalisé par **Gouget (2008)** et regroupé sur le site www.additifs-alimentaires.net. Cinq classes sont déterminées : AA Très toxiques, AA Toxiques, AA Modérément toxiques, AA Douteux et AA Peu ou pas toxiques.

2. RESULTATS

Notre enquête a porté sur 722 produits scindés en deux : 479 produits locaux et 243 produits importés. Quel que soit l'origine des produits inventoriés, ils sont répartis en cinq grandes classes alimentaires : Lait et dérivés, matières grasses, confiseries, boissons et conserves.

Chapitre 2 : Enquête sur les Additifs Alimentaires

Les résultats obtenus lors de notre enquête sont traités dans un premier temps en fonction de différentes catégories d'additifs alimentaires, et dans un deuxième temps, en fonction du degré de toxicité des additifs alimentaires qui y sont incorporés (toute catégorie confondue).

2.1. En fonction des catégories

2.1.1. Laits et dérivés

Nous rappelons que cette classe contient au total 180 produits locaux et 46 produits importés, répartis en trois sous classes :

Laits : 12 produits locaux et 11 importés.

Yaourts : 88 produits locaux et 10 importés.

Fromages : 80 produits locaux et 25 importés.

Selon notre enquête, nous constatons que le nombre des additifs en commun est assez important (dix-huit additifs), Ces derniers appartiennent à cinq principales catégories illustrées dans le tableau (6).

Tableau 06. Additifs alimentaires communs présents dans le lait et ses dérivés.

Catégorie/ Classe	A.A	Laits		Yaourts		Fromages	
		Loc*	Imp*	Loc*	Imp*	Loc*	Imp*
Colorants	SIN160a	/	/	0	40	50	33,33
	SIN160a ii	50	0	1	0	16,67	66,67
Conservateur	SIN202	/	/	92	0	83	0
Acidifiants	SIN330	100	0	48	50	51	33,33
	SIN 331	0	50	3,84	50	13,11	33,33
	SIN 331iii	/	/	25	0	3,28	0
Agents des textures	SIN 404	/	/	1,16	0	1,20	0
	SIN 407	14,29	0	40,22	6,67	28,48	25,00
	SIN 410	7,76	0	9,19	0	7,22	25
	SIN 412	14,29	0	4,60	0	1,20	0
	SIN 414	/	/	2,29	0	1,20	0
	SIN 415	4,76	0	10,34	6,67	1,20	0
	SIN 440	10	0	16,09	20	/	/
	SIN 450	4,76	0	/	/	30,12	25
	SIN 471	4,76	0	1,16	0	/	/
Amidons modifiés	SIN 1422	100	0	22	78	100	0,00

Loc* : Local Imp* : Importé

Le Bêta-carotènes de légumes (SIN160aii) est le colorant commun présent que dans les laits, les yaourts et les fromages fabriquées localement avec des pourcentages varies entre 50% ; 3.37% et 16.67% respectivement parmi tous les colorants présents dans les laits et dérivés. Tandis que le Provitamine A(SIN160a) c'est un additif commun entre le yaourt importé (40%) et le fromage local (50%). Nous remarquons que les agents de texture en commun sont les plus élève (neuf agent de texture) parmi tous les additifs sont présent dans le lait et ses dérivés à des pourcentages variés. Les autres additifs sont incorporés avec des pourcentages variables dans chacune des sous classes.

- **Agents de texture dans les laits**

Dans les laits, plusieurs agents de texture incorporés (épaississants, stabilisants, émulsifiants, gélifiants, texturants) avec des pourcentages différents, sont représentés dans la figure (08).

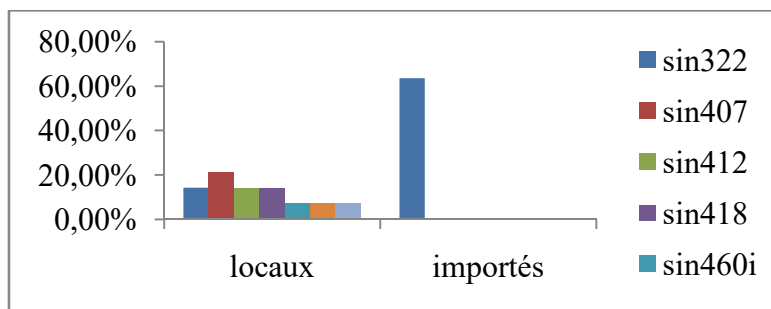


Figure 08. Répartition des agents de texture dans les laits locaux et importés.

La plupart des agents de texture présents dans les laits locaux sont avec des faibles pourcentages ne dépassant pas les 20%, d'une autre part le seul agent de texture présent dans les laits importés est lécithine (sin322) avec un pourcentage de 63.63%.

Un seul gaz d'emballage est trouvé : l'azote (sin941) dans les laits importés seulement avec un pourcentage de 18.18%. Un amidon modifié trouvé ; adipate de diamidonacétylé (sin1422) avec un pourcentage de 14.28% dans les laits locaux seulement. Ce sont uniquement les laits importés qui contiennent les arômes ; il s'agit de l'arôme synthétique avec un pourcentage de 9.09%.

- **Colorants dans les yaourts**

Dans les yaourts, 9/10 colorants sont présents dans les yaourts locaux, à l'exception du paprika (sin160c). Pour les yaourts importés, 3 colorants sont retrouvés : la curcumine (sin100), les carmins (sin120) et le paprika (sin160c) avec un pourcentage de (50%) pour chacun d'entre eux et une absence totale de tous les autres colorants ; ils sont représentés dans l'histogramme de la figure (09).

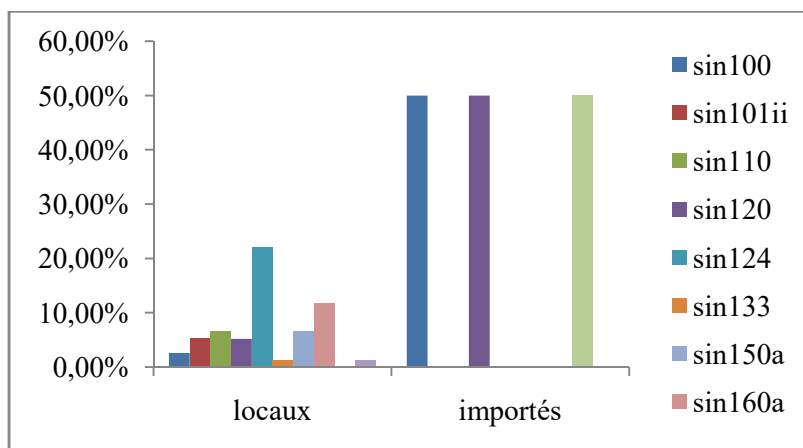


Figure 09. Répartition des colorants dans les yaourts locaux et importés.

Le sorbate de potassium (sin202) est le seul conservateur, présent uniquement dans les yaourts locaux avec un pourcentage de 37.66%. Aussi, un seul antioxydant est ajouté dans les yaourts locaux sous le nom d'acide ascorbique (vitamine C) (sin300), avec un pourcentage de 1.29%. Aucune présence des antioxydants n'a été enregistrée dans les yaourts importés. Deux édulcorants sont retrouvés dans les yaourts locaux : l'aspartame (sin951) et le sucralose (sin955) avec des pourcentages de 1.29% et 2.59% respectivement. Nous retrouvons seulement les arômes synthétiques et uniquement dans les yaourts locaux avec le pourcentage de 83.11%.

• **Amidons modifiés dans les yaourts**

Trois amidons modifiés sont présents dans les yaourts locaux avec des pourcentages entre 20.77% et 55.84%, et un seul dans 50% des produits importés (figure 10).

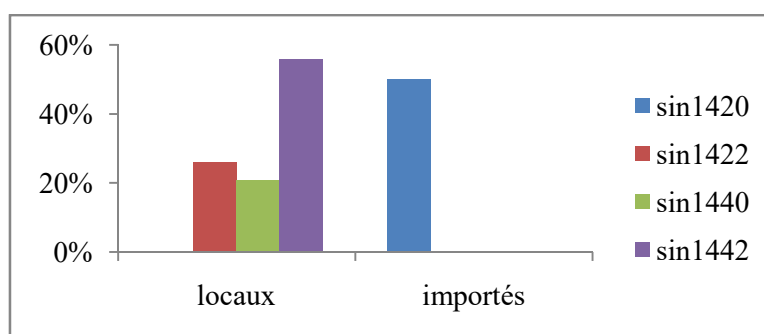


Figure10. Répartition des amidons modifiés dans les yaourts locaux et importés.

• **Colorants et conservateurs dans les fromages**

En ce qui concerne les fromages, nous retrouvons une variété d'additifs alimentaires qui s'ajoutent à ceux retrouvés en commun dans le lait et les yaourts inventoriés. Les résultats des colorants et des conservateurs sont représentés dans la figure (11).



Figure 11. Répartition des colorants (A) et conservateurs (B) dans les fromages locaux et importés.

D'après les résultats, nous constatons que le nombre des colorants dans les produits importés est supérieur à celui des produits locaux avec un pourcentage élevé de carotène (sin160a) dans les produits importés. Outre ; nous avons aussi le ponceau 4R (sin124) qui est présent seulement dans les produits locaux contrairement aux produits importés. Nous trouvons que le nombre des conservateurs dans les produits locaux est supérieur à celui des produits importés avec un pourcentage important du sorbate de potassium (sin202) dans les locaux (15%).

Pour les antioxydants incorporés, les fromages locaux ne contiennent que l'extrait riche en tocophérol (sin306) avec un pourcentage de (1,53%) alors que les importés contiennent des lécithines (sin322) avec pourcentage de (5,55%).

- **Acidifiants et fourre-tout dans les fromages**

Les fromages inclus dans notre étude contiennent huit différents types d'acidifiants et cinq fourre-tout (agent levant, stabilisants, affermissant, fixateurs) qui sont représentés dans la figure (12)

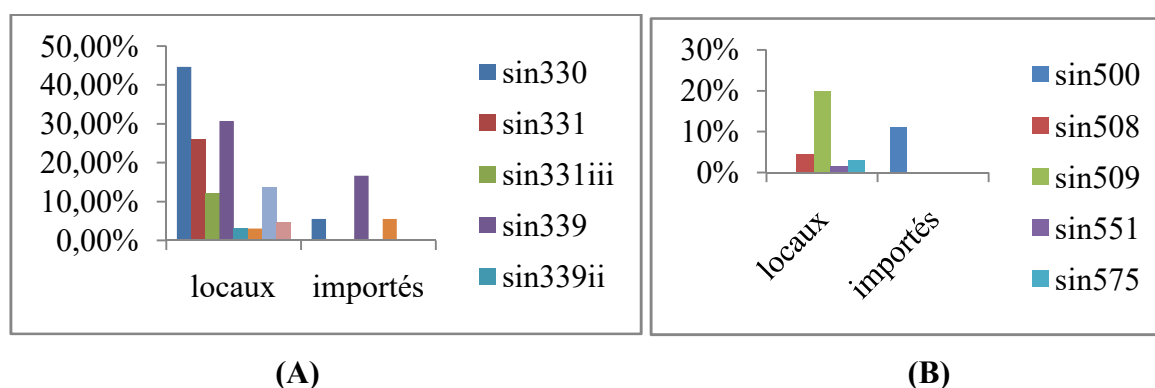


Figure 12. Répartition des acidifiants et les fourre-tout (B) dans les fromages locaux et importés.

D'après ces résultats, nous trouvons que les produits locaux contiennent un nombre important d'acidifiants avec un pourcentage de (44,61%) d'acide citrique (sin330), de (30,76%) de phosphate de sodium (sin339) et de (26,15%) de citrate de sodium. Pour la catégorie des fourre-tout, elle n'est

représentée que dans les produits locaux excepté le carbonate de sodium (sin500) avec un pourcentage de (11,11%) retrouvé dans les fromages importés.

- **Agents de texture dans les fromages**

Les fromages contiennent 18 types d'agents de texture (épaississants, stabilisants, gélifiants et émulsifiants), les résultats sont représentés dans la figure (13).

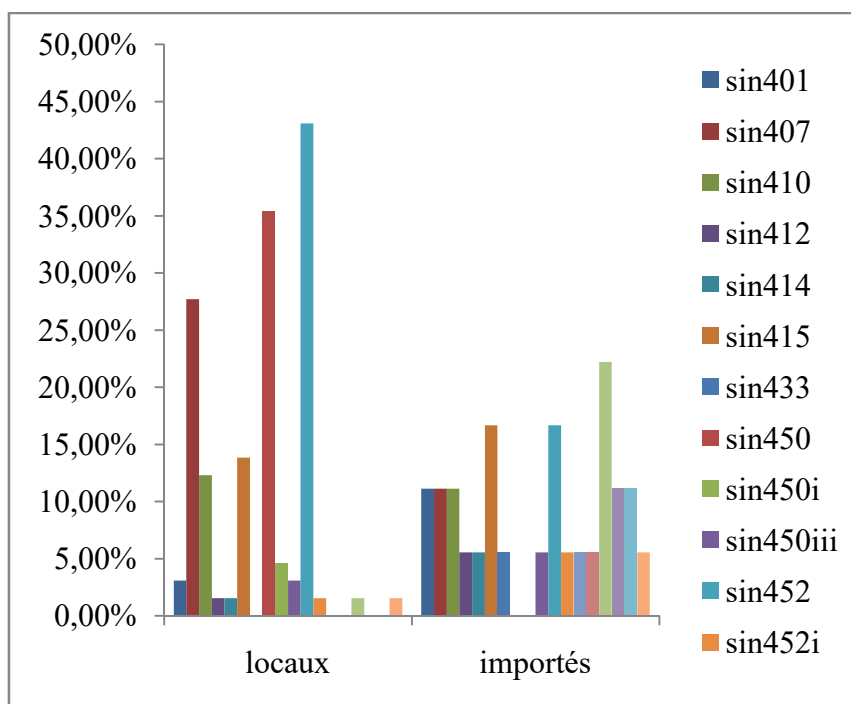


Figure 13. Répartition des agents de textures dans les fromages locaux et importés.

D'après les résultats, nous remarquons que les agents de textures sont présents dans les deux produits locaux et importés avec des pourcentages plus élevés de diphosphate (sin450) et polyphosphate (sin452).

2.1.2. Matières grasses

Nous rappelons que cette classe contient au total 27 produits locaux et 09 produits importés, répartis en trois sous classes :

Huiles : 06 produits locaux et 04 importés.

Beurres et margarines : 15 produits locaux et 09 importés.

Crèmes fraîches : 06 produits locaux et 05 importés.

Selon nos résultats, nous constatons la présence de trois additifs en commun dans la matière grasse (huiles, beurres et margarines et crèmes fraîches) répartis en trois catégories.

Tableau 07. Pourcentage des additifs communs présents dans la matière grasse.

Catégorie/Classe	A.A	Huiles		Beurres et margarines		Crèmes fraîches	
		Loc*	Imp*	Loc*	Imp*	Loc*	Imp*
Colorant	SIN160ai	/	/	40	0	0	100
Antioxydant	SIN319	100	0	16,66	0	/	/
Acidifiant	SIN330	100	0	100	100	0	50

Loc* : Local Imp* : Importé

Les résultats de notre enquête démontrent la présence d'un seul acidifiant en commun l'acide citrique (SIN330) parmi tous les additifs présents dans les matières grasse. Ce dernier, présent dans les huiles fabriquées localement (100%) et dans les crèmes fraîches importés avec un taux 50% alors que il est présent dans les beurres et margarines locaux et importés avec un pourcentage idem 100%.par contre le Beta carotène de synthèse (SIN160ai) est le seul colorant en commun présent dans les beurres et margarines locaux avec un taux de 40% alors qu'il est présent dans toutes les crème fraîches importées. Cependant les huiles sont dépourvues de colorants (tableau 07).

- **Conservateurs et antioxydants dans les beurres et margarines**

Pour la sous classe des beurres et margarines et en plus des additifs en commun recensés et présents dans les huiles et les crèmes fraîches, nous retrouvons d'autres additifs présents détaillés dans la figure (14).

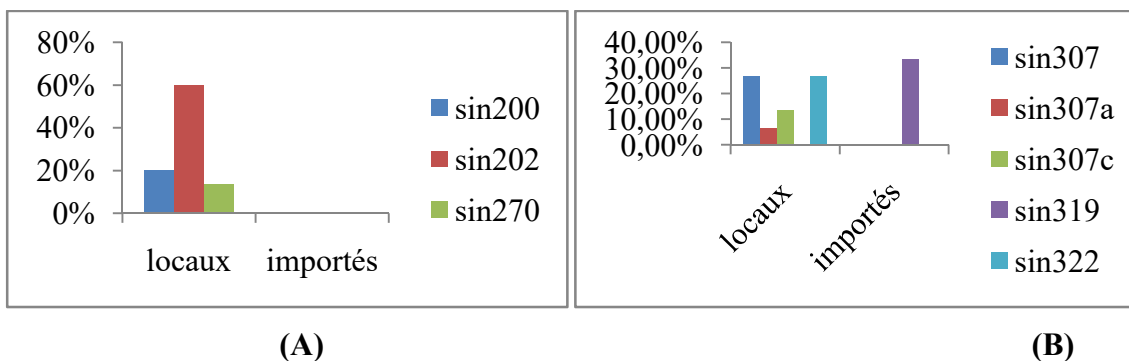


Figure 14. Répartition des conservateurs (A) et antioxydants (B) dans les beurres et margarines locaux et importés.

Nous remarquons que les conservateurs sont présents seulement dans les produits locaux avec un pourcentage de (60%) de sorbate de potassium (sin202) et que la majorité des antioxydants sont présents dans les produits locaux. En outre, le butylhydroquinone tertiaire (sin319) se trouve seulement dans les produits importés avec un pourcentage d'environ (33,33%). Uniquement dans les beurres locaux, un seul amidon est présent : l'amidon blanchi (sin1403) avec 7.2% et un seul type d'arômes : l'arôme synthétique avec 20%.

- **Agents de texture dans les beurres**

Le nombre d'agents de texture (épaississant, gélifiant, stabilisant et émulsifiant) dans les beurres est de quatre comme l'indique la figure (15).

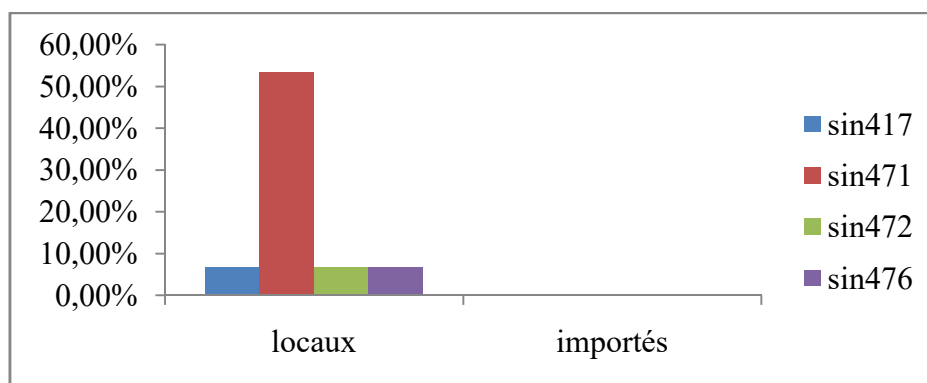


Figure 15. Répartition des agents de texture dans les beurres locaux et importés.

D'après les résultats de notre enquête, nous trouvons que les agents de textures sont présents seulement dans les beurres locaux avec un pourcentage de (53,33%) pour le mono et di-glycérade d'acide gras (SIN417) et de 5% pour les trois autres agents de texture.

- **Additifs alimentaires non communs présents dans les crèmes fraîches**

Pour les crèmes fraîches, la figure (16) illustre le nombre d'additifs alimentaires incorporés dans cette sous classe et qui ne sont pas communs avec les autres sous classes. Le SIN471 et le SIN 1422 sont les additifs les plus présents dans les crèmes fraîches locales.

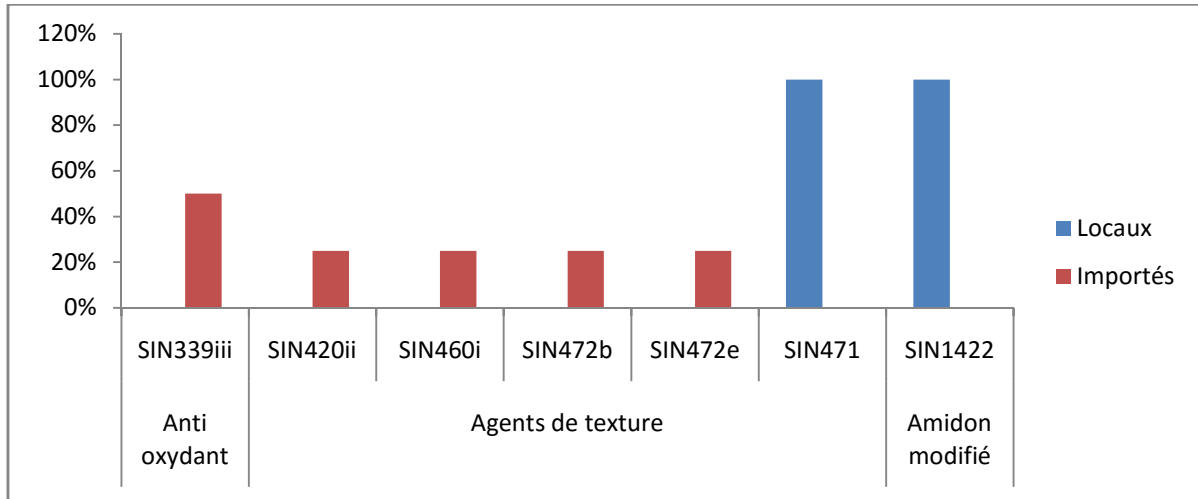


Figure 16. Répartition des additifs alimentaires non communs incorporés aux crèmes fraîches locales et importées.

2.1.3. Confiseries

Nous rappelons que cette classe comprend au total 118 produits locaux et 93 produits importés, répartis en trois sous classes :

Gâteaux et biscuits : 64 produits locaux et 37 importés.

Chocolats : 34 produits locaux et 25 importés.

Bonbons : 20 produits locaux et 31 importés.

Selon notre enquête nous constatons la présence de plusieurs additifs en communs incorporés dans les confiseries répartis en sept catégories (tableau 08).

Tableau 08. Pourcentage des additifs communs présents dans les confiseries.

Catégorie/ Classe	A.A	Gâteaux et Biscuits		Chocolats		Bonbons	
		Loc*	Imp*	Loc*	Imp*	Loc*	Imp*
Colorants	SIN100	0	50	0	4.35	0	11.59
	SIN102	/	/	16.67	4.35	12.5	0
	SIN 110	/	/	16.67	0	4.16	0
	SIN 124	11.11	0	50	4.35	16.66	0
	SIN 129	/	/	16.67	0	0	1.45
	SIN 132	/	/	0	4.35	4.16	2.89
	SIN 133	/	/	0	13.04	4.16	13.04
	SIN 140	11.11	0	0	17.38	0	4.35
	SIN 150a	/	/	0	4.35	/	/
	SIN 160a	/	/	0	13.04	4.16	8.70

Chapitre 2 : Enquête sur les Additifs Alimentaires

	SIN 160c	/	/	0	4.35	0	7.25
	SIN 162	/	/	0	8.70	0	8.70
	SIN 163	/	/	0	13.04	4.16	4.35
	SIN 170	/	/	0	4.35	4.16	1.45
	SIN 171	0	50	/		4.16	18.84
Conservateur	SIN 270	10.72	0	/	/	100	100
Antioxydants	SIN 304	12.5	0	0	50	/	/
	SIN 320	12.5	0	/	/	0	7.69
Acidifiants	SIN 330	100	100	80	75	/	/
	SIN 331	/	/	0	25	100	18.75
	SIN 334	/	/	20	0	0	33.33
Agents de textures	SIN 322	35.59	50	/	/	38.46	38
	SIN 322i	12.71	0	/	/	7.69	0
	SIN 414	0	1.36	0	5.45	7.69	12
	SIN 420	3.39	2.70	0	1.82	15.39	8
	SIN 422	10.17	4.05	0	1.82	7.6	12
	SIN 440	0.85	2.7	0	5.45	15.39	8
	SIN 466	0	2.7	/	/	0	4
	SIN 471	9.32	6.76	3.77	3.64	0	2
	SIN 476	1.69	4.05	3.77	9.09	0	8
	SIN 1200	/	/	0	5.45	15.39	8
Fourre-tout	SIN 500	13.95	42.59	100	50	0	42.84
	SIN 503	23.26	27.78	0	16.67	0	14.29
Exhausteur de gout	SIN 621	100	0	/	/	/	/
Amidons modifiés	SIN 1422	50	33.33	/	/	100	0
	SIN 1520	50	33.33	50	0	/	/

Loc* : Local Imp* : Importé

Le Carbonate de sodium (SIN500) est présent dans les biscuits locaux (13.95%) et importés (42.59%) et 42.84% pour les bonbons importés et 100% pour chips et céréales alors qu'il est présent dans les chocolats locaux et importés avec un pourcentage allant du simple au double (50% et 100%) alors que ce dernier est totalement absent dans le chocolat poudre, par contre l'acide citrique (SIN270) est le seul conservateur en commun parmi tous les additifs présent dans les biscuits, et les bonbons avec des pourcentages variables.

- **Additifs non communs dans les gâteaux et biscuits** (colorants, conservateurs et antioxydants)

Trois catégories d'additifs sont retrouvées en plus des additifs communs avec les autres sous classes ; il s'agit de colorants, conservateurs et antioxydants. Le SIN150d est le colorant le plus présent parmi tous les additifs (colorants, conservateurs et antioxydants) présent dans les produits locaux à 66.67%. Tandis que le SIN282 est le moins abondant parmi tous les additifs présents dans les lots importés avec un taux de 11.11% (figure 17).

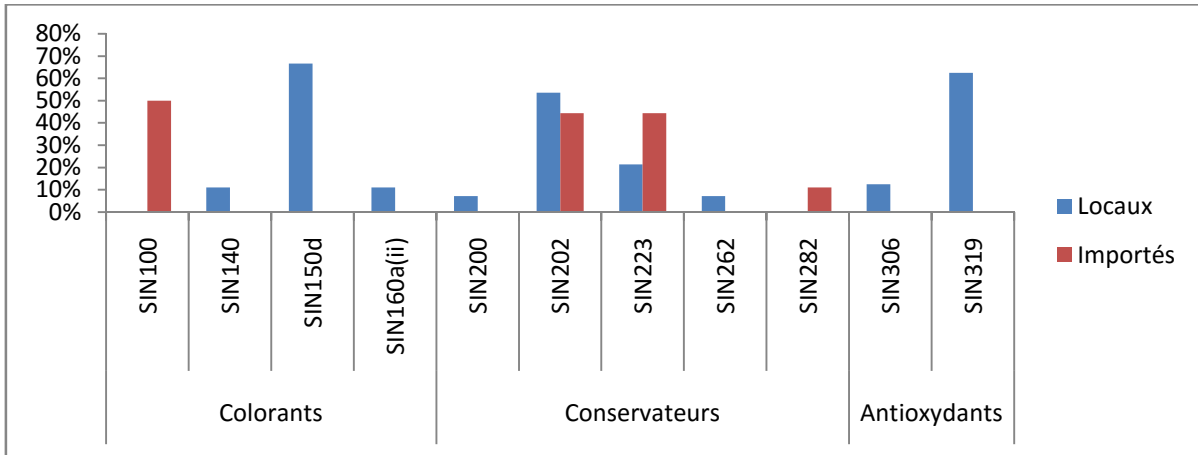


Figure 17. Répartition des additifs non communs (colorants, conservateurs et antioxydants) incorporés aux gâteaux et biscuits locaux et importés.

- **Additifs non communs dans les gâteaux et biscuits** (agents de textures, fourre-tout et amidons modifiés)

Le SIN1414 est l'amidon le plus présent parmi tous les additifs (agent de texture, fourretout et amidon modifié) avec un taux de 33.33% dans les produits importés. En revanche le SIN501 est le seul type de fourre-tout le moins utilisé (1.15%) parmi tous les additifs présents dans les produits fabriqués localement (figure 18).

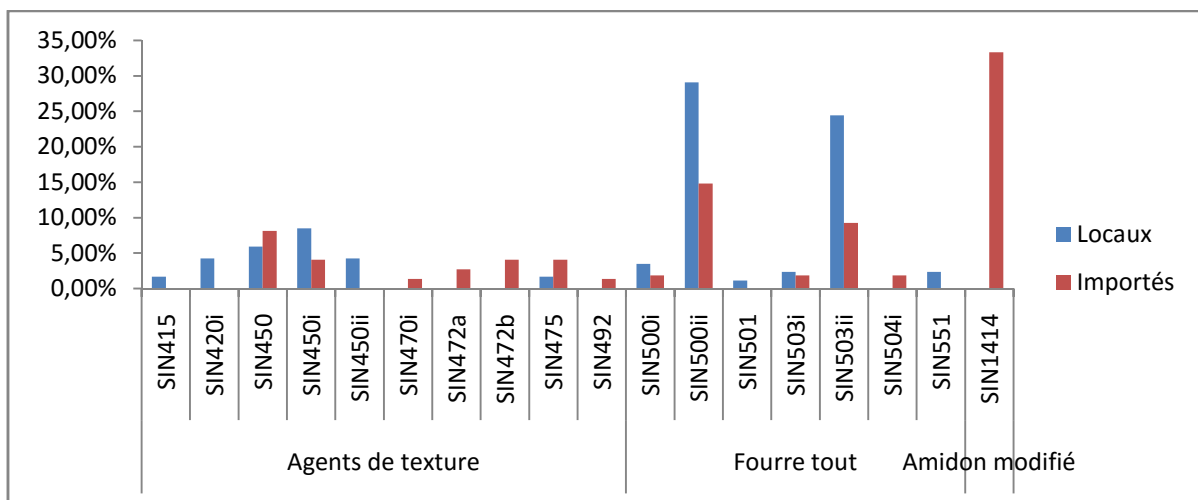


Figure 18. Répartition des additifs non communs (agents de textures, fourre-tout et amidons modifiés) incorporés aux gâteaux et biscuits locaux et importés.

- **Additifs non communs dans les chocolats** (colorants, antioxydants et agents de textures)

Le SIN339 est l'antioxydant le plus présent parmi tous les additifs (colorants, antioxydants, agent de texture) dans les produits importés avec un taux de 50% (figure 19).

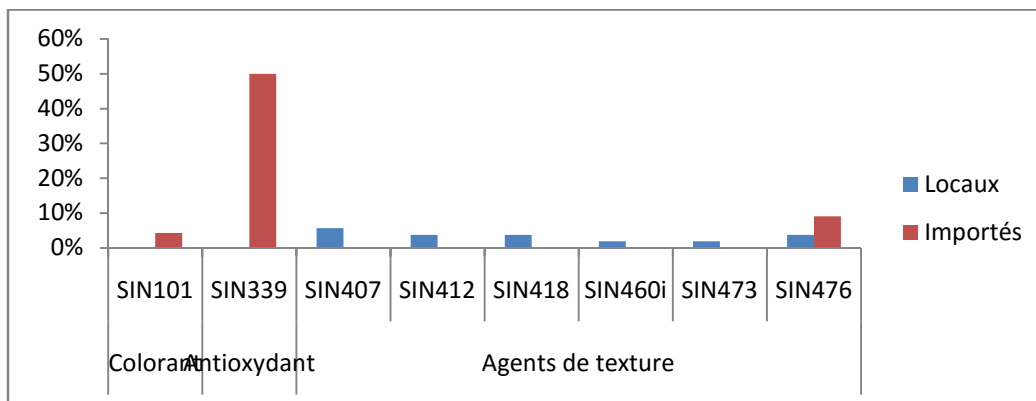


Figure 19. Répartition des additifs non communs (colorants, antioxydants et agents de textures) incorporés aux chocolats locaux et importés.

- **Additifs non communs dans les chocolats** (fourre-tout, gaz d'emballage, enzyme alimentaires et amidons modifiés)

Le SIN500i est le type de fourre tout le moins utilisé avec un taux de 33.33% parmi tous les additifs (fourre-tout, gaz d'emballage, enzyme alimentaire et amidon modifié) dans les produits importés alors que le SIN1519 est le seul additif retrouvé dans les lots locaux avec un taux de 50% (figure 20).

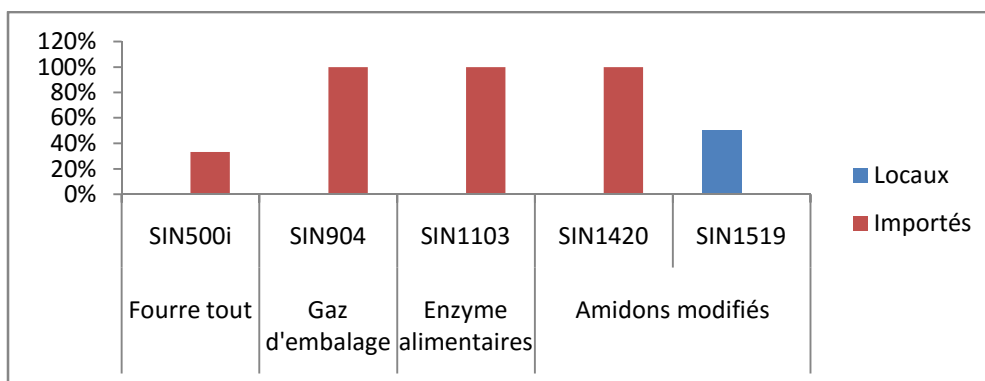


Figure 20. Répartition des additifs non communs (fourre-tout, gaz d'emballage, enzyme alimentaires et amidons modifiés) incorporés aux chocolats locaux et importés.

- **Colorants non communs dans les bonbons**

Pour la sous-classe des bonbons, le SIN 122 et le SIN142 sont les colorants les plus présents dans les produits locaux alors que le SIN104, SIN122, SIN141, SIN150d et SIN160e sont retrouvés dans les lots importés avec un faible taux de l'ordre de 4.35% (figure 21).

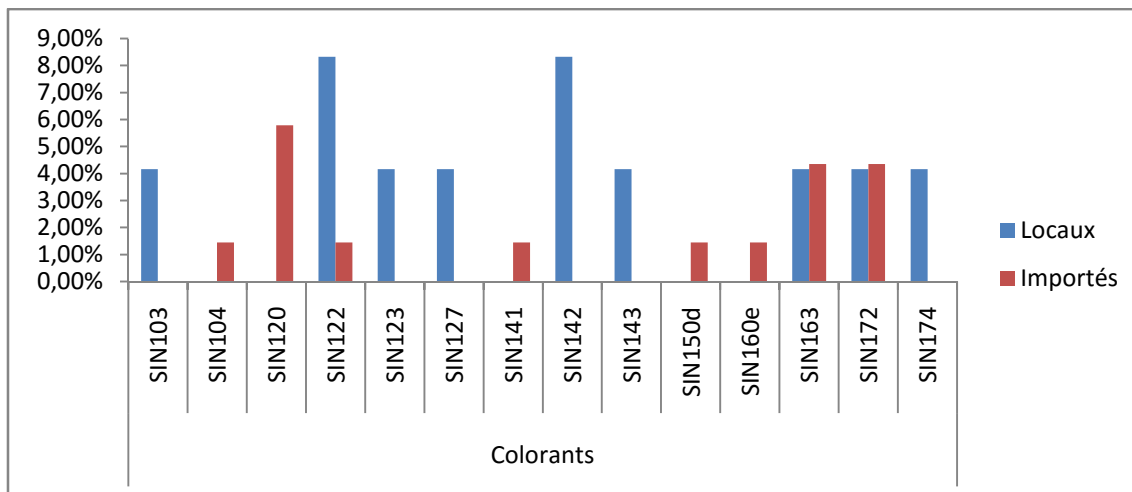


Figure 21. Répartition des colorants non communs incorporés aux bonbons locaux et importés.

- **Additifs non communs dans les bonbons** (antioxydants, acidifiants, agents de texture et fourre-tout)

Le SIN553ii est le type de fourre-tout le plus présent parmi tous les additifs (antioxydant, acidifiant, agent de texture et fourre-tout) dans les produits fabriqués localement (100%) alors que le SIN324 est l'antioxydant le moins utilisé parmi tous les additifs avec un taux de 3.85% (figure 22).

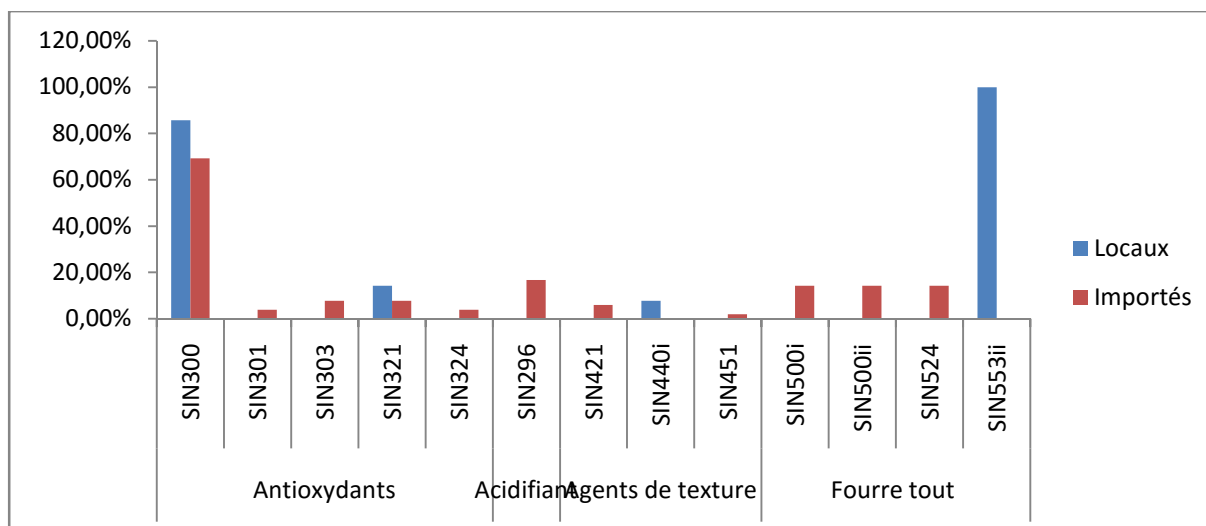


Figure 22. Répartition des additifs non communs (antioxydants, acidifiants, agents de texture et fourre-tout) incorporés aux bonbons locaux et importés.

- **Additifs non communs dans les bonbons** (agents d'emballage, édulcorants et amidons modifiés)

Le SIN1422 est le seul additif présent dans les lots locaux avec un taux de 100% alors que le SIN903 est le plus présent parmi tous les additifs présents des lots importés avec un pourcentage de 68.75% (figure 23).

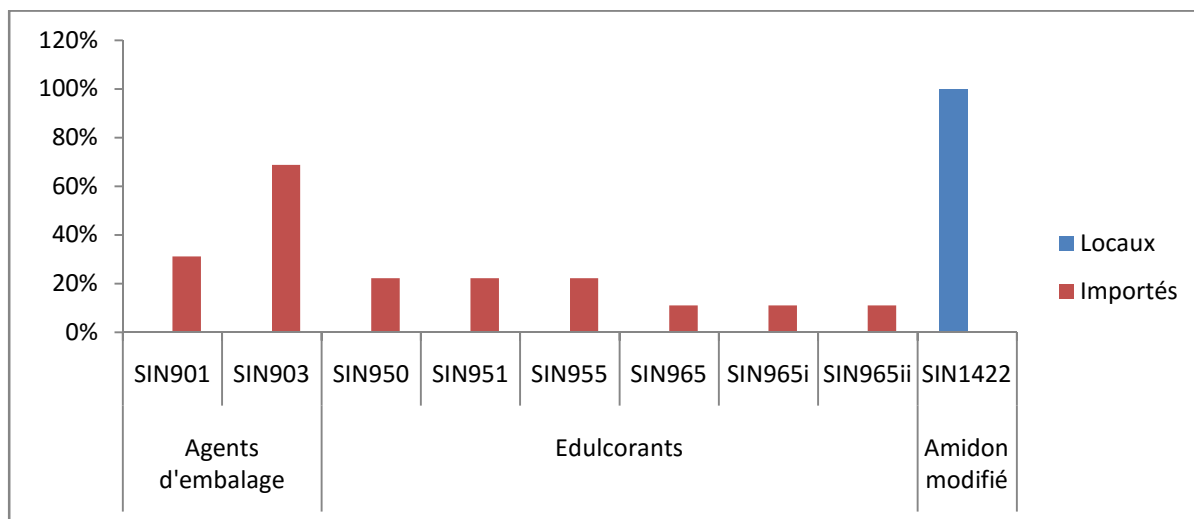


Figure 23. Répartition des additifs non communs (agents d'emballage, édulcorants et amidons modifiés) incorporés aux bonbons locaux et importés.

2.1.4. Boissons

Nous rappelons que cette classe contient au total 131 produits locaux et 53 produits importés, répartis en quatre sous classes :

Boissons gazeuses : 34 produits locaux et 19 importés.

Jus : 87 produits locaux et 25 importés.

Sirops : 04 produits locaux et 06 importés.

Boissons sans sucre (light) : 06 produits locaux et 03 importés.

Les résultats de notre enquête montrent que 26.32% des boissons gazeuses proviennent de France, 15.79% des U.S.A. Les produits d'origine d'Italie, Grande-Bretagne, Autriche et Tunisie font un pourcentage de 10,53% chacun 52% des jus importés sont importés de France, 24% d'Italie et 12% d'Espagne. Pour les sirops, c'est également la France qui exporte le plus en Algérie avec 83.33% du total des produits. Les boissons sans sucre importées proviennent de France, d'Espagne et des USA avec 33.33% chacun (résultats non montrés). Beaucoup de boissons importées surtout dans les moyennes surfaces sont enregistrées sans étiquette d'importation sur l'emballage.

Chapitre 2 : Enquête sur les Additifs Alimentaires

Sur un total de 26 additifs dans les boissons gazeuses locales, nous retrouvons 9 colorants et 5 agents de texture. Pour les boissons gazeuses importées et sur 25 additifs recensés, nous avons 9 colorants et 3 agents de texture. Pour les jus locaux et sur 29 additifs, 11 sont des colorants et 8 agents de texture et dans les 11 additifs des jus importés, 4 colorants. Les sirops locaux contiennent 5 additifs dont 3 colorants et ceux importés en contiennent 8 dont 5 colorants. D'autre part, les SFD locaux et importés contiennent 9 additifs dont 2 édulcorants; SIN950 (Acesulfame potassium) et SIN955 (Sucralose) avec des pourcentages de 83.33% pour le SIN950 dans les deux lots et 67.67% (Local) et 33.33% (importé) pour le SIN955. Tout le détail avec les pourcentages des différents additifs alimentaires enregistrés dans les produits inventoriés est illustré dans le tableau (09).

Tableau 09. Répartition des additifs alimentaires communs incorporés dans les boissons locales et importées en fonction de leur catégorie.

Catégories	Additifs alimentaires	Origine des produits	BG (%)	J (%)	S (%)	BSS (%)
Colorants	SIN102	Local	29.41	5.75	50	/
		Importé	5.26	/	33.33	/
	SIN104	Local	11.76	2.30	/	/
		Importé	/	/	/	/
	SIN110	Local	26.47	3.45	/	/
		Importé	5.26	/	/	/
	SIN122	Local	14.70	1.49	/	/
		Importé	/	/	16.67	/
	SIN124	Local	14.70	/	25	/
		Importé	/	/	16.67	/
	SIN133	Local	/	2.30	/	/
		Importé	5.26	/	33.33	/
	SIN142	Local	/	/	25	/
		Importé	5.26	/	/	/
	SIN150d	Local	35.29	/	/	16.67
		Importé	42.10	/	16.67	33.33
	SIN160a	Local	/	42.53	/	16.67
		Importé	/	20	/	/
Conservateurs	SIN202	Local	11.76	2.30	/	/
		Importé	15.79	4	/	/
	SIN211	Local	61.76	1.49	100	66.67
		Importé	21.05	/	/	33.33
	SIN290	Local	2.94	/	/	/

Chapitre 2 : Enquête sur les Additifs Alimentaires

		Importé	15.79	/	/	/
Antioxydants	SIN300	Local	29.41	42.53	/	/
		Importé	21.05	32	/	33.33
Acidifiants	SIN330	Local	82.35	77.01	100	66.67
		Importé	57.89	44	66.67	66.67
	SIN331	Local	5.88	2.30	/	16.67
		Importé	26.31	8.00	/	/
	SIN338	Local	11.76	/	/	16.67
		Importé	21.05	/	/	33.33
Agents de texture	SIN414	Local	20.59	14.94	/	/
		Importé	26.31	/	/	/
	SIN440i	Local	/	20.69	/	16.67
		Importé	/	20	/	/
	SIN445	Local	32.35	8.04	/	/
		Importé	15.79	/	16.67	/
Edulcorants	SIN950	Local	/	/	/	83.33
		Importé	10.53	/	/	66.67
	SIN955	Local	5.88	/	/	/
		Importé	5.26	/	/	33.33

Nous remarquons que les boissons gazeuses locales et importées incluent toutes les catégories, suivies par les boissons light, jus et enfin les sirops où peu d'additifs sont recensés. Les colorants sont la catégorie d'additifs alimentaires la plus utilisée dans la fabrication des boissons gazeuses et les sirops. Le Caramel IV (SIN150d) est incorporé dans 35.29 % et 42.10% dans les boissons gazeuses locales et importées respectivement. La tartrazine (SIN102) est retrouvé dans 50% des sirops locaux et 33.33% dans les sirops importés. Le benzoate sodium (SIN211) est le conservateur incorporé dans tous les sirops locaux et dans 66.67% et 61.7% des boissons light et boissons gazeuses locales respectivement. L'acide ascorbique (SIN300) est l'antioxydant utilisé dans 42.53% des jus locaux et 32% pour ceux importés. En outre, plusieurs additifs alimentaires sont enregistrés dans uniquement une seule classe parmi les 4 étudiées. Parmi lesquels, nous retrouvons le Rouge Allura AC (SIN 129) dans les boissons locales (8.82%) et importées (5.26%). Nous enregistrerons également l'édulcorant SIN951 (Aspartame) fortement incorporé dans les boissons light avec un pourcentage de 83.33% pour les produits locaux et 33.33% pour les produits importés.

- **Additifs non communs dans les boissons gazeuses**

Pour les boissons gazeuses, elles contiennent principalement des colorants avec des pourcentages variables qu'elles soient locales ou importées. En outre, quatre autres catégories sont recensées (Figure24).

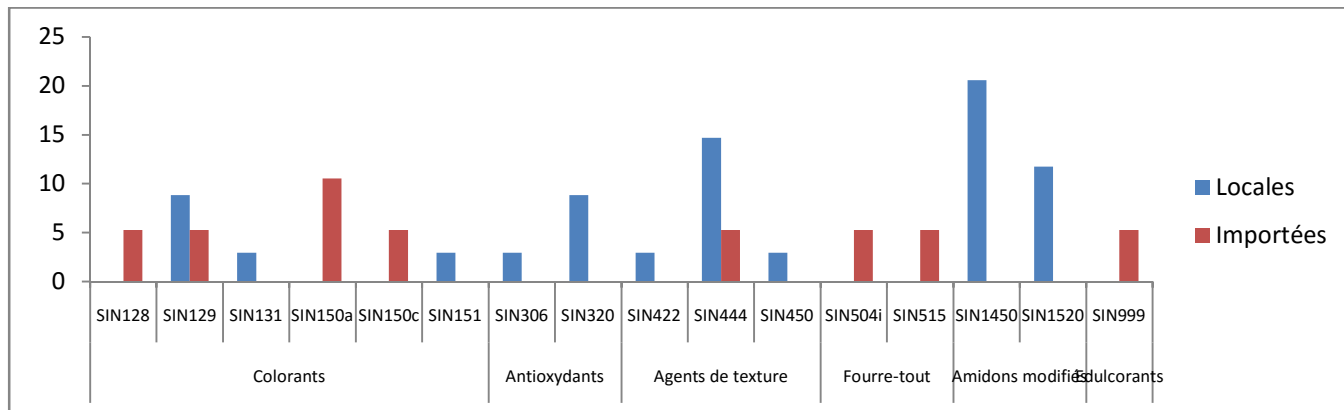


Figure 24. Répartition des additifs non communs incorporés dans les boissons gazeuses locales et importées.

Nous constatons que le nombre d'additifs alimentaires utilisés dans les boissons est important et inclut plusieurs catégories. Les colorants sont classés en premier avec 6/16 au total. L'amidon modifié SIN1450 et l'agent de texture SIN444 sont incorporés dans les boissons locales avec des pourcentages de 21.37% et 14.8% respectivement. Dans les boissons importées, c'est le colorant SIN150a qui est le plus présent avec un pourcentage de 11.45%.

- **Additifs non communs dans les jus**

Pour les jus locaux, six catégories sont répertoriées, tandis que pour ceux importés, nous n'avons enregistrés que trois catégories à savoir colorants, conservateurs et acidifiants. (Figure 25).

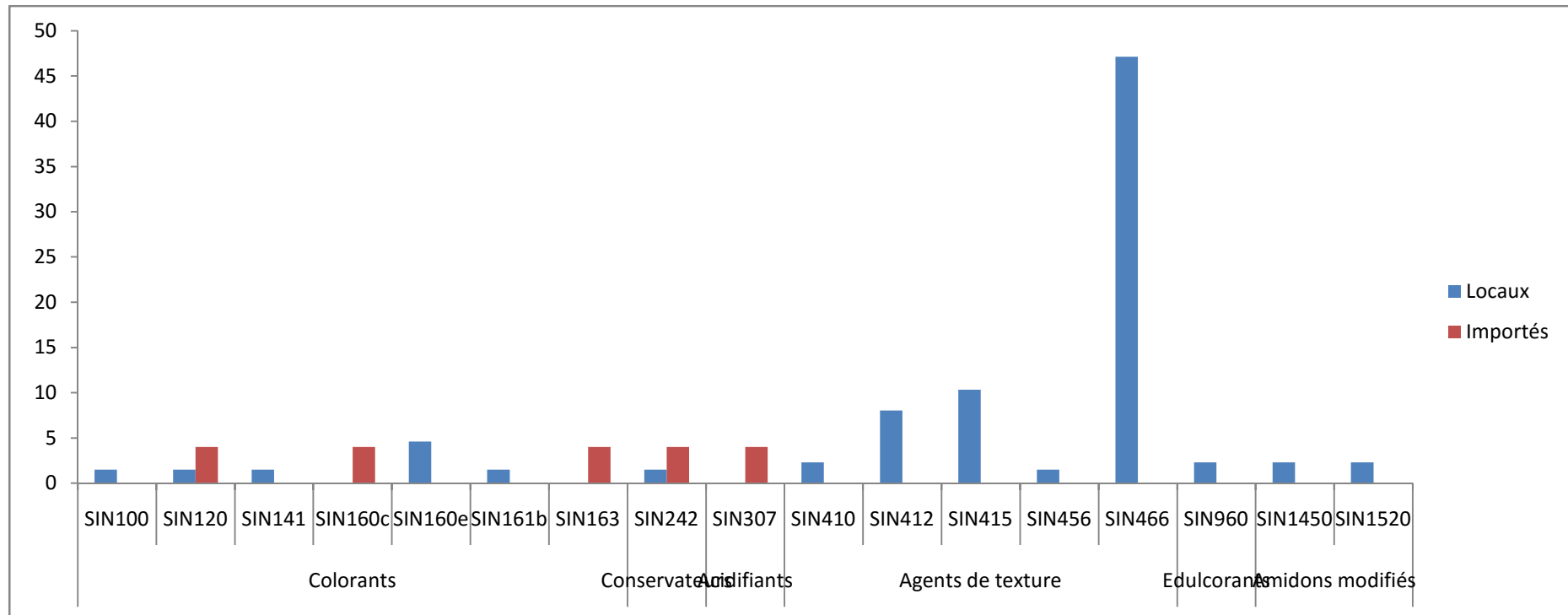


Figure 25. Répartition des additifs non communs incorporés dans les jus locaux et importés.

Au total 17 additifs sont ajoutés dans les produits qu'ils soient d'origine locale ou importée. Les colorants sont au premier rang avec 7 additifs. Les jus locaux contiennent l'agent de texture SIN466 avec 46.73% tandis que les jus importés ne contiennent que 5 additifs sur 17 recensés au total et dont le pourcentage le plus élevé est dans le colorant E160e avec 4.82%.

Pour la sous-classe des sirops, un seul additif non commun présent dans les produits importés ; le SIN224 avec 16.67 %. Enfin et pour les boissons sans sucre (light), un seul additif non commun incorporé, il s'agit du SIN951 avec un pourcentage de 83.33% et 33.33 dans les produits locaux et importés respectivement.

2.1.5. Conserves

Nous rappelons que cette classe contient au total 23 produits locaux et 33 produits importés, répartis en deux sous classes :

Conserves d'origine animale : 07 produits locaux et 25 importés.

Conserves d'origine végétale : 16 produits locaux et 08 importés.

Deux additifs en commun sont présents parmi tous les additifs incorporés dans les deux lots (tableau 10).

Tableau 10. Pourcentage des additifs alimentaires communs présents dans les conserves animales et végétales, locales et importées.

Catégorie	AA	d'origine animale		d'origine végétale	
		Loc*	Imp*	Loc*	Imp*
Acidifiant	SIN330	71,43	50	50	75
Amidons modifiés	SIN1442	0	50	100	0

Loc* : Local /Imp* : Importé

- **Additifs non communs dans les conserves animales**

Pour les conserves d'origine animale, d'autres additifs sont recensés et retrouvés dans les produits inventoriés (figure 26 et 27).

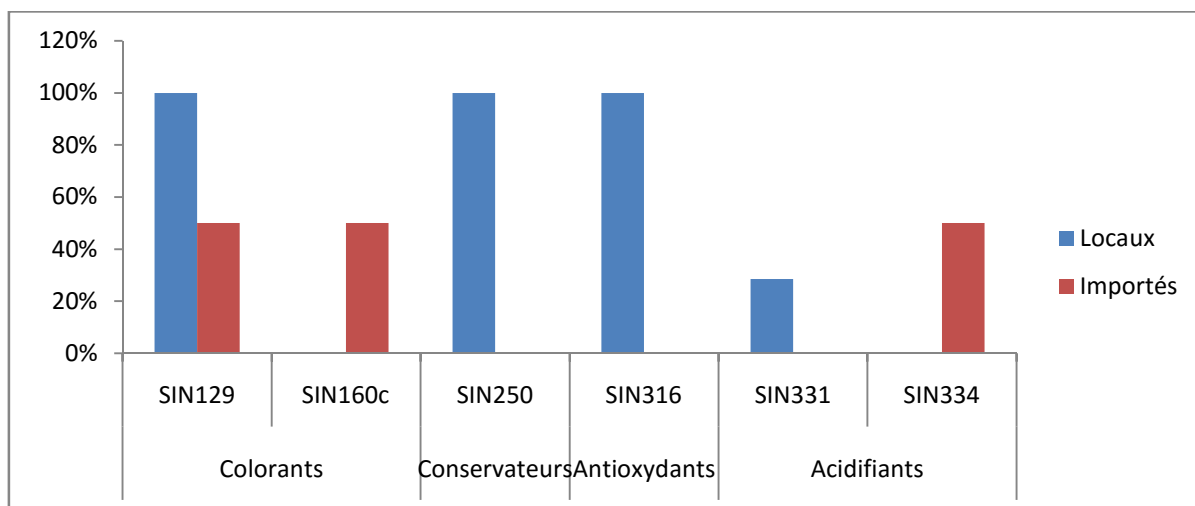


Figure 26. Répartition des additifs non communs (colorants, conservateurs, antioxydants et acidifiants) incorporés dans les conserves d'origine animale locales et importées.

D'après les résultats nous observons que le SIN 129, le SIN 250 et le SIN 316 sont les additifs les plus fréquents parmi tous les additifs (colorants, conservateurs, antioxydants, acidifiants) incorporés dans les produits locaux avec un rapport de 100 %. Alors que dans les produits importés nous avons les 3 additifs SIN 129, SIN 160c et SIN 334 sont avec un pourcentage de 50 %.

Nous constatons que l'agent de texture (SIN 450) est l'additif le plus fréquent parmi tous les additifs (agents de texture, exhausteur de goût et amidons modifiés) incorporés dans les produits locaux. Ainsi les 3 agents de textures (SIN 450i), (SIN 450 ii) et (SIN 451 i) sont les moins fréquents par rapport à tous les additifs incorporés dans les produits locaux. Alors que le (SIN415) est l'additif le plus présent parmi tous les additifs enregistrés dans les produits importés avec un pourcentage de 66.67 %.

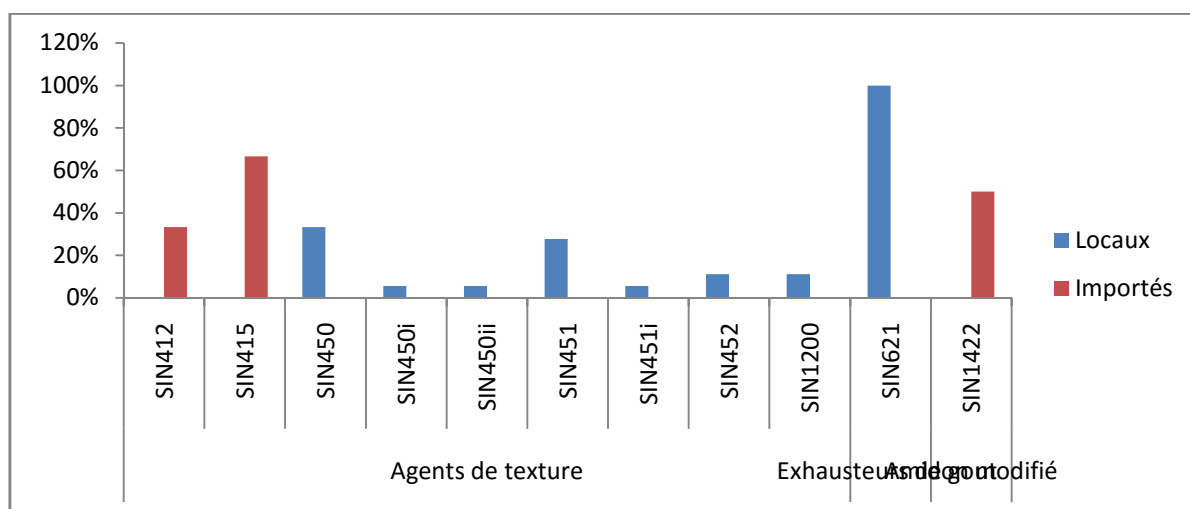


Figure 27. Répartition des additifs non communs (agents de texture, exhausteurs de goûts et amidons modifiés) incorporés dans les conserves d'origine animale locales et importées.

- **Additifs non communs dans les conserves végétales**

La figure 28 montre que les conserves d'origine végétale contiennent une autre liste d'additifs. Nous remarquons que le (SIN 479) est l'additif le plus présent dans les produits locaux avec un taux de l'ordre de 100%. Cependant, parmi les additifs enregistrés dans les produits importés, le conservateur (SIN 223) est l'additif le plus fréquent avec un pourcentage de l'ordre de 100%. L'antioxydant (SIN 385) est le moins présent (25%).

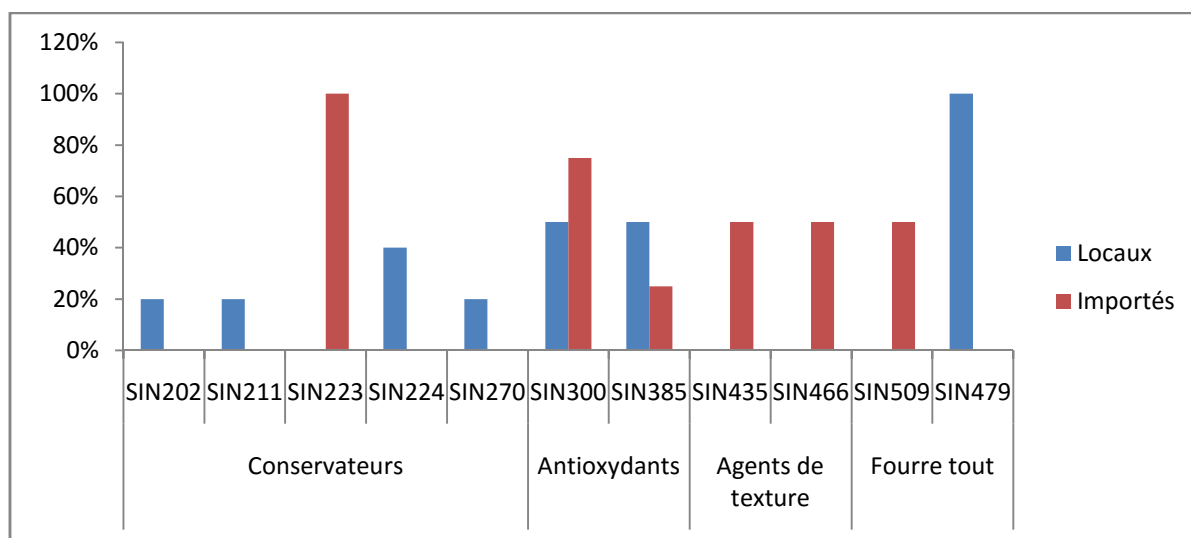


Figure 28. Répartition des additifs non communs incorporés dans les conserves d'origine végétale locales et importées.

2.2. Classification des additifs en fonction de leur toxicité

Nous avons procédé à classer l'ensemble des additifs alimentaires (toute catégorie confondue) retrouvés lors de notre enquête dans les produits locaux et importés en fonction de leur degré de toxicité.

2.2.1. Laits et dérivés

La figure (29) met en évidence d'une part l'absence des additifs du degré très toxique dans tous les laits inventoriés qu'ils soient locaux ou importés, d'autre part, les additifs modérément toxiques représentent le pourcentage le plus élevé (69.23%) dans les laits importés. Tandis que pour les laits locaux, ce sont les additifs toxiques qui sont les plus présents (33.33%). Un pourcentage non négligeable (26.66%) est enregistré pour les additifs modérément toxiques et les additifs peu ou pas toxiques.

Nos résultats montrent également que les yaourts locaux contiennent une très large gamme d'additifs alimentaires de toxicité variable. Nous constatons en outre, que les yaourts locaux ont contiennent plus d'additifs répertoriés 'très toxiques' (9.44%) et 'toxiques' (33.46%).

Qu'ils soient locaux ou importés, tous les fromages de notre enquête contiennent les additifs alimentaires dans leurs ingrédients. D'après les résultats de l'enquête, les additifs alimentaires douteux sont les plus abondants dans les fromages locaux et importés avec un pourcentage supérieur à 38%. La classe très toxique est en faible pourcentage dans les deux produits (locaux avec 1.21% et importés avec 2.12%), vient ensuite, la classe toxique avec un pourcentage à peine dépassant les 10% dans tous les produits. Or, le pourcentage d'additifs modérément toxiques est à 37.65% pour les produits locaux et 23.40% pour ceux importés.

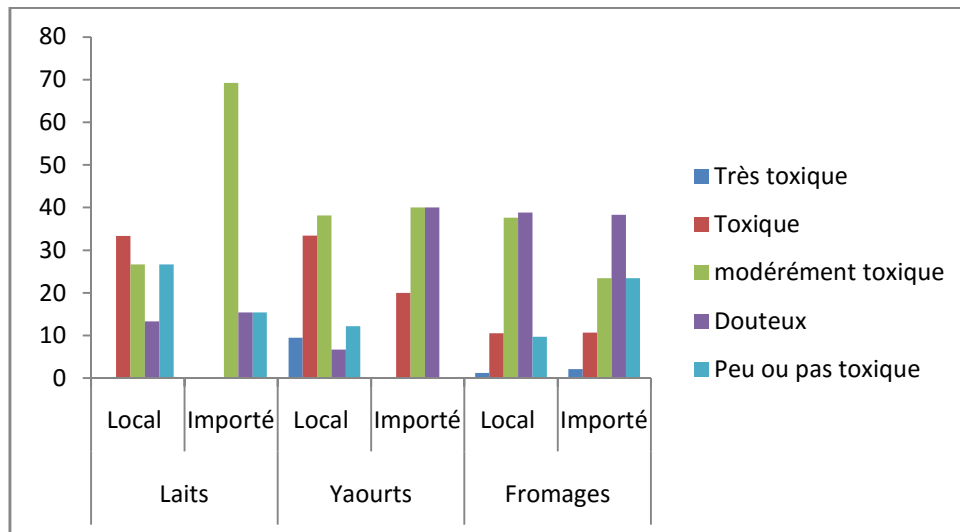


Figure 29. Additifs alimentaires présents dans le lait et ses dérivés en fonction du degré de toxicité.

2.2.2. Matières grasses

La figure (30) montre que les produits importés sont dépourvus d'additifs. En outre les produits locaux comportent les deux types des additifs modérément toxiques et toxiques avec un pourcentage semblable (50%).

D'après les résultats de notre enquête, les produits locaux et importés incluent beaucoup plus des additifs douteux (65.38%) et (50%) respectivement et ils contiennent également les additifs modérément toxiques avec un taux de 21.15% pour les produits locaux et 37.5% pour les produits importés. Les produits locaux sont dépourvus d'éléments de la classe très toxique alors que leur pourcentage est 12% dans les produits importés.

En fin les produits locaux contiennent un pourcentage réduit d'additifs 'peu ou pas toxiques' et 'toxiques' (11.53%et 1.92% respectivement) alors que les produits importés en sont dépourvus. Les produits locaux et importes sont dépourvus d'additifs 'très toxiques'.

Les additifs 'modérément toxiques' et 'douteux' sont présents aux mêmes pourcentages (50%) par contre aucun additif toxique n'est répertorié. En revanche les produits importés incluent beaucoup plus des additifs douteux (71.42%) et ils contiennent également les additifs modérément toxiques et toxiques avec un pourcentage similaires (14.28%).

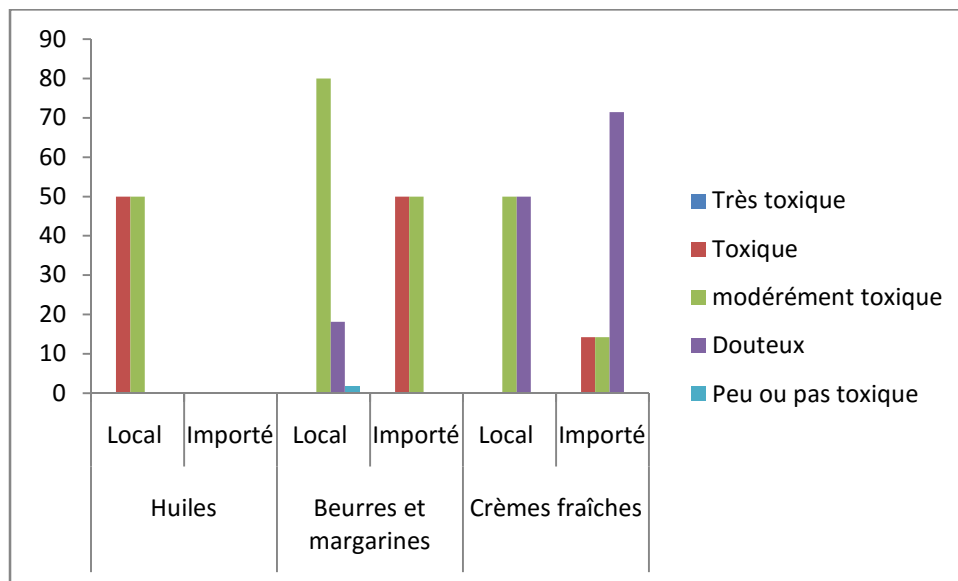


Figure 30. Additifs alimentaires présents dans les matières grasses en fonction du degré de toxicité.

2.2.3. Confiseries

La figure (31) révèle la présence d'additifs alimentaires de toxicité variable pour les gâteaux locaux ou importés.

Le pourcentage d'additifs 'modérément toxiques' est le plus élevé pour tous les produits locaux (6.82%) et importés (49.21%). Viennent après les additifs 'douteux' avec un pourcentage dépassant les 30% pour les gâteaux locaux et importés. Un faible pourcentage est enregistré pour les additifs 'très toxiques' (de l'ordre de 1%).

Les chocolats locaux ne comportent aucun additif classé toxique, alors que, les produits importés en contiennent mais avec un pourcentage n'atteignant pas 1%. Nous remarquons la présence et l'incorporation massive des additifs 'modérément toxiques' dans les chocolats locaux et importés avec un pourcentage de 75% pour les premiers et 62.09% pour les seconds.

Les résultats de notre enquête prouvent la présence des additifs alimentaires de toxicité variable et ce pour les bonbons locaux ou importés. Les pourcentages d'additifs alimentaires ajoutés aux bonbons sont non négligeables toute classe confondue. Nous remarquons que les additifs incorporés dans les bonbons locaux et importés sont surtout les 'modérément toxiques' 38.46% et 53.73% (respectivement). Les additifs alimentaires 'très toxiques' sont également très présents avec des pourcentages non négligeables (23.07% pour les produits locaux et 13.33% pour les produits importés).

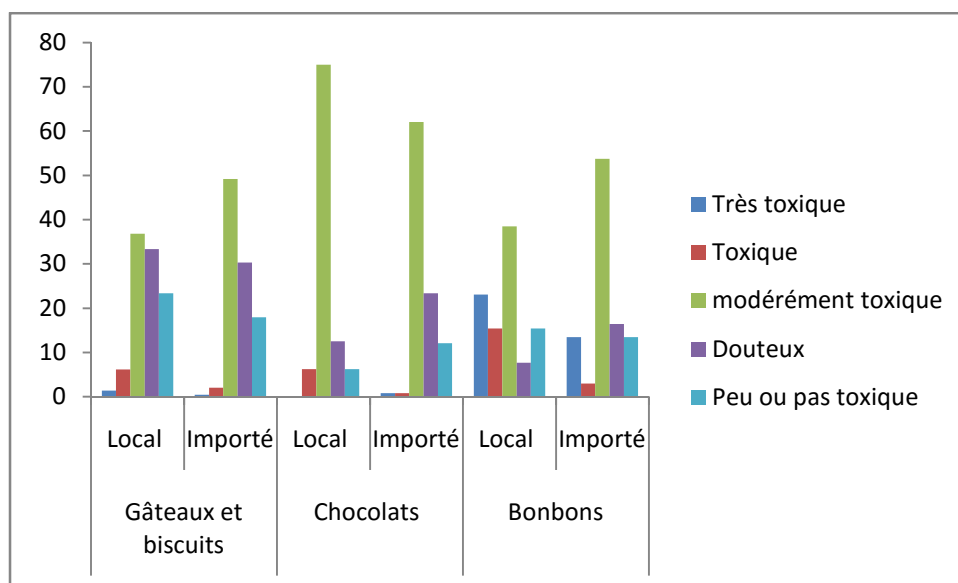


Figure 31. Additifs alimentaires présents dans les confiseries en fonction du degré de toxicité.

2.2.4. Boissons

La figure (32) montre que les additifs alimentaires toxiques sont présents dans la totalité des produits avec un pourcentage de 33.33% dans chacune des boissons sans sucre locales et importées, et de 20% dans les sirops locaux et 25% dans les jus importés. Pour ce qui est des additifs 'modérément toxiques', ils sont présents dans les jus importés avec un pourcentage de l'ordre de 72.73%.

Les boissons sans sucre locales ainsi que et les sirops importés ne contiennent que les additifs 'douteux', tandis-que les sirops locaux ne contiennent ni additifs douteux, ni peu ou pas toxiques. Le pourcentage le plus élevé est retrouvé pour ces deux classes dans les boissons sans sucre avec 22.22%. Le pourcentage le plus important d'additifs 'peu ou pas toxiques' est noté dans les jus locaux avec 24.14%. Cependant, les additifs 'modérément toxiques' sont présents avec le

pourcentage le plus élevé (72,73%) dans les jus importés. Alors que, pour les boissons locales, le pourcentage le plus important revient aux additifs toxiques (60%) contenus dans les sirops locaux.

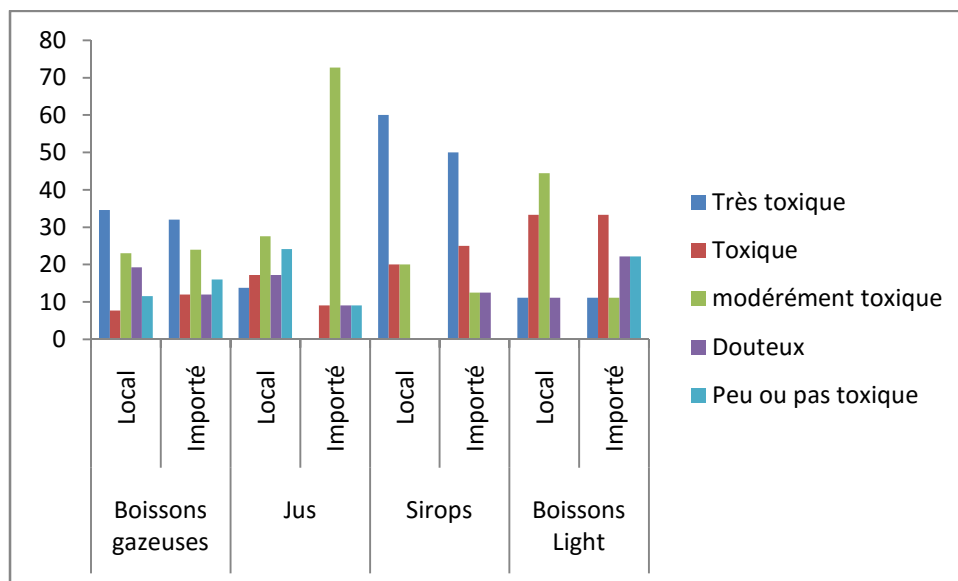


Figure 32. Additifs alimentaires présents dans les boissons en fonction du degré de toxicité.

2.2.5. Conserves

Toutes les conserves recensées qu'elles soient locales ou importées contiennent des additifs de toxicité variable.

La figure 33, révèle que les additifs 'modérément toxiques' représentent le pourcentage le plus élevé 44.44 % dans les produits importés. Tandis que pour les produits locaux, ce sont les additifs 'douteux' avec 42.10%, ces derniers sont absents totalement dans les produits importés. Un pourcentage non négligeable (33.33 %) a été enregistré pour les additifs 'pas/peu toxiques' dans les produits importés. Nous remarquons également que 23.68 % d'additifs 'modérément toxiques' sont présents dans les produits locaux. Les classes très toxiques et toxiques sont présentes dans les conserves d'origine animale locales et importées mais avec de faibles pourcentages (de l'ordre de 10%).

Nos résultats montrent que les produits importés d'origine végétale sont dépourvus d'additifs classés 'très toxiques'. Nous observons que les produits locaux incluent beaucoup plus d'additifs toxiques (46.66 %), néanmoins dans ceux importés, la classe 'modérément toxique' est la plus abondante avec un fort pourcentage de l'ordre de 73.07%. D'autre part la classe 'douteux' est la moins fréquente dans les produits locaux,

alors qu'elle est absente dans ceux importés. Un pourcentage non négligeable d'additifs 'peu /pas toxiques' sont retrouvés dans les produits locaux (20 %).

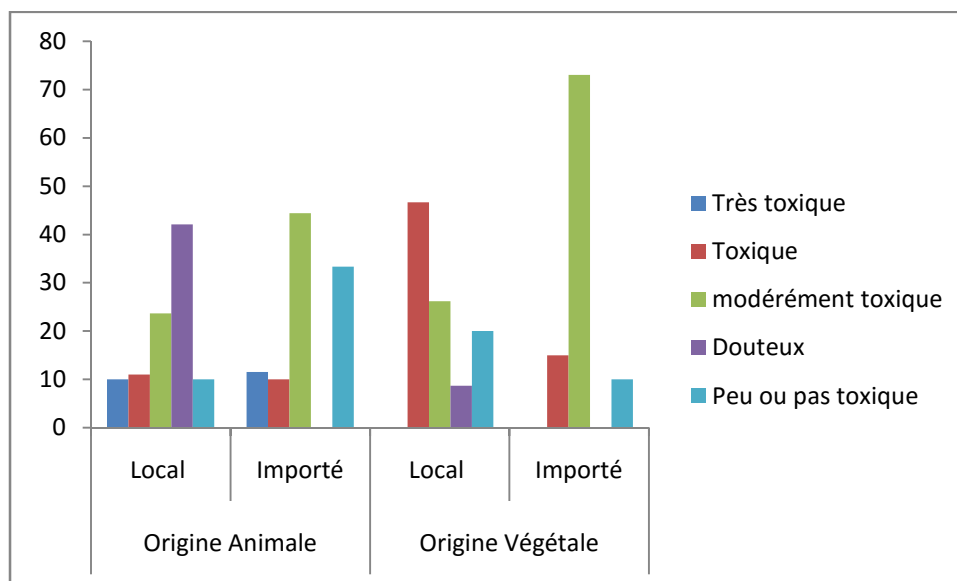


Figure 33. Additifs alimentaires présents dans les conserves en fonction du degré de toxicité.

3. DISCUSSION

Le lait est un produit qui fait partie de notre alimentation depuis des siècles. Des millions de personnes en boivent chaque jour. L'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) estime que la consommation de lait par habitant dans le monde en développement aura augmenté de 1.3% par an entre 1999 et 2030 (soit une augmentation de 50% en 30 ans). Avec le temps, nous avons appris à le transformer pour en varier le goût et la texture, en utilisant différentes catégories d'additifs alimentaires. En générale, la couleur du lait consommé est blanche, néanmoins, dans notre enquête nous avons détecté la présence de colorants dont le Jaune orangé S (SIN 110), Connue comme étant à l'origine de cas d'allergie chez les personnes intolérants aux salicylates (Diezi *et al.*, 2011), de plus l'ARTAC (2011), rapporte un effet cancérigène de cet additif.

En outre, en association avec les benzoates, le Jaune orangé S (SIN 110) serait impliqué dans des cas du syndrome d'hyperactivité chez les enfants (McCann *et al.*, 2007 ; Gaouar *et al.*, 2022). En revanche, nous avons également détecté la présence de Lécithine (SIN 322) dans les laits des deux lots locaux et importés. La lécithine (SIN 322) utilisée en général comme un émulsifiant ou un stabilisant est le seul agent de texture utilisé dans les produits importés, alors que, nous avons trouvé beaucoup d'autres agents de texture dans les laits locaux, ceci pourrait s'expliquer par l'utilisation de

ces additifs dans les laits liquides uniquement, or cette catégorie n'est pas importée. L'addition de la lécithine donne l'impression d'un lait liquide plus concentré.

Le Carraghénanes (SIN407) fait partie des agents de texture prédominants retrouvés dans les produits locaux, cette molécule est à l'origine d'inflammation intestinale chez l'homme et peut causer des ulcères chez les animaux (**Verhaeghe, 2002**). En plus, des additifs ajoutés directement aux produits, notre enquête a révélé la présence de l'azote (SIN 941), un gaz d'emballage qui permet la protection des aliments contre les altérations dues aux facteurs biologiques, chimiques et physiques, tout en conservant leur apparence, leur texture et leur valeur nutritive connu comme étant peu/pas toxique (**Reynal, 2009**). Par ailleurs, l'utilisation des acidifiants et des gaz d'emballage dans les laits importés pourrait être expliquée par souci de conservation au cours leur transfert du pays d'origine jusqu'au pays de destination finale (Algérie).

Notre sondage a révélé que le yaourt est considéré comme un produit de grande consommation. En effet, on constate que 62% le consomme une fois par jour et 28% le consomme deux fois par jour. Notre enquête révèle également que les yaourts locaux contiennent beaucoup de colorants en raison probablement de l'aspect esthétique de l'aliment. Nos résultats ont mis en évidence la présence de colorants dans les yaourts locaux dont le Ponceau 4R (SIN 124) qui donne la couleur rouge. Ce dernier est soupçonné d'être à l'origine de cancer et d'allergies chez les personnes qui sont intolérantes aux salicylates (**Diezi et al., 2011**). En association avec les benzoates, le (SIN 124) serait impliqué dans un grand pourcentage de cas du syndrome d'hyperactivité (**Doepker et al., 2016 ; FAO/WHO, 2019**).

Comme pour le lait, les agents de texture comme les épaississants et les stabilisants et les émulsifiants sont plus présents dans les yaourts locaux que dans ceux importés. Ils sont utilisés comme additifs alimentaires pour modifier les propriétés physiques d'un plat sans en modifier le goût (**Gallen et Pla, 2013**). Nous tenons à signaler que cette différence entre produits locaux et importés pourrait s'expliquer par le nombre insuffisant de yaourts importés mis sur le marché. Comme dans ces catégories d'additifs, il existe une grande différence entre les yaourts locaux et importés inventoriés et mis sur le marché algérien.

Le fromage est un aliment obtenu à partir de lait coagulé ou de produits laitiers, comme la crème, puis d'égouttage suivi ou non par la fermentation et éventuellement d'affinage. Il est fabriqué à partir de lait de vache principalement mais aussi de brebis ou de chèvre. Dans notre enquête, les fromages contiennent également un nombre important d'additifs alimentaires car ces derniers sont devenus indispensables en industries agroalimentaires pour améliorer la conservation des aliments et

Chapitre 2 : Enquête sur les Additifs Alimentaires

de garantir une sécurité sanitaire face aux bactéries pathogènes et aux autres microorganismes responsables de toxi-infections alimentaires (**André, 2013 ; Nowak-Werzyn *et al.*, 2017 ; Lee *et al.*, 2019**).

Selon nos résultats, le nombre des additifs alimentaires incorporés dans les fromages locaux est plus élevé que ceux importés. Nous remarquons que pour les fromages, les colorants sont peu ou pas utilisés. Par contre, nous avons mis en évidence la présence d'agents de texture (stabilisants ou épaississants ou émulsifiants). Le Chlorure de potassium (SIN 508) est classé 'fourre-tout' ; il est présent à un faible taux dans les fromages, car il est toxique à très forte dose (150 grammes) (**www.les-additifs-alimentaires.com**). De plus, lors de notre enquête, nous avons remarqué sept fromages locaux et trois importés ne mentionnent pas la liste des ingrédients sur leurs emballages bien que la réglementation algérienne l'exige. La gomme cellulosique (Sin 466) Carboxyméthyl cellulose de sodium présente dans les fromages est parmi les émulsifiants qui peuvent irriter le tube digestif et perturber la digestion (**Crouzet, 2006 ; Deppenweiler, 2014**).

Cette présence abusive d'additifs alimentaires de toutes catégories confondues dans les laits et dérivés pose la problématique de la consommation simultanée de plusieurs additifs induisant des effets synergiques / cumulatifs potentiels (**Brunellière, 2010 ; Cecconi, 2012**).

La sous classe, beurres et margarines inclut une large variété d'additifs alimentaires aussi bien dans les produits locaux que dans ceux importés. Les résultats de notre enquête ont révélé la présence de colorants : carotène (SIN160a) qui est un caroténoïde d'origine naturelle, des antioxydants qui jouent un rôle protecteur contre les altérations dues à l'oxydation parmi lesquelles le Butylhydroquinone tertiaire (SIN319) présent seulement dans les produits locaux et qui pourrait être cytotoxique, génotoxique et mutagène (**www.additifs-alimentaires.net**). En revanche, le Butylhydroxytolol (SIN321) est présent dans les produits importés, cette molécule est mutagène, reprotoxique potentielle et de plus à l'origine de perturbations endocriniennes et de troubles de la formulation sanguine (**Denans, 2017**). Nous avons également montré la présence de l'acide citrique (SIN330) dans les lots locaux et importés dont la toxicité se manifeste par des allergies cutanées à forte dose (**Gallen et Pla, 2013**). Le Monostéarine (SIN471) est un émulsifiant présent beaucoup plus dans les produits locaux, il est soupçonné de provoquer des troubles digestifs. (**Séror, 2009 ; Sghaier, 2014**).

Dans les beurres locaux, les arômes synthétiques sont présents avec un pourcentage important, car la qualité se situe de façon prioritaire au niveau de l'ensemble des caractères organoleptiques qui rendent une denrée plus ou moins agréable à la consommation (**Crouzet, 2006**). Même si les graisses

Chapitre 2 : Enquête sur les Additifs Alimentaires

végétales, les huiles alimentaires végétales sont donc des aliments importants qui apportent chacun des nutriments très utiles à la santé, chaque huile possède une saveur, un parfum et une qualité nutritive spécifique qui ne permet pas de les considérer comme de simples corps gras. D'après notre enquête certains produits locaux et importés ne mentionnent pas la liste des additifs.

Parmi les additifs incorporés dans les huiles, le Butylhydroquinone tertiaire (SIN 319) est le plus présent. C'est un antioxydant de synthèse utilisé dans les huiles et matières grasses destinées à la friture. Il est toxique à forte dose (**Denans, 2017**) ; ainsi que l'acide citrique (SIN 330) qui pourrait avoir un effet abrasif pour l'émail dentaire s'il est consommé très régulièrement ou à très forte dose (**www.additifs-alimentaires.net**).

Nous avons également montré que les additifs alimentaires ajoutés dans les crèmes fraîches sont pour la plupart des cas des agents de textures tels que le gel de cellulose (SIN 460) qui provoque des troubles digestifs, à forte dose (**Denans, 2017**). D'après la classification de l'ARTAC, le SIN 460 est probablement cancérigène.

Nous remarquons durant notre enquête que la plupart des crèmes fraîches qu'elles soient locales ou importées ne mentionnent pas la liste des additifs alors que la réglementation algérienne impose l'étiquetage des additifs (**JORA, 2012**). Cependant l'utilisation des additifs alimentaires dans les crèmes fraîches, margarines, beurres et huiles peut avoir un effet cumulatif avec la consommation d'autres produits car ils sont considérés comme aliments à consommation indirecte (**McCann et al., 2007**).

La confiserie est l'industrie de fabrication de produits à base de sucre, auxquels sont ajoutés des matières grasses et des arômes. Il s'agit des bonbons, gâteaux, chocolat, biscuit, chewing-gum, etc. De toutes tailles, de toutes formes, de toutes couleurs, dures ou molles, à sucer, à croquer ou à mâchouiller, mielleuses ou acidulées... ; ils font partie de notre patrimoine et de nos traditions culinaires. Depuis toujours, les biscuits et les gâteaux sont des plaisirs à la fois gourmands, bons et nourrissants.

Les biscuits et les gâteaux sont aussi modernes et innovants. Ils ont su s'adapter aux attentes des consommateurs : nouvelles recettes, nouveaux goûts, nouveaux modes de présentation ceci explique la présence de nombreux additifs alimentaires qui servent surtout à l'amélioration de la qualité sensorielle (colorants, agent de texture, exhausteurs de goût). Nous remarquons dans notre enquête, la présence de certains colorants, conservateurs, agents de texture classés 'très toxiques', 'toxiques' et 'modérément toxiques' et même douteux, mais à des faibles pourcentages dans les gâteaux locaux et importés, avec un grand nombre dans ces derniers. La lécithine (SIN 322) est l'additif le plus

fréquent aussi bien dans les produits locaux qu'importés de part sa qualité d'émulsifiant naturel qui permet de mélanger deux phases non miscibles comme l'eau et l'huile (**Aboiron et Hameury, 2004**).

Le bicarbonate de sodium (SIN500ii) trouvé aussi dans cette variété avec des pourcentages variables surtout dans les gâteaux locaux, joue un rôle d'un agent levant et régulateur d'acidité (**Linke et al., 2018**). De fortes doses peuvent irriter, corroder le tractus gastro-intestinal, provoquer des troubles électrolytiques, vomissements, diarrhées, commotions... (**Clémens, 2015 ; Coumoul, 2016**).

Le chocolat est un aliment consommé par tous, le chocolat est même souvent associé au luxe, ou encore à la volupté. (**Fantana, 2013**). Selon nos résultats, les chocolats locaux et importés comportent un nombre important d'additifs alimentaires. Nous avons révélé la présence d'agents de texture, parmi lesquels la Gomme gellane (SIN 418) qui est un polysaccharide naturel, produit à partir de *Pseudomonas elodea*, cet agent a des effets secondaires : Non connus dans les concentrations utilisées, bien que de fortes concentrations entraînent des troubles digestifs, à cause de la fermentation de la microflore intestinale. Malgré ces effets probable, l'**EFSA (2022)** a conclu que son incorporation dans les produits alimentaires n'affecte pas la sécurité des consommateurs. Les conservateurs utilisés dans les chocolats importés les protègent des altérations dues aux micro-organismes. De plus, les chocolats ne contiennent pas beaucoup de colorants puisqu'ils sont composés de cacao dont la couleur est brune (**Sghaier, 2014 ; EFSA, 2015**).

Concernant les bonbons, nos résultats ont confirmé qu'aussi bien les bonbons locaux qu'importés contiennent un grand nombre de colorants de toxicité variable. Ainsi, nous avons mis en évidence la présence d'un taux élevé de colorants classés 'très toxique' utilisés dans les produits locaux tels que la Tartrazine (SIN102), le Jaune soleil FCF (SIN110) et le Ponceau 4R (SIN124) et ce en plus d'agents de texture qui sont d'ailleurs présents aussi bien dans les produits locaux qu'importés.

Les acidifiants et les agents d'enrobage sont également présents dans les produits importés pour améliorer leur texture, leur goût et leur aspect extérieur (**Gallen et Pla, 2013**). D'après un sondage que nous avons effectué en 2017 (résultats non montrés), nous avons remarqué que les bonbons sont consommés par 63% des sujets interrogés les consomment et ce au moins une fois par jour, 23% des sujets les consomment deux fois par jour 8% et 6% les consomment trois à quatre fois.

Selon nos résultats nous constatons que les bonbons locaux ou importés contiennent des colorants sous forme de nanoparticules tel que le Dioxyde de titane SIN 171 (colorant blanchissant). Des études sur les rats montrent que l'ingestion de ces nanoparticules seraient à l'origine de troubles immunitaires et de lésions précancéreuses (**Arnaud, 2011 ; Bettini et Houdeau, 2014**). En outre cet

additif est de plus en plus incorporé dans les produits alimentaires industriels dans sa forme de nanoparticules ce qui pourrait être à l'origine d'une toxicité gastrique, d'une hépatotoxicité ainsi qu'une altération de la flore intestinale (**Medina-Reyes et al., 2020**).

Les acidifiants et les agents d'emballage sont également présents dans les produits importés. Parfois, nous observons que la liste des ingrédients mentionnée sur l'emballage pour le même produit diffère de celle mentionnée par l'importateur.

Des colorants d'origine naturelle ou synthétique et des conservateurs sont utilisés dans les boissons locales et importées pour améliorer leurs aspects et accroître leur sécurité et leur stabilité sanitaire. Nous avons ainsi détecté la présence de la Tartrazine « SIN102 », le jaune de quinoléine « SIN104 », le jaune FCF « SIN110 », l'azorubine « SIN122 », le Ponceau 4R « SIN124 » et enfin le rouge allura « SIN129 ». Selon **Hayder et al., (2011)** ; **Aaron et Torsten (2015)** et **Linke et al., (2018)**, plusieurs colorants de synthèse sont suspectés de réagir avec le benzoate de sodium « SIN211 » et d'entraîner des troubles de déficit de l'attention chez les enfants, avec ou sans hyperactivité (effet synergique).

Les boissons locales contiennent plus d'antioxydants que les boissons importées, ces additifs prolongent la durée de conservation des aliments. Ainsi, le butylhydroxyanisole ou BHA « SIN320 » est un antioxydant puissant présent dans les boissons locales, mais en parallèle, il est soupçonné d'être à l'origine d'une cholestérolémie (**Novelli, 2006**), il est également "cancérogène possible" pour l'Homme selon le **CIRC** (Centre International de Recherche sur le Cancer) (**2018**), perturbateur endocrinien et reprotoxique (**Vicaire et al., 2011**). D'après **Faine et al., (2006)** et **André (2013)**, le BHT serait à l'origine de manifestations allergiques et de troubles des systèmes reproductif et sanguin.

Des agents d'enrobage sont utilisés dans les boissons locales pour leur conférer un aspect brillant, ainsi que les agents de carbonation incorporés pour apporter de dioxyde de carbone à une boisson gazeuse (**Fantana, 2013**). Les édulcorants sont des additifs sucrants qui donnent un goût sucré au produit qui les contiennent, l'aspartame « sin951 », l'acésulfame K « sin950 », sucralose « sin955 » et le maltitol « sin965 » sont également présents dans les boissons (**Meunier, 2011** ; **Daniel, 2013** ; **Muhammad et Dickinson 2019**). L'aspartame est un édulcorant de synthèse classé comme l'additif le plus dangereux il appartient à la famille des excitotoxines, ces dernières sont des acides aminés excitateurs neurologiques, qui ont la capacité de détruire rapidement les neurones de notre cerveau en les excitant jusqu'à ce qu'ils se résorbent provoquant la mort des cellules nerveuses (**Roberts, 2001** ; **Roberts, 2004** ; **Daniel, 2013** ; **Muhammad et Dickinson 2019**).

Chapitre 2 : Enquête sur les Additifs Alimentaires

Les arômes sont présents dans à peu près toutes les boissons rafraîchissantes. Ils sont rajoutés pour offrir un grand choix de goûts. Cependant, ces arômes sont supposés sans risque pour la santé, essentiellement parce que d'infimes quantités sont réellement consommées, environ 15 grammes par an et par personne. Incriminer les arômes selon des critères de la médecine fondée sur les preuves semble toutefois difficile selon **Gouget (2008)**, **Gallen et Pla (2013)** et **Linke et al. (2018)**.

Concernant les conserves, **Fontana (2013)**, **Silva et Lindon (2016)** et **Linke et al., (2018)** rappellent que les méthodes de conservation ont pour objectif de produire des aliments disponibles dans l'espace et dans le temps. En d'autres termes, par des techniques de conservation, il est possible de trouver, à tout moment et à n'importe quel endroit, des aliments à majorité des cas saisonniers et/ou à courte durée de vie.

Dans notre enquête, nous avons relevé que les conserves d'origine animale locales et importées contiennent des colorants tels que le rouge Allura AC (SIN129). Cependant, ce colorant synthétique et classé 'toxique' pourrait induire des allergies diverses, une hyperactivité (**Bourrier, 2006**), pourrait être cancérigène (**ARTAC, 2011**). Il est interdit au Danemark, en Allemagne, en Belgique, en Autriche, en Norvège. (**Gouget, 2008 ; Gouget, 2011 ; Marano, 2016**).

Ainsi dans cette sous classe alimentaire, nous avons trouvé un nombre considérable d'agents de texture dans les produits locaux, comme le Sel métallique de diphosphates (SIN451). Cet additif provoque des troubles digestifs par blocage de nombreuses enzymes. En consommation régulière quelque soit la dose consommée. Il est à l'origine de nombreux dysfonctionnements du métabolisme car le phosphate joue un rôle important dans le métabolisme général, il a une action perturbatrice du rapport calcium / phosphore dans l'organisme ainsi que sur l'assimilation des minéraux, du calcium, du magnésium et du fer avec un risque de décalcification (**Gouget, 2011**).

Les conserves d'origine végétale locales et importées contiennent une large gamme de conservateurs, ainsi, nous avons détecté la présence de Benzoate de Sodium (SIN211) susceptible d'être à l'origine d'hyperactivité, d'allergie ainsi que des troubles digestifs et des problèmes de croissance (**Sésor, 2009 ; Fantana, 2013 ; Coumoul, 2016 ; Slimani, 2019**) et il serait **cancérogène potentiel** (**ARTAC, 2011**). De plus, le benzène est hématotoxique, il est à l'origine de la leucémie chez l'animal et chez l'Homme (**Gouget, 2008**) ; possiblement **cancérogènes** (**ARTAC, 2011**) et selon **Hawkin et al., (2018)**, il est neurotoxique potentiel car il contient des résidus de substances organochlorées. De plus, il peut réagir avec la vitamine C (SIN300) ou l'acide ascorbique (SIN 300) (associé à la formation de petites quantités de benzène) (**www.additif-alimentaire.net**).

Cet additif serait impliqué (au même titre que les autres benzoates) dans certaines urticaires chroniques et plus récemment dans la rhinite chronique de l'adulte (**Gallen et Pla, 2013**). Une autre étude menée au Maroc, auprès de 239 enfants scolarisés dans une école primaire publique et âgés de 6 à 16 ans, montre que l'hyperactivité représente un pourcentage important dans cette population (33,80%) et qu'une corrélation significative entre ce trouble et les additifs alimentaires contenus dans les biscuits et les boissons gazeuses consommés par ces enfants est confirmée (**Rouim et al., 2015**).

Le disulfite de potassium (SIN 224) est le conservateur le plus fréquent dans les produits locaux, il est toxique à des faibles doses, il provoque des troubles digestifs, des maux de tête, une hypotension et peut détruire les vitamines du groupe B avec un risque d'allergie, parfois mortelle (**Dutau, 1996 ; Bourrier, 2006 ; Gouget, 2008 ; Dutau, 2018**). L'EDTA (SIN 385) est présent beaucoup plus dans les conserves locales car utilisé comme antioxydant et séquestrant de synthèse. Il est à l'origine d'une mauvaise absorption des minéraux, de troubles digestifs, de crampes abdominales ou musculaires, troubles de la coagulation du sang avec une hématurie et pourrait être à l'origine d'une perturbation du métabolisme cellulaire. Cet additif est considéré comme dangereux pour les jeunes enfants, il est Interdit en Australie d'après **Gouget (2008)** et selon **ARTAC (2011)**, il est potentiellement cancérigène.

Le colorant ponceau 4R (rouge cochenille) présent dans nos conserves avec un pourcentage important, est un produit chimique potentiellement toxique et provoque des allergies (**Sésor, 2009 ; Dutau, 2018 ; Gaouar, 2022**). Par ailleurs, notre enquête montre clairement que les conserves importées contiennent plus de conservateurs que ceux fabriqués en Algérie.

Les antioxydants sont des protecteurs chimiques, c'est-à-dire des molécules qui s'opposent aux phénomènes de stress oxydant, évitant ou bloquant les réactions d'oxydation, le plus souvent en réagissant avec les radicaux libres oxygénés impliqués dans ces processus, les exhausteurs de goût sont des substances qui, sans avoir une saveur propre prononcée, ne modifient pas le goût mais augmentent l'intensité de la perception olfacto-gustative d'une denrée alimentaire néanmoins, le glutamate monosodique « SIN621 » présent dans les conserves importées est à l'origine de maux de têtes, faiblesse général et bouffées de chaleur (**Becker et al., 2009 ; Rouim et al., 2015**).

Qu'en-est-il des effets cocktails ?

Concernant les colorants, la Tartrazine « sin102 », le jaune FCF « sin110 » et le ponceau 4R « sin124 » sont les colorants toxiques les plus mentionnés sur les étiquettes des produits alimentaires car ils sont devenus indispensables en industrie agroalimentaire, néanmoins ces dernières

pourraient avoir des effets toxiques, comme l'allergie et les troubles digestifs. L'association de ces colorants avec le benzoate de sodium « Sin211 » qui est un conservateur considéré 'toxique' peut provoquer des troubles de l'attention et hyperactivités chez l'enfant (**Houdjedj, 2012**). La prévalence de l'intolérance à la tartrazine est inférieure à 0,1% de la population générale, elle est interdite en Autriche, Finlande, Norvège et en Tunisie (**Gallen et Pla, 2013**).

D'autres additifs toxiques comme la carraghénane « Sin 407 » qui est un texturant et le phosphate de diamidonhydroxypropylé « Sin1442 » utilisé comme épaississant sont à l'origine d'inflammations intestinales, des ulcères coliques ou encore des chocs anaphylactiques (**Bourrier, 2006 ; Gallen et Pla, 2013**). Ces produits peuvent être consommés simultanément et quotidiennement et de façon excessive surtout chez les enfants avec un effet cumulatif dans l'organisme (**Anses, 2016**). D'après **Sasaki et al. ; (2002) et Houdjedj (2012)**, la consommation chronique de ces colorants peut induire des altérations d'ADN des entérocytes chez la souris, ainsi qu'une augmentation du nombre de lymphocytes et d'éosinophiles de la muqueuse gastrique (**Moutinho et al., 2007**).

Le **ponceau 4R** (SIN 124) présent dans les confiseries, de ce fait, un sujet peut subir un surdosage lors de la consommation concomitante de plusieurs produits contenant le même additif avec pour conséquence le dépassant de la Dose Journalière Admissible (DJA).

Gouget (2011) rapporte que cet additif est classé 'très toxique', il est neurotoxique potentiel, il inhibe la respiration mitochondriale et est clastogène. Dès la dose de 10 mg /kg, cette substance induirait des dommages de l'ADN chez les rats. En plus, cette molécule est soupçonnée de l'hyperactivité chez l'enfant. Depuis longtemps interdit dans plusieurs pays tels que les États-Unis, Norvège et Finlande.

Le Rouge Allura AC (SIN 129) qui incorporé dans les confiseries (chocolats et bonbons). La NLM américaine (*National Library of Medicine*) montre que cet additif est un potentiel génotoxique. Plus rarement des symptômes d'allergie, urticaire, asthme, autres symptômes cutanéomuqueux et respiratoires voire des anaphylaxies ont été rapportés. Ce colorant est potentiellement neurotoxique, inhibiteur de la respiration mitochondriale et potentiellement cancérigène (**ARTAC, 2011**). **Houdjedj, (2012) et Laudisi et al., (2018)** ont rapporté que cette molécule est mutagène, génotoxique et induit des troubles comportementaux chez les rats. Les enfants sont les premières victimes des confiseries de grande consommation très présente sur le marché et aussi très vendues.

Les scientifiques ne cessent de tirer la sonnette d'alarme, on sait aujourd'hui, qu'outre l'hyperactivité des enfants, les ajouts synthétiques à nos aliments sont parmi les facteurs déclenchant des maladies dégénératives, neurodégénératives, des allergies alimentaires, des troubles du comportement

alimentaire favorisant l'addiction au sucre, au sel, aux graisses et partant l'obésité ou l'anorexie mais sont aussi significatifs dans l'émergence des cancers.

Pour les conservateurs, le Sorbate de potassium (SIN 202), un conservateur a été enregistré présent dans les deux sous-classes des produits laitiers (yaourt et fromage locaux) et les confiseries locales et importées) et dans les boissons locales et importées. Cet additif classé 'douteux', est suspecté d'être mutagène. Il serait à l'origine d'hypersensibilité et allergies, d'asthme, d'urticaire, de rhinites, de troubles digestifs et peut induire des malformations congénitales (**Bourrier, 2006 ; Rowland *et al.*, 2018 ; Gouget, 2008**).

En outre les huiles, beurres, margarines et crèmes fraîches que nous avons retrouvés contiennent le Métabisulfite de sodium (SIN 223) classé 'très toxique'. Ainsi, les sujets très sensibles, allergiques, asthmatiques ou intolérants aux sulfites sont plus affectés que les autres et pourront avoir des troubles respiratoires, de l'urticaire, de l'asthme, voire plus rarement des anaphylaxies.

Nicolas (2011) montre que cette molécule a des effets mutagènes et reprotoxiques sur des rats. D'un autre côté, cet additif stimule la prolifération de bactéries responsables de troubles intestinaux chroniques et inflammatoires. Il serait d'autant plus hasardeux en cas de régime alimentaire déséquilibré. Proscrire à plus forte raison chez les malades du foie ou des reins, malades cardiovasculaires ; L'intolérance aux sulfites est bien documentée et un des mécanismes avancés est le déficit en sulfite oxydase qui facilite l'accumulation de sulfite avec induction d'un bronchospasme secondaire.

Dans le même contexte, l'anhydride sulfureux et les sulfites possèdent un caractère réducteur. Si la dose limite est franchie (DJA : 0,7 mg/Kg/J), il y a possibilité de dérèglements intestinaux ou pertes calciques. Les sulfites entraînent également la destruction des vitamines B1 et B2 et seraient à l'origine de problèmes allergiques (**EFSA, 2022**).

D'après notre enquête, et en ce qui concerne les antioxydants, l'acide ascorbique (SIN300) (le nom scientifique de la vitamine C) est incorporé dans la plupart des produits inventoriés. A forte dose cet additif provoque une perturbation du métabolisme chez les sujets diabétiques ou accroître le risque d'apparition des calculs urinaires, peut entraîner une concentration excessive d'acide dans le sang (acidose). L'acide ascorbique peut être toxique et avoir de graves problèmes de santé chez les patients atteints de pathologies rénales ou par des maladies caractérisées par une accumulation de fer dans l'organisme (hémochromatose) (**Marano, 2013**). La prise de cet additif alimentaire à forte dose peut également provoquer des effets indésirables tels que des troubles digestifs, un accroissement de

la rapidité du transit intestinal, des brûlures d'estomac, des diarrhées, des ballonnements (**Bourrier, 2006 ; Marano, 2013**).

Ainsi, le BHQT (Butylhydroquinone tertiaire) (SIN319) est présent simultanément dans toutes les sous classes de matière grasse (huiles, beurres margarines et crèmes fraîches), classé 'toxique'. Il est Potentiel cytotoxique, génotoxique, mutagène et cancérigène. Précurseur de tumeurs de l'estomac chez les animaux (**McCann *et al.*, 2007**). On rapporte aussi des troubles comportementaux et/ou de l'hyperactivité chez l'enfant (**Diezi *et al.*, 2011**), selon **Gouget (2015)**, cette molécule est présentée comme un additif à éviter.

Enfin, concernant le **BHA** (SIN320) qui est un antioxydant utilisé largement dans l'industrie alimentaire. Nos résultats montrent qu'il est notamment présent dans les trois sous classes de confiseries : les chocolats, les bonbons, et les biscuits / gâteaux. Cet additif alimentaire est utilisé pour éviter aux matières grasses de rancir. C'est un cancérigène possible selon les données du **CIRC (2018)** et l'**ARTAC (2011)**.

De plus, il provoque une hyperactivité, l'asthme, l'urticaire, une augmente le taux de cholestérol et de lipides, des troubles du métabolisme du foie ainsi que des insomnies. Il est Interdit au Japon (**Gouget, 2008**). D'après **Faine *et al.*, (2006)**, **André (2013)** et **Greco (2014)**, le BHT serait à l'origine de manifestations allergiques et de troubles des systèmes reproductif et sanguin.

Concernant la catégorie des acidifiants, nous avons enregistré la présence massive et importante de l'acide citrique Il est incorporé en commun dans la majorité des classes alimentaires : les confiseries (biscuit, bonbons, ..) ainsi que dans les produits laitiers (lait, fromage, yaourt), les matières grasses (beurre et margarine, huile, crème fraîche) et dans les conserves (d'origine animale et végétale), en accord avec les travaux de **R'Haim *et al.*, (2013)**. Cet additif et selon **Bourrier (2006)** et le rapport de l'**ANSES (2023)**, est à l'origine d'allergie cutanée à forte dose. De plus, une étude de **Doepker *et al.*, (2016)** montre qu'à forte dose, l'acide citrique peut attaquer l'émail dentaire et induire une prolifération des bactéries responsables de la carie dentaire.

Les deux sous classes de confiserie (chocolats et bonbons) que nous avons inventoriés au cours de notre enquête contiennent l'acide tartrique (SIN 334) qui selon **Macioszek et Kononowicz (2004)**, **Mansour et Tlemcani (2009)** et **Linke *et al.*, (2018)** pourrait induire une toxicité cutanée, gastro-intestinale et rénale.

Parmi les agents de texture que nous avons répertoriés dans notre enquête, la Gomme de cellulose (SIN 466) est présente dans les confiseries notamment les biscuits et les bonbons importés. D'après **Viennois *et al.*, (2020)**, cet additif, même à des quantités relativement faibles peut entraîner des

troubles intestinaux et une obésité chez les rats. Ces effets seraient dus à des changements dans la flore intestinale provoqués par l'émulsifiant artificiel. De nouvelles découvertes montrent que la flore intestinale perturbée et les réactions inflammatoires provoquées par SIN 466 peuvent également conduire au cancer du côlon.

Le Mono et di glycérides d'acides gras (SIN 471) est classé probablement cancérigène selon l'ARTAC (2011) et d'après notre enquête cet additif est incorporé dans les divers produits de la même classe alimentaire : les produits laitiers (laits et yaourts locaux), et les confiseries (chocolats, biscuits / gâteaux, bonbons locaux et importés) d'où un probable effet cumulatif.

Cet additif est exclu de l'alimentation biologique dans l'Union Européenne comme aux Etats-Unis. Des effets nocifs sérieux de cet émulsifiant sont aujourd'hui admis comme le cancer du sein, l'hypercholestérolémie, l'athérosclérose, le diabète (résistance à l'insuline), les risques cardiovasculaires, le dysfonctionnement hépatique, la reprotoxicité avec effets obstétricaux, ainsi que des conséquences psychiatriques (Saidani, 2013 ; Greco *et al.*, 2014 ; Lelasseux, 2018).

En ce qui concerne la catégorie des additifs 'fourre-tout' qui englobe à la fois gélifiants, stabilisants, émulsifiants et épaississants présente dans les confiseries (Bonbons, biscuits / gâteaux, chocolats) qui peuvent être consommées quotidiennement tels que le Carbonate d'ammonium (SIN 503).il peut induire à forte dose une détérioration de l'équilibre acide/base de l'organisme, du Ph des urines, une perte de magnésium, de calcium et de phosphate, en plus d'une irritation du tractus gastro-intestinal (Bourrier, 2006 ; Hayder *et al.*, 2011 ; Marano, 2013 ; Linke *et al.*, 2018).

De plus le Chlorure de calcium (SIN 509) est un additif retrouvé dans les conserves d'origine végétale. Cet additif provoque des troubles du rythme cardiaque et des troubles gastro-intestinaux ainsi que l'ulcère des intestins (Gouget, 2008 ; Diezi *et al.*, 2011 ; Marano, 2013). Hayder *et al.*, (2011) et Linke *et al.*, (2018) le déconseillent dans l'alimentation, des expériences sur des cobayes (à forte dose) rapportent des données toxicologiques diverses, notamment des effets mutagènes et cancérigènes

Concernant les exhausteurs de goût, le glutamate monosodique (SIN621) présent dans les sous-classes locales des gâteaux/biscuits et conserves d'origine animale. Cet additif a été de plus en plus utilisé par les industriels de l'agroalimentaire en quantités grandissantes, afin de donner plus de goût aux aliments et de faire de plus en plus de profit grâce à l'argent des consommateurs non informés.

Selon **Gouget (2008) et Biscontin (2018)**, cet additif est incriminé dans le fléau d'obésité que nous connaissons de nos jours, il a aussi tendance à tripler le taux d'insuline avec pour conséquence des cas de diabète de type 2. De plus, il est excitotoxique détruisant le système nerveux et cancérigène.

Le fait de manger du glutamate monosodique peut favoriser les réactions allergiques qui se traduisent par la coloration rouge du cou, du visage et du torse, des vomissements, des nausées et des sensations de brûlure. Quelques minutes après avoir mangé ce produit, la personne peut aussi sentir des bouffées de chaleur, des douleurs thoraciques, des migraines et des réactions d'hypersensibilité.

Le Ribonucléotide de sodium (SIN 635) est présent dans la classe des confiseries (Chocolats et Bonbons importés). Cet additif étant converti en purine (acide urique) dans l'organisme, de grandes quantités peuvent aggraver les symptômes de maladies métaboliques telles que la goutte (**Gouget, 2011**). Selon **Bourrier (2006), Diezi et al., (2011), Linke et al., (2018) et Rowland et al., (2018)**, cet additif peut entraîner des allergies cutanées, des irritations des muqueuses, une hyperactivité et des insomnies.

En ce qui concerne les édulcorants trouvés dans les produits lights (rarement dans les autres produits), les plus utilisés sont : L'acésulfame de potassium « SIN950 », l'aspartame « SIN951 », le sucralose « SIN955 » et le maltitol « SIN965 ». L'aspartame est fréquemment considéré comme un poison lent aux nombreux effets secondaires comme la dérégulation du poids, l'induction de cancer et l'altération du système nerveux. (**Laudisi et al., 2018**). Selon l'Association pour la Recherche Thérapeutique Anti-Cancéreuse (**ARTAC, 2011**) « *c'est un cancérigène certain* ». Malgré ces effets néfastes et son absence dans les produits lights importés, il est présent dans tous les produits locaux.

Le Maltitol (SIN 965) qui est incorporé dans les confiseries (bonbons importés) est intéressant pour l'industrie en raison de son faible coût. Néanmoins, selon **Roberts (2001), Roberts (2004) et Gallen et Pla (2013)**, à fortes doses, ces molécules sont toxiques et provoquent des troubles gastro-intestinaux.

Concernant la catégorie des amidons modifiés, nous avons répertorié durant notre enquête plusieurs molécules. Il en est ainsi du SIN 1422 présent particulièrement dans tous les produits laitiers locaux et crèmes fraîches locales ainsi que les confiseries locales, en plus des yaourts et certaines conserves d'origine animale importés. Le SIN 1440 et SIN 1442 sont présents dans les yaourts fabriqués localement. Le SIN 1420, SIN 1519 et SIN 1520 sont présents dans certaines confiseries aussi bien locales qu'importées. Le SIN 1414, nous l'avons retrouvé dans les gâteaux et biscuits importés. Concernant la classe alimentaire 'boissons', nos résultats ont révélé la présence du SIN 1450 et SIN1520 dans les jus et les boissons gazeuses fabriqués localement.

Chapitre 2 : Enquête sur les Additifs Alimentaires

Ces additifs sont classés comme ‘toxique’ et ‘douteux’ et seraient à l’origine d’un ralentissement de la dégradation des aliments dans l’intestin, ils sont également néphotoxiques et pourraient causer une hyperactivité et un déficit de l’attention chez les enfants (pour lesquels les amidons sont abondamment utilisés) (**McCann *et al.*, 2017 ; Diezi *et al.*, 2011**). Selon la FDA, les aliments apportant plus de 15grs de polydextrose par portion doivent afficher la mention ‘ les personnes sensibles peuvent ressentir un effet laxatif en cas de consommation excessive de ce produit’.

La multitude d’additifs utilisée dans l’alimentation industrielle peut donner lieu à des réactions croisées : un effet synergique favorisant donc une augmentation des risques et des troubles sur la santé de l’Homme quand celui-ci par exemple les consomme dans le même ou différents repas dans la même journée de façon prolongée. C’est-à-dire que le cumul d’aliments contenant chacun différents additifs augmente les risques de troubles de la santé (**Vieira Teixeira da Silva *et al.*, 2019**). C’est pourquoi l’EFSA (2022) mène actuellement des recherches sur les répercussions sur la santé de différentes combinaisons d’additifs ou de contaminants. Ce n’est pas seulement la dangerosité d’un seul additif qui est en cause (sauf pour les allergiques), mais bien l’association avec d’autres additifs et l’impact dans le temps de l’ingestion régulière de ces substances (**Marano, 2013 ; Aaron et Torsten, 2015**).

Certains additifs semblent être inoffensifs lorsqu’ils sont consommés individuellement. Par contre combinés avec d’autres, ils peuvent s’avérer toxiques. Dans certains cas, leur toxicité pourrait être décuplée. Même si à faible dose prise isolément, ces molécules semblent inoffensives, au bout de quelques années leur accumulation peut donner lieu à « l’effet cocktail ». Ce qui peut être à l’origine de maladies graves et chroniques, maladies pour lesquelles il sera difficile de faire le lien avec cet empoisonnement à petit feu (**Hayder *et al.*, 2011 ; Coumoul, 2016 ; Doepker *et al.*, 2016**).

Il est important donc de tenir compte des DJA, mais toutes les données sont fournies comme si nous ne consommions qu’un seul aliment ; or c’est rarement le cas. En effet, un seul aliment contient plusieurs additifs. De plus, chacun individu possède son propre seuil de sensibilité. Il existe très peu d’études portant sur l’ingestion de plusieurs additifs cumulés, mais **Gouget (2008) et Linke *et al.*, (2018)** démontrent que les additifs, dont les exhausteurs de goût, sont toxiques en raison de leur effet cumulatif.

A partir des résultats que nous avons obtenu, les colorants La Tartrazine (SIN102); le jaune de quinoléine (SIN104) ; le jaune orangé S (SIN110) ; la Carmoisine (SIN122) ; le ponceau 4R (SIN124) et le rouge allura AC (SIN129) sont incorporés dans toutes les classes alimentaires inventoriées, de même que le conservateur le Benzoate de sodium (SIN 211) que nous avons le

Chapitre 2 : Enquête sur les Additifs Alimentaires

retrouvés dans les (conserves d'origine végétale). Ces additifs combinés pourraient provoquer des troubles de déficit de l'attention chez enfants hyperactifs (**Biscontin, 2018 ; Rowland et al., 2018**). Les colorants seraient potentiellement neurotoxiques, hépatotoxiques, et cancérigènes. Cependant, ces additifs sont encore autorisés et utilisés aussi bien en Europe qu'en Algérie, même si leur dosage est souvent réglementé et leur usage limité à quelques denrées alimentaires précises (**Gouget, 2011**).

Selon **Dutau et lavaud (2018)**, la législation européenne exige à ce que soit sur les emballages des produits contenant du (SIN110), (SIN104), (SIN122), (SIN129), (SIN102) et (SIN124), la note suivante : « *Ces colorants peuvent avoir un effet nuisible sur l'activité et l'attention des enfants* »

D'après notre enquête, quatre additifs sont recensés dans les produits alimentaires inventoriés, le Jaune de quinoléine (SIN104) présent dans les bonbons importés ainsi que dans les boissons gazeuses et les jus fabriqués localement, l'aspartame (SIN951) dans les bonbons importés, ainsi que le Bleu Brillant (SIN133) présent dans les yaourts, chocolats, bonbons, boissons gazeuses et sirops locaux ainsi que dans les bonbons et les jus locaux. Ces molécules peuvent se combiner avec l'exhausteur de gout le glutamate monosodique (SIN 621). Selon **Gouget (2011) et Berta (2021)**, ces substances, une fois combinées, décuplent leur neurotoxicité: SIN133 + SIN1621 : toxicité multipliée par 4 et SIN104 + SIN451 : toxicité multipliée par 7.

Cette étude montre que la toxicité des substances combinées n'est pas simplement le résultat de la somme additionnelle des toxicités individuelles des molécules, mais bien une multiplication des toxicités (**Brunelliere, 2010**). Ces quatre additifs se retrouvent dans un grand nombre de produits alimentaires et l'inquiétude porte encore une fois sur les enfants dont les cellules nerveuses sont en pleine croissance (**Gouget, 2011**).

Nous avons aussi enregistré la présence de Sorbate de potassium (SIN 202) un conservateur très utilisé en industrie agroalimentaire dans les conserves d'origine végétale et les confiseries. Cet additif réagit avec le nitrite de sodium (SIN 250) incorporé dans les conserves d'origine animale et avec le nitrate de sodium (SIN 251) qui présent dans les viandes surgelés. Ces additifs pourraient combiner et réagir d'entre eux : la combinaison de ces molécules perturbe les systèmes enzymatiques et peut aboutir à la formation de composés mutagènes (risque d'altération de L'ADN), et une tératogénèse. (**Greco et al., 2014**).

4. CONCLUSION

Il ressort de cette étude que les denrées alimentaires industriels contiennent des additifs alimentaires de toxicité variable, qu'il s'agisse de produits locaux ou importés. Différents degrés de toxicité sont enregistrés dans toutes les classes alimentaires étudiées. Nos résultats mettent en évidence une utilisation abusive d'additifs alimentaires avec parfois une exagération allant jusqu'à quatorze additifs différents dans un seul produit. Cette étude mérite d'être élargie à un échantillonnage plus large et dans d'autres villes algériennes notamment dans l'ouest et le sud, afin de mieux cerner l'utilisation des AA. Dans cette optique, il devient urgent d'établir un plan national de surveillance des additifs alimentaires.

Pour faire face à cette situation, il est indispensable d'inciter les consommateurs à prendre les précautions nécessaires pour consommer sainement, en commençant à apprendre à consulter la liste des ingrédients avant d'acheter n'importe quel produit. Il est aussi temps de recommander aux organismes de contrôles (ministère du commerce, ministère de la santé, services de douanes, import/export étatiques ou privés ...), plus de vigilance par rapport à la traçabilité des produits locaux et importés, au respect des conditions de fabrication, de stockage, d'emballage et de transport des boissons et aliments depuis leurs lieux de fabrication jusqu'au consommateur afin de protéger la santé publique.

Chapitre 3

Effet des

nanoparticules sur les

bactéries

Les nanotechnologies dans le secteur agro-alimentaire connaissent un essor considérable. Certaines nanoparticules (NPs) sont de plus en plus incorporées dans les produits alimentaires destinées à la consommation humaine. Ces NPs sont jusqu'à nos jours cachées sous le nom d'additifs alimentaires en absence d'une réglementation rigoureuse d'une part et une ignorance des consommateurs du danger d'autre part. A l'heure actuelle, très peu d'études sont publiées concernant l'évaluation de l'effet des nanoparticules sur les bactéries.

La grande majorité des publications décrivent l'impact des NPs sur les bactéries environnementales ou sur les bactéries pathogènes. La flore bactérienne commensales de l'Homme regroupent des micro-organismes présents à l'état normal dans ou sur les individus, variable selon les sites, l'âge et l'environnement. Ces bactéries commensales peuvent être réparties en 4 flores principales (cutanée, respiratoire, génitale et digestive), qui participent activement au maintien de la santé (**Tomas *et al.*, 2013 ; Minemura *et al.*, 2015**).

Parmi les flores les plus complexes c'est la flore du tube digestif qui porte en permanence environ 100 milliards de bactéries, présentes tout au long du tractus digestif, elle est essentiellement localisée dans le côlon. Pour la voie orale, c'est dans la notion d'une exposition chronique aux faibles doses que les études les plus récentes témoignent d'un potentiel de toxicité des NPs pour l'organisme. Le challenge porte sur des cibles « santé » encore peu étudiées, à l'exemple du microbiote intestinal pour lequel les propriétés biocides de certaines NPs sont suspectées d'altérer la composition et/ou l'activité métabolique des bactéries colonisant notre intestin (**Houdeau et Lamas, 2019**) (Figure 34).

Le microbiote intestinal (auparavant appelé flore intestinale) est un écosystème complexe composé principalement de bactéries, mais également d'archées, de virus, de champignons et de protozoaires. Cette communauté joue un rôle important dans plusieurs fonctions de l'organisme (**Natividad et Verdu, 2013 ; Rooks *et al.*, 2016**), d'abord localement dans le développement et la différenciation de l'épithélium et du système immunitaire (deux acteurs essentiels de la fonction de barrière intestinale), tout en facilitant la digestion et la fermentation des polysaccharides, mais aussi au-delà en contribuant au maintien de fonctions hépatiques et cérébrales normales (**Tomas *et al.*, 2013 ; Minemura *et al.*, 2015 ; Dinan et Cryan, 2017**).

L'environnement intestinal, en particulier les cellules immunitaires du tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT), façonne le microbiote de la naissance à l'âge adulte, et permet à ces micro-organismes d'être tolérés par l'hôte. La majorité de ces bactéries appartiennent aux phyla Firmicutes et Bacteroidetes, qui représentent environ 90% de la population microbienne, tandis que d'autres espèces sont membres des phyla Protéobactéries, Verrumicrobies, Actinobactéries, Fusobactéries et

Chapitre 3 : L'Effet des Nanoparticules sur les Bactéries

Cyanobactéries (Qin *et al.*, 2010 ; Huttenhower *et al.*, 2012). Le génome entier des microorganismes intestinaux (appelé microbiome intestinal) est 150 fois plus volumineux que le génome humain (Qin *et al.*, 2010), fournissant un large éventail d'activités biochimiques et métaboliques du microbiote nécessaire à la physiologie de l'hôte (Rosenfeld *et al.*, 2015 ; . Meijnikman *et al.*, 2018). Une altération du microbiote intestinal (appelée dysbiose), dans son écologie (population microbienne) et/ou ses fonctions métaboliques (production de métabolites bactériens) est ainsi connue pour favoriser un certain nombre de maladies digestives et métaboliques chroniques (Verdu *et al.*, 2015 ; Ni *et al.*, 2017 ; Richard *et al.*, 2018).

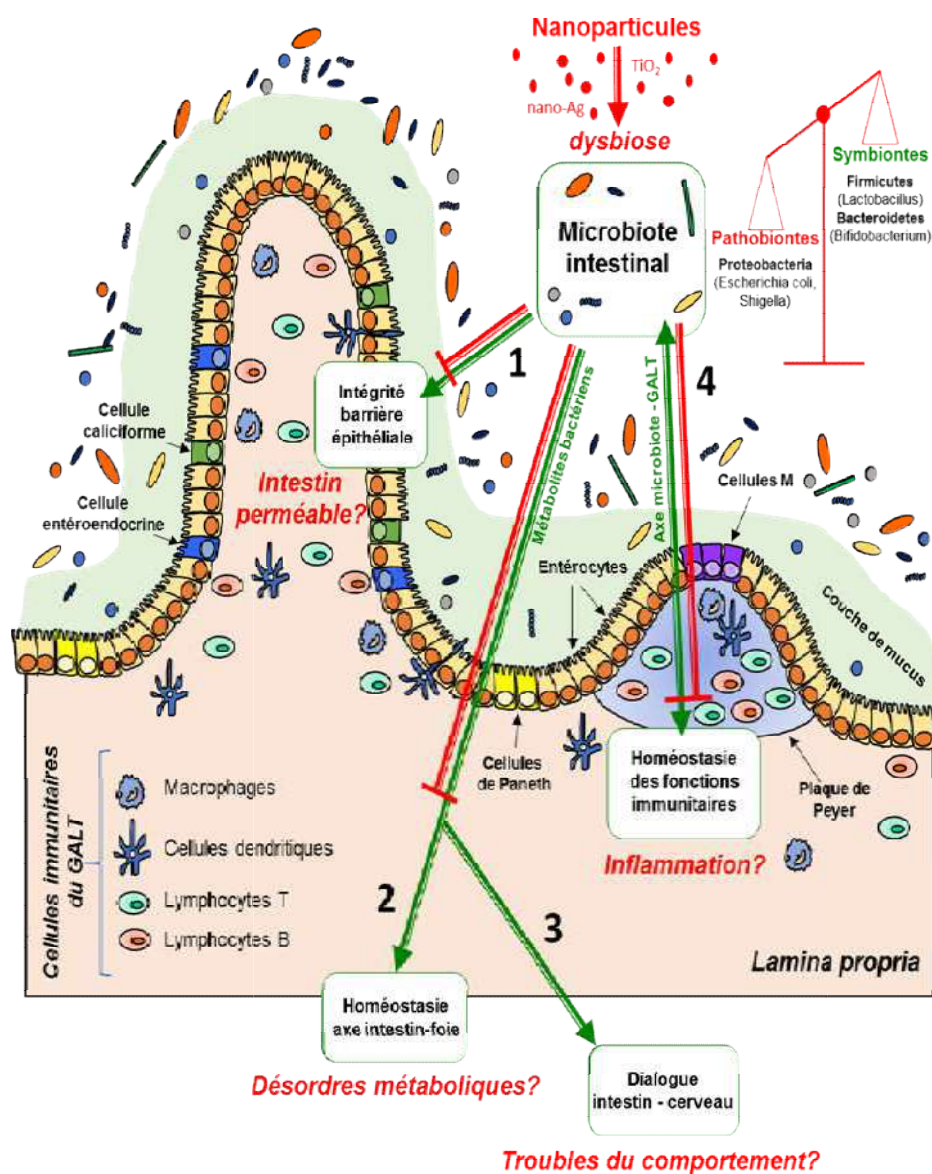


Figure 34. Rôles et déséquilibres du microbiote intestinal dans la santé de l'hôte (Houdeau et Lamas, 2019).

Chapitre 3 : L'Effet des Nanoparticules sur les Bactéries

Bien que plusieurs études mettant en évidence le caractère bactéricide du TiO₂ (Dioxyde de Titane) et du Nano-argent sur des communautés bactériennes présentes dans les sols (McGeet *al.*, 2017 ; Timmusk *et al.*, 2018), l'impact éventuel de telles NPs par voie orale est encore peu documenté.

Face à cette problématique double, nous avons mené la présente étude qui porte sur l'impact toxicologique des nanoparticules présentes dans les produits alimentaires sur les bactéries de la flore commensale de l'Homme. Pour cela, 2 types de NPs (TiO₂ et SiO₂) ont été testées sur 2 espèces bactériennes de la cavité bucco-dentaire : *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus sp.*, les NPs Ag sur *Escherichia coli* (Bactérie commensale du tube digestif) et enfin 2 mixtures NPs TiO₂ / Ag et NPs SiO₂ / Ag sur *E.coli*. Le but de cette étude est d'investiguer les interactions biologiques et physicochimiques entre nanoparticules et bactéries afin de comprendre les mécanismes de toxicité qu'implique l'échelle du nanomètre.

A l'heure actuelle, très peu d'études sont publiées concernant l'évaluation de l'effet des nanoparticules sur les bactéries. La grande majorité des publications décrivent l'impact des NPs sur les bactéries environnementales ou sur les bactéries pathogènes. Certaines nanoparticules sont de plus en plus incorporées dans les produits alimentaires destinées à la consommation humaine. Ces NPs sont jusqu'à nos jours cachées sous le nom d'additifs alimentaires en absence d'une réglementation rigoureuse d'une part et une ignorance des consommateurs du danger d'autre part. Face à cette problématique double, nous avons mené la présente étude qui porte sur l'impact toxicologique des nanoparticules présentes dans les produits alimentaires sur les bactéries de la flore commensale de l'Homme. Pour cela, 2 types de NPs (TiO₂ et SiO₂) ont été testées sur 2 espèces bactériennes de la cavité bucco-dentaire : *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus sp.* et les NPs Ag sur *Escherichia coli* (Bactérie commensale du tube digestif).

1. MATERIEL ET METHODES

Le présent travail, a été réalisé au niveau du Laboratoire de microbiologie de la faculté des Sciences, Département des sciences de la nature et de la vie, Université 20 Août 1955 Skikda en collaboration avec le laboratoire de Recherche de Toxicologie Cellulaire, Université Badji Mokhtar Annaba

1.1. Matériel biologique

Dans ce travail, nous avons utilisé des souches cliniques et des souches de référence ATCC (*American Type Culture Collection*) (Tableau 11, Figure 35). Les souches de référence sont gracieusement fournies par le laboratoire de microbiologie du centre hospitalo-universitaire (CHU) – Annaba.

Tableau 11. Souches cliniques et souches de référence testées.

Souches cliniques	Souches de référence
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Streptococcus sp.</i>	ATCC ^R 22
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922

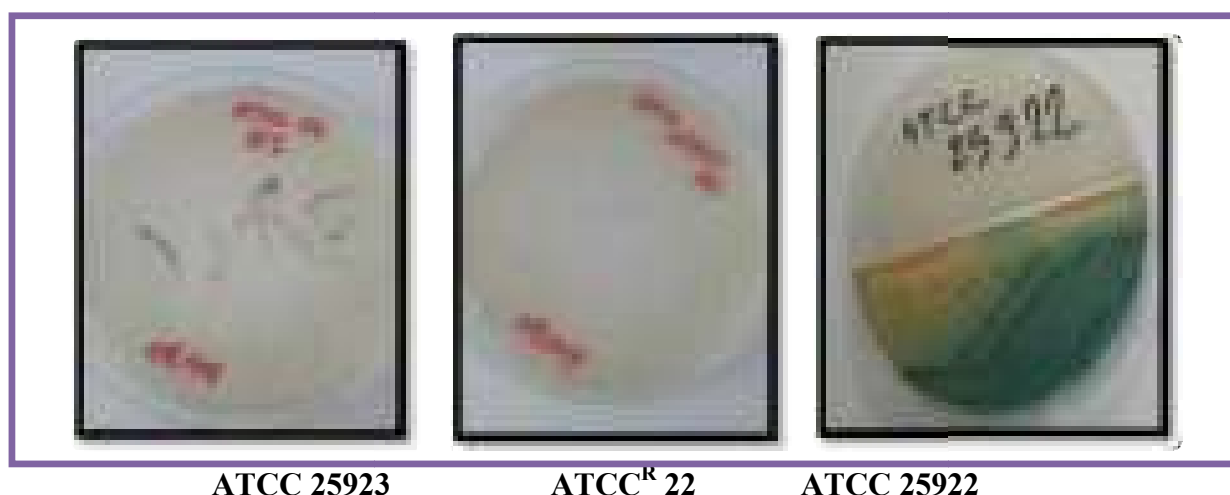


Figure 35. Observation microscopique des 3 souches de référence étudiées.

1.1.1. Genre *Staphylococcus* / ATCC25923

Les staphylocoques appartiennent au groupe de *Staphylococcus* des *cocci* catalase +, ce sont des bactéries ubiquistes, très répandues dans la nature (Figure 36). Chez l'Homme, elles font partie de la flore commensale de la peau et des muqueuses (notamment nasales). Elles sont localisées dans les cavités buccales et nasales, les plis cutanés, le périnée et le côlon (Avril *et al.*, 2000). Les

staphylocoques sont isolés dans la plaque prothétique, chez des sujets immunodéprimés et dans de nombreuses infections orales (ostéites, infections parodontales) (Marsh & Martin, 2009).

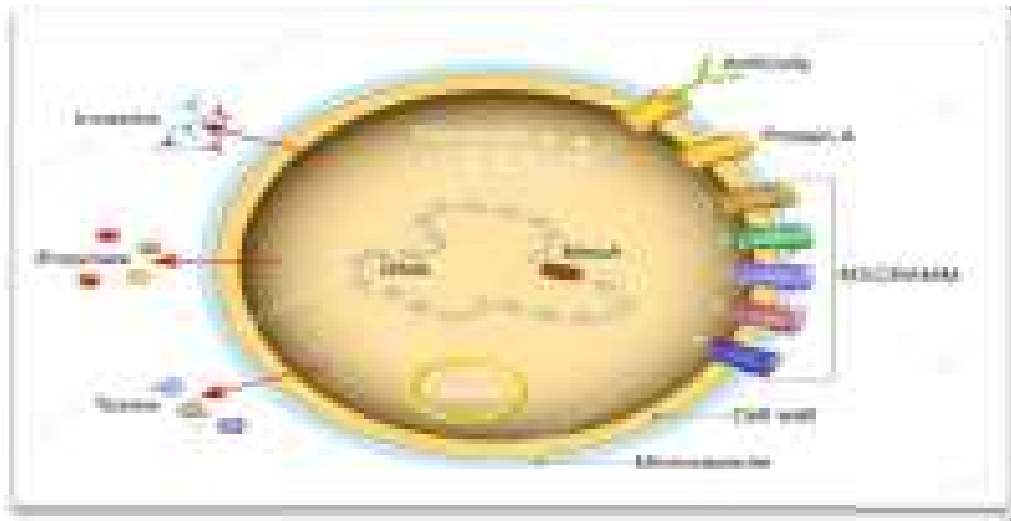


Figure 36. Morphologie de la bactérie *Staphylococcus aureus*.

(<https://fr.dreamstime.com/structure-cellulaire-staphylococcus-aureus-facteurs-pathog%C3%A8nes-image122532471>)

✓ **Classification**

Selon la 9ème édition du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, les staphylocoques sont classés parmi les bactéries à Gram positif pauvres en GC, dans le phylum des Firmicutes (Tableau 12).

Tableau 12. Classification de *Staphylococcus aureus* (Avril *et al.*, 2000).

Classe	Bacilli
Ordre	Bacillales
Famille	Staphylococcaceae
Genre	Staphylococcus
Espèce	<i>Staphylococcus aureus</i>

1.1.2. Genre *Streptococcus*/ATCC^R22

Les streptocoques oraux sont des bactéries commensales de la cavité buccale et participent à l'équilibre écologique de la flore buccale (Figure 37). Ils sont divisés en quatre groupes

Chapitre 3 : L'Effet des Nanoparticules sur les Bactéries

phylogéniques : *salivarius*, *mutans*, *anginosus*, *etmitis*. Les streptocoques sont également isolés dans les nécroses pulpaires, les gingivites chroniques et les péri-implantites (Chardin *et al.*, 2006).

Au sein de l'écosystème buccal, les streptocoques sont prépondérants. Premiers colonisateurs de la bouche, dès le deuxième jours de leur la naissance, ils sont également le groupe bactérien le plus représenté numériquement dans la cavité orale puisqu'ils représentent plus de 20% de la flore buccale. Le genre *Streptococcus* est présent sur toutes les surfaces buccales, avec des spécificités selon les espèces (Roger, 2011).

✓ Classification

La classification du Bergey's manual reste la référence. Certains streptocoques sont capables de sécréter des substances pouvant lyser les érythrocytes. Cette propriété permet de classer ces bactéries suivant le type d'hémolyse entourant les colonies sur gélose au sang :

- Streptocoques β -hémolytiques : zone large de lyse franche autour de la colonie (lyse des hématies de la gélose qui devient donc incolore).
- Streptocoques α -hémolytiques : zone étroite de lyse floue et partielle, de coloration verdâtre.
- Streptocoques non hémolytiques.

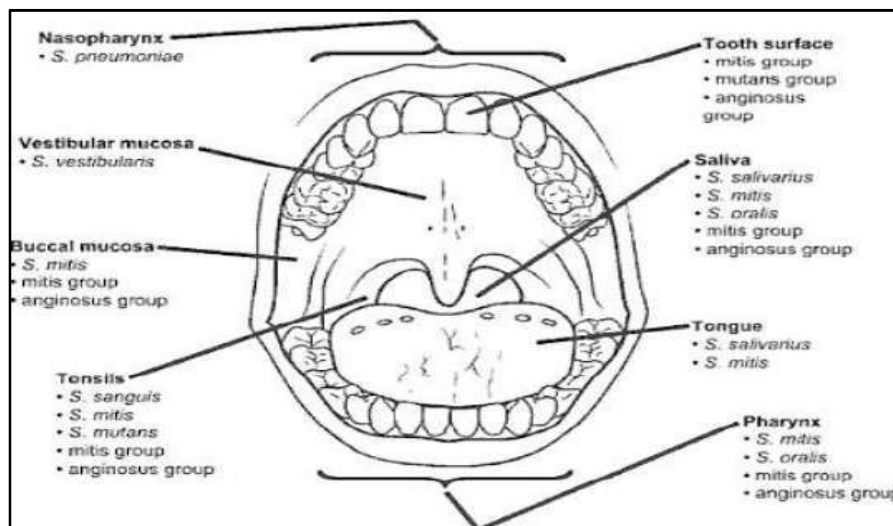


Figure 37. Colonisation des sites buccaux par les Streptocoques (Roger, 2011).

1.1.3. Genre *Escherichia*/ ATCC25922

Ce genre appartient à la famille des entérobactéries. Ce sont des bactéries commensales ou pathologiques du tube digestif de l'Homme et des animaux, d'où leur nom (entéro=intestin grêle). Parmi les espèces qui composent cette famille et ce genre d'*Escherichia*, des bactéries commensales

Chapitre 3 : L'Effet des Nanoparticules sur les Bactéries

telles que *E. coli* (Avril *et al.*, 2000). Cette espèce représente 2/3 à 3/4 des bactéries identifiées dans un laboratoire de bactériologie. *E. coli* est retrouvé de façon commensale dans la flore intestinale et fécale (Figure 38).

La flore intestinale est colonisée peu après la naissance, la bactérie et l'hôte co-existent sans impact sur la santé respective. Cette coexistence entraîne des bénéfices mutuels (Kaper *et al.*, 2004). Elles peuvent leur fournir de la vitamine K2 et les protègent d'invasion par des bactéries pathogènes (Tenailon *et al.*, 2010).

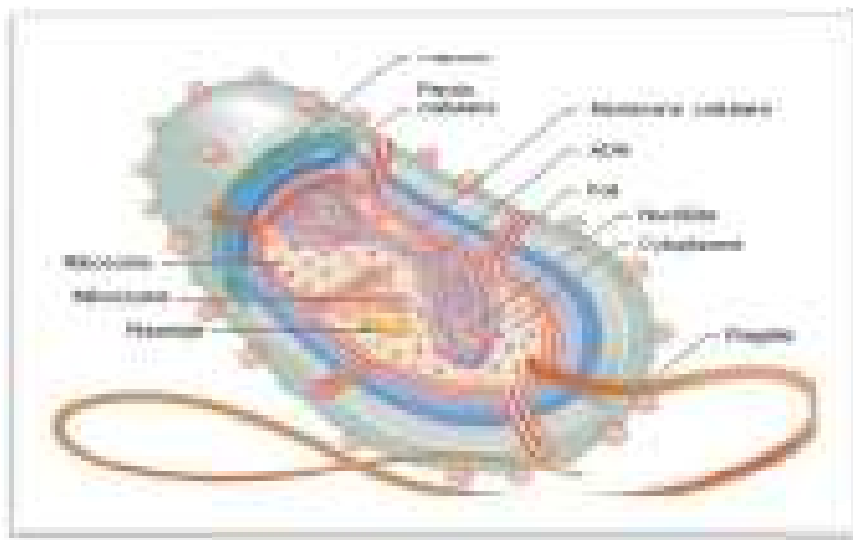


Figure 38. Structure d'*E. coli* (Bougon, 2007)

✓ Classification

Selon le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2012), les bactéries *E. coli* sont classées comme illustré dans le tableau 13.

Tableau 13. Classification d'*Escherichia coli* selon (Avril *et al.*, 2000).

Règne	Bactéria
Embranchement	Proteobacteria
Classe	Gamma proteobacteria
Ordre	Enterobacteriales
Famille	Enterobacteriaceae
Genre	Escherichia
Espèce	<i>Escherichiacoli</i>

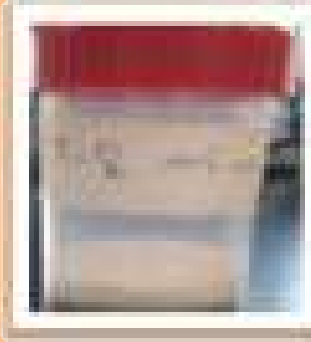





Chapitre 3 : L'Effet des Nanoparticules sur les Bactéries

1.2. Matériel chimique

Trois types de nanoparticules font l'objet de notre étude : Le dioxyde de titane (NPs TiO_2) et le dioxyde de silicium (NPs SiO_2) nanométriques ; fournis gracieusement par le Professeur Mekki Abdelmadjid du laboratoire d'Etude des surfaces et interfaces de la matière solide (LESIMS) du département de Physique de l'université Badji-Mokhtar-Annaba. Les nanoparticules d'argent (NPs Ag) provenant de la société ALDRICH dans un flacon contenant 5g sous la référence du lot MMKBX3387V (Tableau 14).

Dans un premier temps, l'effet séparé de chaque NPs sur les bactéries est étudié, ensuite l'effet de deux mixtures ; entre NPs Ag/NPs TiO_2 d'une part et entre NPs Ag/NPs SiO_2 d'autre part est testé.

Tableau 14. Différentes nanoparticules utilisées dans l'étude.

Nanoparticules	Dioxyde de titane (TiO_2)	Dioxyde de silicium (SiO_2)	Nanoparticules d'argent (Ag)
Image réelle			
Taille	105nm	14nm	<99nm
Poudre des NPs			

1.3. Echantillonnage

1.3.1. Cavité bucco-dentaire : prélèvement de crachats sur des personnes saines et volontaires pour la recherche des bactéries des genres *Staphylococcus* et *Streptococcus*.

Pour l'isolement des bactéries, une dilution du 1/5 de chaque prélèvement est réalisée : 20cc de prélèvement + 80cc de sérum salé à 0.45%.

Chapitre 3 : L'Effet des Nanoparticules sur les Bactéries

Ensuite, un ensemencement des échantillons dans des boîtes de pétri sur trois milieux de culture différents est effectué : Hektoen, Chapman et gélose au sang cuit (milieu Muller Hinton avec du sang). Toutes les boites de pétri ensemencées sont incubées pendant 24h à 37°C. Après 24h, et afin de bien visualiser les colonies, un ré-isolement secondaire est exécuté pour procéder à l'identification des différentes souches.

1.3.2. Tube digestif : Prélèvement de selles sur des personnes saines et volontaires pour la recherche des bactéries du genre *Escherichia*.

Pour la coproculture ; un enrichissement est réalisé dans un tube contenant 5ml du milieu SFB (Sélénite acide de sodium D/C) additionné de sélénite de sodium pour incubation pendant 4h à 37°C.

Ensuite, chaque échantillon est ensemencé dans une boite de pétri contenant le milieu de culture sélectif : Hektoen. L'ensemble des boites de pétri ensemencées est incubé pendant 24h à 37°C.

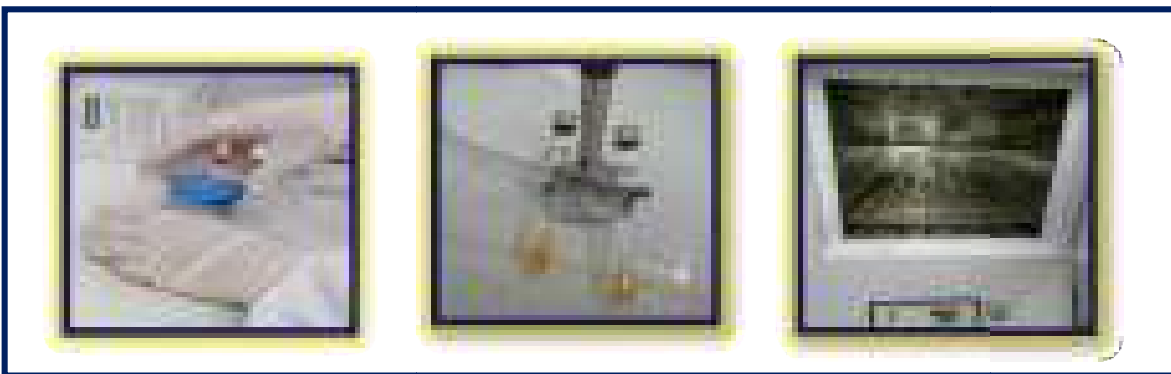


Figure 39. Etapes d'enrichissement

1.4. Recherche et identification des souches cliniques

- **Repiquage :** Le repiquage est effectué afin d'obtenir des colonies différentes, espacées les unes des autres.

Après 24 heures d'incubation à 37°C :

- Pour *Staphylococcus* et *Streptococcus* : Avec une anse de platine stérile, une goutte de la suspension bactérienne est prise et déposée dans une boite de pétri contenant le milieu sélectif correspondant à l'espèce bactérienne préalablement identifiée (à partir de la préculture).
- Pour *Escherichia* : A l'aide d'une anse de platine stérile, une seule colonie est sélectionnée et ensemencée sur le milieu sélectif (Hektoen) de l'espèce bactérienne préalablement identifiée (à partir de la préculture) dans une boite de Pétri. Les souches sont incubées dans l'étuve pendant 24h à 37°C.

Chapitre 3 : L'Effet des Nanoparticules sur les Bactéries

- **Etat frais** : C'est l'examen microscopique des bactéries vivantes, en milieu liquide. Il permet d'apprécier leur mobilité (ou immobilité), morphologie (forme) et mode de regroupement.

D'abord et avec une pipette Pasteur, une gouttelette d'eau distillée stérile (EDS) est déposée sur une lame propre et stérile.

Puis, à l'aide d'une anse de platine stérile, une trace de culture est prélevée et mélangée avec la gouttelette d'EDS jusqu'à l'homogénéisation. La suspension bactérienne est recouverte d'une lamelle et prête pour l'observation microscopique à l'objectif (x10), ensuite (x40).

- **Coloration de Gram** : Permet non seulement d'observer la forme des cellules mais aussi de diviser les bactéries en deux grands groupes taxonomiquement différents : les bactéries Gram positives et les bactéries Gram négatives.

La technique de la coloration repose sur le protocole suivant :

- Etalement et fixation par la chaleur de la suspension bactérienne sur une lame porte objet.
- Coloration pendant 60 secondes au violet de gentiane. Rinçage à l'eau.
- Fixation au Lugol pendant 20 secondes avec 2 répétitions et rinçage à l'eau à chaque fois.
- Décoloration à l'éthanol à 95° pendant quelques secondes. Rinçage à l'eau.
- Contre coloration pendant 60 secondes par une solution de fuschine. Rinçage à l'eau.

Après séchage, la lame peut être observée au microscope optique avec un objet à immersion. Les bactéries à GRAM⁺ apparaissent en violet et les bactéries à GRAM⁻ en rose.

- **Test catalase** : La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatifs elle décompose l'eau oxygénée formée en eau et en oxygène qui se dégage. Pour effectuer ce test, il suffit de prendre une lame porte-objet propre et y déposer une goutte d'eau oxygénée et émulsionner.
- **Identification biochimique (GalerieApi)**

Le système API® BioMérieux (Appareillage et Procédé d'Identification) est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries. Lorsqu'une suspension bactérienne de densité convenable est répartie dans les différentes alvéoles qui composent la micro-galerie (contenant de substrats déshydratés), les métabolites produits durant la période d'incubation se traduisent par des changements de couleur spontanés ou révélés par addition de réactifs. Elle comprend 20 tests biochimiques. Elle permet l'identification d'une centaine de bacilles à Gram négatif dont les Entérobactéries. Ensuite, deux types de galeries étaient utilisés pour l'identification biochimique des différentes souches :

Chapitre 3 : L'Effet des Nanoparticules sur les Bactéries

-Pour les Entérobactéries : galerie API 20 E.

-Pour les Staphylocoques : galerie API 20 *Staph*.

-Pour les Streptocoques : A cause de la non disponibilité de la galerie API 20 *Strep* (rupture nationale), uniquement le test d'hémolyse et l'agglutination avec anti sérum sont réalisés pour pouvoir classer nos souches dans leur groupe correspondant.

1.5. Dilution des NPs et ensemencements des souches sur gélose traitée

1.5.1. Préparation de la solution mère

Nous avons procédé à la préparation de la solution mère de la façon illustrée dans la figure (40).

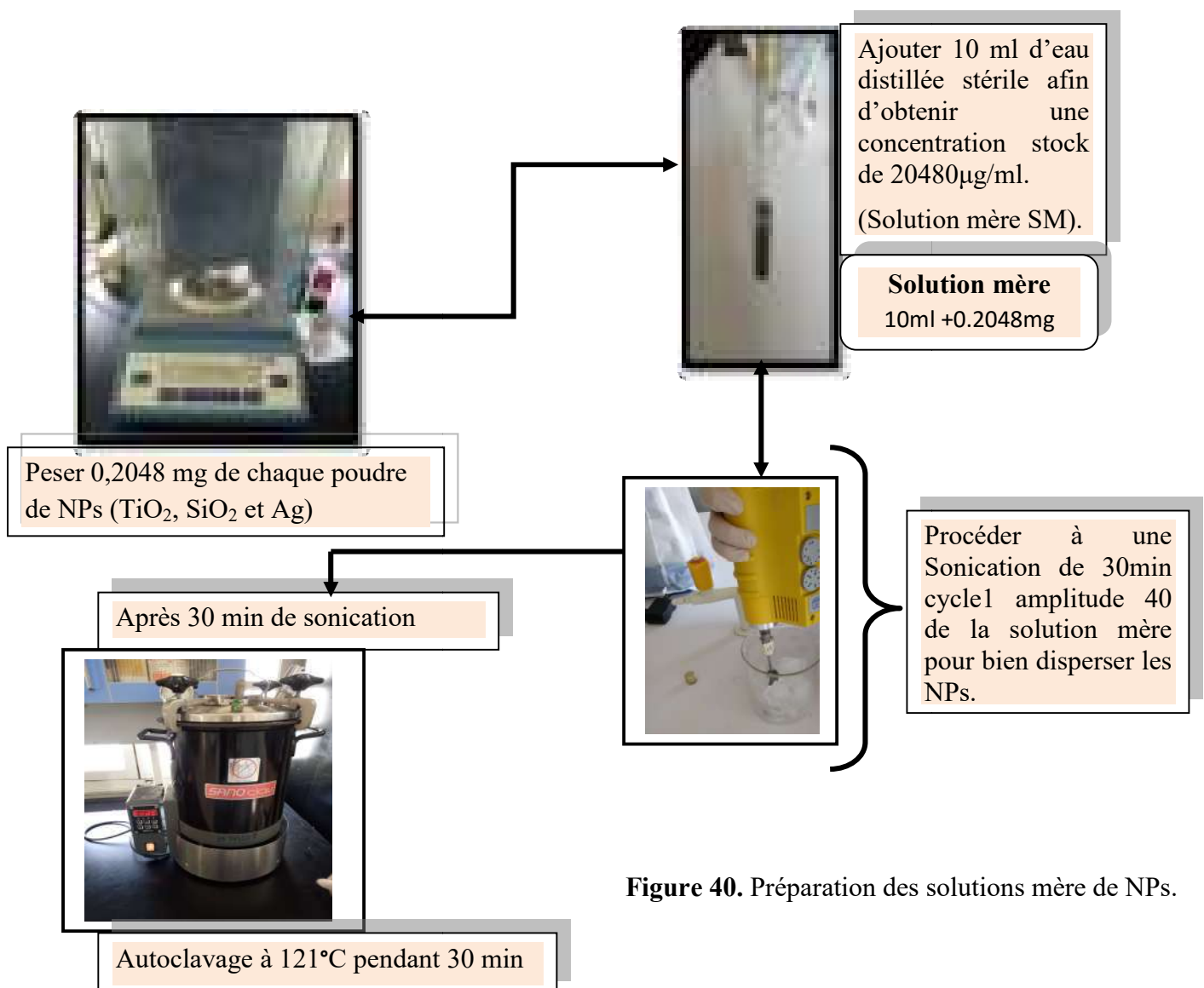


Figure 40. Préparation des solutions mère de NPs.

A la fin de la préparation, nous avons obtenu 3 solutions mères correspondants aux 3 NPs étudiées.

1.5.2. Technique de dilution semi-logarithmique

-Une série de dilution semi-logarithmique est réalisé pour chacun de nos produits.

-La dilution obtenue (1 / 10^{ème}) dans chaque boite aboutit à une concentration finale allant de 2048 µg/ml à 0,125 µg/ml. La gamme de dilution obtenue est : 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8,16, 32, 64, 128, 256, 512,1024 et 2048 µg/ml (Figure 41).

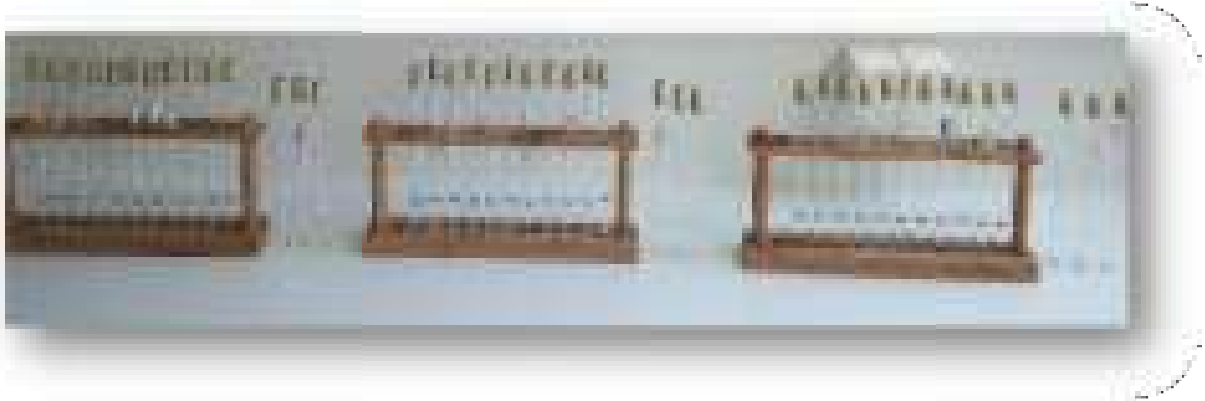


Figure 41. Dilution semi-logarithmique des NPs

Etudes des effets des NPs séparés : Répartir 2 ml de chaque concentration dans la boite correspondante en procédant de la plus faible concentration à la concentration la plus élevée.

Etudes des effets de mixture de NPs : Répartir 1 ml de NPsTiO₂ et 1ml NPsAg/ 1 ml de NPsSiO₂ et 1ml NPsAg de chaque concentration dans la boite correspondante (Figure 42).

Dans les 2 cas :

- Compléter chaque boite avec 18 ml de milieu de culture sélectif déjà liquéfié et homogénéiser délicatement,
- Préparer une boite témoin en remplaçant le volume de nanoparticules par le même volume d'eau distillée stérile à savoir 2 ml.
- Ensemencer l'ensemble des boites de pétri contenant la gélose traitée avec les bactéries à étudier (*S.aureus*, *Streptococcus sp.* et *E.coli*).
- Incuber pendant 24h à 37°C.



Figure 42. Préparation de l'Hecktoen traitée à la mixture de NP Ag/NP TiO₂.

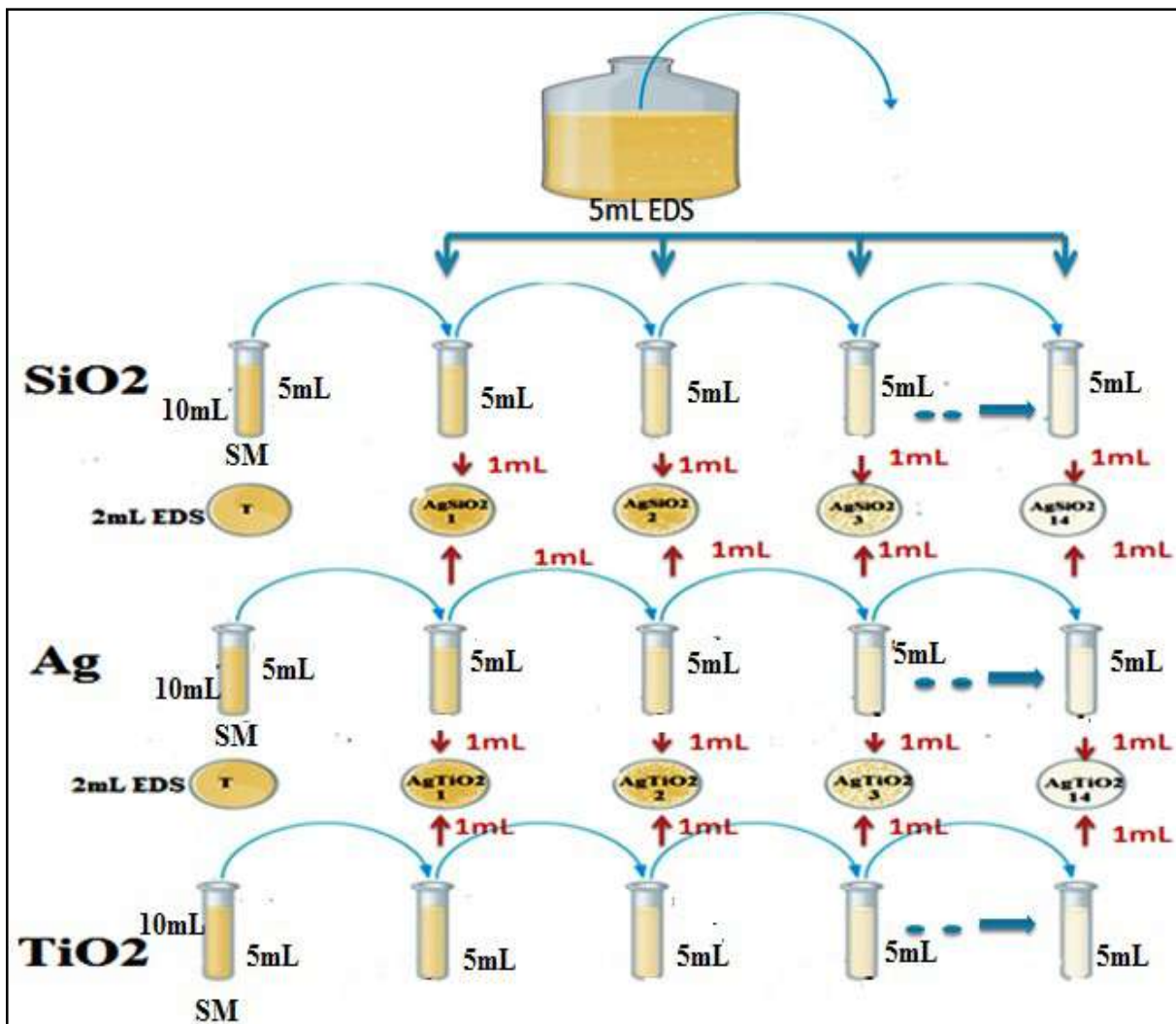


Figure 43. Préparation des solutions des NPs utilisées pour l'essai (Mixture AgSiO₂ et AgTiO₂)

- Après 24h d'incubation, faire le dénombrement des colonies à l'aide du compteur de colonie.
- Faire une observation macroscopique et microscopique afin de détecter les différents changements liés à l'interaction NPs-Bactéries en se focalisant sur la taille, la couleur et la forme des colonies.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Nous rappelons que les souches de référence sont fournies aimablement par le laboratoire de microbiologie du CHU Dorban – Annaba –. Il s'agit de 3 souches de référence : ATCC 25922 *E.coli*, ATCC 25923 *Staphylococcus aureus* et ATCC^R 22 *Streptococcus sp.*

Après réception des souches cliniques, nous avons réalisé une série de tests: réactivation des souches, repiquage et ensemencement avec une série de test classique de microbiologie (Catalase, oxydase...) afin de confirmer l'identification bactérienne de nos souches. Les résultats ont révélé qu'il s'agit des trois souches : (a) *Staphylococcus aureus*, (b) *Streptococcus spet* (c) *Enterococcus sp.* représentées dans la figure (44).

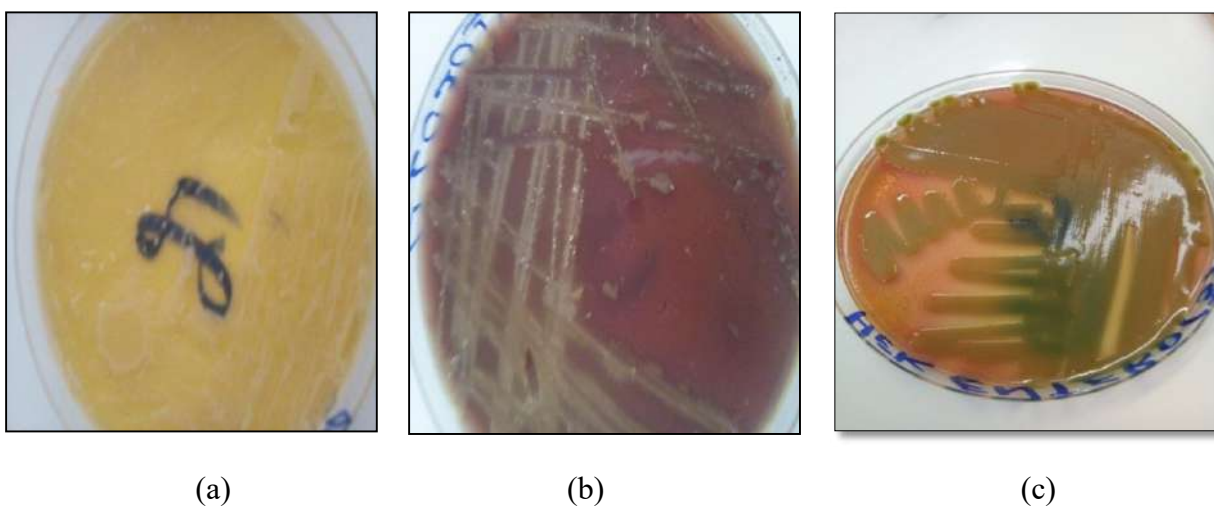


Figure 44. Souches cliniques *E.coli*(a), *Staphylococcus aureus* (b) et *Streptococcus sp.*(c).

Une identification biochimique par la galerie Api est réalisée pour l'identification biochimique des souches *E. coli*. (Figure 45) et *S. aureus*. Cependant, nous n'avons pas pu réaliser l'identification biochimique des souches Streptocoques en raison d'une rupture de stock à l'échelle nationale.



Figure 45. Identification biochimique par galerie API20E des souches *E. coli* cliniques.

2.1. Souches d'*E. coli*, Staphylocoques et Streptocoques sur gélose non traitée aux NPs

a) Dénombrement des souches

Avant de traiter les milieux de culture sélectifs aux NPs, un dénombrement des souches est effectué grâce au compteur de colonie. Le tableau (15) met en évidence le dénombrement des colonies des souches cliniques et de référence.

Tableau 15. Nombre de colonies des souches de référence et clinique et ensemencées sur géloses non traitées aux NPs.

SouchesCliniques	Nbr de colonies	Souches de référence	Nbr de colonies
<i>Escherichia coli</i>	>300	ATCC 25922 <i>Escherichia coli</i>	230
<i>Staphylococcus aureus</i>	>300	ATCC 25923 <i>Staphylococcus aureus.</i>	250
<i>Streptococcus sp</i>	176	ATCC ^R 22 <i>Streptococcus agalactiae III</i>	188

Chapitre 3 : L'Effet des Nanoparticules sur les Bactéries

Nous remarquons que le nombre de colonies de souches cliniques dépasse les 230 colonies pour les *E.coli* et *S.aureus* qu'elles soient clinique ou de référence. Il s'agit donc de cultures denses.

b) Observation macroscopique des souches sur gélose non traitées aux nanoparticules

Le tableau (16) illustre l'aspect macroscopique des souches, ce qui nous permet de confirmer certains caractères tels que la taille, la croissance et la forme, des paramètres sur lesquels nous nous sommes basés dans notre étude.

Tableau 16. Aspect macroscopique des colonies des souches de référence et cliniques.

Souches	Taille	Croissance	Forme	Surface	Consistance	Opacité	Couleur	Odeur
R* ATCC 25922	Moyenne	Dense	Plate	Lisse	Sèche	Opaque	Orange	Présente
C* * <i>E. coli</i>	Moyenne	Dense	Plate	Lisse	Sèche	Opaque	Orange	Présente
R* ATCC 25923	Moyenne	Dense	Bombée	Lisse	Crémeuse	Opaque	Blanche	Présente
C* * <i>S. aureus</i>	Moyenne	Dense	Bombée	Lisse	Crémeuse	Opaque	Blanche	Présente
R* ATCC® 22	Petite	Dense	Bombée	Lisse	Crémeuse	Opaque	Blanche	Présente
C* * <i>Strept sp.</i>	Petite	Dense	Bombée	Lisse	Crémeuse	Opaque	Blanche	Présente

R* : Souches de référence C** : Souches cliniques


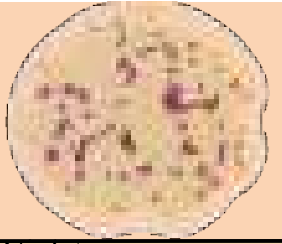
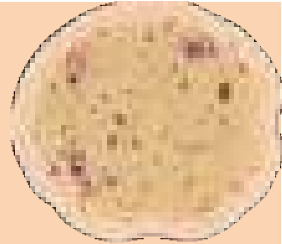
Nous constatons que macroscopiquement, les souches cliniques et de référence ont les mêmes caractéristiques.

c) Observation microscopique des souches sur gélose non traitées aux NPs

L'observation microscopique concerne uniquement les souches cliniques afin de pouvoir confirmer leur identification.

L'observation microscopique des souches à l'état frais sert à étudier les paramètres de mobilité, mode de regroupement et la morphologie. Le tableau (17) met en évidence ces paramètres.

Tableau 17. Observation microscopique des souches cliniques à l'état frais.

Bactéries		<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus sp</i>
Etat frais	Mobilité	Colonies mobiles	Colonies immobiles	Colonies immobiles.
	Mode de regroupement	Diplobacilles	Colonies en amas (en grappe de raisin)	Colonies en chaînette
	Morphologie	Coccobacilles	Coques (Cocci)	Coques (Cocci)
Coloration de GRAM (X100)		GRAM ⁻	GRAM ⁺	GRAM ⁺
				
		Rose	Violet	Violet

2.2. Souches de Staphylocoques et Streptocoques sur gélose traitée aux NPs TiO₂

a) Dénombrement des souches

✓ Témoin

Le tableau (18) met en évidence le nombre de colonies chez les souches témoins aussi bien cliniques que de référence.

Tableau 18. Dénombrement des colonies des souches Témoins.

Souches	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Streptococcus sp</i>	
	C	R	C	R
Type de souche				
Nombre de colonie	288	250	297	260

**Staphylococcus aureus*: La figure (46), illustre les résultats du dénombrement des souches *S. aureus* cliniques et de référence. Nous remarquons que le nombre de colonies cliniques et de référence croit de manière similaire et proportionnelle aux dilutions.

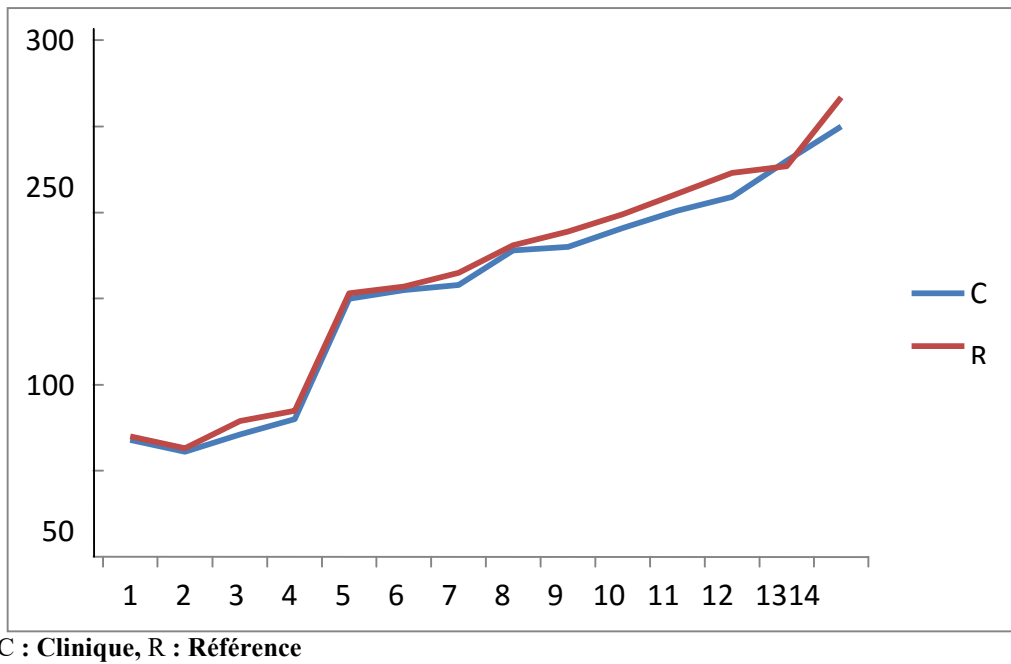


Figure 46. Nombre de colonies des souches cliniques et de référence *S.aureus* en fonction des dilutions de NPs TiO₂.

* *Streptococcus sp.* : La figure (47), illustre les résultats du dénombrement des souches *Streptococcus sp.* cliniques et de référence en fonction des différentes dilutions. Nous remarquons que le nombre de colonies cliniques et de référence croit de manière similaire et proportionnelle aux dilutions.

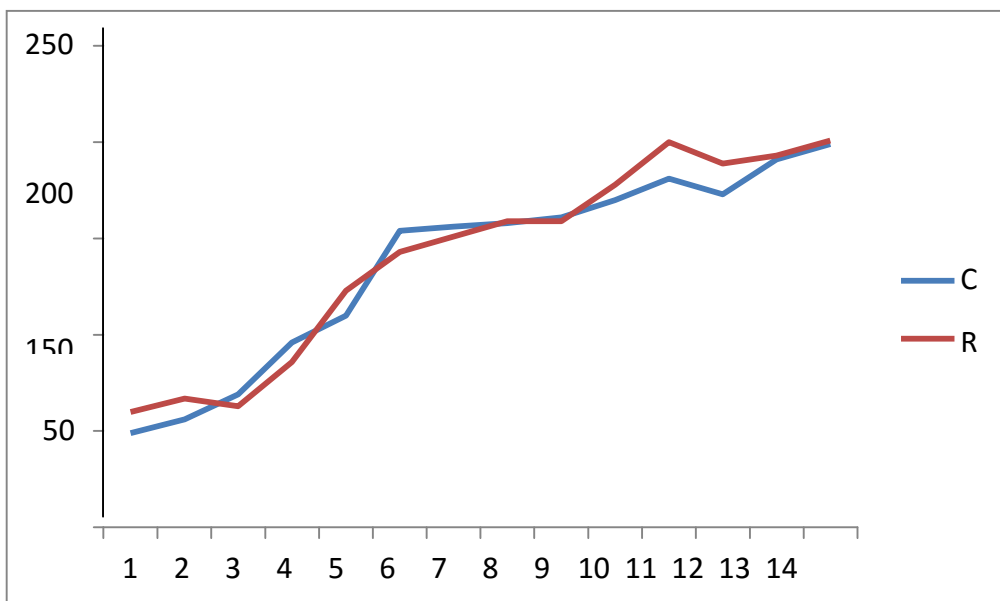


Figure 47. Nombre de colonies des souches cliniques et de référence *Streptococcus sp.* en fonction des dilutions de NPs TiO₂.

b) Observation macroscopique

L'aspect macroscopique des souches nous permet de confirmer certains caractères tels que la taille, la croissance et la forme, des paramètres sur lesquels nous nous sommes basés dans notre étude. Le détail de tous les résultats est illustré dans le tableau (19). Ces résultats démontrent que la croissance et la forme des colonies sont influencées par les deux types des nanoparticules.

* *Staphylococcus aureus*

Le tableau 19 montre les changements dans la forme et la croissance des souches cliniques traitées par les différentes concentrations de NPs. La croissance pour *S. aureus* était avant traitement de gélose au TiO₂ était dense et la forme bombée. Après traitement, ces paramètres ont changé ainsi, nous remarquons par exemple que pour la dilution 11, la croissance qui était dense (D) est devenue faible (F) pour les souches de référence et moyenne (M) pour les souches cliniques.

Tableau 19. Caractères morphologiques des colonies *S. aureus*. sur gélose traitée aux NPs TiO₂.

Numéro de dilution	[] µg/ml	Croissance		Forme	
		R	C	R	C
1	1024	M	D	B	B
2	512	M	M	B	PI
3	256	M	M	PI	B
4	128	M	F	PI	PI
5	64	D	F	B	PI
6	32	F	F	PI	PI
7	16	F	M	B	PI
8	8	M	F	PI	PI
9	4	M	M	B	B
10	2	M	D	B	PI
11	1	F	M	PI	B
12	0,5	M	F	B	PI
13	0,25	F	M	B	B
14	0,125	M	F	B	B

Faible : F Moyenne : M Dense : D Plate : PI Bombé : B

Les changements dans les souches de *S. aureus* sont observés au niveau de croissance et la forme. La croissance est passée de moyenne (M) à dense (D) et/ou faible (F) surtout pour les dernières dilutions de 2µg/ml à 0.125µg/ml pour les souches de référence et cliniques.

***Streptococcus sp**

Le tableau (20) met en évidence des changements dans la forme et la croissance des souches cliniques et de référence traitées par les différentes concentrations des NPs. La croissance pour *S. aureus* était dense (D) et de forme bombée (B) avant le traitement de la gélose par le NPs TiO₂

Tableau 20. Caractères morphologiques des colonies *Streptococcus sp.* sur gélose traitée aux NPs TiO₂.

N° de dilution	[] µg/ml	Croissance		Forme	
		C	R	C	R
1	1024	Faible		Plate	
2	512				
3	256				
4	128				
5	64				
6	32				
7	16				
8	8	Moyenne		Bombée	
9	4				
10	2				
11	1				
12	0.5				
13	0.25				
14	0.125				

Après traitement, la croissance devient faible (F) pour les sept premières concentrations et la forme plate (P) (1024µg/ml à 16µg/ml). Pour les sept dernières concentrations de NPs TiO₂ (8µg/ml à 0.125µg/ml), la croissance devient moyenne (M) et la forme bombée (B).

c) Observation microscopique

L'observation microscopique concerne les témoins, les souches cliniques et les souches de référence afin de pouvoir confirmer l'effet des Nanoparticules sur la taille, la croissance et la forme.





- **Etat frais**

L'observation microscopique des souches à l'état frais (sans coloration) sert à étudier les paramètres de mobilité, mode de regroupement et la morphologie.

Le tableau 21 décrit l'état frais des souches étudiées.

Chapitre 3 : L'Effet des Nanoparticules sur les Bactéries

Tableau 21. Description des colonies du *S. aureus* et *Streptococcus sp.* à l'état frais.

Bactéries		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus sp</i>
Etat frais	Mobilité	Colonies immobiles	Colonies immobiles.
	Mode de regroupement	Colonies en diplocoque	Colonies en chaînette
	Morphologie	Très petites coques (Cocci)	Coques (Cocci)
	Observation microscopique des témoins (SR)		
	Observation microscopique des témoins (SC)		

Nous constatons que les colonies des deux espèces étudiées sont immobiles, et les colonies sont en diplocoque pour *S.aureus* et en chaînette pour les *Streptococcus sp.*

****Staphylococcus aureus***

Le tableau 22 montre l'état frais de *S.aureus* C et R. Nous remarquons que pour les souches traités par différentes concentrations de NPs TiO₂, des changements sont observés. Ainsi, les souches passent de l'état petites Cocci à petites Cocci fines.

Chapitre 3 : L'Effet des Nanoparticules sur les Bactéries

Tableau 22. Etat frais des souches *S. aureus* (C et R) en fonction des dilutions de NPs TiO₂.

Souches	[] µg / ml	<i>Staphylococcus aureus</i>	
		Souches cliniques	Souches de référence
1	1024	Petites Cocci, très fin, en amas, immobile	Petites Cocci, en amas, immobile
2	512	Petites Cocci, très fines, en diplocoque, immobile	Petites Cocci, en diplocoque, immobile
3	256	Petite Cocci, en diplocoque, immobile	Petite Cocci, en amas, immobile
4	128		Petite Cocci, en diplocoque, immobile
5	64	Petites Cocci, très fines, en diplocoque, immobile	Petite Cocci, en diplocoque, immobile
6	32		Petite Cocci, en amas, immobile
7	16	Petite Cocci, en amas, immobile	
8	8	Petites Cocci, en amas, immobile	
9	4	Petite Cocci, en diplocoque, immobile	
10	2		
11	1	Petites Cocci, très fines, en diplocoque, immobile	Petites Cocci, en diplocoque, immobile
12	0,5	Petite Cocci, isolées, immobile	Petites Cocci, en amas, immobile
13	0,25	Petite Cocci, en diplocoque, immobile	
14	0,125	Petites Cocci, très fines, en diplocoque, immobile	Petites Cocci, en diplocoque, immobile

***Streptococcus sp**

Le tableau (23) montre que les *Streptococcus sp.* C et R traitées par les différentes concentrations de NPs TiO₂ ne changent que pour les concentrations 512µg/ml et 2µg/ml. ces souches sont passées à l'état 'petite cocci'.

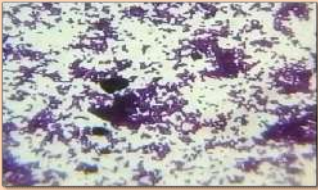

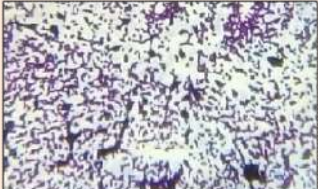
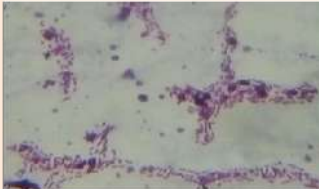
Tableau 23. Etat frais des souches *Streptococcus sp.* (C et R) en fonction des concentrations de NPs TiO₂.

Souches	[] µg/ml	<i>Streptococcus sp.</i>	
		Souches cliniques <i>Streptococcus sp</i>	Souches de référence <i>Streptococcus agalactis</i>
2	512	Petite cocci, en chaînette, immobile	Petite cocci, en chaînette, immobile
10	2	Cocci, en chaînette, immobile	

• **Coloration de GRAM**

Le tableau (24) reflète l'état des souches *S. aureus* et *Streptococcus sp.* après coloration de GRAM. Nous remarquons que les souches sont sous forme de Cocci et grappe de raisin et sont GRAM+.

Tableau 24. Description des colonies du *S. aureus* et *Streptococcus sp.* après coloration de GRAM.

Bactéries		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus sp.</i>
Coloration de GRAM	Morphologie et mode de regroupement	Cocci en grappe de raisin (SR et SC)	
	GRAM	GRAM +	
	Observation microscopique des témoins (X100)		
			
	SR	SR	
	SC	SC	

Chapitre 3 : L'Effet des Nanoparticules sur les Bactéries

* *Staphylococcus aureus*

la figure 48 montre que la coloration de GRAM réalisée pour l'identification des souches cliniques et de référence montre que les grappes de raisin sont de grande taille à la différence de la coloration de GRAM réalisée après traitement aux NPs où les grappes de raisin sont de taille nettement plus petite.

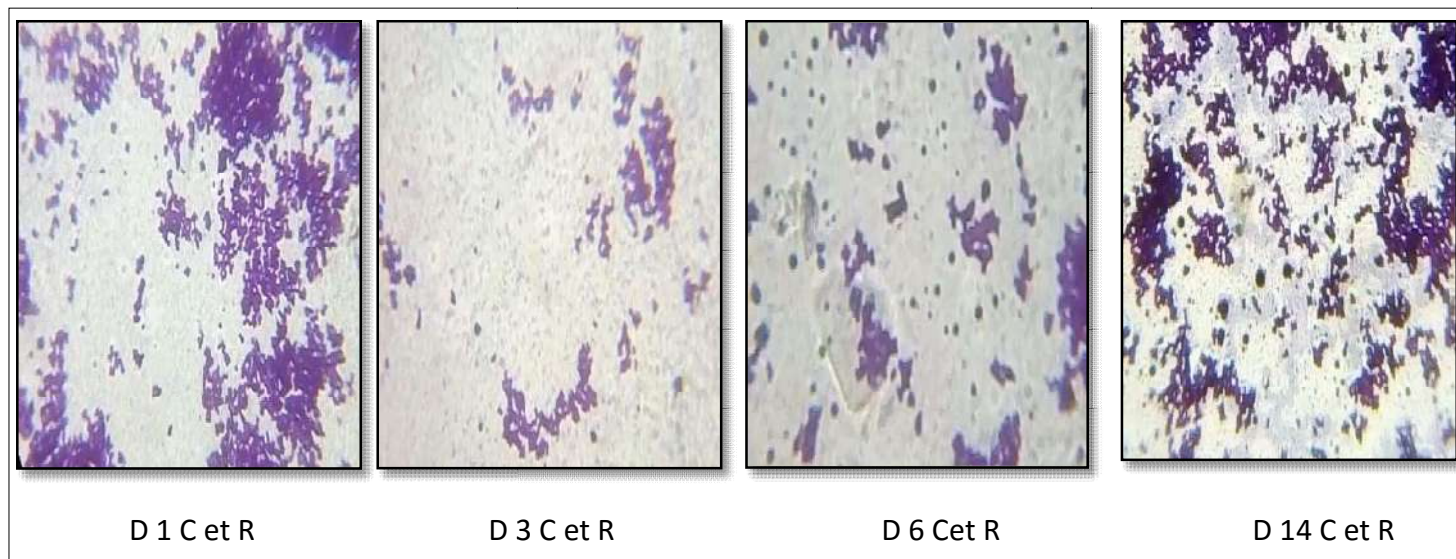


Figure 48: Observation microscopique des Cocci en grappe de raisin GRAM à l'objectif (X100).

D 1 : Dilution 1 : 1024 μ g

D 3 : Dilution 3 : 256 μ g

D 6 : Dilution 6 : 32 μ g

D 14 : Dilution 14 : 0.125 μ g

C : Clinique

R : Référence

Chapitre 3 : L'effet des Nanoparticules sur les Bactéries

**Streptococcus sp*

Le tableau (25) et la figure (49) montre que la coloration GRAM réalisée sur les souches révèle qu'elles sont GRAM⁺ et de forme Cocci avec un mode de regroupement en chaînette et ce pour les 2 concentrations mentionnées.

Tableau 25. Coloration de GRAM des souches de *Streptococcus sp* (C et R) dans 2 dilutions.

Souche	Concentration	<i>Streptococcus sp</i>	
Type	µg /ml	Souches cliniques	Souches de référence
de dilution			
2	512	Cocci en chaînette, GRAM ⁺	
10	2		



D 2 et 10 Clinique



D 2 et 10 Référence

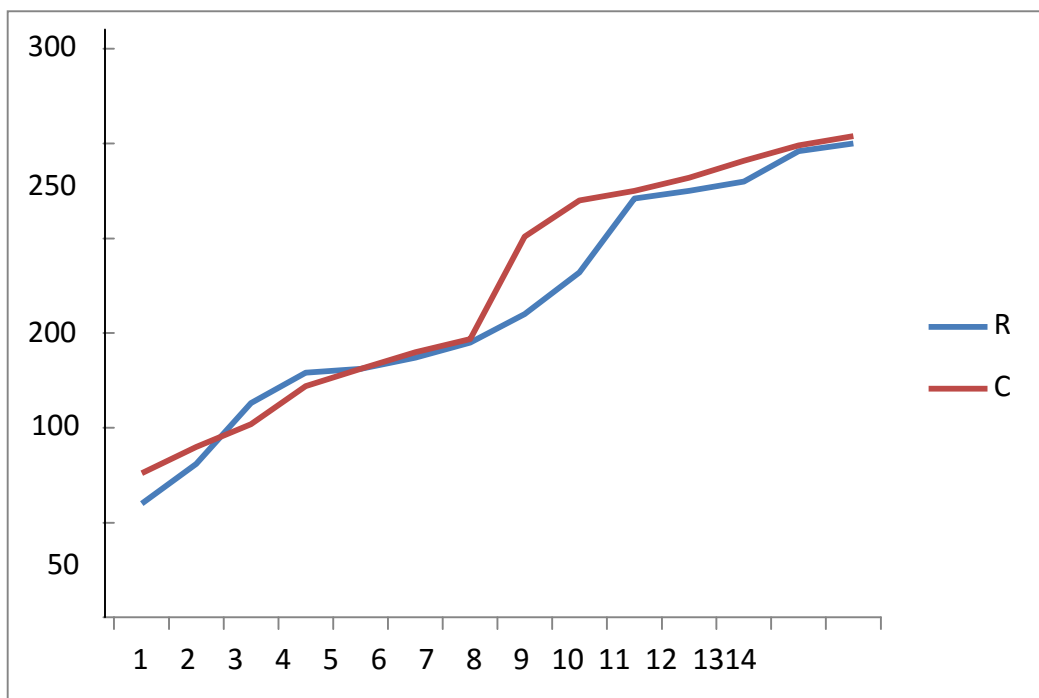
Figure 49. Coloration de GRAM des souches C et R des dilutions 2 et 10.

2.3. Souches de Staphylocoques et Streptocoques sur gélose traitée aux NPs SiO₂

a) Dénombrement des souches

**Staphylococcus aureus*

La figure (50) montre que le nombre de souches témoins cliniques et de référence traitées aux NPs SiO₂ est similaire et ce pour toutes les concentrations testées. Ainsi, le nombre de souches est de l'ordre de 275 UFC pour les témoins, il en est de même pour le nombre de souches traitées aux NPs SiO₂ à la concentration 14.



C : Clinique, R : Référence

Figure 50. Nombre de colonies des souches cliniques et de référence *S.aureus* en fonction des dilutions de NPs SiO₂

**Streptococcus sp*

La figure (51) illustre l'évolution du nombre de Streptocoques cliniques et de référence traités aux NPs SiO₂. Ainsi, par exemple pour la concentration 14, le nombre de souches est de l'ordre de 220UFC pour les souches de référence et de 200UFC pour celles cliniques.

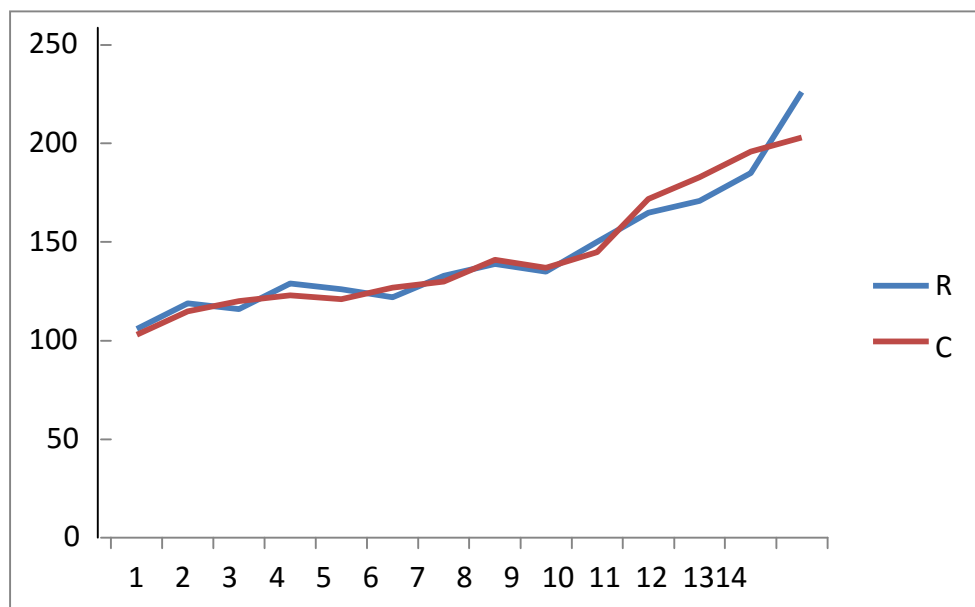


Figure 51. Nombre de colonies des souches cliniques et de référence *Streptococcus sp.* en fonction des dilutions de NPs SiO₂

b) Observation macroscopique

**Staphylococcus aureus*

Toutes les modifications morphologiques observées dans les souches de *S. aureus* sont représentées dans le tableau (26). Nous constatons que la taille, la croissance et la forme sont les trois paramètres ayant variés.

Chapitre 3 : L'effet des Nanoparticules sur les Bactéries

Tableau 26. Aspect macroscopique des souches *S.aureus* sur gélose traitée aux NPs SiO₂.

Numéro de dilution	[] µg/ml	Taille		Croissance		Forme	
		R	C	R	C	R	C
1	1024	Petites colonies		Faible		Bombée	
2	512						
3	256						
4	128						
5	64						
6	32						
7	16			Moyenne			
8	8						
9	4						
10	2						
11	1						
12	0,5						
13	0,25						
14	0,125						

***Streptococcus sp**

Le tableau (27) montre que les souches de *Streptococcus sp.* étudiées ont connu des modifications dans la morphologie (taille, croissance et forme).

Tableau 27. Aspect macroscopique des souches *Streptococcus sp.* sur gélose traitée aux NPs SiO₂

Numéro de dilution	[] µg/ml	Taille		Croissance		Forme	
		R	C	R	C	R	C
1	1024	Petites colonies		Faible		Plate	
2	512						
3	256						
4	128						
5	64						
6	32						
7	16			Dense			
8	8			Bombée			
9	4						
10	2						
11	1						
12	0,5						
13	0,25						
14	0,125						

c) Observation microscopique

• Etat frais

**Staphylococcus aureus*

Le tableau (28) illustre les modifications microscopiques observées chez les souches *S.aureus* à l'état frais en fonction des différentes concentrations de NPsSiO₂. Nous constatons que pour les plus fortes concentrations allant de (1024-128µg/ml) et les plus faibles allant de (0.5-0.125µg/ml), les modifications sont similaires pour les deux souches cliniques et de référence.

Tableau 28. Etat frais des souches *Staphylococcus aureus* en fonction des dilutions de NPs SiO₂

N° de dilution	[] µg /ml	Souches cliniques	Souches de référence
1	1024	Petite Cocci, en amas, immobile.	
2	512		
3	256		
4	128		
5	64	Petite Cocci, en diplocoque, immobile.	Petite Cocci, en amas, immobile.
6	32	Petite Cocci, en diplocoque, immobile.	
7	16		
8	8	Petite Cocci très fine, en diplocoque, immobile.	Petite Cocci, en diplocoque, immobile.
9	4		
10	2	Très petite Cocci, en diplocoque, immobile.	Petite Cocci, en diplocoque, immobile.
11	1		
12	0.5	Petite Cocci, en diplocoque, immobile.	
13	0.25		
14	0.125		

**Streptococcus sp*

Le tableau (29) montre que les souches *Streptococcus sp.* cliniques et de référence ont subi les mêmes modifications microscopiques à l'état frais pour les concentration 32µg/ml et 4µg/ml.

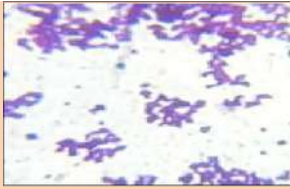
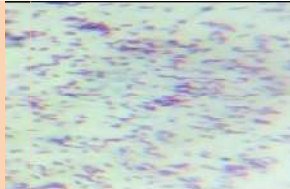
Tableau 29. Etat frais des souches de *Streptococcus sp.* en fonction des dilutions de NPsSiO₂.

N° de dilution	[] µg /ml	Souche clinique <i>Streptococcus sp</i>	Souche de référence <i>Streptococcus agalactis</i>
6	32	Petites Cocci très fine, en chaînette, immobile.	
9	4	Cocci, en chaînette, immobile.	Petite cocci, en chaînette, immobile.

- **Coloration de GRAM**

Le tableau (30) met en évidence la morphologie, le mode de regroupement et la coloration GRAM des souches *S. aureus* et *Streptococcus sp.* Nous constatons que les premières sont Cocci en amas et les deuxièmes Cocci en chaînette. Les deux souches sont GRAM⁺.

Tableau 30. Coloration de Gram des souches *Streptococcus sp.*

Bactéries		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus sp</i>
	Morphologie et mode de regroupement	Cocci en amas	Cocci en chaînette
Coloration de GRAM	GRAM	GRAM +	
	Observation microscopique des témoins(X100)	 <p>SC :0.125 µg/ml</p>	 <p>SC : 32 et 4 µg/ml</p>

2.4. Etude comparative de la toxicité des NPsTiO₂ et NPsSiO₂ sur *S.aureus* et *Streptococcus sp.*

Nos résultats suggèrent ainsi que :

D'une part, les NPsTiO₂; ont un effet sur les deux souches *Staphylococcus aureus* : clinique et de référence (ATCC 25923) et sur les deux souches *Streptococcus sp.*: clinique: *Streptococcus sp.* et de référence (ATCC^R 22 III). Il existe ainsi une relation inversement proportionnelle entre le nombre des colonies et la concentration des Nps ; quand la concentration augmente, le nombre de colonies diminue et inversement.

D'autre part, par les NPsSiO₂: leur effet est semblable à celui des NPsTiO₂ que ce soit sur les souches cliniques ou de référence, néanmoins.

Ainsi, ces résultats concordent avec ceux publiés par **Zeyons (2008)** qui a indiqué que des tests UFC réalisés dans des conditions bien déterminées mettent en évidence une réduction de la survie d'*E. coli* dès les plus faibles concentrations de nanoparticules de CeO₂. Les premières observations confirment une toxicité importante des nanoparticules de CeO₂ pour *E. coli* dans l'eau ultrapure, mais à la

Chapitre 3 : L'effet des Nanoparticules sur les Bactéries

différence de *Synechocystis*, la mortalité est totale pour les plus fortes concentrations de NPs. Selon le même auteur, ceci confirme de nouveau que les 20% de survie observés chez *Synechocystis* aux fortes concentrations de NPs résultent bien de l'existence d'une sous-population de cellules résistantes et non pas d'un artefact physico-chimique indépendant de la nature du microorganisme étudié.

A la lumière de nos résultats, nous remarquons que l'aspect des souches (cliniques et référence) traitées soit par les NPs TiO_2 ou les NPs SiO_2 est très différencié particulièrement au niveau de la Taille, la Forme, et la Croissance.

Concernant la taille, les colonies des souches (clinique et de référence) *S. aureus* et *Streptococcus sp.* sont de petite taille plus petite par rapport à celle des colonies du témoin,

Pour la forme, les souches (clinique et de référence) *S. aureus* et *Streptococcus sp.* sur gélose non traitée ont une forme bombée (B). Or, après traitement avec les deux types des Nps la forme devient plate (Pl).

En ce qui concerne la croissance, Pour les *S. aureus* et *Streptocoques sp* (clinique et de référence), la croissance est ralentie à moyenne, contrairement aux témoins de toutes les colonies des souches testées (cliniques et de référence) qui étaient dense.

Ces changements observés au niveau de la taille, la forme et la croissance des colonies pourraient être expliqués par l'effet des NPs TiO_2 et NPs SiO_2 sur les bactéries. Un effet indépendant de la taille des NPs elles-mêmes car les NPs TiO_2 ont une taille de 105nm et les NPs SiO_2 ont une petite taille de 14nm.

D'après **Franklin et al. (2007)**, la taille des nanoparticules n'influence pas sur leur effet, ils observent en effet des toxicités identiques pour des nanoparticules de ZnO de 30 nm que pour des microparticules de ZnO ou pour la forme ionique : ZnCl_2 . Il en est de même, pour **Zhang et al., (2007)**, qui a montré que la concentration des nanoparticules de ZnO a plus d'effet que leur taille. Les ions Zn^{2+} libérés lors de la dissolution des nanoparticules semblent de nouveau être à l'origine de l'effet bactéricide. Ce phénomène de dissolution est aussi mis en exergue par **Franklin et al., (2007)**;

Chapitre 3 : L'effet des Nanoparticules sur les Bactéries

qui explique que les nanoparticules de CeO₂ ne sont pas connues pour être très solubles bien que cela reste à vérifier.

Jusqu'à l'heure actuelle et malgré le nombre important de travaux réalisés, il existe encore des contradictions quant à l'effet joué par la taille des nanoparticules de TiO₂. Pour **Adams *et al.*, (2006)** et **Verran *et al.*, (2007)**, celle-ci n'a aucun effet, tandis que pour **Qi *et al.*, (2006)**, la toxicité augmente lorsque la taille diminue. Ces différences proviennent probablement des différences de composition des nanoparticules et des conditions dans lesquelles les tests de toxicité sont réalisés, les nanoparticules peuvent notamment avoir tendance à s'agréger (**Verran *et al.*, 2007**).

Sondi et Salopek-Sondi (2004), observent également que les nanoparticules d'argent métalliques sont toxiques uniquement lorsque le contact a lieu sur un milieu solide contrairement au milieu liquide où ils ne notent qu'un retard de croissance. D'après ces auteurs, l'explication tient à l'agrégation des nanoparticules d'argent avec les composants intracellulaires des cellules mortes. Une fois les nanoparticules agrégées, elles ne sont plus bactéricides, ce qui permet aux autres bactéries du milieu de se développer normalement. **Sondi et Salopek-Sondi (2004)**, observent également que les nanoparticules d'argent métalliques sont toxiques uniquement lorsque le contact a lieu sur un milieu solide contrairement au milieu liquide où ils ne notent qu'un retard de croissance.

Notre étude microbiologique nous montre que pour l'examen à l'état frais des souches cliniques et de références traitées par les deux types des Nps (TiO₂ et SiO₂), la taille des *Cocci* pour les *Staphylococcus aureus* et Streptococoques est devenue plus petite et très fine par rapport à celle de la souche témoin.

Afin de confirmer nos résultats, nous avons effectué la coloration de GRAM. Nos résultats révèlent une diminution de la taille des *Cocci* des souches clinique et de référence ensemencées sur géloses traitées par les deux types de Nps, avec une réduction de la taille des grappes de raisin de *Staphylococcus aureus* et des chaînettes du *Streptococcus sp* en rapport avec la diminution des *Cocci*. Des études sont réalisées sur l'effet des NPs Ag sur le microbiote intestinal, et constatent une augmentation générale des bactéries à Gram Négatif dans l'iléon (**Ansari *et al.*, 2014 ; Garuglieri *et al.*, 2016**).

Le Traitement avec les nanoparticules de taille 10 nm provoque une diminution des Firmicutes, particulièrement du genre *Lactobacillus*. Toutefois, Cet effet ne semble pas spécifique à la forme

Chapitre 3 : L'effet des Nanoparticules sur les Bactéries

nanoparticulaire de l'argent car des tendances similaires ont été retrouvées avec de l'acétate d'argent (Gill *et al.*, 2006). Il faut ici souligner que l'essentiel des résultats décrits dans la littérature portent sur la composition du microbiote sans établir de lien fonctionnel avec l'activité métabolique de ce dernier (Gill, 2006).

Les travaux sur les interactions bactéries/TiO₂ se focalisent essentiellement sur la bactérie modèle *Escherichia coli* et les propriétés antibactériennes du nano-TiO₂ (Liu *et al.*, 2010 ; Zhukova, 2012 ; Houdeau et Lamas, 2019). Ces dernières sont généralement associées à des effets photocatalytiques du composé, même s'il a été décrit chez *E. coli* des dommages à la membrane externe au niveau des lipopolysaccharides, ainsi qu'une diminution de la fluidité membranaire après traitement au TiO₂ seul et sans irradiation UV (Liu *et al.*, 2010).

Selon Kumar *et al.*, (2011), il a également été montré que le nano-TiO₂ peut induire, chez *E. coli* et à l'abri de la lumière, à la fois un stress oxydant et des dommages à l'ADN. De plus, Adams *et al.*, (2006) montre que les nanoparticules de TiO₂ présentent systématiquement un effet bactéricide. Cet effet ouvre les portes sur beaucoup de questions sur le mécanisme de ces NPs et leur effet sur les bactéries de la flore commensale qu'elle soit buccale, intestinale ou autres et de cela, leur effet sur la santé des consommateurs.

2.5. Souches *E. coli* sur gélose non traitée aux NPs Ag

a) Dénombrement des souches

Avant de traiter les milieux de culture sélectifs aux NPs, un dénombrement des souches a été effectué grâce au compteur de colonie. Les résultats sont représentés dans le tableau (31).

Tableau 31. Dénombrement des colonies des souches *E. coli* cliniques et de référence.

Souches	Nbr de colonies
Souche clinique : <i>Escherichia coli</i>	>300
Souche de référence : ATCC 25922 <i>Escherichia coli</i>	230

Nous constatons que le nombre de colonies de la souche clinique dépasse les 300UFC, tandis qu'il est de 230UFC pour la souche de référence.

Chapitre 3 : L'effet des Nanoparticules sur les Bactéries

b) Observation macroscopique

- **Souches cliniques**

L'aspect macroscopique des souches nous permet de confirmer certains caractères tels que la taille, la croissance et la forme, des paramètres sur lesquels nous nous sommes basés dans notre étude. Les résultats obtenus est illustré dans le tableau (32).

Tableau 32. Aspect macroscopique des colonies des souches *E.coli* clinique et référence.

Souches <i>E. coli</i>	Taille	Croissance	Forme	Surface	Consistance	Opacité	Couleur	Odeur
Clinique	Moyenne	Dense	Plate	Lisse	Sèche	Opaque	Orange	Présente
Référence ATCC25922	Moyenne	Dense	Plate	Lisse	Sèche	Opaque	Orange	Présente


Nous constatons que macroscopiquement, les souches cliniques et de référence ont les mêmes caractéristiques.

b) Observation microscopique

- **Etat frais**

L'observation microscopique des souches à l'état frais (sans coloration) sert à étudier les paramètres de mobilité, mode de regroupement et la morphologie. Le tableau (33) montre que les souches *E. coli* sont mobiles, coccobacilles avec un mode de regroupement en diplobacilles et sont GRAM-.

Tableau 33. Caractère morphologique des souches *E.coli* à l'état frais et coloration de Gram.

Bactéries		<i>E. coli</i>	
Etat frais	Mobilité	Colonies mobiles	
	Mode de regroupement	Colonies en diplobacilles	
	Morphologie	Coccobacilles	
Coloration GRAM	de	Observation microscopique des témoins	 GRAM -

2.6. Souches *E. coli* sur Hecktoen traitée aux NPs Ag

a) Dénombrement

*Témoin

Le tableau (34) et la figure (52) montrent que le nombre de colonies augmente en parallèle en fonction des concentrations de NPs Ag. L'effet de NPs Ag est clairement observé sur les deux souches clinique et référence, avec une relation inversement proportionnelle entre le nombre de colonies et les concentrations testées du NPs. Lorsque la concentration commence à augmenter le nombre de colonies diminue et inversement, cela pourrait être expliqué par l'effet toxique des concentrations élevées de NPsAg sur la croissance (inhibition de la croissance) ou, par la présence des NPs Ag à des concentrations importantes à proximité de *E. coli* qui pourraient induire des effets toxiques lorsque le contacte a lieu dans un milieu de culture solide.

Tableau 34. Dénombrement des colonies des souches *E. coli* Témoins.

Souche <i>Escherichia coli</i>		
Type de souche	Clinique	Référence
Nbr de Colonie	120	221

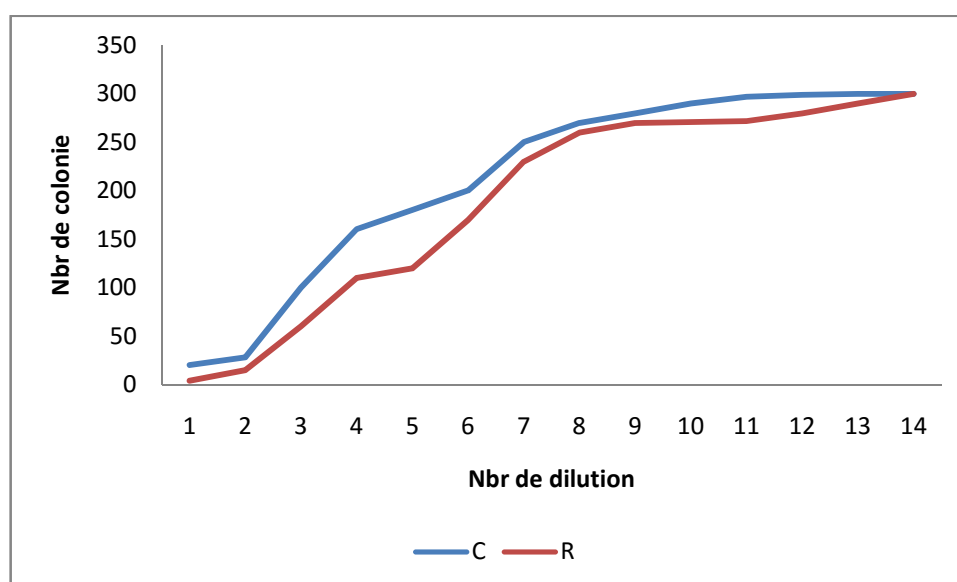


Figure 52. Nombre de colonies des souches cliniques et de référence *Escherichia coli* en fonction des dilutions de NPs Ag.

Chapitre 3 : L'effet des Nanoparticules sur les Bactéries

Des espèces radicalaires provenant des NPs seraient libérées dans le milieu et interagiraient avec les lipopolysaccharides de la membrane de *E.coli* pour y créer des altérations létales, sans oublier aussi que l'absence d'EPS chez *E.coli* rend les cellules sensibles aux NPs en permettant un contact direct entre ces dernières et la paroi cellulaire et induisant ainsi une toxicité aux NPs. En comparant avec les travaux de **Sondi et Salopek-Sondi (2004)**, qui observent également que les nanoparticules d'argent sont toxiques uniquement lorsque le contact a lieu sur un milieu solide contrairement au milieu liquide où ils ne notent qu'un retard de croissance.

Jung et al., (2008), ont montré que la solution d'ion argent a une meilleure activité contre *E. coli* Gram-négative que contre le *S. aureus* Gram positif, en raison probablement de l'épaisseur de la couche de peptidoglycane, qui peut empêcher l'action des ions d'argent à travers la paroi cellulaire de la bactérie. De plus, les travaux de **Zeyons (2008)**, sur *Synechocystis* dans l'eau ultra pure en présence de nanoparticules montrent une réduction de la survie pour des concentrations supérieures à 30ppm de CeO₂. (Les concentrations en CeO₂ supérieures ou égales à 30 ppm provoquent une baisse très importante de la survie de *Synechocystis*). Pour toutes les concentrations supérieures à 100 ppm, la mortalité est supérieure à 95 %. Ces premières observations confirment une toxicité importante des nanoparticules de CeO₂ pour *E. coli* dans l'eau ultra pure, ceci est en accord avec nos résultats. La survie des colonies traitées aux faibles concentrations est approximativement identique à celle des témoins c'est-à-dire croissance dense. Ceci est confirmé par les travaux de **Brayner et al., (2006)** et **Reddy et al., (2007)**, chez *E. coli* traitée par de faibles concentrations de NPs ZnO

Nous avons étudié l'influence de l'activité bactéricide en testant également la toxicité de NPsAg, les résultats montrent que les fortes concentrations provoquent une baisse importante de la survie des souches. En effet, quel que soit la concentration de NPs Ag ajoutées, pour des faibles concentrations la survie des *E. coli* atteint un plateau.

b) Observation macroscopique

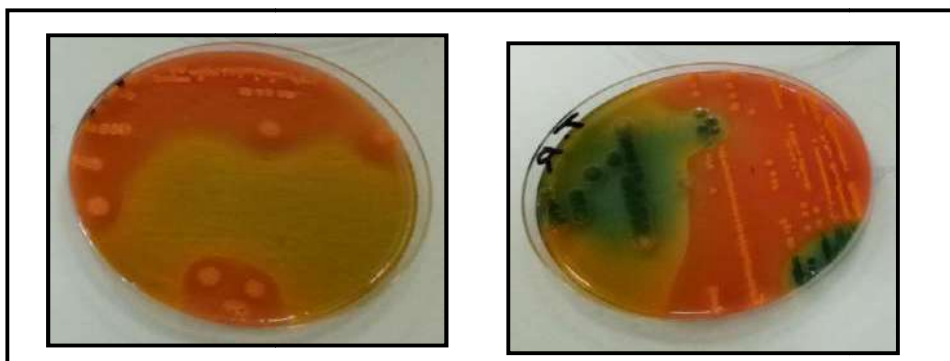
*Témoins

Le tableau (35) et figure (53) illustrent les caractéristiques morphologiques des *E. coli* témoins cliniques et de référence. Nous remarquons que la croissance et la couleur passent respectivement de dense à moyenne et de verdâtre orange à orange pour les souches cliniques. Pour la forme, elle devient plate à bord régulier pour les deux souches cliniques et de référence. Ce qui pourrait s'expliquer par le nombre réduit des souches reçues avant traitement clinique.

Chapitre 3 : L'effet des Nanoparticules sur les Bactéries

Tableau 35. Description des colonies des souches *E.coli* témoins cliniques et référence.

Souche <i>Escherichia coli</i>								
Caractères	Taille	Croissance	Forme	Surface	Consistance	Opacité	Couleur	Odeur
Souches cliniques	Moyenne	Moyenne	Plate à bord régulier	Lisse	Sèche	Opaque	Orange	Présente
Souches de référence		Dense					Verdâtre orange	de bière



(A)

(B)

Figure 53. Souche Témoin clinique (A), Souche Témoin de référence (B)

*Souches traitées

Le tableau (36) illustre les changements observés chez les souches cliniques et de référence ensemencées sur gélose Hektoen aux différentes concentrations de NPs Ag.

Tableau 36. Caractéristiques macroscopiques des souches *E.coli* clinique et de référence.

Numérotage dilution	[] µg/ml	Taille		Croissance	
		R	C	R	C
1	1024	P		F	
2	512	P	M		
3	256	P		F	M
4	128	P	M	M	
5	64	P		F	D
6	32	M	P	M	D
7	16	M			
8	8	P		D	

Chapitre 3 : L'effet des Nanoparticules sur les Bactéries

9	4				
10	2	M	P		
11	1			M	D
12	0,5	P		D	
13	0,25	P	G		
14	0,125	P			

Grosse :G Petite:P Moyenne :M Faible :F Dense:D

Les résultats de l'examen macroscopique obtenu après le traitement des NPsAg montre des différences significatives en comparaison avec les souches témoin (ou avant traitement).

La croissance des souches *E.coli* clinique et de référence (ATCC25922) est faible de la 1^{ère} à 5^{ème} dilution, entre moyenne et dense de la 6^{ème} à 14^{ème} dilution contrairement aux témoins qui étaient dense ce qui reflète l'impact des NPs Ag. Cela pourrait être expliqué par la présence de ROS ainsi que les radicaux libres générés par les NPs qui seraient la cause de l'inhibition dans les concentrations les plus élevées.

Selon **Chatterjee et al., (2011)**, la production de ROS a été trouvée dans une gamme variée de nanoparticules d'oxydes métalliques qui peuvent entraîner un stress oxydatif, un foyer inflammatoire et des dommages sur les macromolécules (protéines, lipoprotéines et ADN). Les mêmes auteurs révèlent que la courbe de croissance d'*E. coli* dans les conditions normales présente des phases de latence, exponentielle, stationnaire et enfin de déclin. Sous l'effet de diverses concentrations de NPs d'oxyde de fer (50 µg / ml, 100 µg / ml, 150 µg / ml et 200 µg / ml), l'auteur rapporte un raccourcissement progressif de la phase exponentielle.

Une étude effectuée par **Gill et al., (2006)** menée chez le rat traité par des concentrations croissantes de Nps Ag montre une augmentation de la croissance des bactéries à Gram Négatif dans l'iléon. Le traitement par les nanoparticules de taille 10 nm provoque une diminution des *Firmicutes*, particulièrement du genre *Lactobacillus*.

La toxicité des NPsAg sur les souris a été évaluée par l'évaluation de la prise de poids, de l'inflammation et de l'intégrité de l'intestin ; l'ADN bactérien a été estimé dans les matières fécales par séquençage de nouvelle génération (NGS). Les résultats obtenus ne montrent pas de toxicité globale chez les souris exposées ; cependant les richesses spécifiques (nombre d'espèces) et (nombre

Chapitre 3 : L'effet des Nanoparticules sur les Bactéries

d'individus par espèce) ont diminué suite à l'exposition. Le ratio entre le phylum des *Firmicutes* (bactéries à Gram positif) et celui des *Bacteroides* (bactéries à Gram négatif anaérobies strictes) a augmenté. Cette donnée s'explique notamment par une augmentation en nombre des bactéries de la famille des *Lachnospiraceae* (*Firmicutes*) et une diminution des bactéries de la famille S24-7 (*Bacteroides*) (Vernis, 2017).

La taille des colonies des souches cliniques et références est plus petite par rapport à celle des témoins. Ce changement est observé avec presque toutes les concentrations testées.

c) Observation microscopique

- **Etat frais**

Le tableau (37) illustre l'observation microscopique des souches à l'état frais. Ainsi, mis à part le mode de regroupement qui n'est pas le même pour les deux souches : Diplocoques (souche clinique) et isolées (souche référence), les autres paramètres sont identiques pour les deux souches témoins à savoir, elles sont mobiles et de forme Bacilles.

Concernant les souches cliniques et de référence traitées aux NPs Ag, le tableau (38) montre une perte de la mobilité pour les souches traitées par les fortes concentrations. Les souches redeviennent mobiles lorsque les concentrations commencent à diminuer progressivement (0.5 à 0.125 $\mu\text{g} / \text{ml}$ AgNPs).

Nos résultats sont confirmés par les travaux de Garuglieri *et al.*, (2016), qui ont comparé les effets des concentrations sublétales de nanoparticules d'argent (NPsAg) sur la cinétique de croissance, la capacité d'adhérence, le stress oxydatif et les changements phénotypiques des bactéries modèles *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis* dans des conditions aérobies et anaérobies, les tests de motilité ont révélé que 0,01 et 1 $\mu\text{g} / \text{ml}$ NPs Ag respectivement, favorisent le mouvement de surface chez *E. coli* et *B. subtilis* dans des conditions aérobies et anaérobies.

Chapitre 3 : L'effet des Nanoparticules sur les Bactéries

Tableau 37. Etat frais des souches témoins clinique et de référence.



Souches	Témoin Clinique	Témoin de Référence
Observation microscopique des colonies à l'objectif (x40)		
Critères	Mobilité : mobile Mode de groupement : Diplocoques Morphologie : Bacilles	Mobilité : Mobile Mode de groupement : Isolées Morphologie : Bacilles et coccobacilles

Tableau 38. Etat frais des souches cliniques et de référence.

Souches	<i>E. coli</i> Clinique			<i>E. coli</i> de référence				
	ATCC25922							
Critères	Mobilité	Mode de groupement	Morphologie	Mobilité	Mode de groupement	Morphologie		
[1024]	Immobile	Diplocoques	Cocci Bacilles	Immobile		Cocci Bacilles		
[512]			Bacilles plus longue				Bacilles +++ Cocci++	
[256]			Bacilles					Cocci+++ Coccobacilles
[128]								Mobiles

Chapitre 3 : L'effet des Nanoparticules sur les Bactéries

		Isolées			Isolées	Bacilles+
[64]			Petits bacilles	Immobile		Bacilles
[32]			Petits et longues bacilles	Mobiles		Petits bacilles Cocci
[16]		Diplocoques Isolées	Petits bacilles Cocci			Petits bacilles
[8]	Mobiles	Isolées	Coccobacilles	Immobile		
[4]			Bacilles Cocci		Isolées Diplocoques	Cocci++ Petits bacilles+
[2]		Diplocoques Isolées	Bacilles Courtes et longues. Cocci.			Petits bacilles++ Cocci+
[1]	Immobile		Cocci+++ Bacilles++			Petits bacilles++ Cocci+
[0,5]		Isolées Diplocoques+++	Bacilles Coccobacilles	Mobiles	Isolées	Petits bacilles (Coccobacilles)
[0,25]	Mobiles	Isolées++ Diplocoques	Petits bacilles			Petits bacilles

Chapitre 3 : L'effet des Nanoparticules sur les Bactéries

		++			
[0,125]		Isolées++Dip locoques+	Bacilles +++ Cocci++		Petits bacilles (Coccobacil les

+: Moins nombreux ++ : Nombreux +++ : Plus nombreux

Nos résultats montrent une modification de la taille et de la forme des bactéries des souches référence et clinique. Ainsi aux plus fortes concentrations, les bacilles deviennent plus longs, et de forme sphérique aux faibles concentrations. Ces résultats sont en accords avec ceux de **Mathelié-Guinlet (2017)** qui a étudié la cytotoxicité des NPsSiO₂, de taille et de charges diverses, sur *E.coli* et *Bacillus subtilis*. Concernant le mode de groupement, il est conservé pour la souche de référence après traitement avec le NPsAg contrairement de la souche clinique particulièrement aux fortes concentrations (les souches sont devenues isolées et ont perdu leur caractère Diplocoque).

Sondi et salopek-Sondi (2004) ont étudié l'activité antimicrobienne des nanoparticules d'argent contre *E. coli*. Des tests ont été réalisés dans du milieu Luria-Bertani (LB) sur des plaques d'agar solide et dans des systèmes liquides additionnés de différentes concentrations de particules d'argent nanométriques. Ces particules se sont révélées être bactéricides. La microscopie électronique à balayage et à transmission (SEM et TEM) a été utilisée pour étudier l'action biocide de ce matériau nanométrique. Les résultats ont confirmé qu'*E. coli* traitées étaient endommagées, montrant la formation de «fosses» dans la paroi cellulaire de la bactérie avec accumulation de particules d'argent au niveau de la membrane bactérienne, expliquant ainsi l'augmentation de la perméabilité puis la mort de la cellule.

B-Coloration de GRAM

Les figures de (54) à (62) illustrent l'état d'*E. coli* traitées et témoins, cliniques et de référence après coloration GRAM. Après coloration de Gram, nos résultats montrent que les colonies ont subi des modifications au niveau de la structure de la paroi bactérienne par acquisition de la couleur violette,

Chapitre 3 : L'effet des Nanoparticules sur les Bactéries

alors que d'autres frottis ont gardé la même coloration initiale représentative du groupe des entérobactéries des colonies roses.

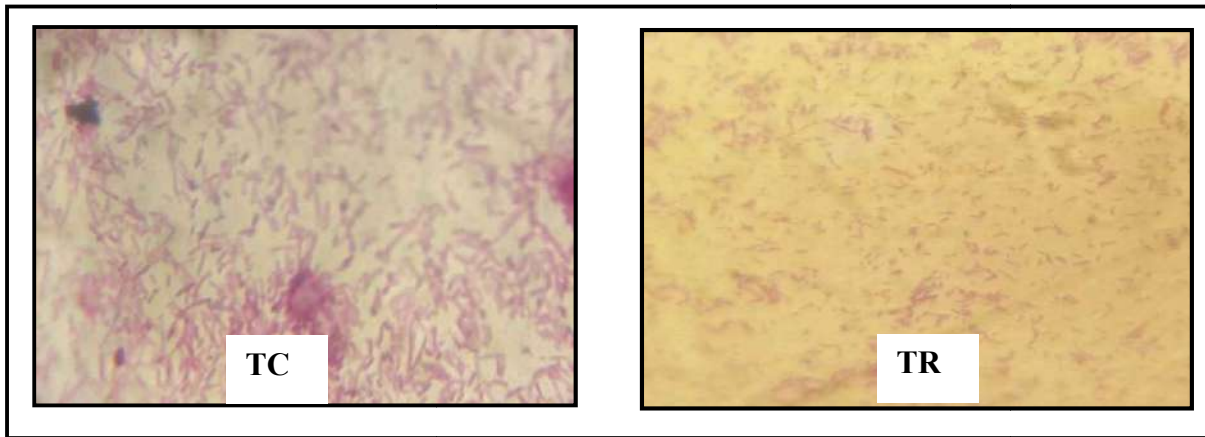


Figure 54. Coloration de GRAM d'*E.coli* (Témoin clinique et de référence) à l'objectif (x100)

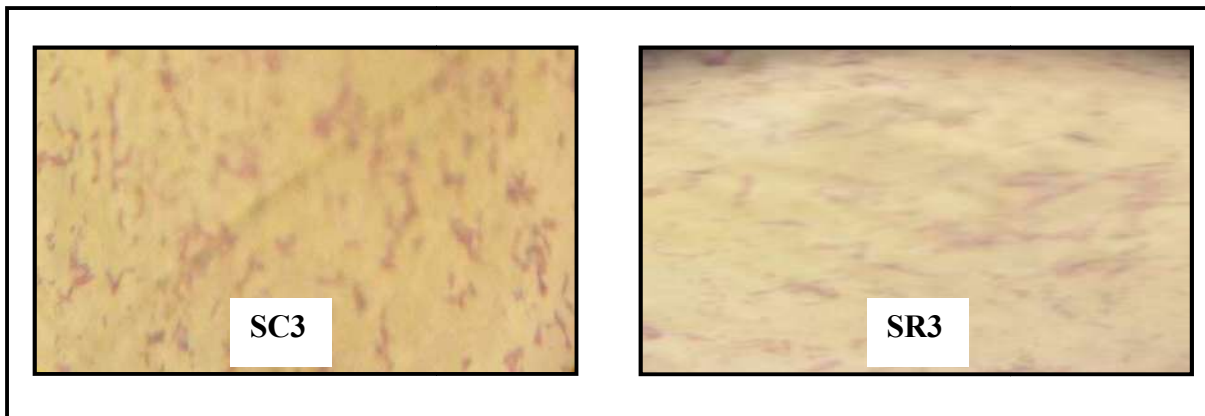


Figure 55. Coloration de GRAM d'*E.coli* de la dilution 3 après traitement avec le NpAg à l'objectif (x100).

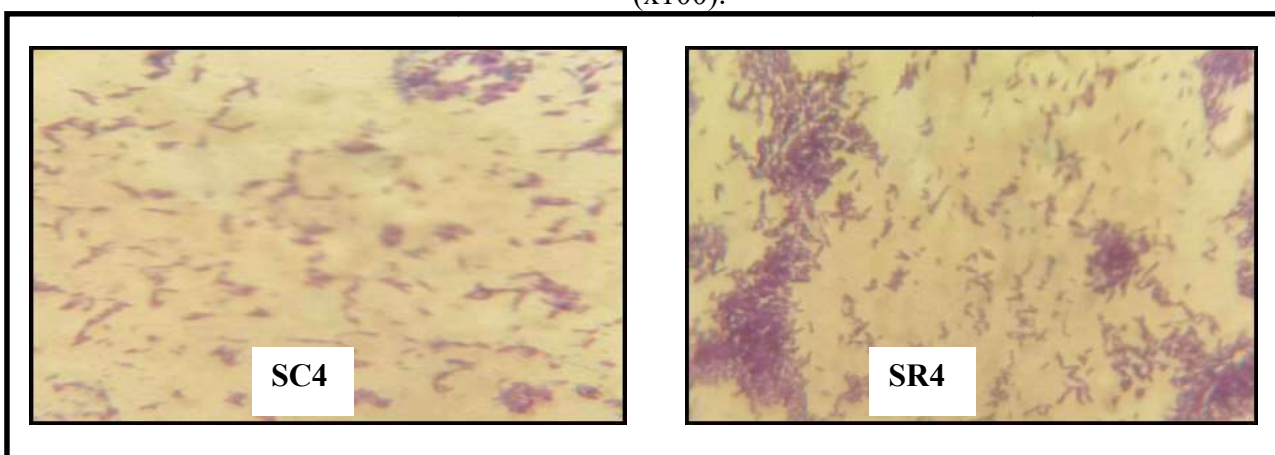


Figure 56. Coloration de GRAM d' *E.coli* de la dilution 4 après traitement avec le NpAg à l'objectif (x100)

TC : Témoin Clinique

SC : Souche Clinique

TR : Témoin de référence

SR : Souche de référence

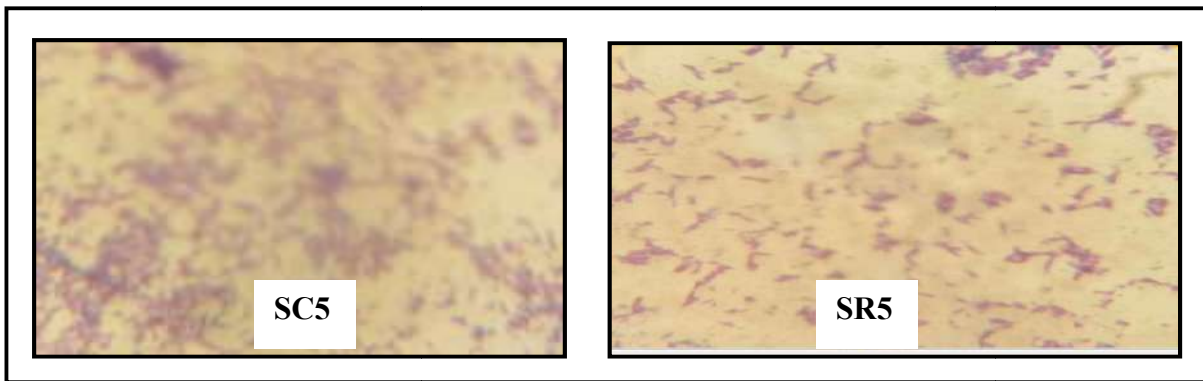


Figure 57. Coloration de GRAM de *E. coli* de la dilution 5 après traitement avec le NpAg à l'objectif (x100)

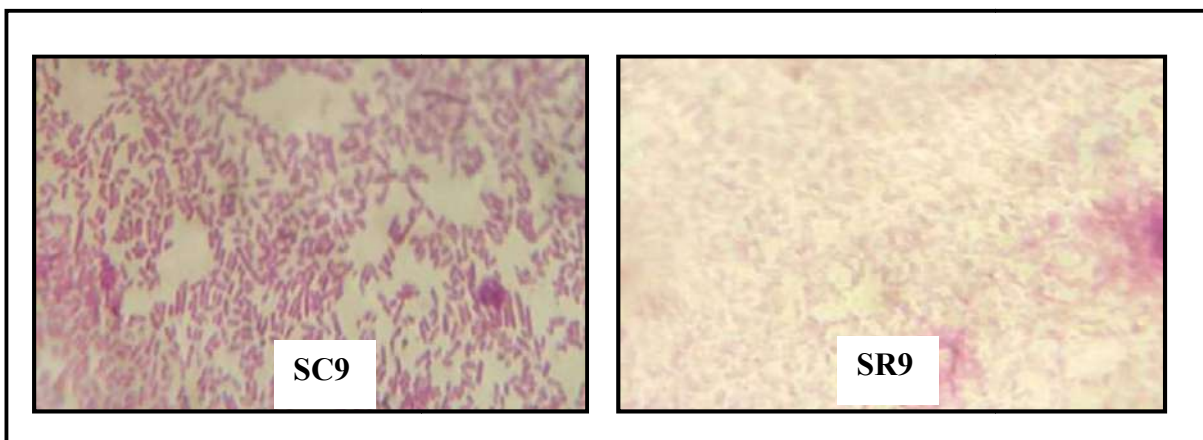


Figure 58. Coloration de GRAM de *E. coli* de la dilution 9 après traitement avec le NpAg à l'objectif (x100)

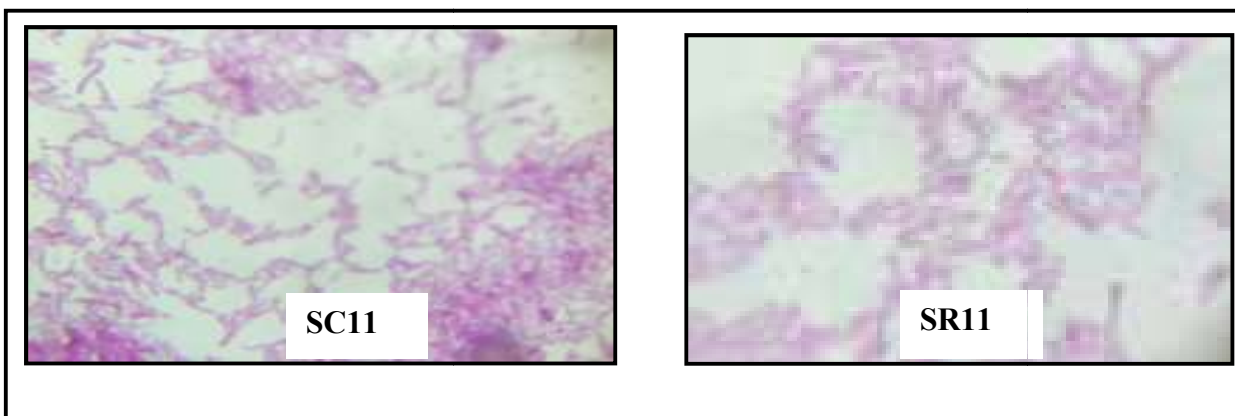


Figure 59. Coloration de GRAM d'*E. coli* de la dilution 11 après traitement avec le NpAg à l'objectif (x100)

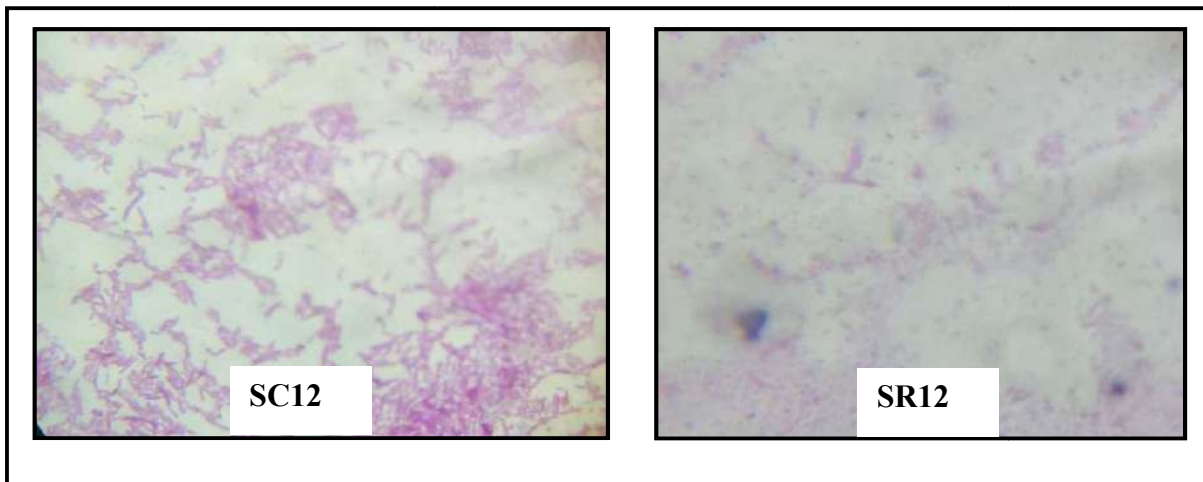


Figure 60. Coloration de GRAM de *E. coli* de la dilution 12 après traitement avec le NpAg à l'objectif (x100)

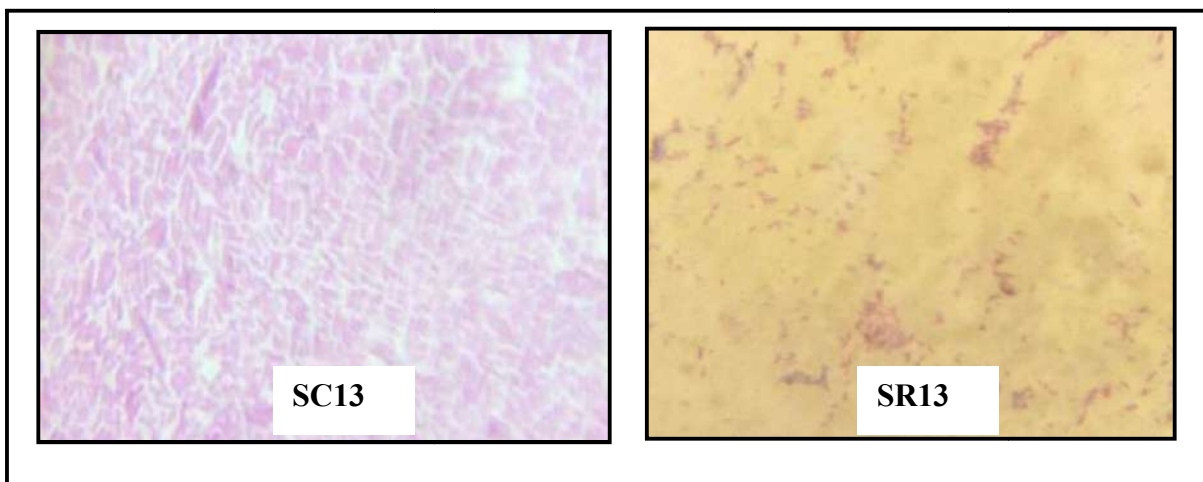


Figure 61. Coloration de GRAM de *E. coli* de la dilution 13 après traitement avec le NpAg à l'objectif (x100)

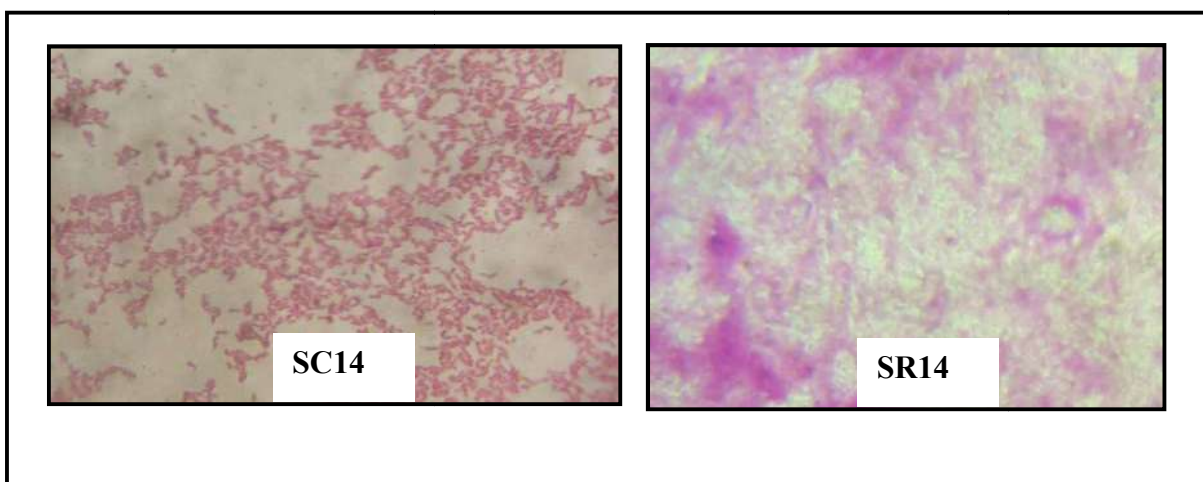


Figure 62. Coloration de GRAM de *E. coli* de la dilution 14 après traitement avec le NpAg à l'objectif (x100)

Chapitre 3 : L'effet des Nanoparticules sur les Bactéries

La coloration de Gram met en évidence des différences chez les souches traitées par la 4^{ème} (SC4, SR4) et 5^{ème} dilution (SC5, SR5) par rapport aux témoins (TC, TR). Nous avons ainsi observé une modification de la paroi bactérienne révélée par une coloration violette (Gram positif). Ceci pourrait s'expliquer par une mutation au niveau du génome induite par les NPsAg. vu que le génome de *E. coli* est connu par sa grande plasticité (**Holt et Bard, 2005**).

La séquence complète du génome de plusieurs souches d'*Escherichia coli* révèle la présence de nombreuses séquences d'insertion (IS), de séquences Bactéριο-phagiques, qui témoignent de l'extraordinaire plasticité du génome de ce genre bactérien. Ce sont les isolats cliniques d'*Escherichia coli* qui possèdent les plus grandes tailles de génomes, alors que ceux de l'*Escherichia coli* de laboratoire, non pathogène ne font que 4,63 Mb. En effet, plus d'1% des isolats d'*Escherichia coli* ou de *Salmonella* impliqués dans des infections alimentaires sont des « mutateurs » qui présentent une forte tendance à muter, un phénomène corrélé à une déficience dans certains systèmes de réparation de l'ADN (**Feng et al., 2000**).

L'existence d'une interaction directe entre les nanoparticules d'argent et l'ADN génomique chez *E. coli* est rapportée aussi par **Ansari et al., (2014)** qui ont constaté une augmentation d'un facteur 3 de la fréquence de mutation du génome d'*E. coli* en présence de nanoparticules d'argent de 30-50 nm de diamètre (la fréquence de mutation passe de $1,08 \cdot 10^{-6}$ pour l'échantillon contrôle à $3,14 \cdot 10^{-6}$).

Des études préliminaires réalisées par **Brayner et al., (2006)** sur les effets biocides et l'internalisation cellulaire des NPsZnO sur *E. coli* ont confirmé qu'à près contact avec les NPsZnO sont endommagées, montrant avec une modification à triple membrane Gram-négative entraînant l'augmentation de la perméabilité membranaire, l'accumulation de nanoparticules de ZnO dans la membrane bactérienne et également l'internalisation cellulaire de ces nanoparticules. La coloration de Gram confirme les modifications de la morphologie et du mode de regroupement observées à l'état frais. Depuis près de 10 ans, 250 génomes bactériens, pour la plupart d'intérêt médical, ont été déchiffrés et plusieurs centaines d'autres sont en cours de séquençage et d'annotation.

La comparaison *in silico* d'*Escherichia coli* commensales et pathogènes a révélé que les gènes chromosomiques sont ordonnés de manière relativement conservée d'une souche à l'autre. L'autre fait marquant de cette analyse génomique comparative est la présence chez les pathovars, de matériel génétique supplémentaires (10 à 30%) (**Dobrint, 2005**). Il se pourrait que l'acquisition de ces gènes soit facilitée par une importante aptitude à muter (**Moualkia et Ansar, 2015**).

2.7. Effets des deux mixtures de NPs TiO₂/Ag et SiO₂/Ag sur les bactéries *E.coli*

2.7.1. Observation macroscopique et microscopique d'*E.coli* témoins

La figure (63) illustre l'état des colonies *E. coli* témoins après incubation à 37° pendant 24h sur milieu sélectif Hektoen. Les souches ensemencées ont un caractère phénotypique illustré dans le tableau (39). Au total, 8 paramètres sont étudiés et observés macroscopiquement.



Figure 63. Observation macroscopique des souches *E.coli* témoins



Tableau 39. Caractères cultureux des souches *E.coli* témoins sur Hektoen.

N de colonies	Croissance	Taille	Forme	Surface	Consistance	Opacité	Couleur	Odeur
>300 UFC	Dense	Moyenne	Circulaire bombée à bord régulier	Lisse	Sèche	Opaque	Orange	Présente

En ce qui concerne les autres caractéristiques, les observations microscopiques des souches *E.coli* à l'état frais ainsi qu'après coloration de GRAM sont représentées dans le tableau (40). Nos résultats révèlent qu'*E. coli* sont mobiles, avec deux modes de regroupement Isolé pour les bacilles et Diplobacilles pour les coccobacilles.

Chapitre 3 : L'effet des Nanoparticules sur les Bactéries

Tableau 40. Observation et caractéristiques microscopique des souches *E.coli* témoins.

Etat frais(x40)				Coloration de gram (x100)		
Observation microscopique (x40)	Mobilité	Mode de groupement	Morphologie	Observation microscopique (x100)	Type de Gram	
	Mobile	Isolé Diplobacilles	Bacille Cocobacille		Gram -	

2.7.2. Effets des deux mixtures de NPs TiO₂ / Ag et SiO₂ / Ag sur *E. coli* à l'état frais

Le tableau (41) montre qu'après traitement, sur les huit paramètres étudiés des changements n'ont touché que la taille, la croissance, la forme et la couleur pour les souches cliniques et de référence.

Tableau 41. Caractéristiques d'*E. coli* traitées par les deux mixtures de NPs TiO₂ / Ag et SiO₂ / Ag.

[µg/ml]	Taille		Croissance		Forme		Couleur	
	TiO ₂ / Ag	SiO ₂ / Ag	TiO ₂ / Ag	SiO ₂ / Ag	TiO ₂ / Ag	SiO ₂ / Ag	TiO ₂ / Ag	SiO ₂ / Ag
1024	M		M	F	Ci B BR		Orange	
512	P	M		M	Ci BR			
256		P	D		PL	B		
128				P	Ci PL BR			
64					D			
32	M							
16								
8	M							

Chapitre 3 : L'effet des Nanoparticules sur les Bactéries

4		M	M		Ci B BR	
2	P	P		D		
1	M		M	D		V+ O++
0.5	P			D		Orange
0.25	M		M	M		V++ O+
0.125	P			D		Orange

B : Bombée **BR** : Bord Régulier **Ci** : Circulaire **D** : Dense **F** : Faible
M : Moyenne **O** : Orange **P** : Petite **PL** : Plate **V** : Vert

Dans notre travail, nous observons que le nombre de colonies traitées est modifié contrairement aux témoins qui restent denses confirmant ainsi l'impact des NPs sur les souches *E.Coli*. Le nombre de colonies varie de manière inversement proportionnelle avec les concentrations de NPs. De plus la mixture de NPs TiO₂ / Ag a un impact plus délétère que la mixture de NPs SiO₂ / Ag.

TiO₂Ag : la croissance est moyenne dans les dilutions 1, 2, 9, 11 et 13.

SiO₂Ag : la croissance est faible dans la 1ère dilution et moyenne dans les dilutions 2, 3 et 13.

Tout ceci pourrait s'expliquer par la production des espèces réactives à l'oxygène (ERO) (**Choi et Hu, 2009 ; Moore, 2006**) qui peuvent entraîner un stress oxydatif, une inflammation et des dommages sur les macromolécules (protéines, l'ADN, ...). Nos résultats sont en accord avec ceux de **Chatterjeet al., (2011)** qui a étudié l'effet des NPs Fe sur la croissance bactérienne dans des conditions normales et sous l'influence des nanoparticules (Fe₃O₄) et ont montré que la courbe de croissance d'*E.coli* dans les conditions normales décrit clairement les phases de latence, exponentielle, stationnaire et de mort cellulaire. Sous l'effet de concentrations croissantes de nanoparticules d'oxyde de fer (50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml) un raccourcissement dose-dépendant progressif de la phase exponentielle est observé. Les espèces réactives à l'oxygène (ROS) ainsi que les radicaux générés par les NPs d'oxyde de fer seraient la cause de l'inhibition de la croissance.

D'un autre côté, **Feng et al., (2000)**, explique le blocage de la réplication d'ADN par l'interaction des ions Ag⁺ avec les bases de l'ADN et la formation de complexes Ag⁺/ADN, les ions Ag⁺ se lient également aux groupements phosphates reliant les bases de l'ADN.

Chapitre 3 : L'effet des Nanoparticules sur les Bactéries

Dans une autre étude, menée chez le rat après 13 semaines de gavage quotidien (2fois/jour) par des NPsAg (10,75 et 110 nm) et doses (9,18 et 36 mg/kg (p.c.) /jour) différentes, l'ADN bactérien a été estimé dans les matières fécales par séquençage de nouvelle génération (NGS). Les résultats ont montré que le ratio entre le phylum des *Firmicutes* (bactéries à Gram positif) et celui des Bactéroïdes (bactéries à Gram négatif anaérobies strictes) a augmenté (Vernis, 2017). Cette donnée s'explique notamment par une augmentation en nombre des bactéries de la famille des *Lachnospiraceae* (*Firmicutes*) et une diminution des bactéries de la famille S24-7 (Bactéroïdes).

Dans une étude a été réalisée par Holt et Bard (2005), pour étudier la relation entre les ions Ag⁺ et la chaîne respiratoire des bactéries, chez *E.coli* en suspension ou immobilisées sur une surface de verre, ont montré que ions métalliques interagissent avec les enzymes de la chaîne respiratoire (ex : NADH déshydrogénase) et empêchent le transport des électrons d'un complexe à l'autre de cette chaîne.

Talbot *et al.*, (2004) a testé deux types de TiO₂ (P25 Aéroxide, et E171 (colorant alimentaire)) sous deux formes métrologiques différentes (soniquée et non soniquée). Les effets du TiO₂ sur la croissance de bactéries commensales (*Escherichia coli*, *Lactobacillus rhamnosus*) ou apportées par l'alimentation (*Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus sakei*). Les résultats ont révélé des effets délétères sur l'ensemble des bactéries testées avec une augmentation du temps de latence et diminution du taux de croissance et de la biomasse finale par rapport aux conditions contrôle. Le colorant E171 semble avoir plus d'effet que le P25, surtout sous sa forme soniquée.

Une étude publiée par Zeyons, (2008) indique que des tests UFC réalisés sur des souches d'*E. coli* montrent une inhibition dose dépendante de la survie d'*E. coli* traitées par des NPs CeO₂ dès les plus faibles concentrations de nanoparticules de CeO₂.

Ainsi, selon nos résultats, les NPs TiO₂/Ag sont plus toxiques aux plus fortes concentrations (2, 3, 4), contrairement aux mixtures NPs SiO₂/Ag qui sont toxiques aux faibles concentrations (12, 13, 14). Pour les concentrations intermédiaires (5, 6, 7), les deux mixtures révèlent le même type de toxicité.

Concernant la forme et contrairement aux souches témoins qui ont une forme circulaire (Ci), bombée (B) et bombée régulière (BR), chez les traitées par les mixtures de NPs, nous avons observé des modifications :

SiO₂/ Ag : les dilutions de la 3^{ème} à 7^{ème} ont une forme Ci, PL et BR.

Chapitre 3 : L'effet des Nanoparticules sur les Bactéries

TiO₂ / Ag : les dilutions de 3^{ème} à 7^{ème} ont une forme Ci PL BR

En ce qui concerne la taille, les bactéries sont de petite taille de la 2^{ème} jusqu'à la 7^{ème} dilution puis varie de petite à moyenne entre la 9^{ème} à la 14^{ème} dilution chez les traitées NPs TiO₂ / Ag. Pour les traitées aux NPs SiO₂ / Ag, les bactéries sont de petites taille de la 4^{ème} à la 8^{ème} dilution et de la 10^{ème} à la 14^{ème}.

Nos résultats sont en accord avec ceux **Mathélié-Guinlet (2017)** qui a testé la cytotoxicité des NPs de silice, de tailles et charges diverses, sur les propriétés des *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*. Les NPs chargées négativement (NPs-) de diamètre inférieur à 50 nm, mènent à l'isolation des bactéries *E. coli*, induisent une "sphérisation" de la cellule initialement en bâtonnet, provoquent des lésions dans la membrane externe et une réorganisation de sa structure, il apparaît que la longueur des cellules d' *E. coli* est affectée différemment selon le diamètre des nanoparticules lorsque le diamètre est supérieur ou égal 80 nanomètres l'aspect de *E. coli* est conservé en revanche lorsqu'il est strictement inférieur à 80 nanomètres son aspect est modifié pour une forme plus sphérique.



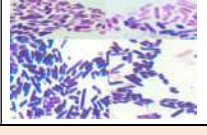


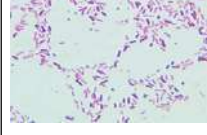
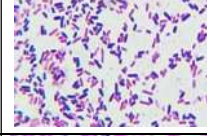




Nos résultats ont mis en évidence une perte de la mobilité des bactéries contrairement aux témoins qui étaient mobile ce qui justifierait l'impact des NPs sur les souches *E. coli*. Ainsi pour les traitées avec les NPs TiO₂/Ag, nous avons constaté une perte de mobilité pour les dilutions 1, 4 et 8. Il en est de même pour celles traitées aux NPs SiO₂/Ag aux dilutions 2, 7, 9 et 10. Ceci serait due probablement à l'inhibition de la synthèse des protéines provoquant le détachement de la paroi cellulaire **Kampmann et al., (2008)**.

Nos résultats sont confirmés par une étude que nous avons effectuée antérieurement et qui a révélé une perte de la mobilité chez *E. coli* traitée par des fortes concentrations aux NPs Ag (résultats non montrés). Les travaux de **Garuglieri et al., (2016)**, qui visent à comparer les effets des concentrations sublétales de NPs Ag sur des souches de référence: ATCC 25922 *E. coli* ont montré que les concentrations 0,01 µg/ml et 1 µg/ml NPs Ag favorisent le mouvement de surface dans des conditions aérobies et anaérobies.

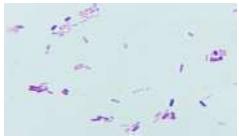


2.7.3. Effets des deux mixtures de NPs TiO₂/Ag et SiO₂/Ag sur *E. coli* après coloration de GRAM

Le tableau (42) met en évidence les modifications microscopiques observées chez *E. coli* traitées avec différentes concentrations de mixtures de NPs TiO₂/Ag et SiO₂/Ag.

Tableau 42. Observations microscopiques d'*E.coli* traités aux mixtures de Nps TiO₂Ag et SiO₂Ag

Mixtures TiO ₂ / Ag			Mixtures SiO ₂ / Ag		
[µg/ml]	Observation Microscopique (x100)	Changement de Gram	[µg/ml]	Observation Microscopique (x100)	Changement de Gram
			1024 (1)		G - (++) G + (+)
			128 (4)		G - (++) G + (+)
64 (5)		G+ (++) G- (+)	64 (5)		G - (++) G + (+)
			16 (7)		G - G +
			4 (9)		G+ (+) G- (++)
2 (10)		G+(++) G- (+)	2 (10)		G - G +
1 (11)		G+ (+) G-(++)	1 (11)		G - (++) G + (+)
			0.5 (12)		G - G +

Chapitre 3 : L'effet des Nanoparticules sur les Bactéries

0.25 (13)		G- (++) G+	0.25 (13)		G- G+
0.125 (14)		G+			

Nos résultats révèlent que certaines colonies ont gardé leur coloration de Gram –, tandis que d'autres ont subi une modification de la couleur qui vire du rose vers le violet. Il en est ainsi pour les dilutions suivantes :

TiO₂ / Ag : 5, 9, 10, 11, 13, 14.

SiO₂ / Ag : 1, 4, 5, 7, 10, 11, 12 et 13.

La toxicité de la mixture NPs SiO₂ / Ag apparaît dès la 1^{ère} dilution. Ceci pourrait être due à des modifications au niveau génomique et au niveau de la structure de la paroi bactérienne ; le génome de *E. coli* est connue par sa grande plasticité et la séquence complète du génome de plusieurs souches d'*Escherichia coli* montre la présence de nombreuses séquences d'insertion (IS), de séquences bactério-phagiques, qui témoignent de l'extraordinaire plasticité du génome de ce genre bactérien. En effet, plus d'1% des isolats d'*E. coli* ou de *Salmonella sp.* impliqués dans des infections alimentaires sont des « mutateurs » qui présentent une forte tendance à muter, un phénomène corrélé à une déficience dans certains systèmes de réparation de l'ADN (Moulakiae et Ansar, 2015).

En plus, les parois des cellules bactériennes déterminent les paramètres d'adhésion des nanoparticules à leurs surfaces. La membrane cellulaire bactérienne est semi-perméable et la membrane externe permet le processus d'adhésion cellulaire grâce à sa structure très chargée et leur groupes fonctionnels (carboxyle, hydroxyle, phosphate et amide) (Jiang *et al.*, 2010). Selon Kumar (2011), les NPs TiO₂ peuvent induire, chez *E. coli* et à l'abri de la lumière, à la fois un stress oxydant et des dommages à l'ADN.

Jiang *et al.*, (2010) ont émis l'hypothèse que les NPs ont tendance à s'agréger et à s'attacher à la surface bactérienne, ce qui expliquerait leur toxicité. Les Nps SiO₂ peuvent induire un stress externe (mécanique ou chimique) responsable d'une réponse générale de la cellule, plus probable pour l'ensemble de NPs. Un champ externe (pression magnétique, viscosité ...) peut en effet conduire à des déformations élastiques et / ou plastiques de la paroi bactérienne.

Chapitre 3 : L'effet des Nanoparticules sur les Bactéries

Selon des travaux de **Kim et al., (2007 et 2008)** l'action biocide des nanoparticules est liée à la présence de radicaux libres, générés en surface qui endommagent la membrane lipidique des cellules.

Des tests bactériologiques ont été réalisés dans du milieu Luria-Bertani (LB) sur des plaques d'agar solide et dans des systèmes liquides additionnés de différentes concentrations de particules d'argent nanométriques. Les résultats ont confirmé qu'*E. coli* traitées sont endommagées, montrant la formation de « fosses » dans la paroi cellulaire de la bactérie, alors que les nanoparticules d'argent s'accumulaient dans la membrane bactérienne (**Sondi et Salopek-Sondi, 2004**).

La plupart des travaux concernant les interactions bactéries/TiO₂ se focalisent essentiellement sur le modèle *Escherichia coli*. (**Liu et al., 2010 ; Zhukova et al., 2012**) et les propriétés antibactériennes des NPs TiO₂. Ces dernières sont généralement associées à des effets photo-catalytiques du composé, même s'il a été décrit chez *E. coli* des dommages à la membrane externe au niveau des lipopolysaccharides, ainsi qu'une diminution de la fluidité membranaire après traitement aux NPs TiO₂ seul et sans irradiation UV (**Liu et al., 2010**).

Fang et al., (2006) explique qu'un changement de la composition lipidique de la membrane en présence de fullerènes, est la preuve d'une déstabilisation et/ou d'une adaptation des bactéries. Dans le cas d'une déstabilisation, cela pourrait être dû à la formation d'espèces réactives de l'oxygène qui entraîneraient par exemple une peroxydation des lipides de la membrane. L'interaction des nanoparticules de silice est possible par l'interaction de type hydrogène entre les fonctions OH des sucres des LPS présents dans la membrane d'*E. coli* et le groupement oxo Hydroxyle présent à la surface des nanoparticules de silice.

Les LPS d'*E. coli* peuvent avoir des liaisons hydrogènes avec les NPs TiO₂ (**Kaper et al., 2004**). Selon **Li et al., (2018)** les souches *E. coli* et *P. aeruginosa* ayant un LPS long adhérent plus fortement au film mince de NPs TiO₂. Dans cette étude, les lipopolysaccharides (G-) et les acides lipotéichoïques (G +) forment des liaisons hydrogène et échangent des ligands avec les nanoparticules. De plus, lorsque la liaison phospho-diester de la L- α -phosphatidyl-éthanolamine est cassée, elle forme des mono-esters de phosphate conduisant à des troubles désordonnés de la chaîne alkyle et perturbation de la membrane bactérienne conduisant à la mort cellulaire.

Il a été démontré que l'exposition aux NPs induisait des modifications de la structure protéique des biomolécules de surface bactériennes (rapport feuilles β / hélices α) indiquant que la toxicité des nanoparticules d'Al₂O₃, de TiO₂ et de ZnO semblait également liée à la fonction de la paroi cellulaire

Chapitre 3 : L'effet des Nanoparticules sur les Bactéries

bactérienne. Plus précisément, les NPs ZnO sont les plus toxiques des trois nanoparticules, probablement en raison de leur solubilité. Des espèces radicalaires provenant des NPsAg seraient libérées dans le milieu et interagiraient avec les lipopolysaccharides de la membrane d'*E.coli* pour y créer des altérations létales. De plus, l'absence d'Exo-polysaccharides chez *E.coli* rend les cellules sensibles aux NPs en permettant un contact direct entre ces dernières et la paroi cellulaire ce qui induit ainsi une toxicité spécifique aux NPs.

3. CONCLUSION

Au départ, il s'agissait d'un progrès fantastique. Issus du monde de l'infiniment petit, les nanomatériaux ont ainsi été intégrés, depuis la fin des années 90, dans une grande variété de produits de la vie courante...Sauf que leur succès soulève aujourd'hui de nombreuses questions, à commencer par celle de leur éventuel impact sanitaire. L'exposition orale croissante à ces produits représente donc un nouveau défi en toxicologie face à la diversité de leurs propriétés qui leur permettent d'interagir avec le système biologique selon les habitudes alimentaires.

D'après notre étude, nous avons pu relever les points suivants :

- *S. aureus* et *Streptococcus sp.* traitées par les NPs TiO₂ ont subi des modifications phénotypiques au niveau de la forme et la croissance.
- *S. aureus* et *Streptococcus sp.* traitées par les NPs SiO₂ ont subi des modifications phénotypiques au niveau de la taille, la forme et la croissance.
- *E. coli* traitées par les NPs Ag ont connu des changements au niveau de la taille et la croissance.
- Pour l'effet séparatif, les trois bactéries testées ont conservé leur caractère GRAM+ (*S. aureus* et *Streptococcus sp.*) et GRAM- (*E. coli*).
- Chez les souches *E. coli* traitées avec les deux mixtures de NPs TiO₂ / Ag , et NPs SiO₂ / Ag, nos résultats mettent en évidence une toxicité qui s'est manifestée par : une altération de la flore bactérienne (influence sur la croissance), une modification au niveau génomique (détérioration de la paroi, perte de mobilité) et phénotypique (changement de la taille et la forme). Toutes ces perturbations pourraient être à l'origine d'une dysbiose du microbiote intestinal.

Ces résultats nous ouvrent les perspectives prometteuses dans le domaine de la recherche agroalimentaire et particulièrement concernant notre problématique à savoir : l'effet de la mixture des Nps sur la flore intestinale cas *E. coli* soulignant la nécessité de :

- Rechercher les relations entre nanoparticules et santé et ceci à travers une démarche pluridisciplinaire, afin, d'une part, développer et enrichir les recherches sur les propriétés biologiques des nanoparticules et, d'autre part, définir des stratégies réglementaires pertinentes conduisant à des autorisations de mise sur le marché pour protéger l'homme et son environnement.
- Rechercher l'impact toxicologique de mixture des nanoparticules, par la détermination de leur mécanisme d'action et focaliser sur l'influence de la taille de ces nanoparticules sur d'autres bactéries de la flore intestinale.

*Conclusion générale
et perspectives*

Dans l'industrie agro-alimentaire, l'incorporation d'additifs alimentaires a comme objectif préalable la préservation, la conservation et l'amélioration de la qualité des aliments. Or et suite à leur utilisation exponentielle et parfois abusive, de nombreuses questions pertinentes sont posées par les scientifiques et chercheurs en agro-alimentaire notamment à propos de leur devenir dans l'organisme, leur effet cumulatif et/ou synergique...d'autant plus que certains de ces additifs alimentaires sont introduits sous une forme nanoparticulaire, ce qui laisse suggérer des conséquences imprévisibles voir graves sur la santé des consommateurs..

Les objectifs tracés dans la présente étude étaient :

- D'identifier les additifs alimentaires utilisés dans les produits alimentaires destinés à la consommation humaine ;
- De les classer en fonction de leur catégorie et degré de toxicité tracés par le *Codex Alimentarius* ;
- D'évaluer l'effet séparé de trois nano-additifs (NPsTiO₂, NpsSiO₂ et NPsAg) utilisés dans la production d'aliments sur trois bactéries commensales des genres : Staphylocoques et Streptocoques et *Escherichia*.
- D'évaluer l'impact toxicologique de deux mixtures de nano-additifs alimentaires (NPs TiO₂/Ag et Nps SiO₂/Ag) sur une bactérie de la flore intestinale *E.coli*.

En conclusion, notre travail a abouti aux résultats suivants :

- Concernant le volet 'Enquête sur les additifs alimentaires', nous avons montré que :
 - Les produits alimentaires inventoriés qu'ils soient locaux ou importés contiennent toutes les catégories d'additifs alimentaires (colorants, conservateurs, antioxydants, acidifiants, ...)
 - Toutes les classes de toxicité des additifs alimentaires ('très toxique', 'toxique', 'modérément toxique', 'douteux' et 'peu / pas toxique') sont retrouvées dans l'ensemble des cinq classes alimentaires étudiées.
 - Notre enquête sur les produits fabriqués localement a révélé des additifs alimentaires classés 'très toxiques' et 'toxiques' dans le lait et ses dérivés. Tandis que, dans les produits importés, ce sont les additifs alimentaires 'modérément toxiques' qui sont les plus représentés. Pour les matières grasses, les confiseries, les boissons et les

conserves, les additifs alimentaires les plus présents sont ceux classés ‘très toxiques’, ‘toxiques’ et ‘modérément toxiques’ avec toujours des pourcentages plus élevés dans les produits locaux par rapport à ceux importés.

- Certains additifs alimentaires connus par leur incorporation en forme de nano-additifs tels que le dioxyde de titane codé SIN 171 est retrouvé dans la classe des confiseries (gâteaux importés et bonbons locaux et importés).
- En ce qui concerne l’effet séparatif des nanoparticules sur les bactéries commensales, huit paramètres macroscopiques sont étudiés (taille, forme, croissance, odeur, consistance...), nous avons abouti aux résultats suivants :
 - Les bactéries de la cavité bucco-dentaire *S. aureus* et *Streptococcus sp.* traitées par les NPs TiO₂ ont subi des changements de leur forme et une perturbation de la croissance avec un effet plus important chez *S. aureus* touchant les souches traitées par toutes les dilutions.
 - Des modifications de la taille, la forme ainsi que la croissance sont observées chez les mêmes bactéries traitées aux NPs SiO₂.
 - Pour la coloration de GRAM, toutes les souches *S. aureus* et *Streptococcus sp.* testées ont gardé leur caractère GRAM+.
 - les bactéries du tractus intestinal *E. coli* traitées par les NPs Ag ont subi des changements au niveau de la taille et de la croissance. Ces bactéries ont conservé leur caractère GRAM-.
- Pour l’effet des deux mixtures de NPs TiO₂/Ag et NPs SiO₂/Ag sur *E. coli*, les résultats de notre étude montrent que :
 - Des modifications de quatre paramètres à savoir, la taille, la croissance, la forme et la couleur sont observées. Ces changements concernent les deux mixtures avec un effet plus marqué pour la mixture NPs TiO₂ / Ag pour la taille et la croissance.
 - Certaines bactéries sont passées de GRAM- à GRAM+ dans les deux mixtures avec un effet plus marqué pour la mixture de NPs SiO₂ / Ag où ces changements sont observés pour toutes les dilutions.
 - Le changement de GRAM chez *E.coli* confirme l’altération de la paroi et l’introduction des NPs dans la cellule bactérienne. Ceci pourrait avoir pour conséquence une dysbiose du microbiote intestinal.

Perspectives

En perspectives, il serait intéressant :

- D'élargir l'enquête sur un éventail plus important de produits en raison de l'introduction massive et continue de nouveaux produits sur le marché ;
- De créer une base de données nationale incluant tous les additifs alimentaires incorporés et autorisés dans l'industrie alimentaire et la rendre accessible aux citoyens ;
- De préciser dans la base de données les DJA ainsi que le degré de toxicité des additifs ;
- De démontrer l'impact toxicologique des NPs étudiées à l'échelle moléculaire ;
- De suivre le mécanisme d'action de ces NPs et leur effet sur l'apparition de divers troubles de santé et pathologies tels que le cancer, le diabète, l'hyperactivité et déficit de l'attention chez les enfants.
- D'étudier d'autres NPs connues pour leur incorporation dans l'industrie agroalimentaire.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- Aaron, L. et Torsten, M. (2015).** Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews*, 14 : 479–489.
- Aboiron, J. et Hameury, E. (2004).** Additifs Alimentaires : Les Lécithines. IUP, Université Paris Val de Marne, France, 31p.
- Adams, L. K., Lyon, L. Y. et Alvarez, P. J. (2006).** Comparative ecotoxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water Research*, 40: 3527-3532.
- Adeinat, L. (2018).** L'impact des colorants et des conservateurs de l'industrie alimentaire sur notre santé. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Poitiers, France, 223p.
- AFSSA (2019).** Agence française de sécurité sanitaire des aliments. Expertise hors évaluation de risques sur les analyses de lait des prélèvements post-accidentels liés à l'incendie de l'usine Lubrizol en Seine-Maritime. Saisine n° 2019-SA-0165 et 2019-SA-0176
- AFSSA (2009).** Agence française de sécurité sanitaire des aliments. Nanotechnologies et nanoparticules dans l'alimentation humaine et animale.
- Amouyal, C. et Andreelli, F. (2012).** Effet métabolique des édulcorants. *Réalités en Nutrition et en Diabétologie*, 41 : 25-28.
- André, M. L. (2015).** Les additifs alimentaires. Ed: Jouvence maxipratique, France, 160p.
- André, M. L. (2013).** Les additifs alimentaires : un danger méconnu. Ed: Jouvence, France, 160p.
- Andrieux-Ledier, A. (2012).** Elaboration de nanoparticules d'argent par réduction de sels métallo-organiques : contrôle de taille, stabilité, organisation et propriétés physiques, 11p.
- Ansari, M. A., Khan, H. M., Khan, A. A., Ahmad, M. K., Mahdi, A. A., Pal, R. et Cameotra, S. S. (2014).** Interaction of silver nanoparticles with *Escherichia coli* and their cell envelope biomolecules. *Journal of Basic Microbiology*, 54 (9): 905-915.
- ANSES (2016).** Agence Nationale de Sécurité Sanitaire des aliments. Nanomatériaux dans les produits destinés à l'alimentation. <https://www.anses.fr/fr/system/files/ERCA2016SA0226Ra.pdf>
- ANSES (2019).** Agence Nationale de Sécurité Sanitaire des aliments. The Environment and Work. <https://www.anses.fr/fr/content/evolution-de-l%E2%80%99utilisation-des-additifs-alimentaires-dans-les-produits-transform%C3%A9s>.
- ANSES (2023).** Agence Nationale de Sécurité Sanitaire des aliments. Syndrome de sensibilité chimique multiple (SCM). Description des cas enregistrés dans le Réseau national de vigilance et de prévention des pathologies professionnelles (RNV3P) entre 2001 et 2021. <https://www.anses.fr/fr/system/files/RNV3P2021AST0185Ra.pdf>

- APAB (2019).** Association des Producteurs Algériens des Boissons. <https://apab-algerie.org/?s=additifs+alimentaires>.
- Armand, L. (2011).** Effet des nanoparticules de dioxyde de titane sur les métalloprotéases, influence des paramètres physicochimiques. Th D, Toxicologie, L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, Agro Paris Tech.
- ARTAC (2011).** Association pour la Recherche Thérapeutique Anti-Cancéreuse. Classification de l'ARTAC des additifs alimentaires selon leur risque potentiellement ou certainement cancérigène. https://www.artac.info/fic_bdd/pdf_fr_fichier/Classification_des_additifs_13299194710.pdf
- Attalah, M. (2010).** Elaboration et caractérisation des couches minces d'oxyde de silicium, obtenues par voie sol-gel. Mémoire de Magister en physique.
- Avril, J. L., Denis, F., Dabernat, H. et Monteil, H. (2000).** Bactériologie clinique. 2^{ème} édition Marketing, Paris.
- Baeza-Squiban, A. (2014).** Impacts physiopathologiques des nanoparticules inhalées. *Biologie Aujourd'hui*, 208 (2): 151-158.
- Becker, L., Bendouma, M., Bonnart, A., Bousquière, J., Donzeau, A., Gervais, C., Hiernaux, M., Maison, M., Mathieu, R., Napoliano, L., Obadia, E., Palermo, A. et Thollet, M. (2009).** Les additifs alimentaires: le meilleur et le pire. ENSAIA: *National School of Agronomy and Food Industries*, Nancy. 3-23p.
- Belfennache, D. E. (2012).** Elaboration et étude de nanoparticules Au/TiO₂ et Ag/TiO₂, Mémoire de Magister en Physique, Université Mentouri Constantine.
- Ben Marzouq, A. (2017).** In Agra alimentation : additifs alimentaires. l'EFSA propose de fixer une dose journalière admissible pour les glutamates. From : <https://www.agra.fr/agra-innovation/lefsa-propose-de-fixer-une-dose-journaliere-admissible-pour-les-glutamates>.
- Bergey's (2001).** Manual of systematic Bacteriology, Vol.1, 2^{ème} édition.
- Berta, L. (2021).** Santé et Nutrition. <https://www.laurentberta.com/article-nutrition/sante-bien-etre/additifs-alimentaires-risques-pour-sante>
- Bettini, S. et Houdeau, E. (2014).** Exposition orale aux nanoparticules de dioxyde de titane (TiO₂) : du franchissement de l'épithélium buccal et intestinal au devenir et aux effets dans l'organisme, *Biologie aujourd'hui*, 208 (2):167-175.
- Biscontin, A. (2018).** Habitudes alimentaires : Evolution, caractéristiques, impact sur la santé et génétique nutritionnelle. Thèse en vue de l'obtention du d'état de Docteur en Pharmacie. Université Aix*Marseille, France.

- Bougon, N. (2007).** L'influence des circulations hydrologiques sur la structure des communautés bactériennes à l'interface sol-nappe. Thèse pour l'obtention de grade de Docteur. Université de Rennes 1, <https://core.ac.uk/download/pdf/48257003.pdf>
- Bourrier, T. (2006).** Intolerance and allergy to colorants and additives. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 46 (2): 68-79.
- Bouvier, M. (2017).** Allergie à la Gomme de Guar : à propos d'une observation. *Revue française d'allergologie*, 57 (3) : 227-228.
- Brayner, R., Ferrari-Iliou, R., Brivois, N., Djediat, S., Benedetti, M. F. et Fievet, F. (2006).** Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano Letters*, 6(4): 866-870.
- Brigand, G., Chaumontet, C., Guion, P., Hoellinger, H., Leroux, H., Manchon, P., Martel P., Nordmann, H., Pascal, G., Rizzotti, R., Servoz, C. et Verger, P. (1998).** Dossier scientifique de l'institut français pour la nutrition: Les additifs, 126p.
- Brunelière, Y. (2010).** Décrypter les étiquettes alimentaires. City éditions, Paris, 207p.
- Burniat, W., Cole, T. J., Lissau, I., Poskitt, E. M. E. (2002).** Child and Adolescent Obesity: Causes and Consequences, Prevention and Management. Cambridge University Press. *J. R. Soc. Med.*: 96: 312-313.
- Buttiaux, R., Le minor, L., Gaudier, B., Le minor, S., et Nicolle, P. (1956).** Epidemiologie research on gastroenteritis due to *Escherichia coli* in a Hospital in Northern France. *Archives des Maladies de l'Appareil Digestif et des Maladies de la Nutrition*, 45: 225-247.
- Cecconi, F. (2012).** Additifs Alimentaires et auxiliaires de fabrication. P.1. Disponible sur: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.0/fr/pdf>
- Chatterjee, S., Bandyopadhyay, A. et Sarkar, K. (2011).** Effect of iron oxide and gold nanoparticles on bacterial growth leading towards biological application. *Journal of Nano biotechnology*, 9(1): 34.
- Chardin, H., Barsotti, O. et Bonnaure-Mallet, M. (2006).** Microbiologie en odonto-stomatologie. Ed Maloine, Paris, 331p.
- Chen, X. et Schluesener, H. J. (2008).** Nano-silver: A nan-product in medical application. *toxicology letters*, 174(1): 1-12.
- Choi, O. et Hu, Z. (2009).** Role of Reactive Oxygen Species in Determining Nitrification Inhibition by Metallic/Oxide Nanoparticles. *Journal of Environmental Engineering*, 135:1365-1370.
- CIRC (2018).** Centre International de Recherche sur le cancer. Les cancers attribuables au mode de vie et à l'environnement en France métropolitaine. https://gco.iarc.fr/includes/PAF/PAF_FR_report.pdf

- Clémens S. (2015).** Les additifs alimentaires: législation et problèmes liés à leur utilisation. Thèse de doctorat en pharmacie. Joseph Fourier University, Grenoble, France, 92.
- Codex Alimentarius. (2016).** Normes alimentaires internationales FAO-OMS normes générale pour les additifs alimentaires, 515p.
- Codex Alimentarius. (2014).** Guidelines for the simple evaluation of dietary exposure to food additives (CAC/GL 3-1989).
- Coumoul, X. (2016).** Food contaminants and cancer risk. Cahier de Nutrition et de Diététique, 51(2):104-110.
- Cozien, T. (2012).** Impact des additifs alimentaires sur la santé humaine, 254p.
- Crouzet, J. (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire : Structure phénolique et arôme, Ed : Pascale sarnimanchado et véronique cheynier, Paris, 55-88.
- Daniel M. (2013).** Les Additifs Alimentaires. Réseau Santé Diabète Bruxelles Les Capucines.
- Dembel, M. (2006).** Fréquence d'isolement des souches d'*Escherichia coli* au laboratoire de L'HGT de février 2002 à décembre 2004. Thèse pour l'obtention du diplôme de docteur en Pharmacie. Université de Bamako, Mali, 115p,
- Denans, A. (2017).** Le Nouveau Guide Des Additifs. ISBN 978-2-36549-234-8. Edition : Thierry Souccar, Vergèze, 272p.
- Deppenweiler, A. (2014).** Le glutamate monosodique comme exhausteur de goût : confiance ou méfiance. Thèse en vue de l'obtention du diplôme de docteur d'état en pharmacie. Université Brdeaux 2, France. 120p.
- Dey, S. et Nabagatu, B. H. (2022).** Applications of food color and bio-preservatives in the food and its effect on the human health. *Food Chemistry Advanced*, 1 : 1-13.
- Diezi, M., Buclin, T. et Diezi, J. (2011).** Additifs alimentaires et troubles de l'attention/hyperactivité chez l'enfant. *Paediatrica*, 22(5) : 12-15.
- Dinan, T. G. et Cryan, J. F. (2017).** Gut instincts: microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration. *J Physiol (Lond)*, 595:489–503.
- Diogo, J. S .G., Silva, L. S. C., Pena, A. et Lino, C. M. (2013).** Risk assessment of additives through soft drinks and nectars consumption on Portuguese population: a 2010 survey. *Food and Chemical Toxicology*, 62 : 548-553.
- Dobrint, U. (2005).** (Patho-)Genomics of *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, 295 : 357-371
- Doepker C., Lieberman H.R., Smith A.P., Peck J.D., El-Soehy, Welsh B.T. (2016).** Caffeine: Friend or Foe?. *Annu Rev Food SciTechno*, 17: 117-137.
- Dutau, G, Lavaud, F. (2018).** Intolérances et allergies aux colorants et aux additifs: quelle est réellement leur fréquence ?. *Revue française d'allergologie*, 58 : 479-81.

- Dutau, G., Rancé, F., Fejji S., Juchet, A., Brémont F., Nouilhan P. (1996).** Intolérance aux additifs alimentaires chez l'enfant : mythe ou réalité ? *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 36(2) : 129-42.
- European Regulation (CE) (2016).** n°: 1333/2008. In: EUR-Lex: les additifs alimentaires.
- EFSA (2022).** Autorité Européenne de Sécurité des Aliments. Les sulfites : un problème de sécurité pour les grands consommateurs, mais les données font défaut. <https://www.efsa.europa.eu/fr/news/sulfites-safety-concern-high-consumers-data-lacking>.
- EFSA (2015).** Autorité Européenne de Sécurité des Aliments. Scientific Opinion on the re-evaluation of polyoxyethylene sorbitan monolaurate (E432), polyoxyethylene sorbitan monooleate (E433), polyoxyethylene sorbitan monopalmitate (E434), polyoxyethylene sorbitan monostearate (E435) and polyoxyethylene sorbitan tristearate (E436) as food additives. https://www.efsa.europa.eu/fr/efsa_journal/pub/4152.
- EFSA (2016).** Autorité Européenne de Sécurité des Aliments. Re-evaluation of titanium dioxide (E171) as a food additive. *EFSA J* 14, 1831-4732.
- El Khoury, D. (2017).** Towards the use of electrostatic force microscopy to study interphases in nanodielectric materials. Université Montpellier, France, 195p.
- Etacheri, V., Di Valentin, C., Schneider, J., Bahnemann, D. et Pillai, S. C. (2015).** Visible-light activation of TiO₂ photocatalysts: Advances in theory and experiments. *Journal of Photochemistry and Photobiology C Photochemistry Reviews*, 25: 1-29.
- Fang, C., Shi, B., Pei, YY., Hong, M. H., Wu, J. et Chen, H. Z. (2006).** In vivo tumor targeting of tumor necrosis factor- α -loaded stealth nanoparticles: effect of MePEG molecular weight. *Engineering and Science*, 23(5): 22-36.
- Fantana, A. (2013).** Food additives additifs alimentaires, Ed : technique et documentation Lavoisier, Paris, 33p.
- FAO/WHO (2019).** Food and Agriculture Organization of the United Nations World Health Organization (2020). In Compendium of Food Additive Specifications Expert Committee on Food Additives (JECFA), 87th Meeting June 2019, 110p.
- Faine, L. A., Rodrigues, H. G., Galhardi, C. M., Ebaid, G. M., Diniz, Y. S., Fernandes, A. A. et Novelli, E. L. (2006).** Butyl hydroxytoluene (BHT) induced oxidative stress: Effects on serum lipids and cardiac energy metabolism in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 57 (3) : 221-226.
- Feng, Q.L., Wu, J., Chen, G.Q., Cui, F.Z., Kim, T.N. et Kim, J.O. (2000).** A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, 52(4) : 662-668.
- Fernández-Bertólez, N., Costa, C., JoãoBessa, M., Park, M., Carriere, M., Dussert, F., PauloTeixeira, J., Pásaro, E., Laffon, B. et Valdiglesias, V. (2018).** *Mutation Research /*

Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Assessment of oxidative damage induced by iron oxide nanoparticles on different nervous system cells.

- Franklin, N. M., Rogers, N. J., Apte, S. C., Batley, G. E., Gadd, G. E. et Casey, P. S. (2007).** Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*pseudokirchneriella subcapitata*): The importance of particle solubility. *Environmental Science & Technology*, 41(24): 8484-8490.
- Gaffet, E. (2011).** Nanomaterials: A review of the definitions, applications, health effects. How to implement secure development. *C R Physique*, 12: 648-658.
- Gallen, C. et Pla, J. (2013).** Allergie et intolérance aux additifs alimentaires. *Revue Française d'Allergologie*, 53: 9-18.
- Gaouar, Z. L., Besseghir, F. Z., Gharbi, M. et Kecir, I. (2022).** Additifs alimentaires : Inventaire des substances ajoutées aux denrées alimentaires de large consommation dans l'Ouest algérien. *J Fac Med Or*, 6 (2): 779-830.
- Garuglieri, E., Cattò, C., Villa, F., Zanchi, R. et Cappitelli, F. (2016).** Effects of sublethal concentrations of silver nanoparticles on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* under aerobic and anaerobic conditions. *Biointerphases*, 11(4): 04B308
- Gill, S. R., Pop, M., Deboy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., Gordon, J. I., Relman, D. A., Fraser-Liggett, C. M. et Nelson, K. E. (2006).** Metagenomic analysis of the human distal gut micro-biome. *Science*, 312(5778):1355-1369.
- Gouget, C. (2008).** Additifs alimentaires, danger : Le guide indispensable pour ne plus vous empoisonner. Chariot d'or, Escalquens, 102p.
- Gouget, C. (2011).** Additifs alimentaires, danger. 31-36p.
- Gouget, C. (2015).** Additifs alimentaires, danger. 15Ed. Chariot d'or, 164p.
- Greco, F., Courbier, B., Rose, J., Orsière, T., Sari, I., Bottero, J., Auffan, M. et Perrin, J. (2014).** Gynécologie obstétrique Samp; fertilité. Reprotoxicité des nanoparticules. 43(1): 49-55.
- Harroun. S. G., Zhang. Y., Chen. T. H., Hsu. C. L. et Chang. H. T. (2018).** Adsorption orientation of 8-azaadenine on silver nanoparticles determined by SERS and DFT. *J. Raman Spectrosc.*, 49 : 376–382. doi: 10.1002/jrs.5272.
- Holt, K. B. et Bard, A. J. (2005).** Interaction of silver(I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag⁺. *Biochemistry*, 44:13214–13223.
- Hayder, H., Mueller, U. et Bartholomaeus, A. (2011).** Review of intolerance reactions to food and food additives. *International food risk analysis journal*, 1(2):23-32.

- Hawkins, S. J., Crompton, L. A., Sood, A., Saunders, M., Boyle N. T., Buckley, A., Minogue A. M., McComish, F. S., Jiménez-Moreno, N., Cordero-Llana, O., Stathakos, P., Gilmore, C. E., Kelly, S., Jon, D., Lane, J. D., Case, C. P., Maeve, A. et Caldwell, M. A. (2018).** Nanoparticle-induced neuronal toxicity across placental barriers is mediated by autophagy and dependent on astrocytes, *Nature Nanotechnology*, 13: 427-433,
- Hemmerlin, M. (2014).** Toxicité de deux types de nanoparticules d'argent sur la cyanobactérie modèle: *Synechococcus elongatus* PCC 7942. Rapport de Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, France.
- Heringa, H. et Albrecht. (2001).** Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *Journal of Pharmacology Sciences*, 90 (12): 1927-36.
- Heringa, M., Peters, R., Bleys, R., Van Der Lee, M., Tromp, P., van Kesteren, P., Van Eijkeren, J., Undas, A., Oomen, A. et Bouwmeester, H. (2018).** Detection of titanium particles in human liver and spleen and possible health implications. *Particle and Fibre Toxicology*, 11;15(1):15.
- Houdeau, E. et Lamas, B. (2019).** Nanoparticules dans l'alimentation - Interactions avec le microbiote intestinal, impacts sur la fonction barrière de l'intestin et devenir systémique. *Innovations Agronomiques*, 73: 81-90.
- Houdjedj, N. (2012).** Evaluation du risque toxicologique du colorant alimentaire tartrazine, à court terme chez la souris swiss. Thèse de doctorat, Université d'Oran, Algérie.
- Huang, L., Li D., Lin, Y., Wei, M., Evans, D. et Duan, X. (2005).** Control lable preparation of Nano-MgO and investigation of its bactericidal properties. *Journal Inorganic Biochemistry*, 99(5): 986-993.
- Huk, A., Izak-Nau, E., Reidy, B., Boyles, M., Duschl, A., Lynch, I. et Dusinska, M. (2014).** Is the toxic potential of nanosilver dependent on its size?. *Particle and Fibre Toxicology*, 11 (65).
- Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., Badger, J. et Chinwalla, A. (2012).** Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486 : 207–214.
- INERIS. (Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques) (2012).** Rapport scientifique, 59p
- Jacquot, M., Fagot, P. et Voilley A. (2012).** La couleur des aliments : De la théorie à la pratique. Ed : technique et documentation Lavoisier, Paris, ISSN : 0243-5624.
- Jen, J. S. et Chen, J. (2017).** Food Safety in China: Science, Technology, Management and Regulation. Ed: Wiley, 696p.
- JORA (2012).** Journal Officiel de la République Algérienne. Décret exécutif n°12-214 du 23 Joumada Ethania 1433 correspondant au 15 mai 2012 fixant les conditions et les modalités d'utilisation des additifs alimentaires dans les denrées alimentaires destinées à la consommation humaine.

Consulté sur : From: <https://www.commerce.gov.dz/reglementation/decret-executif-n-deg-12-214>.

- Jung, W. K., Koo, H. C., Kim, K. W, Shin, S., Kim, S. H. et Park, Y. H. (2008).** Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *App. Environ. Microbiol.*, 74 (7): 2171-2178.
- Kampmann, Y., Clerck, E., Kohn, S., Patchala, D., Langerock, R. et Kreyenschmidt, J. (2008).** Study on the antimicrobial effect of silver-containing inner liners in refrigerators. *Journal of applied microbiologie*, 104(6): 1808-1814 .
- Kaper, J. B., Nataro, J. P. et Mobey, H. L. T. (2004).** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*, 2: 123-140.
- Kim, J., Kuk, E., Yu, K., Kim, J., Park, S., Lee, H., Kim, S., Park, Y., Park, Y., Hwang, Y., Kim, Y., Lee Y., Jeong, D. et Cho, M. (2007).** Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*, 3(1): 95-101.
- Kim, Y., Kim, J., Cho, H., Rha, D., Kim, J., Park, J., Choi, B., Lim, R., Chang, H., Kwon, H., Jeong J., Han, B. et Yu, I. (2008).** Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhalation Toxicology*, 20 (6): 575-83.
- King, T., Kocharunchitt, C., Gobijs, K., Bowman, J.P. et Ross, T. (2016).** Physiological Response of *Escherichia coli* O157:H7 Sakai to Dynamic Changes in Temperature and Water Activity as Experienced during Carcass Chilling. *Mol Cell Proteomics*, 15(11) : 3331-3347.
- Kiwi, J. et Nadtochenko, V. (2005).** Evidence for the mechanism of photocatalytic degradation of the bacterial wall membrane at the TiO₂ interface by ATR-FTIR and laser kinetic spectroscopy. *Langmuir*, 21(10) : 4631-4641.
- Kregial, D. (2015).** Health safety of soft drinks: contents, containers, and microorganisms. *BioMed Research International*, 1-15.
- Kumar, A., Pandey A., Singh S., Shanker R., Dhawan A., 2011.** Engineered ZnO and TiO₂ nanoparticles induce oxidative stress and DNA damage leading to reduced viability of *Escherichia coli*. *Free Radical Biology and Medicine*, 51: 81p.
- Kwan-Ming, N., Wai-Kee, L., Siu-Kwan, W., Chun-Wai, T. et Ngai-Ling, M. (2004).** Silver (I) affinities of amides: a combined ab initio and experimental study. *Physical chemistry chemical physics*, 6:144-153.
- Laudisi, F., Di Fusco, D., Dinallo, V., Vezza, T., Marafini, I., Colantoni, A., Ortenzi, A., Monteleone, I., Pallone, F. et Monteleone, G. (2016).** Food preservatives and additives exacerbate intestinal inflammation. *Abstracts of the 22nd national congress of digestive diseases / digestive and liver disease* O.C.11.4. e112

- Lee, E, Barnes, E. H., Mehr, S. et Campbell, D. E. (2019).** Differentiating acute food protein-induced enterocolitis syndrome from its mimics: a comparison of clinical features and routine laboratory biomarkers. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 7: 471-8.e3.
- Lelasseux, C. (2018).** Evaluation Additifs Alimentaire. <https://www.quechoisir.org/comparatif-additifs-alimentaires-n56877/>
- Ge, L., Li Q., Wang, M., Ouyang, J., Li, X. et Xing, M. M. (2014).** Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity, *Ge Int J Nanomedicine*, 9: 2399-2407
- Liau S.Y., Read D.C., Pugh W.J., Furr J.R. et Russell A.D. (1997).** Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions, *Letters in Applied Microbiology*, 25: 279-283.
- Li, J., Yang, S., Lei, R., Gu, W., Qin, Y., Ma, S., Chen, K., Chang, Y., Bai, X., Xia, S., Wu, C. Et Xing G. (2018).** Oral administration of rutile and anatase TiO₂ nanoparticles shifts mouse gut microbiota structure. *Nanoscale*, 10: 7736-7745.
- Linke B.G.O., Casagrande T.A.C. et Cardoso L.A.C. (2018).** Food additives and their health effects: A review on preservative sodium benzoate. *African J Biotech*, 17(10): 306-310.
- Liu P., Duan W., Wang Q. et Li X. (2010).** The damage of outer membrane of *Escherichia coli* in the presence of TiO₂ combined with UV light. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 78(2): 171-176.
- Lok, C.N., Ho, C.M., Chen, R., He, Q.Y., Yu, W.Y., Sun, H., Kwong-Hang, Tam, P., Chiu, J. F. et Che, C.M. (2006).** Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J. Proteome Res*, 5 : 916–924.
- Macioszek V.K. et Kononowicz A.K. (2004).** The evaluation of genotoxicity of two commonly used food colors: Quinoline Yellow (E104) and Brilliant Black BN (E151). *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 9(1):107-122.
- Magdelaine C. (2019).** Rapport d'enquête sur la présence de dioxyde de titane dans les dentifrices, [notre-planete.info.https://www.notre-planete.info/actualites/2256-dioxyde-detitane-nanoparticule-dentifrice](https://www.notre-planete.info/actualites/2256-dioxyde-detitane-nanoparticule-dentifrice)
- Mansour H.B. et Tlemcani L.L (2009).** Les colorants naturels sont-ils de bons additifs alimentaires? *Phytothérapie*, 7(4):202-10.
- Marano, F., Hussain, S., Rodriguez-Lima, F., Baeza-Squiban, A. et Boland, S. (2011).** Nanoparticles: Molecular targets and cell signalling. *Arch Toxicol*, 85: 733-741.
- Marano, F. et Guadagnini R. (2013).** Nanoparticles and alimentation: What risks for consumers ?. *Cahier de Nutrition et de Diététique*, 48: 142-150.
- Marano, F. (2016).** Faut-il avoir peur des nano?. Ed : Buchet-Chastel, Paris, 128p.

- Martinez-Gastanon, G.A., Nino-Martinez, N., Martinez-Gutierrez, F., Martinez-Mendoza, J.R. et Ruiz, F. (2008).** Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *J Nanopart Res*, 10 : 1343-1348.
- Mathelié-Guinlet M. (2017).** Etude de l'interaction nanoparticules-bactéries: application à l'élaboration d'un biocapteur .thèses de doctorat : lasers matière et nanosciences. Université de bordeaux , France, 256p.
- McCann D., Barrett A., Cooper A., Crumpler D., Dalen L., Grimshaw K., Kitchin E., Lok K., Porteous L., Prince E., Sonuga B.E., Warner J. et Stevenson J. (2007).** Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *Lancet*, 370 (9598): 1560-1567.
- McGee, C.F., Storey, S., Clipson, N. et Doyle, E. (2017).** Soil microbial community responses to contamination with silver, aluminium oxide and silicon dioxide nanoparticles. *Ecotoxicology*, 26 : 449-458.
- Medina-Reyes, E. I., Rodríguez-Ibarra, C., Déciga-Alcaraz, A., Díaz-Urbina, D., Chirino, Y. I. et Pedraza-Chaverri, J. (2020).** Food additives containing nanoparticles induce gastrotoxicity, hepatotoxicity and alterations in animal behavior: The unknown role of oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology* 146 : 111814. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111814>
- Mercier-Bonin, M., Despax, B., Raynaud, P., Houdeau, E. et Thomas, M. (2016).** Oral exposure and fate of food nanoparticles within the gut: Examples of silver and titanium dioxide. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 51 (4): 195-203.
- Meunier C. (2011).** Soft drinks: definition, composition and nutritional intakes contribution. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 46 (1): H5-H12.
- Moll M. et Moll N. (1998).** Additifs alimentaires et auxiliaires technologiques. Ed Dunod, Paris, 218p.
- Moore M. N. (2006).** Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment International*, 32(8) : 967-976.
- Minemura, M. et Shimizu, Y. (2015).** Gut microbiota and liver diseases. *World J Gastroenterol*, 21 : 1691-702.
- Meijnikman, A. S., Gerdes, V. E., Nieuwdorp, M. et Herrema, H. (2018).** Evaluating Causality of GutMicrobiota in Obesity and Diabetes in Humans. *Endocr Rev*, 39 : 133-153.
- Moualkia H. et Ansar K. (2015).** Pathogénicité chez *Escherichia coli*. Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master Spécialité: Génétique Moléculaire Université des Frères Mentouri Constantine, Algérie, 30p.
- Morones J.R., Elechiguerra J.L., Camacho A., Holt K., Kouri J.B., Ramirez J.T. et Yacaman M.J. (2005).** The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10) : 2346-2353.

- Moreau, J. W., Weber, P. K., Martin, M. C., Gilbert, B., Hutcheon, I. D., et Banfield, J. F. (2007).** Extracellular proteins limit the dispersal of biogenic nanoparticles. *Science*, 316 (5831): 1600–1603.
- Muhammad H. F. L. et Dickinson K. M. (2019).** Nutrients, Energy Values and Health Impact of Conventional Beverages. *Nutrients in Beverages*, 12: 41-75.
- Natividad, J. M. M. et Verdu E. F. (2013).** Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications. *Pharmacol Res*, 69 : 42–51.
- Nauciel, C. et Vildé, J. L. (2005).** Bactériologie médicale. 2^{ème} Ed Masson, Paris, 272p.
- Nel, A., Xia, T., Madler, L. et Li, N. (2006).** Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311 (5761): 622-7.
- Nicolas, J. F. (2011).** Hypersensibilité aux sulfites intolérance aux sulfites. <https://allergolyon.fr/wp-content/uploads/2020/04/fiche14.pdf>
- Ni J., Wu G. D., Albenberg L. et Tomov V. T. (2017).** Gut microbiota and IBD: causation or correlation?. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 14 : 573-584.
- Nowak-Werzyn, A., Chehade, M., Groetch, M. E., Spergel, J.M., Wood, R. A. et Allen, K. (2017).** International consensus guidelines for the diagnosis and management of food protein-induced enterocolitis syndrome: executive summary-workgroup report of the Adverse Reactions to Foods Committee, American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. *J Allergy Clin Immunol*, 139 : 1111-26.e4.
- OMS (2023).** Organisation Mondiale de la Santé. Additifs alimentaires. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/food-additives>
- Panáček A., Libor Kvítek L., Smékalová M., Renata Večeřová R., Milan Kolář M., Magdalena Röderová M., Filip Dyčka F., Marek Šebela M., Robert Pucek R., Ondřej Tomanec O. et Zbořil R. (2018).** Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nature Nanotechnology*, 13: 65-71.
- Pandey, R. M. et Upadhyay, S. K. (2012).** Food additive Food Additive, Prof. Yehia El-Samragy (Ed.), ISBN: 978-953-51-0067-6. doi:10.5772/34455
- Pathakoti K., Manubolu M. et Hwang H.M. (2017).** Nanostructures: current uses and future applications in food science. *Journal of Food Drug Analysis*, 25: 245-253
- Qi, K., Daoud, W., Xin, J., C.L., M., Tanga, W. et Cheunga, W. (2006).** Self-cleaning cotton. *Journal of Materials Chemistry*, 16: 4567-4574.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S. et Manichanh, C. (2010).** A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464 : 59–65.

- Rai, M., Kon, K., Ingle, A., Duran, N., Galdiero, S. et Galdiero, M. (2014).** Broad-Spectrum Bioactivities of Silver Nanoparticles: The Emerging Trends and Future Prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98: 1951–1961.
- Reddy, K. M, Feris, K., Bell, J., Wingett, D. G., Hanley, C. et Punnoose, A. (2007).** Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. *Applied Physics Letters*, 90(21) : 213902.
- Reynal, B. (2009).** Les additifs alimentaires. Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires, 4^{ème} édition.
- R’Haiem, N., Chahboun, N., Abed, H., Esmail, A., Berny, E. H., Hammoumi, A. et Ouhssine, M. (2013).** Additifs alimentaires du marché de Kénitra. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **152** (1-4) : 53-64.
- Ricaud, M. et Witschger, O. (2012).** Nanoparticules dans l’alimentation- Interactions avec le microbiote intestinal, impacts sur la fonction barrière de l’intestin et devenir systémique Les nanomatériaux: Définitions, risques toxicologiques, caractérisation de l’exposition professionnelle et mesures de prévention. INRS: ED 6050.
- Richard, M. L., Liguori, G., Lamas, B., Brandi, G. da Costa, G., Hoffmann, T. W., Pierluigi, Di Simone, M., Calabrese, C., Poggioli, G., Langella, P., Campieri, M. et Sokol, H. (2018).** Mucosa-associated microbiotadysbiosis in colitis associated cancer. *Gut Microbes*, 9: 131-142.
- Roberts, H. J. (2001).** Aspartame Disease: An Ignored Epidemic. *Ed Sunshine Sentinel Pr Inc*, 1038p.
- Roberts, H. J. (2004).** Aspartame Disease. A Possible Cause for Concomitant Graves' Disease and Pulmonary hypertension. *Tex Heart Inst J.*, 31 (1): 105.
- Roger, P. (2011).** Réponses de *Streptococcus salivarius* K12 à l’environnement et à la dynamique de la bouche simulés en bioréacteur. Thèse de doctorat en Génie Microbiologique. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l’Environnement (AgroParisTech), France, 190p.
- Rooks, M. G. et Garrett, W. S. (2016).** Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat Rev Immunol* 16 : 341-352.
- Rosenfeld, C. S. (2015).** Microbiome Disturbances and Autism Spectrum Disorders. *Drug Metab Dispos*, 43 : 1557–1571.
- Rouim, F. Z, Azzaoui, F. Z. et Ahami, A. (2015).** Food Additives and Hyperactivity Disorder Among School Children in the City of Kenitra (Morocco): Preliminary Study. *European Psychiatry*, 30 (s1) : 1210.
- Rowland, A. S., Skipper, B. J., Rabiner, D. L., Qeadan, F., Campbell, R. A., Naftel, A. J. et Umbach, D. M. (2018).** Attention Deficit/Hyperactivity. Disorder (ADHD): Interaction between socioeconomic status and parental history of ADHD determines prevalence. *J Child Psychol Psychiatry*, 59 (3): 213-222.

- Saidani M. (2013).** Epidémiologie des pyélonéphrites et prostatites communautaires: Les traitements probabilistes recommandés sont-ils toujours adaptés? Thèse Université Paris 7, faculté de médecine. France.
- Sasaki, K., Abe, H. et Yoshizaki, F. (2002).** *In vitro* antifungal activity of naphthoquinone derivatives. *Biol Pharm Bull*, 25(5) : 669-670.
- Sergé, S. (1998).** Les émulsions alimentaires, Utilisation de la Lécithine: Exemple de la mayonnaise. *The Sergi5.com Journal*, 5 (5): 55-555.
- Sésor, R. (2009).** Additifs alimentaires. France, 23p.
- Sghaier, M. (2014).** Les conservateurs alimentaires. Rapport de recherche. Université libre de Tunis, Tunisie.
- Shakil, M. H., Talikdar-Trisha, A., Rahman, M., Talukdar, S., Kobun, R., Huda, N. et Zzaman, W. (2022).** Nitrites in Cured Meats, Health Risk Issues, Alternatives to Nitrites: A Review. *Foods*, 11 (3355): 1-26.
- Silva, M. M. et Lidon, F. C. (2016).** Food preservatives- an overview on applications and side effects. *Emir. J. Food Agric*, 28 (6) : 366-373.
- Silva, M. M. N., Albuquerque, T. L., Pereira, K. S. et Coelho, M. A. Z. (2019).** Food additives used in non-alcoholic water-based beverages, a review. *J Nutrit Health & Food Engin*, 9 (3): 109-121.
- Simon-Beckers, A. (2008).** Effets biologiques de nanoparticules manufacturées: Influence de leurs caractéristiques. Toxicologie humaine et environnementale. Thèse de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech).
- Simon, P. et Joner, E. (2008).** Conceivable interactions of biopersistent nanoparticles with food matrix and living systems following from their physicochemical properties. *Journal of Food and Nutrition Research*, 47 (2): 51-59.
- Slimani, H. (2019).** Cancer: les nanoparticules favoriseraient l'apparition de métastases Communiqué de presse de l'Université de Singapour <https://www.bioalaune.com/fr>
- Sondi, I. et Salopek-Sondi, B. (2004).** Silver Nanoparticles as Antimicrobial Agent: A Case Study on *E. coli* as a Model for Gram-Negative Bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275: 177-182.
- Talbot, P., Radziwil, J., Bienkowska, K., Steenkeste, B., Cinquin, F., Jamme, V., Robert, C., Cherbuy, F., Chain, F., Rul, M., Hampomier-Vergès, M., Réfrégiers, M., Thomas M. et Mercier-Bonin, M. (2004).** Interactions entre les nanoparticules alimentaires de TiO₂, le mucus et les bactéries du microbiote intestinal: approche in vitro. 28 : S29-S61
- Tenaillon, O., Shurnuk, D., Picard, B. et Denamur E. (2010).** The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*, 8: 207-217.

- Tighrine, A. (2019).** Recherche et dosage de quelques additifs alimentaires sur les produits dérivés de fruits, effet sur la santé et comparaison aux normes: optimisation et validation des méthodes analytiques. Thèse doctorat: Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques : Université Mouloud Mammeri Tizi Ouzou, Algérie.
- Timmusk, S., Seisenbaeva, G. et Behers, L. (2018).** Titania (TiO₂) nanoparticles enhance the performance of growth-promoting rhizobacteria. *Sci Rep*, 8 : 617.
- Tomas, J., Wrzosek, L., Bouznad, N., Bouet, S., Mayeur, C., Noordine, M. L., Honvo-Houeto, E., Langella, P., Thomas, M. et Cherbuy, C. (2013).** Primocolonization is associated with colonic epithelial maturation during conventionalization. *FASEB J*, 27 : 645–655.
- Tsao N., Luh T.-Y., Chou C.-K., Chang T.Y., Wu J.J., Liu C.C. et Lei, H.Y. (2002).** *In vitro* action of carboxyfullerene. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(4):641- 649.
- Verdu, E. F., Galipeau, H. J. et Jabri, B. (2015).** Novel players in coeliac disease pathogenesis: role of the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 12 : 497-506.
- Verhaeghe, E. J. G. (2002).** Carraghénanes et cancer du côlon: Etude expérimentale chez des rats a flore humaine, mécanismes d'action. Thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, France, 66p.
- Vernis, L. (2017)*.** Effets des nanoparticules d'argent sur les communautés bactériennes. *Bulletin de veille scientifique*, 32: 12-14.
- Vernis, L. (2017)**.** Quelles voies de réponse au stress en présence de nanoparticules et quelles conséquences?, *Bulletin de veille scientifique*, 32: 61p.
- Verran, J., Sandoval, G., Allen, N.S., Edge, M. et Stratton, J. (2007).** Variables affecting the antibacterial properties of nano and pigmentary titania particles in suspension. *Dyes and Pigments*, 73: 298-304.
- Vicaire, Y. Ruffinengo, E, Rosanderl, P. et Van-Vliet, L. (2011).** Liste SIN : Substitution Immédiate Nécessaire. Dossier de presse, 17p. <https://wecf-france.org/wp-content/uploads/2019/03/document-listeSIN.pdf>
- Vierling, E. (2008).** Aliments et boissons : technique et aspect réglementaire. 3^{ème} Edition Doin éditeurs, Velizy-Villacoublay, 278p.
- Viennois, E., Bretin, A., Dube, P. E., Maue, A., Dauriat, C. J. G., Barnich, N., Gewirtz, A. T. et Chassaing, B. (2020).** Dietary Emulsifiers Directly Impact Adherent-Invasive *E. coli* Gene Expression to Drive Chronic Intestinal Inflammation. *Cell Reports*, 33 : 1-16.
- Vieira Teixeira da Silva, D., Dos Santos Baião, D., De Oliveira Silva, F., Alves, G., Perrone, D. et Mere Del Aguila, E., (2019).** Betanin, a Natural Food Additive: Stability, Bioavailability, Antioxidant and Preservative Ability Assessments. *Molecules*, 24(3) : 458.

- Warheit, D. B., Hoke, R. A., Finlay, C., Donner, E. M., Reed, K.L. et Sayes, C.M. (2007).** Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management. *Toxicology Letters*, 171(3) : 99-110.
- Weimmerskirch-Aubatin, J. (2014).** Propriétés de luminescence et caractérisation structurale de films minces d'oxyde de silicium dopés au cérium et co-dopés cérium-ytterbium. Thèse de doctorat, spécialité Physique. Université de Lorraine, France.
- Viennois, E., Merlin, D., Gewirtz, A.T., Chassaing, B. (2017).** Dietary Emulsifier-Induced Low-Grade Inflammation Promotes Colon Carcinogenesis. *Cancer Res.* 77:27–40.
- Wijnhoven, S. W. P., Peijnenburg, W. J. G. M., Herberts, C. A., Hagens, W. I., Oomen, A. G., Heugens, E. H. W., Roszek, B., Bisschops, J., Gosens, I. et Van De Meent, D., (2009).** Nanosilver a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology*, 3:109-138.
- Xu, X. H. N., Brownlow, W. J., Kyriacou, S. V., Wan, Q. et Viola J. J. (2004).** Real-time probing of membrane transport in living microbial cells using single nanoparticle optics and living cell imaging. *Biochemistry*, 43:10400–10413.
- Zamorano, J. (2006).** Technique de l'ingénieur agroalimentaire: carraghénane agent gélifiant épaississant et stabilisant. Techniques de l'ingénieur (France), 3 (F5080).
- Zeyons, O. (2008).** Etudes des interactions physicochimiques et biologiques entre des nanoparticules manufacturées et des bactéries de l'environnement. Thèse de doctorat: Physicochimie. France : l'université Paris VI - Pierre et Marie Curie, 330p.
- Zhang, L. L., Jiang, Y. H., Ding, Y. L., Povey, M. et York, D. (2007).** Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). *Journal of Nanoparticle Research*, 9 (3) : 479-489.
- Zhukova L.V., Kiwi J., Nikandrov V.V. (2012).** TiO₂ nanoparticules suppress *Escherichia coli* cell division in the absence of UV irradiation in acidic conditions. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 97: 240-247.

Health Safety in Drinks: Evaluation of Certain Food Additives in Algeria

Saoussene Chernine

Department of Biology, Cell Toxicology Laboratory, University Badji Mokhtar, 23000, Annaba, Algeria, saoussene.chernine@gmail.com

Samira Djekoun Bensoltane

Department of Dental Medicine, University Badji Mokhtar, 23000, Annaba, Algeria, s.chernine@yahoo.com

Follow this and additional works at: <https://corescholar.libraries.wright.edu/jbm>



Part of the [Nutrition Commons](#)

Recommended Citation

Chernine, S., & Djekoun Bensoltane, S. (2022). Health Safety in Drinks: Evaluation of Certain Food Additives in Algeria, *Journal of Bioresource Management*, 9 (3).

ISSN: 2309-3854 online

(Received: Dec 17, 2021; Accepted: May 19, 2022; Published: Sep 30, 2022)

This Article is brought to you for free and open access by CORE Scholar. It has been accepted for inclusion in *Journal of Bioresource Management* by an authorized editor of CORE Scholar. For more information, please contact library-corescholar@wright.edu.

Health Safety in Drinks: Evaluation of Certain Food Additives in Algeria

Cover Page Footnote

We would like to extend our warmest thanks to all the volunteers who answered our questionnaire and all the managers of the places of sale (small and medium surfaces, supermarkets and hypermarkets) which opened the doors and facilitated the access to the inventoried products.

© Copyrights of all the papers published in Journal of Bioresource Management are with its publisher, Center for Bioresource Research (CBR) Islamabad, Pakistan. This permits anyone to copy, redistribute, remix, transmit and adapt the work for non-commercial purposes provided the original work and source is appropriately cited. Journal of Bioresource Management does not grant you any other rights in relation to this website or the material on this website. In other words, all other rights are reserved. For the avoidance of doubt, you must not adapt, edit, change, transform, publish, republish, distribute, redistribute, broadcast, rebroadcast or show or play in public this website or the material on this website (in any form or media) without appropriately and conspicuously citing the original work and source or Journal of Bioresource Management's prior written permission.

HEALTH SAFETY IN DRINKS: EVALUATION OF CERTAIN FOOD ADDITIVES IN ALGERIA

SAOUSSENE CHERNINE^{1*} AND SAMIRA DJEKOUN BENSOLTANE^{1,2}

¹Department of Biology, Cell Toxicology Laboratory, University Badji Mokhtar, 23000, Annaba, Algeria

²Department of Dental Medicine, University Badji Mokhtar, 23000, Annaba, Algeria

Corresponding author's email: saoussene.chernine@gmail.com

ABSTARCT

Consumption of drinks remains a controversial issue for public health. For more than 50 years, potential adverse reactions to additives have been suggested, but data to date are conflicting. The purpose of this article is to provide an approach to the health threat by inventorying the food additives used in 304 local and imported drinks sold in the Algerian market and classifying them according to their toxicity. In second time, survey population destined to 1200 subjects to evaluate their drink consumption and health problems. The results show that the inventoried drinks contain many food additives, mostly consisting of dyes. Toxic and very toxic additives are incorporated in local products, while moderately toxic additives are present in imported ones. Children consume mostly soft drinks and juices and suffer from hyperactivity, gastro-intestinal disorders, and food allergies. Adults suffer from gastro-intestinal disorders, obesity, food allergies, and diabetes. This study provides a broad overview of available scientific knowledge and cites numerous studies on various aspects of drinks and their implications for health safety. Particular attention is given to ingredients, including artificial flavorings, colorings, and preservatives, and to the lesser known risks of microbiological and chemical contamination during processing and storage.

Keywords: Food additives, drinks, survey, human health, toxicity.

INTRODUCTION

Food additives have an essential role in the food industry and consumer habits, giving differentials to foods and increasing their stability and safety. Due to the evolution of science, new conservation techniques have been developed, such as the addition of preservatives, antioxidants, and sweeteners, which provide, in addition to conservation, desirable changes in food (Moll and Moll, 1998; Jen et al., 2017; Anses, 2019). Currently, food additives play a vital role in the industry, especially artificial sweeteners such as saccharin, acesulfame potassium and aspartame, preservatives such as benzoic and sorbic acid, and flavoring agents such as caffeine (Diogo et al., 2013; Kregial, 2015; Doepker et al., 2016).

The consumption of beverages has intensified over the years, mainly due to changes in eating habits and the search for a healthier diet by the population (Meunier, 2011). This increase has triggered the diversification of the beverage sector in general, both for the "recreational" drink sector and for those with other uses, such as meeting nutritional demands (Burniat et al., 2002; Muhammad et al., 2019; Silva et al., 2019).

According to the Association of Algerian Beverage Producers (APAB), Algeria marketed approximately 4.8 billion liters of soft drinks in 2016. To date, soft drinks have dominated with 2 billion liters sold at the end of 2014 and a growth of 8 % each year (APAB 2019). Soft drinks are made up of mostly water (at least 85 %), sugar, and potentially

vegetable extracts in colas or a percentage of fruit juice, varying according to the recipe (between 5 % and 12 %), together with food additives (Commission CA 2014; Muhammad et al., 2019).

Studies have shown that the food additives most likely to affect children's behavior are tartrazine (SIN102), propionate (SIN282), artificial colors (SIN110, E122, E124), and benzoate (E211) ((Macioszek, 2004; Linke, 2018; Rowland, 2018). Safety assessments of food additives are provided by specialized authorities, such as the Joint FAO/WHO Committee of Experts on Additives food, which establishes the lists of authorized and unauthorized additives and their specific acceptable daily doses (ADI or DJA). This ADI is an estimate of the amount of a food additive in food or beverages, expressed on the basis of body weight, ingested daily for a lifetime that is safe to the consumer's health (Ben Marzouq, 2017; FAO/WHO 2018).

It is therefore important to evaluate additives in food in an important industrialized product in the Algerian market, such as the soft drink, and identify which additives are used in their manufacture. This endeavor requires a careful examination of the labels, which is a more or less tedious task due to the ingenuity introduced in labels to distract consumers from the composition of the product. The list of components is usually written in lowercase letters for the packaging, or the product must be rotated in all directions for retrieval. We therefore decided to carry out a study on the evaluation of additives used in soft drinks marketed in our region.

Because of their possibility of transmitting diseases, such as malaria, encephalitis and filariasis, these diseases are caused by pathogens and parasites that they transmit to humans (Azari-Hamidian et al., 2019). Several species of mosquitoes are vectors of zoonotic diseases. *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) can transmit several viruses that cause serious

human diseases (Wang et al., 2021), In particular Dengue, Chikungunya, yellow fever and Zika fever (Ducheyne et al., 2018).

A good knowledge of the Culicid fauna, by studying its taxonomy along with abundance, is very important before carrying out mosquito control. Larval surveys continued to be important for assessing population size and the impact of control measures. A good knowledge of pre-imaginal ecology is essential for understanding mosquito population dynamics (Service, 1993).

The present work aims to make a more extensive inventory of the Culicidae fauna in various stations in Tizi-Ouzou. It was being carried out as part of an updated inventory to deepen our knowledge of the faunal richness of the Culicidae, which can

MATERIALS AND METHODS

Food Additive Survey

From the start, it was challenging to study the countless compositions of food products sold on the shelves of stores, which led us to consider selecting criteria for the survey sites (small and medium surfaces, supermarkets, or hypermarkets) and their locations (metropolitan, cities, or small towns, etc.) for better representation. Thus, the selected sites were as follows: Metropolis Algiers; three hypermarkets, Setif Province; 1 hypermarket, Annaba Province; 5 hypermarkets and 6 small areas, Skikda Province; and 17 hypermarkets and 9 small areas. Setif, Annaba, and Skikda are 3 large departments in eastern Algeria. After carefully inspecting the list of selected local and imported products, we focused our survey on those purchased by different social classes (with different economic performance) of all ages.

Our sample consisted of 304 products that were sorted into four classes: soft drinks (SD), juices (J), syrups (S), and sugar-free drinks (SFD). We browsed shelf

by shelf and class by class the drinks in all the above mentioned commercial sites. During this operation, a range of products was inventoried, stored in data files for each class, and photographed, focusing on the following information: trade name and place of manufacture (country); composition of the product (ingredients list).

Through this investigation, we clearly noticed the unreadable labeling on many products due to the significantly small size, which did not allow the consumer to check on the purchased product's composition.

We classified all the additives found according to their category based on the classification of the *Codex Alimentarius* used in the European Union. This classification is the same as that chosen by the Algerian Trade Ministry (JORA, 2012). We proceeded to classify all food additives (all categories) that we came across during our investigation within four drink classes (SD, J, S, and SFD) of local or imported origin according to their degree of toxicity based on the European classification (2016).

Population Survey

The study was conducted using two methods with a structured questionnaire to reach the four corners of Algeria. The first method was carried out directly with consumers at different schools, and the second method was conducted online. We surveyed 1200 volunteers: the first population consisted of 600 school aged children, and the second population consisted of 600 adults. The survey covered sex, age, type of beverage consumed, the number of times per day and/or per week of consumption, and health problems.

RESULTS

Based on the products placed on the Algerian market and due to the limited number of some imported beverages (S and SFD), the number of products inventoried was as follows: SD, n = 68; J, n = 174; S, n = 42; SFD, n = 20.

Food Additive Survey

The results of our survey showed that the local and imported SFD contained 9 additives, including 2 sweeteners, SIN950 (Acesulfame potassium) and SIN955 (Sucralose). SIN950 had percentages of 83.3 % in both lots, and SIN955 had values of 67.7 % (Local) and 33.3 % (imported). We noticed that local and imported SD included all categories, followed by SFD, J, and finally S where few additives were listed.

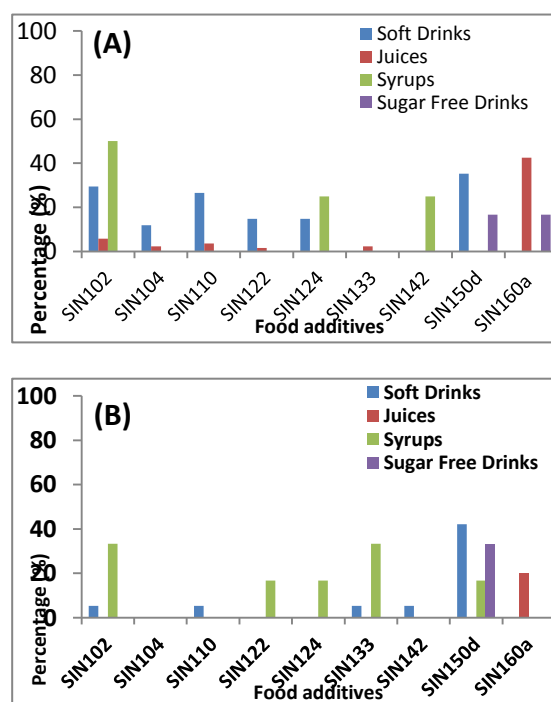


Figure 1 : Percentages of dyes incorporated in local (A) and imported (B) drinks inventoried.

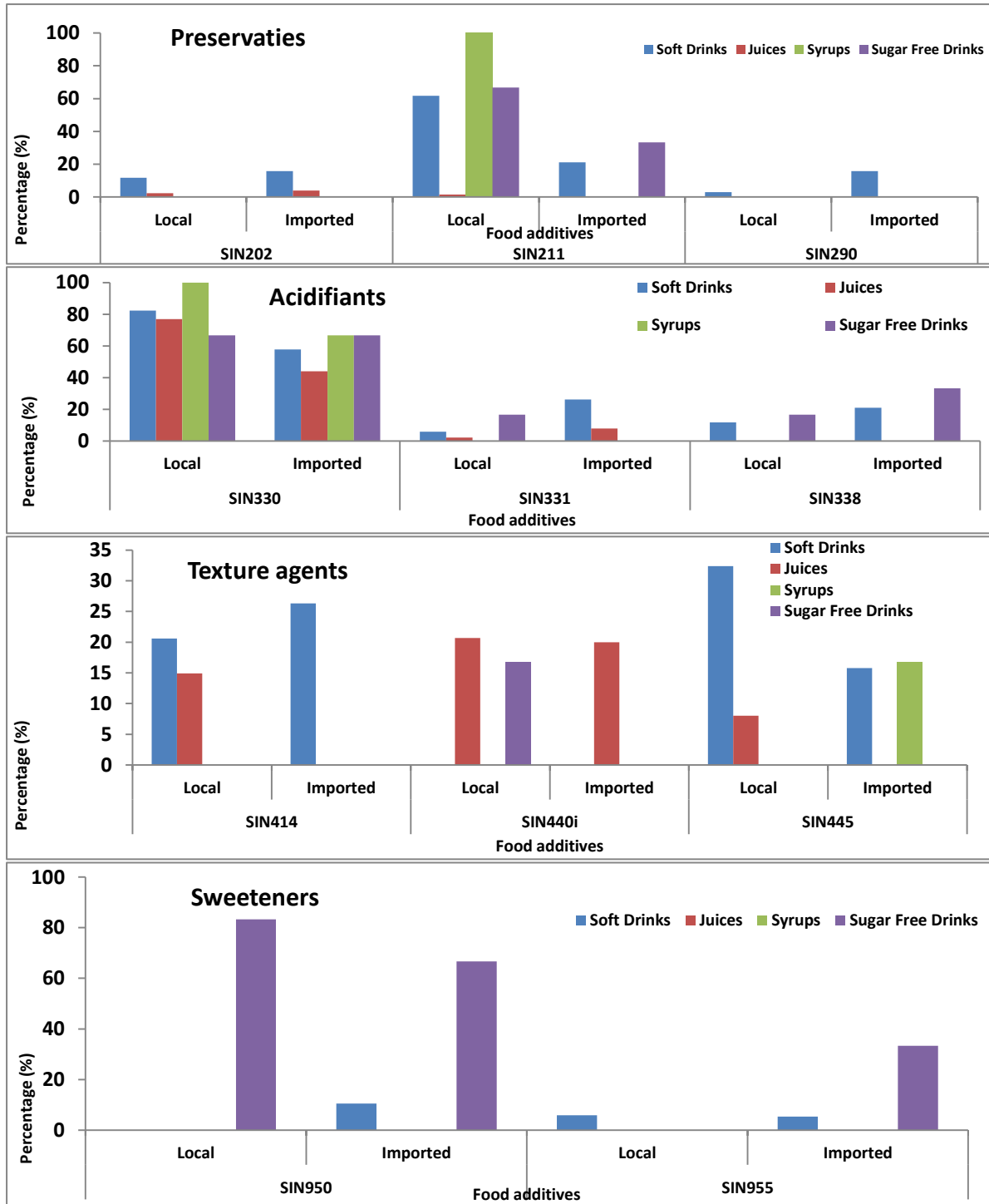


Figure 2: Percentages of food additives incorporated in local and imported drinks inventoried according to categories.

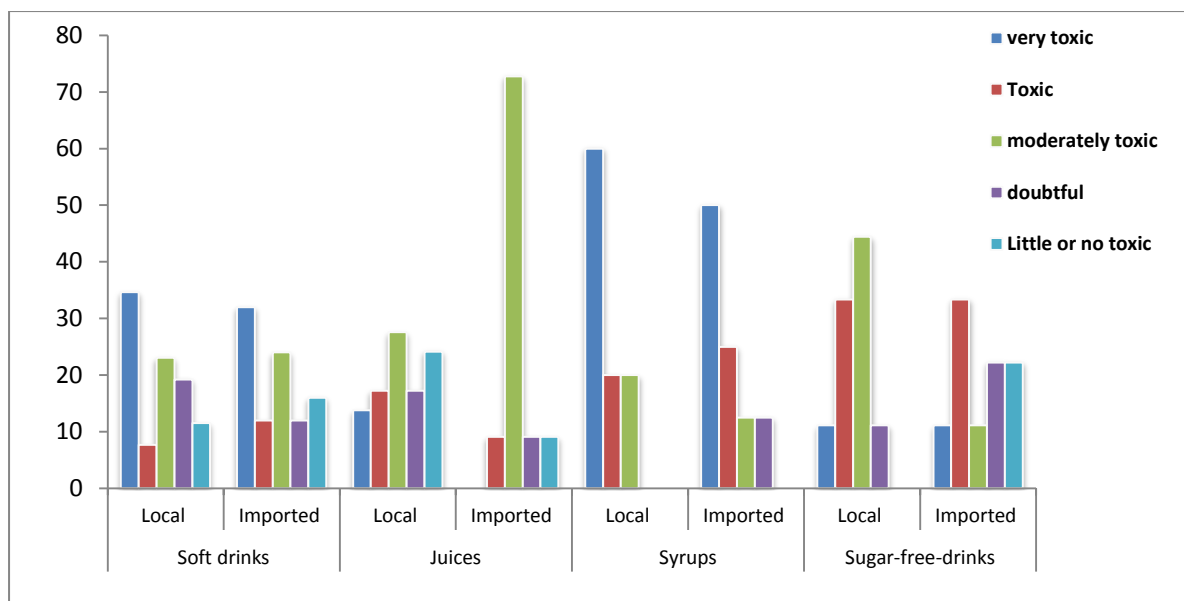


Figure 3: Distribution of food additives incorporated in the local and imported drinks according to the degree of toxicity.

According to the results (Figure 1), dyes were the most widely used category of food additive in the manufacturing of SD and S. Caramel IV (SIN150d) was incorporated in 35.3 % and 42.1 % of local and imported soft drinks, respectively. Tartrazine (SIN102) was found in 50 % of local S and 33.3 % of imported S.

Figure 2 illustrates that the preservative sodium benzoate (SIN211) was incorporated in all local S and in 66.7 % and 61.7 % of the local SFD and SD, respectively. The antioxidant ascorbic acid (SIN300) was used in 42.5 % of local J and 32 % of imported ones.

In addition, citric acid (SIN330) was incorporated into all the inventoried products ranging from 44-100 %. In addition, several food additives were registered in only one class among the four studied. Among them, Allura Red AC (SIN129) was present in local (8.8 %) and imported (5.3 %) SD. Additionally, the sweetener SIN951 (Aspartame) was present in SFD at 83.3 % for local products and 33.3 % for imported ones. We proceeded to classify all food additives (all categories) found during our investigation within four classes (SD, J, S, and SFD) of local or imported origin depending on their

degree of toxicity. All other additives with percentages and categories are shown.

According to the results, we first noticed the presence of additives that are considered very toxic in all inventoried local drinks, whereas the imported J did not contain such a high degree of toxicity (Figure 3).

In addition, the highest percentage was found in local (60 %) and imported (50 %) S. Toxic food additives were present in all products at 33.3 % each of local and imported SFDs, 20 % of local S, and 25 % of imported J. Moderately toxic food additives were registered at 72.7 % of imported J, while in local products, 44.4 % was observed in SFD. However, the incorporation of doubtful and little/non-toxic food additives remained limited. Local S did not contain these two degrees, and imported S as well as local SFD contained only doubtful additives. The highest rate was recorded for these two degrees in SFD at 22.2 %. The most important percentage of additives with little or no toxicity was noted in local juices at 24.1 %. Conversely, moderately toxic additives represented the highest percentage (72.7 %) in imported J. For local drinks, the highest rate was

represented by toxic additives (60 %) in local S. In summary, we found that highly toxic and toxic food additives were used excessively in Algerian beverages, while in imported drinks, moderately toxic food was the most utilized. In our survey, there was no indication or mention of the presence of nanoparticles on the packaging of all drinks that we examined.

Population Survey

Among the children, we surveyed 51 % girls and 49 % boys. There were also two age groups: the first group (0-5 years old) represented 17.6 % of the subjects, and the parents answered the questionnaire; the second group (6-15 years old) formed the majority at 83.4 %. The results of the survey showed that 6.2 % of children between the ages of 1-5 years consumed J several times per day; 3.3 % of them consumed it once per day and 3.3 % 2-4 times/week. In addition, 4.5 % of these children consumed SD 2-4 times/week. The disorders observed in these children mostly consisted of gastrointestinal disorders (12 %) and food allergies (8 %), while the parents reported that 53 % had no disorders. For children aged 6-15 years old, we found that 18.4 % consumed SD once a day, although this value reached several times per day for 12.7 %. A rate of 15.2 % was determined for children between 6-15 years old for J, 14.3 % several times/day, and 18 % 2-4 times/week. The S was not consumed by 57.38 % of the children and less than once a week by 13.9 % of them. Concerning disorders recorded in this age group, hyperactivity was observed the most at 21.3 %, followed by gastrointestinal disorders (6.2 %), obesity (5.3 %), and food allergies (4.1 %).

For adults, respondents to our questionnaire were predominantly female at 60 %. We distributed the population according to consumption frequency of different classes of drinks, as shown in Table 1.

The age groups studied were the same for both sexes: 15-25 years old (71.9 % women and 28.1 % men), 26-45 years old (56.3 % women and 43.7 % men), and 46-75 years old (34.4 % women and 65.6 % men). The results shown in Table 1 indicate that among consumers aged 15-25 years (adolescent to young), men consumed mainly SD at least once or twice per day (5.2 %), while 10.9 % of women in the same age group did not consume them more than 2-3 times/week. We found that 6 % of men consumed J 2-3 times/week, while 9.6 % of women consumed it once a day and 8.3 % of them consumed it 4-6 times/week and 2-3 times/week. S was rarely consumed (12.1 % of men and 17.9 % of women) or never consumed (8.6 % of men and 22.4 % of women).

The population aged between 26-45 years preferred SD and J once a day (6.9 % and 12.9 %, respectively) and twice a day (7.8 % for both drinks) every day. This same age group rarely (12.9 %) or never (9.5 %) consumed S. We also found that the female population in this age group consumed J twice/day (7.1 %) and SD 2-3 times/week (7.7 %), while S were rarely (12.8 %) or never (20.5 %) consumed. The oldest population in our survey (46-75 years) was different from the other two groups; men consumed SD (11.2 %) and J (9.5 %) once a day every day, but women rarely consumed them (5.1 % for both drinks). This population rarely (12.9 % of men and 8.9 % of women) or never (11.2 % of men and 7.1 % of women) consumed "S". The two populations (15-25 and 26-45 years old) stated that they never consumed SFD, whereas 0.32 % of the population aged 46-75 years consumed it rarely. Gastrointestinal disorders were the most common health problem (28.7 %) suffered by adults, followed by obesity (12.9 %), food allergies (7.7 %), and diabetes (5.5 %).

Table 1: Distribution of the population according to the consumption frequency of drinking classes

<i>Drinks</i>	Ages (years)	Sex	Once / day (%)	2 times / day (%)	3 times / day (%)	4 times and more / day (%)	4-6 times / week (%)	2-3 times / week (%)	Once / week (%)	Rarely (%)	Never (%)
Soft Drinks (SD)	15-25	M ^a	5.17	5.17	1.72	1.72	1.72	2.59	0	3.45	1.72
		W ^b	4.49	4.49	3.21	5.13	5.13	10.9	3.00	8.97	1.92
	26-45	M ^a	6.90	7.76	2.59	1.72	2.59	3.45	0.86	11.21	2.59
		W ^b	3.21	4.49	0	2.56	1.28	7.69	1.92	12.82	5.13
	46-75	M ^a	11.21	3.45	0	0.86	0	2.59	0.86	12.93	1.72
		W ^b	2.56	2.00	1.28	1.28	0.64	3.21	1.28	5.13	0
Juices (J)	15-25	M ^a	3.45	1.72	2.59	0.86	4.31	6.03	0.86	5.17	0
		W ^b	9.62	5.77	2.00	0.64	8.33	8.33	1.28	10.26	1.00
	26-45	M ^a	12.93	7.76	3.45	0.86	0	0.86	7.76	6.90	0
		W ^b	5.13	7.05	0.64	3.85	0.64	10.9	1.92	8.33	0.64
	46-75	M ^a	9.48	2.59	0.86	1.72	2.59	3.45	0.86	7.76	4.31
		W ^b	2.56	2.00	0	1.28	1.28	3.21	1.28	5.13	0
Syrups (S)	15-25	M ^a	0.86	0	0	0.86	0	0	0.86	12.07	8.62
		W ^b	1.92	0	1.00	0	0	3.00	3.00	17.95	22.44
	26-45	M ^a	2.53	0	0	0	0	2.59	1.72	12.93	9.48
		W ^b	1.92	0.64	0	0	0.64	1.28	0.64	12.82	20.51
	46-75	M ^a	3.45	0	0.86	0.86	0.86	0.86	2.59	12.93	11.21
		W ^b	0.64	0	0	0	0	0	0	8.97	7.05

During our investigation, we noticed that some manufacturing/expiration dates and ingredient lists were difficult to read due to their small size. The results of our questionnaire showed that 23.7 % of subjects read the date of manufacture/expiration of the products and ingredient lists, while 41 % of them did not. We found that 30.8 % of them simply read the date of manufacture/expiration, and only 4.5 % read the ingredient lists. Concerning their knowledge of food additives incorporated in beverages, we noted that 61 % of the interviewers did not know that beverages contain food additives, and of the 39 % who knew, 58 % did not know that these additives could be toxic and dangerous for public health.

DISCUSSION

Concerning the categories of food additives used in the inventoried products, we found dyes, preservatives, acidifiers, texture agents, and sweeteners in the four

studied classes. SD, J, and SFD also contained antioxidants. Only SD and J contained coating agents and modified starches. According to the British Food Standard Agency, dyes can alter several functions, especially in children, by increasing their hyperactivity and impulsivity, thus promoting attention disorders (André, 2013). Since 2009, in the European regulation (2016), dyes SIN102, 104,110, 122, 124 and 129 have been labeled with the following statement: ‘it has adverse effects on activity and attention in children’. All of these dyes were used in the inventoried local drinks but present to a reduced extent in imported beverages. These dyes cause various disorders (AFSSA, 2009), in particular hyperactivity and skin reactions, potentially justifying the percentage of surveyed children with hyperactivity (21.31 %) and food allergies (8 % of those 0-5 years old and 4.10 % of those 6-15 years old). Diezi et al. (2011), found that these additives could intervene in the

nervous system, causing abnormalities in the neuronal receptors responsible for hyperactivity. Tartrazine (SIN 202) and cochineal red A (SIN124) were highly incorporated in local SD and S, where they were present in lower proportions in the same products of foreign origin. Gallen and Pla (2013) have indicated that these two dyes are used to add color to products or restore their original color if altered by processing, and they appear to cause allergies. However, according to AFSSA (2009), in susceptible individuals, they can aggravate existing neurodermatitis and cause dyspnea and asthma attacks. In the study by Gallen and Pla (2013), SIN102 was prohibited in some countries (Austria, Finland, Norway, and Tunisia), and its presence must be indicated on labels in other countries (Gallen and Pla, 2013). Becker et al.(2009) reported food additives that are capable or incapable of inducing abnormal proliferation of cells, leading to tumor formation.

In addition, the Association for Therapeutic Anticancer Research established in 2010-2011, according to data from the international scientific literature, a classification of the additives depending on their toxicity. Tartrazine (SIN102) and yellow quinolone (SIN104) were classified as possibly carcinogenic agents. We also found red Allura AC (SIN129), brilliant blue (SIN133), and bright green (SIN142), which may also be carcinogenic according to the ARTAC. All of these dyes were present in our inventoried products. Sunset yellow FCF (SIN110), Azorubin (SIN122), and red Cochineal A (SIN124) are probably or certainly carcinogenic (ARTAC 2012), which were detected mainly in local products in our survey. André (2013) declared that many dyes of natural or synthetic origin are found at the heart of controversies. In the study reported by Bourrier (2006) and Coumoul (2016), preservatives were used to maintain food freshness and to protect against the effects of microorganisms to increase lifespan.

Potassium sorbate (SIN202) was found at higher rates in imported SD and J compared with local ones. In her book, Marano (2016) indicated that potassium sorbate is one of the most harmless preservatives that can present certain allergenic traits, triggering hypersensitivity reactions such as urticaria. In large amounts, it can additionally cause damage to the cells that might lead to cancer. The Algerian consumer is in real danger because of the frequency of SD and J consumption of at least 1-2 times/day. Sodium benzoate (SIN211) was present in all local inventoried products (1.49-100 %) and only in imported SD (21.05 %) and SFD (33.33 %). Gouget (2015) described this preservative, known for its ability to block the development of certain yeasts and molds, as incorporated into certain sweet beverages to extend their shelf life. According to Gallen (2013), it is a hazardous and toxic agent that is carcinogenic and may cause allergy (Fontana-Tachon, 2013; Clémens 2015).

Gaffet (2011) also elucidated that the reactions of food additives are related to the dose, and at present, it is the simultaneous consumption of several additives that sometimes raises concern regarding what we call the synergistic or cocktail effect of additives. The adverse effects of combinations of a class of preservatives, including SIN211 with six dyes (SIN102, SIN104, SIN110, SIN122, SIN124 and SIN129), on children's behavior was demonstrated by a team of British researchers in 2007. These combinations are likely to cause attention deficit disorders in children with or without hyperactivity (McCann et al., 2007), which might explain the rate of children in our survey who were hyperactive due to the high amount of daily consumption of SD and J containing a wide range of dyes that can interact with the preservatives found in the inventoried products. Despite the danger of these combinations to the health of consumers, especially children, there is no indication

on the packaging of the inventoried products, local or imported. Citric acid (SIN330) is an acidifier used to control acidity, it was present in all local (66.67-100 %) and imported (44-66.67 %) inventoried drinks. However, in the AFSSA report (2009), it is known to cause dissolution of the dental flora and promote the absorption of metals such as lead or aluminum in the blood (AFSSA, 2009)). Moreover, according to Marano (2016), not only can citric acid affect brain activity leading to memory and learning disorders, but it also plays a role in neurodegenerative conditions such as Alzheimer's or Parkinson's disease (Marano, 2016). In the study by Roberts (2004), sweeteners are described as sweetening additives that endow a sweet taste to the product. Acesulfame potassium (SIN950), aspartame (SIN951), and sucralose (SIN955) were present in our inventoried beverages: SIN950 was present in imported SD and SFD (local and imported) and SIN955 in SD (local and imported) and imported SFDs. Aspartame was present in local (83.33 %) and imported (33.33 %) SFDs. In the official Journal of the Algerian Republic (JORA, 2012), the labeling of table-top sweeteners containing polyols and/or aspartame and/or the aspartame-acesulfame salt should bear the following warnings: (i) polyols: excessive intake may have laxative effects; (ii) aspartame/aspartame-acesulfame salt: contains a source of phenylalanine.

However, in all the local drinks inventoried, none of these mentioned agents were found. The ARTAC (2012) classified aspartame as a toxic additive. Gallen and Pla (2013) described it as the most dangerous additive belonging to the family of excitotoxins. In a publication by Roberts (2001), they are described as neurological excitatory amino acids with the ability to instantly destroy neurons in our brain by exciting them until they resolve (death of nerve cells) (Gouget, 2015). The ARTAC (2012) considered aspartame to be a slow-acting poison with

many side effects, such as the deregulation of weight and the formation of different forms of cancer. In our survey, only 20 SFD (10 local and 10 imported) were placed on the Algerian market, among a total of 304 inventoried drinks. The people who answered our questionnaire, despite anonymity, did not contribute information about their consumption of this class of drinks. However, concerning health problems, 5.33 % of children and 12.87 % of adults suffered from obesity, and 5.33 % of adults had diabetes. This result may be due to their consumption of SFD and SD, with a daily consumption frequency (Table 1). Gouget (2015) and Brunellière (2010) described a study that was carried out to examine the combined effect of aspartame (SIN951) and quinoline yellow (SIN104), on the one hand, and brilliant blue (SIN133) with sodium glutamate (SIN621), on the other hand, on the nerve cells of laboratory mice. The results showed that these four additives were potent inhibitors of nerve cell growth, but overall, combining these substances increased their toxicity tenfold on nerve cells. SIN133 + SIN621 resulted in fourfold toxicity and SIN104 + SIN951 in sevenfold toxicity. This study showed that the toxicity of the combined substances was not simply the result of the additional sum of the individual toxicities of the molecules, but a multiplication of toxicities (Brunellière, 2010). These four additives were present in a large number of food products, again raising concern about children with growing brain cells (Robert, 2004).

The results of our survey showed that the diet of Algerian consumers, both children and adults, was characterized by massive consumption of SD and J at a minimum of once per day every day, mainly by men. In addition, we found that S was less consumed regardless of gender. According to the results, an average of 47.89 % of children and 48.51 % of adults suffered from health problems, especially gastrointestinal disorders, obesity, food

allergies, hyperactivity, and diabetes. These health problems could have a direct link to the unhealthy diet of Algerian consumers, which is consistent with the opinions of other scientists such as Marano (2013) and Gaffet (2011), who said that these disorders are directly related to diet. As they shop, most subjects buy beverages without consulting the date of manufacture/expiration or the list of ingredients, which is often difficult to read due to the small font size on millions of packs of groceries placed on the Algerian market. Additionally, the packaging of several products among those listed lacks essential information. Moreover, a large number of consumers are not aware of the incorporation of food additives into beverages, nor are they informed about the toxicity; this could be justified by a lack of nutritional awareness. Regarding children, our questionnaire showed an abuse of SD and J consumption despite their young age. Thus, children could constitute the population most exposed to food additives essential for industrialists. Nevertheless, and as Gouget (2008) specified, the human body is not made to consume large quantities of these additives, and even less should be consumed by children.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

AUTHORS CONTRIBUTION

All authors participated to draft and critically review the manuscript.

REFERENCES

AFSSA French Food Safety Agency. (2009). In: *Nanotechnologies et nanoparticules dans l'alimentation humaine et animale*.
André M.L (2013). *Les additifs alimentaires: un danger méconnu*. Juvence, France, ISBN: 978-2-88911-405-4.

ANSES: National Health Security Agency Food, the Environment and Work. (2019)
<https://www.anses.fr/fr/content/evolution-de-l-utilisation-des-additifs-alimentaires-dans-les-produits-transformes>. Accessed on July 22, 2020.

APAB Association des Producteurs Algériens des Boissons (2019). <https://apab-algerie.org/?s=additifs+alimentaires>. Accessed on March 8, 2021.

ARTAC Association for Therapeutic Anti-Cancer Research. (2012). In: *Durablo: Développement Durable et Viabilité Economique*.

Becker L, Bendouma M, Bonnart A, Bousquière J, Donzeau A, Gervais C, Hiernaux M, Maison M, Mathieu R, Napoliano L, Obadia E, Palermo A, Thollet M (2009). *Les additifs alimentaires : le meilleur et le pire*. ENSAIA: National School of Agronomy and Food Industries, Nancy., pp. 3-23.

Ben Marzouq A (2017). In *Agriculture : additifs alimentaires*. l'EFSA propose de fixer une dose journalière admissible pour les glutamates. From : <https://www.agra.fr/agra-innovation/lefsa-propose-de-fixer-une-dose-journaliere-admissible-pour-les-glutamates>.

Bourrier T (2006). Intolerance and allergy to colorants and additives. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique.*, 46 (2): 68-79.

Brunellière Y (2010). *Décrypter les étiquettes alimentaires*. City éditions, Paris., pp 207.

Burniat W, Cole TJ, Lissau I, Poskitt E ME (2002). *Child and Adolescent Obesity: Causes and Consequences, Prevention and Management*. Cambridge University Press : Cambridge.,

- pp307-326.
- Clémens S (2015). Les additifs alimentaires: législation et problèmes liés à leur utilisation. Thèse de doctorat en pharmacie. Joseph Fourier University, Grenoble, France., 92.
- Comission CA (Codex Alimentarius) (2014). Guidelines for the simple evaluation of dietary exposure to food additives (CAC/GL 3-1989).
- Coumoul X (2016). Food contaminants and cancer risk. *Cahier de Nutrition et de Diététique.*, 51(2):104-110.
- DieziM, Buclin T, Diezi J (2011). Additifs alimentaires et troubles de l'attention / hyperactivité chez l'enfant. *Paediatrica.*, 22(5):12-15.
- Diogo J SG, Silva L SC, Pena A, Lino CM (2013). Risk assessment of additives through soft drinks and nectars consumption on Portuguese population: a 2010 survey. *Food and Chemical Toxicology.*, 62:548-553.
- Doepker C, Lieberman HR, Smith AP, Peck JD, El-Sohemy, Welsh BT (2016). Caffeine: Friend or Foe?. *Annu Rev Food SciTechno.*, 17 : 117-137.
- European Regulation (CE) n° 1333/2008. (2016). In: EUR-Lex : les additifs alimentaires.
- FAO/WHO: Food and Agriculture Organization of the United Nations World Health Organization (2020). In *Compendium of Food Additive Specifications Expert Committee on Food Additives (JECFA), 87th Meeting June 2019.*, pp110.
- Fontana-Tachon A (2013). In: *Additifs alimentaires* From: <https://docplayer.fr/34816974-Additifs-alimentaires.html>. Accessed on January 04, 2021.
- Gallen, C, Pla J (2013). Allergy and intolerance to food additives. *Revue française d'allergologie.*, 53: S9-S18.
- Gaffet, E (2011). Nanomaterials: A review of the definitions, applications, health effects. How to implement secure development. *C R Physique.*, 12: 648-658.
- Gouget C (2008). *Additifs alimentaires, danger: Le guide indispensable pour ne plus vous empoisonner.* Chariot d'or, Escalquens., pp102.
- Gouget C (2015). *Additifs alimentaires, danger.* 15Ed. Chariot d'or., pp164.
- Jen J JS, Chen J (2017). *Food Safety in China: Science, Technology, Management and Regulation.* Ed. Wiley., pp696.
- JORA: Official Journal of the Algerian Republic (2012). In: Algerian Trade ministry. From: <https://www.commerce.gov.dz/reglementation/decret-executif-n-deg-12-214>.
- Kregial D (2015). Health safety of soft drinks: contents, containers, and microorganisms. *BioMed Research International.*, 2015: 1-15.
- Linke B GO, Casagrande T AC, Cardoso L AC (2018). Food additives and their health effects: A review on preservative sodium benzoate. *African J Biotech.*, 17(10):306-310.
- Macioszek VK, Kononowicz AK (2004). The evaluation of genotoxicity of two commonly used food colors: Quinoline Yellow (E104) and Brilliant Black BN (E151). *Cell Mol Biol Lett.*, 9(1):107-122.
- Marano F (2016). *Faut-il avoir peur des nano?*. Buchet-Chastel, Paris., pp 128.
- Marano F, Guadagnini R (2013). Nanoparticles and alimentation : What risks for consumers ?. *Cahier de Nutrition et de Diététique.*, 48: 142-150.
- McCann D, Barrett A, Cooper A, Crumpler D, Dalen L, Grimshaw K, Kitchin E, Lok K, Porteous L, Prince E, Sonuga BE, Warner J, Stevenson J (2007). Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children

- in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *Lancet.*, 370 (9598) : 1560-1567.
- Meunier C (2011). Soft drinks: definition, composition and nutritional intakes contribution. *Cahiers de Nutrition et de Diététique.*, 46 (1-1) : H5-H12.
- Moll M, Moll N (1998). Additifs alimentaires et auxiliaires technologiques. Ed Dunod, Paris., pp218.
- Muhammad HF L, Dickinson KM (2019). Nutrients, Energy Values and Health Impact of Conventional Beverages. *Nutrients in Beverages.*, 12: 41-75.
- Roberts HJ (2001). Aspartame Disease: An Ignored Epidemic. Ed Sunshine Sentinel PrInc., pp1038.
- Roberts HJ (2004). Aspartame Disease. A Possible Cause for Concomitant Graves' Disease and Pulmonary hypertension. *Tex Heart Inst J.*, 31(1): 105.
- Rowland AS, Skipper BJ, Rabiner DL, Qeadan F, Campbell RA, Naftel AJ, Umbach DM (2018). Attention Deficit / Hyperactivity. Disorder (ADHD): Interaction between socioeconomic status and parental history of ADHD determines prevalence. *J Child Psychol Psychiatry.*, 59(3): 213–222.
- Silva M MN, Albuquerque TL, Pereira KS, Coelho M AZ (2019). Food additives used in non-alcoholic water-based beverages – a review. *J Nutrit Health & Food Engin.*, 9(3): 109-121.