



anses

# Évaluation des risques liés à la consommation de nitrates et nitrites

Avis révisé de l'Anses  
Rapport d'expertise collective

Juillet 2022



CONNAÎTRE, ÉVALUER, PROTÉGER



Le directeur général

Maisons-Alfort, le 06 juillet 2022

## AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

### relatif aux risques associés à la consommation de nitrites et de nitrates<sup>1</sup>

---

*L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.  
L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.  
Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.  
Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).  
Ses avis sont publiés sur son site internet.*

---

L'Anses a été saisie le 29 juin 2020 par la Direction générale de la santé (DGS), la Direction générale de l'alimentation (DGAL) et la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) pour la réalisation de l'expertise suivante : saisine relative aux risques associés à la consommation de nitrites et de nitrates.

## 1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

### 1.1. Contexte

Le contexte de cette expertise est présenté ci-après selon les termes de la saisine (en italique et entre guillemets).

*« La présence de nitrites dans l'organisme peut conduire à l'oxydation de l'hémoglobine réduisant la capacité des globules rouges à transporter l'oxygène. Elle peut également contribuer à la formation d'autres composés, tels que les nitrosamines, dont certains sont cancérigènes.*

*Il existe différentes sources d'exposition des consommateurs aux nitrites et notamment :*

---

<sup>1</sup> Cette version annule et remplace la version du 1er juillet 2022

i) La conversion de nitrates présents dans certaines denrées alimentaires, en nitrites.

Les nitrates se retrouvent dans l'eau notamment en raison de leur utilisation en production primaire. Ils sont naturellement présents dans certaines denrées alimentaires, en particulier dans les légumes-feuilles comme les épinards ou la laitue. Chez l'Homme, une partie des nitrates consommés peut être convertie en nitrites par les bactéries présentes dans la cavité buccale.

ii) La présence non intentionnelle de nitrites dans les denrées alimentaires.

Les nitrites peuvent notamment être présents dans les légumes mais à des teneurs généralement très inférieures aux nitrates.

iii) L'utilisation de nitrites et de nitrates en tant qu'additifs dans les denrées alimentaires.

Les nitrites de potassium et de sodium (E249, E250) et les nitrates de sodium et de potassium (E251, E252) sont couramment utilisés pour préserver la viande et d'autres produits périssables. Ils contribuent également à limiter la prolifération de microorganismes nuisibles, en particulier *Clostridium botulinum*, responsable du botulisme. Il s'agit d'additifs alimentaires autorisés dans l'Union européenne. A ce titre, ils ont fait l'objet de travaux scientifiques d'évaluation pour caractériser les risques liés à leur utilisation.

Actuellement la réglementation européenne<sup>2</sup> prévoit une teneur maximale d'incorporation de 150 mg/kg pour les produits de viande transformés, hors produits traditionnels. Pour les produits traditionnels dont la production est moindre en volume que les produits fabriqués par les industriels et qui contribuent donc moins à l'exposition des consommateurs, la réglementation prévoit une teneur de nitrites et nitrates résiduels pouvant aller jusqu'à 250 mg/kg. La teneur résiduelle varie selon différents facteurs liés au procédé de transformation (température de transformation, pH, présence d'acide ascorbique, etc.) et ne dépend pas uniquement de la teneur initialement incorporée. Les autorités danoises ont, pour leur part, souhaité maintenir un niveau d'emploi plus faible, à 60 mg/kg, qu'ils avaient fixé avant l'harmonisation européenne.

L'association du fer-héminique avec les nitrites ajoutés a notamment été envisagée comme une explication du risque accru observé de développement de cancers du côlon ou du rectum lié à la consommation de certains produits carnés (données CIRC-INCa 2018)<sup>3</sup>. Le fer-héminique contenu dans la viande favoriserait la conversion des nitrites en nitrosamines, substances classées cancérigène probable (groupe 2A).

Pour répondre à la demande des consommateurs, l'industrie a développé des solutions qu'elle présente comme alternatives à l'utilisation de sels nitrés (raccourcissement des DLC, bouillons de légumes, extraits de végétaux, etc.). En outre, des opérateurs s'engagent de manière plus globale à diminuer l'utilisation des additifs conformément aux objectifs définis par le programme national de l'alimentation et de la nutrition (PNAN).

---

<sup>2</sup> Règlement (CE) n°1333/2008 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 16 décembre 2008 sur les additifs alimentaires.

<sup>3</sup> Etude CIRC-INCa 2018 « Les cancers attribuables au mode de vie et à l'environnement en France métropolitaine ». Lyon : International Agency for Research on Cancer, 2018.

*Dans le cadre de la réévaluation des additifs, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) a rendu des avis en juin 2017<sup>4</sup> et conclu, sur la base des éléments de preuve disponibles, que les niveaux de sécurité existants pour les nitrites et les nitrates ajoutés en tant qu'additif à la viande et à d'autres aliments constituaient une protection adéquate pour les consommateurs.*

*Plus précisément :*

- *s'agissant des nitrates en tant qu'additif, et en ayant recours à des données dites réalistes (c'est-à-dire, les niveaux de concentration effectivement observés dans les aliments), les experts ont estimé que l'exposition des consommateurs aux nitrates utilisés comme additifs alimentaires était inférieure à 5% de l'exposition globale aux nitrates dans les aliments et ne dépassait pas la DJA ;*
- *s'agissant des nitrites en tant qu'additif, les experts ont estimé que l'exposition se situait dans des limites sûres pour tous les groupes de population, à l'exception d'un léger dépassement chez les enfants dont le régime alimentaire est riche en aliments contenant ces additifs.*

*De plus, le panel de l'EFSA soulignait, lorsque l'ensemble des sources d'expositions alimentaires (présence naturelle dans les aliments, contamination environnementale, utilisation en tant qu'additifs) étaient prises en compte :*

- *pour les nitrates, des dépassements de la DJA pour l'ensemble des groupes d'âges (hypothèse d'exposition moyenne à haute) ;*
- *pour les nitrites, des dépassements de la DJA pour l'ensemble des groupes d'âges sous l'hypothèse d'exposition haute, et pour des groupes d'âges spécifiques (nourrissons, jeunes enfants et enfants) sous l'hypothèse d'une exposition moyenne.*

*L'EFSA a également émis des recommandations pour pallier certaines incertitudes. »*

En parallèle des travaux d'expertise de l'EFSA<sup>3</sup>, des travaux avaient été engagés à l'Anses afin de caractériser les expositions aux nitrates par voie alimentaire (notamment légumes et eau destinée à la consommation humaine) propres à la France dans le cadre de la saisine 2015-SA-0029. Ces travaux résultent d'une saisine de l'Anses par l'association Eaux et rivières de Bretagne (le 15/01/2015), par la Coordination rurale (le 19/01/2015) puis par la Fédération Nationale des Syndicats d'Exploitants Agricoles (FNSEA, le 26/01/2015) sur les impacts sanitaires des nitrates présents dans l'alimentation et dans l'environnement. En effet, les habitudes alimentaires, de même que la présence de nitrates dans les aliments (légumes notamment) et l'eau, en France, peuvent différer sensiblement des données européennes utilisées par l'EFSA. Cela est particulièrement vrai pour l'eau de consommation humaine distribuée dont les concentrations des paramètres caractérisant sa qualité physico-chimique

---

<sup>4</sup> European Food Safety Authority (2017). Scientific Opinion on the re-evaluation of sodium nitrate (E 251) and potassium nitrate (E 252) as food additives. EFSA Journal 2017;15(6):4787, 123 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4787>

European Food Safety Authority (2017). Scientific Opinion on the re-evaluation of potassium nitrite (E 249) and sodium nitrite (E 250) as food additives. EFSA Journal 2017;15(6):4786, 157 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4786>

varient en fonction des ressources exploitées et des traitements mis en œuvre. Ces travaux avaient pour but d'apprécier, au plan national, la situation d'exposition de la population aux nitrates au regard des repères toxicologiques. Les résultats permettraient d'identifier les situations méritant attention, de façon à recommander si possible des mesures utiles, en particulier grâce à l'identification des aliments (y compris l'eau de boisson) les plus contributeurs à l'exposition aux nitrates en France. Ces travaux précédemment initiés sur les nitrates sont intégrés à la présente expertise relative aux expositions alimentaires aux nitrites et aux nitrates.

L'Agence signale également qu'elle travaille actuellement sur une saisine du ministère chargé de la santé sur la question plus spécifique des nitrates dans l'eau de boisson, pour les unités de distribution qui présentent des dépassements de la limite de qualité, en s'appuyant sur une partie des travaux présentés ci-après.

## 1.2. Objet de la saisine

Dans la continuité des travaux conduits par les différentes instances sanitaires, il est demandé à l'Anses dans le cadre de la présente expertise :

« 1) d'établir si possible, en prenant en compte les travaux de l'EFSA sur la préservation des produits carnés vis-à-vis du risque de contamination par *Clostridium botulinum*, les situations – y compris en cas d'usage de procédés présentés par l'industrie comme un moyen de remplacement des sels nitrés - dans lesquelles une diminution des taux de nitrites/nitrates présents dans les denrées est susceptible d'accroître de manière significative les risques liés à la prolifération de bactéries pathogènes dans certains aliments ;

2) de recenser les leviers d'actions permettant de diminuer l'exposition globale des consommateurs, en fonction de l'exposition propre à la France, aux nitrites et nitrates par ingestion quelle que soit leur origine, et donc in fine aux nitrosamines ;

3) d'évaluer si de nouvelles connaissances scientifiques, notamment en réponse aux recommandations de l'EFSA, sont susceptibles de lever les incertitudes sur les mécanismes de transformation des nitrates et nitrites dans l'organisme et dans les denrées alimentaires, ainsi que de justifier le réexamen des DJA/VTR déterminées par l'EFSA ;

4) d'évaluer si, depuis la publication du CIRC/INCa de 2018, de nouvelles connaissances scientifiques sont susceptibles de mieux caractériser le lien entre cancérogenèse chez l'Homme et apport de fer héminique associé aux nitrites via la consommation de produits carnés. Pour ce faire, l'Anses prendra l'attache de l'INCa, en tant que de besoin. »

## 2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

### 2.1. Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'expertise relève majoritairement du domaine de compétences du Comité d'experts spécialisé (CES) « Evaluation des risques physico-chimiques dans les aliments » (ERCA). L'Anses a confié l'instruction de cette saisine au groupe de travail « Risques associés à la consommation de Nitrites et de Nitrates » (GT NiNa), créé par décision du 20 novembre 2020 après un appel public à candidatures. Ce GT est rattaché au CES ERCA.

La saisine et les travaux d'expertise du groupe de travail NiNa ont été soumis régulièrement au CES ERCA (tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques) entre septembre 2020 et juin 2022. Les travaux ont également été présentés aux et validés par les experts du CES « Evaluation des risques biologiques dans les aliments » (Biorisk) pour ce qui concerne l'expertise se rapportant à la question 1. Les experts du CES « Eaux » et du CES « Valeurs Sanitaires de Référence » (VSR) ont également été consultés. Le rapport produit par le groupe de travail tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres des CES.

Ces travaux sont ainsi issus de collectifs d'experts aux compétences complémentaires.

Ils ont été adoptés par le CES « ERCA » réuni le 17 juin 2022.

### 2.2. Prévention des risques de conflits d'intérêts

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet <https://dpi.sante.gouv.fr/>.

### 2.3. Méthode d'expertise

#### 2.3.1. Groupe de réflexion en amont de la saisine

En amont de la création du GT, un groupe de 4 rapporteurs, issus des CES VSR et ERCA, nommés en vue d'un travail préparatoire, a procédé à une revue bibliographique ayant pour objectif de faire l'état des lieux des connaissances toxicologiques et épidémiologiques sur les nitrates et les nitrites.

Ce groupe de rapporteurs a noté la complexité des mécanismes impliqués dans la cancérogénèse et leurs interactions, la nécessité de bien en comprendre le fonctionnement afin d'en tenir compte dans l'expertise. Par ailleurs, ce groupe a mis en exergue l'implication possible de différents composés néoformés.

### 2.3.2. Méthode du travail du groupe de travail

Pour répondre aux questions de la saisine, le GT a identifié les axes de travail suivants :

1. évaluer l'impact de la réduction ou du retrait des additifs nitrités sur les risques microbiologiques liés à la présence de certains agents pathogènes dans les produits carnés et transformés (*Clostridium botulinum*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*) ;
2. collecter les données de concentrations en nitrates, nitrites et composés néoformés dans les aliments et l'eau ;
3. évaluer l'exposition aux nitrates et nitrites par les aliments et l'eau ;
4. recenser les composés nitrosés<sup>5</sup> formés dans les produits carnés traités par les nitrates et les nitrites ;
5. recenser les composés nitrosés formés dans l'organisme du consommateur en fonction de l'apport en nitrates/nitrites via les produits carnés, autres que les aliments et l'eau ;
6. inventorier les connaissances relatives à la toxicité des composés nitrosés ;
7. actualiser la revue des études épidémiologiques sur les liens entre cancérogénèse et exposition aux nitrates et aux nitrites via l'eau et les aliments ;
8. évaluer la pertinence des valeurs toxicologiques de référence utilisées par l'EFSA dans ses rapports de 2017 ;
9. caractériser le risque, pour la population française, lié à l'exposition alimentaire aux nitrates et aux nitrites ;
10. recommander des mesures de gestion des risques liés à la présence des nitrates et des nitrites naturellement présents ou ajoutés dans les aliments et de leurs composés néoformés.

Pour mettre en œuvre l'approche méthodologique, trois sous-groupes de travail ont été formés au sein du groupe de travail pour travailler sur les volets :

- Microbiologie ;
- Chimie/Expologie ;
- Toxicologie/Epidémiologie.

Des auditions ont également été conduites dans le cadre de cette expertise, auprès de représentants des filières de la viande et de la charcuterie (ADIV<sup>6</sup>, IFIP<sup>7</sup>, FICT<sup>8</sup>, ACTIA<sup>9</sup>),

---

<sup>5</sup> Différents termes sont utilisés dans la littérature pour désigner les composés issus de la conversion des nitrites. Dans un souci d'harmonisation et d'homogénéité entre les différentes parties du document, le GT a choisi d'utiliser le terme « composés nitrosés ».

<sup>6</sup> Association pour le développement de l'industrie de la viande

<sup>7</sup> Institut du porc

<sup>8</sup> Fédération française des industriels charcutiers, traiteurs et transformateurs de viandes

<sup>9</sup> Le réseau français des instituts techniques de l'agro-alimentaire

d'équipes de recherche de l'INRAE<sup>10</sup> (QuaPA<sup>11</sup>, Toxalim<sup>12</sup>), de l'Inserm (EREN<sup>13</sup>), et de l'INCa<sup>14</sup>.

Chaque étape du traitement de la saisine a fait l'objet de discussions au sein des Comités d'experts spécialisés concernés durant l'expertise dans le cadre d'une validation scientifique collective.

Le présent avis se fonde sur le rapport d'expertise collective relatif à l'évaluation des risques liés à la consommation de nitrates et de nitrites.

### 3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES ERCA ET DU GT NINA

La présentation des réponses aux questions de la saisine ne suit pas *stricto sensu* l'ordre des questions telles que posées dans le texte de saisine. Après présentation des substances d'intérêt, de leur origine et du cadre réglementaire, ce présent avis expose d'abord les éléments conclusifs liés à l'évaluation du risque microbiologique. Puis, sont exposées les conclusions relatives à l'évaluation des données épidémiologiques et toxicologiques disponibles, permettant de conduire à la caractérisation des risques liés aux nitrates et aux nitrites ingérés après estimation des expositions.

#### 3.1. Substances d'intérêt traitées dans le cadre de la saisine

De manière générale, la présente saisine traite de la problématique des ions nitrate et nitrite dans l'alimentation ainsi que des substances néoformées, potentiellement délétères pour la santé du consommateur.

**Nitrates-Nitrites et composés nitrosés** sont donc les balises d'une approche holistique et pragmatique qui repose sur des faits concrets et documentés à la lumière des données scientifiques les plus pertinentes actuellement disponibles.

Les considérations précédentes situent la problématique et son approche dans une perspective à la fois descriptive et dynamique des ions nitrate et nitrite, incluant leur origine, leur métabolisme et leur transformation, comme le montre le synoptique ci-dessous (Figure 1). L'occurrence des nitrates et des nitrites dans l'alimentation :

1. est liée à la contamination des ressources en eau par des activités anthropiques (utilisation d'engrais azotés, épandages de lisiers, rejets d'origine urbaine ou industrielle) ;
2. résulte d'une bioaccumulation dans les végétaux ;
3. résulte d'une utilisation intentionnelle (additifs nitrates et nitrites ajoutés en tant qu'agents de conservation aux denrées dont majoritairement les produits carnés).

---

<sup>10</sup> Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement

<sup>11</sup> Unité Qualité des Produits Animaux

<sup>12</sup> Unité TOXicologie ALIMentaire

<sup>13</sup> Inserm-Equipe de recherche en épidémiologie nutritionnelle

<sup>14</sup> Institut National du Cancer

Les questions traitées dans le présent avis imposent de considérer de manière dynamique et la plus intégrative possible toutes les voies de transformation des ions nitrate et nitrite en composés nitrosés néoformés et d'en considérer les effets sur la santé humaine. En parallèle, il s'agit également d'évaluer les effets d'une réduction de l'utilisation des nitrites sur le risque microbiologique associé aux produits carnés.

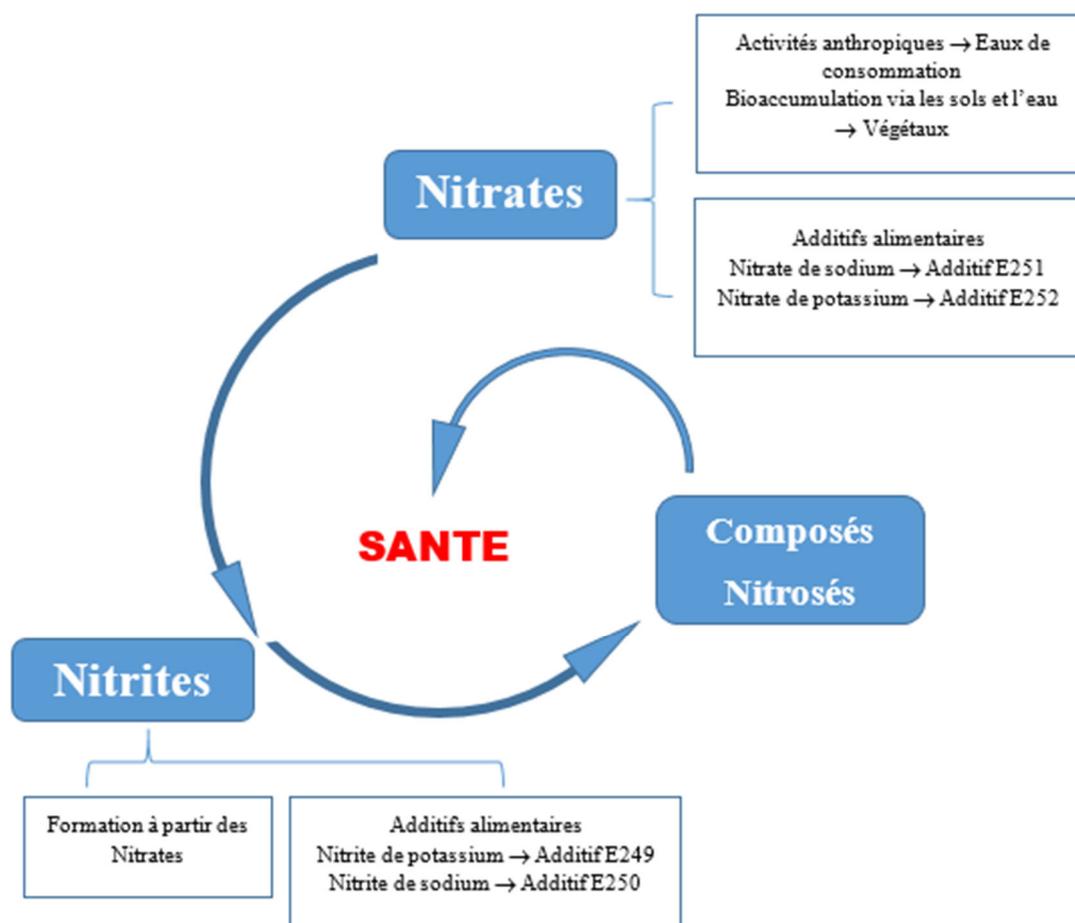


Figure 1. Les substances d'intérêt traitées dans le cadre de la saisine : vue synoptique

### 3.2. Origine et devenir des nitrates et des nitrites dans les eaux et les aliments

Les sources de nitrates dans les eaux brutes sont principalement liées à des processus naturels associés au cycle de l'azote (minéralisation de la matière organique), aux activités agricoles (par l'épandage de fertilisants minéraux, d'effluents d'élevage) et aux rejets d'origine urbaine ou industrielle. Certaines activités industrielles peuvent aussi conduire à un rejet d'eaux très riches en nitrates. Il s'agit notamment de l'industrie agroalimentaire, et plus particulièrement des abattoirs et des laiteries-fromageries, de l'industrie chimique et parachimique, et de l'industrie papetière.

Les nitrates dans les organes et produits végétaux ne doivent pas être considérés comme des contaminants mais comme des constituants naturels essentiels au développement du tissu végétal. Toutefois, des pratiques excessives de fertilisation azotée peuvent conduire à une

accumulation de ces ions. Dès lors, les teneurs en nitrates des légumes-feuilles, les salades notamment, peuvent être très élevées et dépasser les besoins physiologiques des plantes (Escobar-Gutiérrez et al., 2002)<sup>15</sup>.

Dans les produits carnés, la présence de nitrates et de nitrites résulte surtout de leur usage en tant qu'additifs pour leurs propriétés antioxydantes et antimicrobiennes et leur effet sur la couleur des produits.

Les nitrates et les nitrites participent à la production d'agents nitrosants (NO°, NO<sup>+</sup>) qui conduisent, dans les denrées, à la formation de composés nitrosés dont :

- les nitrosamines en particulier dans les produits cuits ou frits à haute température ;
- les nitrosothiols ;
- le nitrosylhème.

### 3.3. Règlementation

Les nitrates et les nitrites sont réglementés dans les eaux, dans les denrées d'origine végétale et dans les produits carnés.

Au niveau européen, les EDCH distribuées en réseau, les eaux de source et les eaux rendues potables par traitement sont réglementées par la Directive 2020/2184 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2020 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine<sup>16</sup>, tandis que les eaux minérales naturelles sont réglementées par les Directives 2003/40/CE<sup>17</sup> et 2009/54/CE<sup>18</sup>.

Au niveau français, la réglementation distingue d'une part les eaux minérales naturelles, et d'autre part les eaux destinées à la consommation humaine (EDCH) qui regroupent les eaux distribuées en réseau (eaux du robinet), les eaux rendues potables par traitement conditionnées et les eaux de sources conditionnées. Dans les EDCH, les limites de qualité pour les nitrates et pour les nitrites sont respectivement de 50 mg L<sup>-1</sup> et de 0,50 mg L<sup>-1</sup> (arrêté du 11 janvier 2007). En cas de dépassement de la limite de qualité, une dérogation temporaire d'utilisation de l'eau peut être accordée sous certaines conditions (Article R1321-26 à 36 du code de la santé publique). Pour les nitrates, « *une procédure de dérogation peut être envisagée pour des teneurs comprises entre 50 et 100 mg L<sup>-1</sup> dans l'eau distribuée. Cette*

---

<sup>15</sup> Escobar-Gutiérrez, A. J., I. G. Burns, A. Lee & R. N. Edmondson (2002). Screening lettuce cultivars for low nitrate content during summer and winter production, *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 77:2, 232-237. <http://dx.doi.org/10.1080/14620316.2002.11511485>

<sup>16</sup> Directive (UE) 2020/2184 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2020 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine

<sup>17</sup> Directive 2003/40/CE de la Commission du 16 mai 2003 fixant la liste, les limites de concentration et les mentions d'étiquetage pour les constituants des eaux minérales naturelles, ainsi que les conditions d'utilisation de l'air enrichi en ozone pour le traitement des eaux minérales naturelles et des eaux de source

<sup>18</sup> Directive 2009/54/CE du Parlement européen et du Conseil du 18 juin 2009 relative à l'exploitation et à la mise dans le commerce des eaux minérales naturelles

dérogation doit alors être impérativement accompagnée d'une recommandation de non-consommation pour les femmes enceintes et les nourrissons »<sup>19</sup>.

L'Union européenne a fixé des teneurs maximales pour les nitrates dans les denrées d'origine végétale<sup>20</sup> exprimées en mg d'ion nitrate par kg. En revanche, aucune teneur réglementaire n'est fixée en ce qui concerne les nitrites dans le règlement européen concernant les contaminants dans les denrées alimentaires. Actuellement, la réglementation prend en compte six catégories de produits végétaux, considérés comme les plus préoccupants au regard des apports en nitrates : les épinards frais ou non (en conserve, surgelés, congelés), les laitues, les laitues « iceberg », la roquette et les préparations à base de céréales et aliments pour nourrissons et enfants en bas âge.

En ce qui concerne l'utilisation des nitrates et des nitrites en tant qu'additifs alimentaires, parmi les 27 catégories fonctionnelles d'additifs alimentaires prévues actuellement dans le règlement (CE) n° 1333/2008<sup>21</sup> du parlement européen et du conseil (EU, 2008), les nitrites de potassium ou de sodium (respectivement E249 ou E250) et les nitrates de sodium ou de potassium (respectivement E251 ou E252) font partie de la catégorie des « conservateurs » (« substances qui prolongent la durée de conservation des denrées alimentaires en les protégeant des altérations dues aux micro-organismes et/ou qui les protègent contre la croissance de micro-organismes pathogènes »). En vertu de ce règlement européen, les nitrites sont autorisés dans certaines préparations de viande (au sens du règlement (CE) n° 853/2004<sup>22</sup>) et dans les produits à base de viande, traités thermiquement ou non, tandis que les nitrates sont autorisés dans certains poissons (harengs au vinaigre et sprats), dans certaines catégories de fromages et dans les produits à base de viande non traités thermiquement. Les nitrates et les nitrites sont également autorisés dans certains produits traditionnels saumurés par immersion ou traités en salaison sèche. Le règlement (CE) n° 1333/2008 prévoit des doses maximales, soit d'emploi, soit résiduelles, de sels de nitrate et de nitrite pour les différentes catégories de produits dans lesquels ils sont autorisés. En France, les valeurs réglementaires concernant l'utilisation de ces additifs dans les produits de viande transformée sont prises en compte dans le « Code des usages de la charcuterie, de la salaison et des conserves de viande » établi par les professionnels afin d'uniformiser les pratiques.

---

<sup>19</sup> Instruction n°DGS/EA4/2018/79 du 21/03/18 relative aux modalités de gestion des non-conformités dans les eaux destinées à la consommation humaine prévues par notes d'information pour l'année 2018.

<sup>20</sup> Règlement (CE) n°1881/2006 de la commission du 19 décembre 2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires

<sup>21</sup> Règlement (ce) n° 1333/2008 du parlement européen et du conseil du 16 décembre 2008 sur les additifs alimentaires

<sup>22</sup> Règlement (CE) n° 853/2004 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 29 avril 2004 fixant des règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale

### 3.4. Conclusions et recommandations relatives à l'évaluation des risques microbiologiques liés à la réduction des taux de nitrates/nitrites en tant qu'additifs dans certains aliments – Question 1 de la saisine

#### 3.4.1. Conclusions

En raison de leurs propriétés antimicrobiennes et technologiques, les nitrites et les nitrates (comme précurseurs des nitrites) sont très utilisés en tant qu'additifs alimentaires dans une grande diversité de denrées, principalement carnées (charcuteries et salaisons). L'activité inhibitrice et microbicide des nitrites s'exerce sur un nombre important de microorganismes, notamment des bactéries pathogènes. L'impact de la réduction de l'emploi des nitrates/nitrites dans les denrées alimentaires sur les microorganismes d'altération<sup>23</sup> n'a pas été évalué dans le cadre du présent avis.

La présente expertise a été conduite en identifiant, au sein des catégories de produits de charcuterie et de salaison et des dangers microbiologiques qui y sont associés, certains couples danger/aliment<sup>24</sup> considérés comme des exemples pertinents pour estimer le risque microbiologique pour le consommateur lié à une réduction ou une suppression des quantités de nitrites utilisés.

Cette évaluation s'appuie sur des modèles de microbiologie prévisionnelle pour trois couples danger/aliment et fournit des estimations de l'augmentation potentielle du risque en fonction des scénarios de réduction en nitrites testés. Cette expertise est par nature non-exhaustive : des évaluations quantitatives des risques supplémentaires incluant d'autres couples danger/aliment et la disponibilité de nouvelles connaissances pourraient permettre d'approfondir ces premiers résultats et d'apporter des recommandations, notamment pour les catégories de denrées alimentaires encore non explorées.

Sur la base de ces travaux, les experts du GT et des CES ERCA et BIORISK considèrent que la réduction ou la suppression de l'emploi des nitrites :

- dans les produits de charcuterie cuits prêts à être consommés, n'augmenterait pas le risque de listériose, sous réserve de la maîtrise effective de la température de conservation et d'une réduction de la durée de vie des produits concernés ;
- dans les saucissons secs, devrait nécessairement et prioritairement s'accompagner de mesures de réduction de la charge en salmonelles des porcs à l'élevage et de mesures d'hygiène à l'abattoir telles que recommandées dans l'avis de l'Anses de 2018<sup>25</sup>, sans préjuger de la mise en œuvre d'autres dispositions ;
- dans les jambons secs, est compatible avec la prévention du risque lié au botulisme, sous réserve d'assurer une maîtrise stricte du taux de sel et de la température au cours des étapes de salage, de repos et d'affinage du produit.

---

<sup>23</sup> Microorganisme (bactérie, levure, moisissure) qui au cours de la conservation de l'aliment va se développer ou modifier les propriétés organoleptiques de l'aliment.

<sup>24</sup> *Listeria monocytogenes*/jambon cuit - *Salmonella*/saucisson sec - *Clostridium botulinum*/jambon sec

<sup>25</sup> Anses. 2018. Avis et rapport relatif aux mesures de maîtrise des salmonelles en filière porcine : état des connaissances et appréciation quantitative des risques. <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2016SA0037Ra.pdf>.

Les experts du GT et des CES ERCA et BIORISK soulignent que plus la réduction de l'emploi des nitrites est importante, plus le risque microbiologique pour les consommateurs augmente. Par conséquent, les mesures de maîtrise complémentaires à mettre en place par les opérateurs devraient alors être drastiques et/ou plus nombreuses. La faisabilité de leur application et leur efficacité devront donc être évaluées.

L'efficacité des alternatives à l'emploi des nitrates/nitrites dans les produits carnés actuellement à l'étude ou appliquées n'a pas été évaluée dans le présent avis. Cependant, les experts du GT et des CES ERCA et BIORISK soulignent pour certaines d'entre elles le manque de données portant sur leur efficacité antimicrobienne et leur évaluation toxicologique.

### 3.4.2. Recommandations

Les experts du GT et des CES ERCA et BIORISK rappellent que l'application des bonnes pratiques d'hygiène et la mise en place d'un système HACCP sont des mesures efficaces et demeurent une obligation légale dans les unités de production.

Ils recommandent :

- que la suppression ou la réduction éventuelle de l'usage des nitrates/nitrites soit systématiquement associée à des mesures de maîtrise compensatrices autorisées, validées, surveillées, vérifiées et partagées par les professionnels et par les autorités ;
- que la validation de ces mesures compensatrices s'appuie sur des données prédites (par des outils de microbiologie prévisionnelle) et/ou sur des données expérimentales sur les matrices concernées ;
- que tout changement dans l'emploi des nitrates/nitrites soit accompagné d'une révision des guides de bonnes pratiques d'hygiène des filières concernées.

Les experts du GT et des CES ERCA et BIORISK recommandent par ailleurs :

- de mener des travaux permettant d'améliorer les connaissances sur la contamination par les salmonelles des matières premières et son évolution au cours du processus de fabrication des saucissons secs ;
- d'acquérir des données sur la prévalence de *Clostridium botulinum* dans les viandes fraîches et les concentrations associées ;
- d'établir un cadre d'évaluation des mesures alternatives à l'emploi des nitrates/nitrites comme antimicrobiens ;
- d'acquérir des données sur les mesures alternatives à l'emploi des nitrates/nitrites concernant leur efficacité antimicrobienne, leur toxicité éventuelle et leur impact sur les propriétés organoleptiques des denrées alimentaires concernées.

Les experts du GT et des CES ERCA et BIORISK notent que certains procédés qui se substituent à l'ajout direct de nitrites consistent à apporter des nitrates d'origine naturelle

(extraits végétaux, bouillons de légumes, etc.) qui, sous l'effet d'enzymes bactériennes, sont convertis en nitrites. Ce type d'alternatives ne conduit donc pas à diminuer l'exposition des consommateurs aux nitrites.

### **3.5. Conclusions et recommandations relatives à l'évaluation de nouvelles connaissances scientifiques susceptibles de mieux caractériser le lien entre cancérogénèse chez l'Homme et apport en nitrates/nitrites via la consommation alimentaire (eau et aliments) – Question 4 de la saisine**

Dans le cadre du traitement de la question 4 de la saisine, le groupe de travail a trouvé opportun d'élargir son analyse aux études traitant de l'exposition aux nitrates et aux nitrites via toutes les sources alimentaires (hydriques, végétales, animales dont les viandes transformées). La méthodologie du GT a consisté à recenser de manière systématique dans la littérature tous les articles parus postérieurement aux recherches présentées dans les avis de l'EFSA<sup>3</sup>, c'est-à-dire, fin décembre 2014.

#### **3.5.1. Approche méthodologique**

L'extraction a permis d'identifier 187 articles sur la période allant de janvier 2015 à mars 2022 avec les mots clés présentés en table 1 (recherche effectuée à partir de PubMed et Scopus).

**Tableau 1. Liste des mots clés utilisés lors de la revue approfondie de la littérature.**

Type	Mots clés
<i>Substances</i>	Nitrates, nitrites, NOCs, nitrosylated heme
<i>Réponse</i>	Neoplasm, cancer
<i>Population</i>	Cohort, case-control
<i>Période</i>	janvier 2015 à mars 2022
<i>Langue</i>	Anglais

Les articles pris en compte sont basés sur les résultats d'études de cohortes ou d'études cas-témoins. Concernant l'exposition, l'indicateur est varié, nitrates, nitrites, par source (alimentaire, eaux, aliments d'origine animale ou végétale) et composés nitrosés (par exemple : NDMA, NDEA, FeNO).

Certains articles n'ont pas été pris en compte pour les raisons suivantes :

- ils ne présentent pas de résultats issus d'une étude de cohorte et/ou cas-témoins ou ne présentent pas de résultats originaux (méta-analyse) ;
- le schéma de l'étude ne permet pas d'attribuer de risque relatif ou d'odd ratios (OR) aux substances d'intérêts ;
- les risques de biais n'ont pas ou insuffisamment été pris en compte dans le calcul des OR.

Lorsqu'une seule étude décrit une association entre une exposition et le développement de cancer ou lorsque plusieurs articles fournissent des résultats non convergents, il est considéré que le niveau de preuve est insuffisant pour conclure sur l'existence ou l'absence d'association.

### 3.5.2. Résultats

Les résultats de cette revue systématique de la littérature sont présentés sous forme d'un diagramme Prisma dans la figure 2.

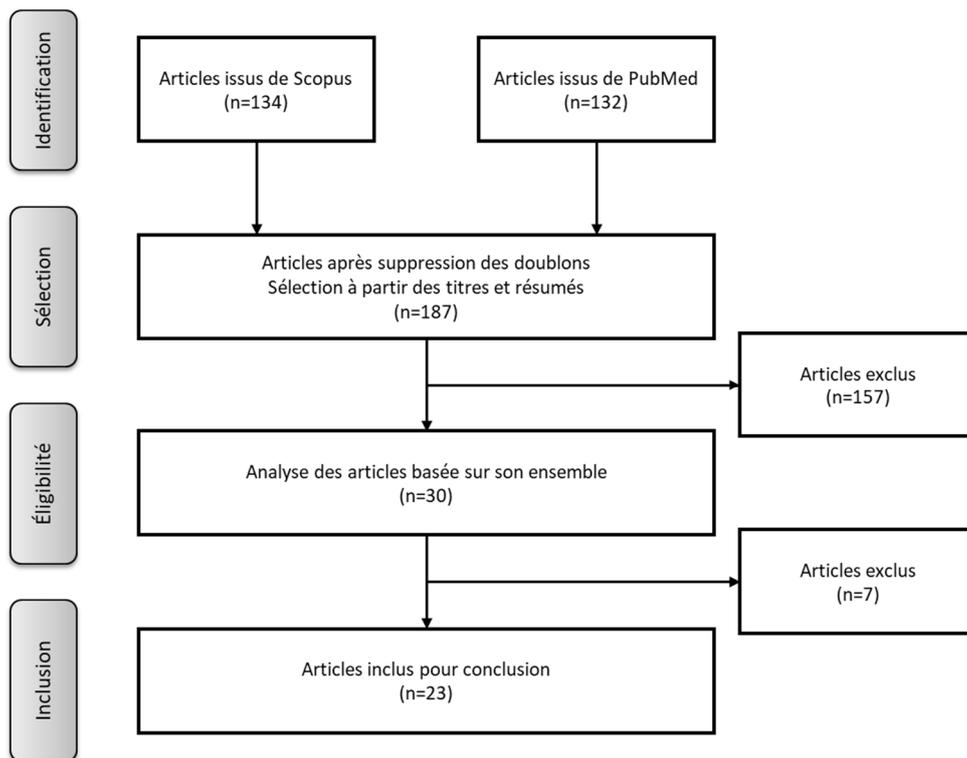


Figure 2. Diagramme Prisma relatif à la revue de la littérature sur les données épidémiologiques (janvier 2015 à mars 2022)

### 3.5.3. Conclusions

Le groupe de travail conclut à :

- l'existence d'une association positive entre l'exposition aux **nitrate**s via l'**eau de boisson** et le risque de cancer colorectal ;
- l'existence d'une association positive entre l'exposition aux **nitrate**s **et/ou** aux **nitrite**s via la **viande transformée** et le risque de cancer colorectal.

Pour la première fois, une étude récente rapporte l'impact d'une exposition périnatale aux nitrates sur le risque de cancers pédiatriques. S'agissant de la seule étude disponible, le GT n'est pas en mesure de conclure sur ce point.

Dans la mesure où un seul article était disponible, le GT considère qu'il n'a pas été possible, en l'état actuel des connaissances, de conclure à l'existence d'une association entre exposition aux nitrates et aux nitrites et le risque d'autres cancers que le cancer colorectal mais note :

- ✓ une association positive suspectée entre :
  - l'exposition aux **nitrates** présents dans l'**eau de boisson** et le risque de cancers des ovaires et des reins ;
  - l'exposition aux **nitrates** présents dans l'**alimentation** (eau de boisson exclue, naturels ou provenant de l'utilisation d'additifs) et le risque de cancer des ovaires ;
  - l'exposition aux **NDEA (N-Nitrosodiéthylamine) et NDMA (N-Nitrosodiméthylamine)** présents dans l'**alimentation** (eau de boisson exclue, naturels ou provenant de l'utilisation d'additifs) et le risque de cancer du pancréas ;
  - l'exposition aux **NDEA et NDMA** présents dans l'**alimentation d'origine végétale** et le risque de cancers du foie et des voies biliaires ;
  - l'exposition aux **nitrates** présents dans la **viande transformée** et le risque de cancers du sein, de la vessie et de mortalité par cancer ;
  - l'exposition aux **nitrites** présents dans la **viande transformée** et le risque de cancers du pancréas, de l'estomac, de l'œsophage, du sein, de la vessie, de la prostate et de mortalité par cancer.
  
- ✓ une association inverse suspectée entre l'exposition aux **nitrites** par la consommation d'**aliments d'origine végétale** et le risque de cancers du foie et des voies biliaires.

Dans la mesure où plusieurs articles fournissent des résultats non convergents, pour la population des femmes ménopausées, le groupe de travail ne peut conclure quant à l'association positive observée dans certaines études, entre les expositions aux nitrates dans l'eau de boisson et le risque de cancer de la vessie et du sein.

#### 3.5.4. Recommandations

Les associations positives constatées ci-dessus, par l'examen approfondi des études épidémiologiques, soulignent la nécessité de limiter l'exposition alimentaire :

- aux nitrates et aux nitrites via les viandes transformées ;
- aux nitrates via l'eau de boisson.

Concernant les cancers pédiatriques et les cancers chez la femme ménopausée, une attention particulière doit être portée à l'impact de l'exposition aux nitrates dans l'eau de boisson. Des recherches complémentaires doivent être menées.

Pour le cas particulier des cancers chez la femme ménopausée, des études complémentaires seraient nécessaires au regard du rôle potentiel des nitrates au titre de la perturbation endocrinienne.

### **3.6. Conclusions et recommandations relatives à la nécessité du réexamen des VTR de l'EFSA et aux mécanismes de transformation des nitrates/nitrites dans les denrées alimentaires et dans l'organisme– Question 3 de la saisine**

#### **3.6.1. Conclusions relatives au réexamen des VTR de l'Efsa**

Actuellement, l'EFSA<sup>3</sup> recommande d'utiliser des doses journalières admissibles (DJA) pour les nitrates de 3,7 mg d'ions nitrate (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>, et pour les nitrites de 0,07 mg d'ions nitrite (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>. Comme pour les nitrates, la DJA des nitrites se fonde sur l'augmentation du taux de méthémoglobine dans le sang suite à la l'exposition aux nitrites dans l'eau chez les rongeurs (NTP, 2001)<sup>26</sup>.

Les études de génotoxicité n'indiquent pas de potentiel génotoxique des nitrates et des nitrites. Les études de cancérogénèse du NTP sur les nitrites dans l'eau de boisson (2001) concluent à l'absence de preuve d'activité cancérogène chez les rats F344/N mâles et femelles et les souris B6C3F1 mâles. Les résultats sont équivoques chez les souris B6C3F1 femelles sur la base de la tendance positive des incidences de papillome spinocellulaire ou carcinome (combiné) du pré-estomac. Toutefois, le NTP souligne que les études ont été conduites dans des conditions ne favorisant pas la formation endogène de nitrosamines.

En l'absence d'autres données, le groupe de travail conclut que le doublement du niveau basal de la méthémoglobinémie peut être identifié comme un marqueur précoce d'exposition aux nitrates et aux nitrites (indicateur d'oxydation). A ce stade, la prise en compte de ce marqueur précoce d'exposition reste justifiée par le fait qu'il s'agit de l'effet observable à la plus faible dose.

#### **3.6.2. Conclusions relatives aux mécanismes de transformation des nitrates/nitrites dans les denrées alimentaires et dans l'organisme**

Le Centre International de recherche sur le Cancer (IARC, 2010)<sup>27</sup> a classé "probablement cancérogène pour l'Homme" (2A) les nitrates et les nitrites ingérés dans des conditions pouvant conduire à la formation de composés endogènes nitrosés.

L'état des connaissances a permis d'identifier la formation de composés nitrosés, en particulier lors de la consommation de produits carnés traités aux additifs nitrés. Après exposition orale, 75 % des nitrates alimentaires absorbés sont excrétés dans les urines, les 25 % restants sont sécrétés par les glandes salivaires dans la cavité buccale où une partie sera réduite en nitrites par les bactéries. Les nitrites sont instables et, en excès, peuvent générer la formation de composés nitrosés dans le tractus gastro-intestinal tels que :

- les S-nitrosothiols (RSNO) formés principalement dans l'estomac où ils agissent comme donneurs de monoxyde d'azote (NO) ;

<sup>26</sup> NTP (National Toxicology Program), 2001. NTP Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of Sodium Nitrite (CAS No. 7632-00-0) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (drinking water studies).

<sup>27</sup> IARC (International Agency for Research on Cancer), 2010. Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 94, v–vii, 1–412.

- les composés *N*-nitrosés, notamment les nitrosamines, qui peuvent être formées tout au long du tractus digestif soit à pH acide dans l'estomac, soit à pH neutre et en présence de fer dans l'intestin. Les composés *N*-nitrosés peuvent conduire à la formation d'adduits à l'ADN ;
- le fer nitrosylé (FeNO) ou nitrosylhème formé dans l'intestin et principalement dans le côlon.

La consommation de **viande rouge**, très riche en fer héminique, est directement et de manière dose-dépendante associée à la formation de composés nitrosés coliques et à la formation d'adduits à l'ADN spécifiques de ces composés. La consommation de **charcuterie (produits carnés traités)** augmente la formation de composés nitrosés par rapport à la consommation de viande rouge. La consommation de **charcuterie (produits carnés traités) diminuée en nitrites et additionnée de composés aux propriétés antioxydantes** permet une diminution significative de la formation des composés nitrosés comparativement à la charcuterie classique.

Parmi les composés nitrosés, les nitrosamines sont les mieux caractérisées. Les données toxicologiques soulignent la génotoxicité et cancérogénicité de ces composés dans les études expérimentales. La *N*-nitrosodiméthylamine (NDMA) est identifiée comme ayant le plus fort potentiel cancérogène. La benchmark dose (BMDL<sub>10</sub>), estimée à partir de données expérimentales chez le rat (SCCS, 2011)<sup>28</sup>, a été utilisée dans la suite des travaux pour estimer le niveau de préoccupation sanitaire en se basant sur la marge d'exposition (MOE) après estimation de la quantité de nitrosamines endogènes formée après ingestion de nitrates et de nitrites cumulés.

Les données relatives à l'identification et la quantification des composés nitrosés exogènes<sup>29</sup> et endogènes<sup>30</sup> sont lacunaires. De plus, les données sur le potentiel toxicologique de ces composés, et en particulier du fer héminique nitrosylé et des nitrosothiols, font défaut.

En conclusion, les nouvelles connaissances disponibles ne sont pas suffisantes pour modifier la DJA proposée par l'EFSA<sup>3</sup> et celle-ci est donc reprise pour l'évaluation des risques dans la présente expertise.

### 3.6.3. Recommandations

Le groupe de travail recommande :

- de mener une réflexion sur l'établissement de valeurs toxicologiques de référence tenant compte de la co-exposition aux nitrates, aux nitrites et aux composés nitrosés endogènes et exogènes, et considérant les matrices alimentaires ;

---

<sup>28</sup> SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), 2011. Opinion on nitrosamines and secondary amines in cosmetic products. European Commission. Health & Consumer Protection. SCCS/1458/11. ISSN 1831-4767

<sup>29</sup> Dans la matrice alimentaire

<sup>30</sup> Dans l'organisme du consommateur

- de mener des études expérimentales permettant d'identifier les effets critiques des nitrates et des nitrites dans des conditions reflétant la formation de composés nitrosés endogènes ;
- que soient conduites d'autres études expérimentales de toxicité chronique et de cancérogénèse sur modèle animal permettant d'évaluer le lien potentiel avec la consommation de produits carnés traités ou non à différentes doses de nitrates/nitrites ajoutés ;
- d'identifier les composés nitrosés exogènes et endogènes autres que les nitrosamines, de les quantifier et d'évaluer leur toxicité potentielle ;
- d'étudier les facteurs influençant la toxicité liée à la consommation de produits carnés traités (régime alimentaire, vieillissement, microbiote, pathologies, etc.).

### **3.7. Conclusions et recommandations relatives aux leviers d'action permettant de diminuer l'exposition aux nitrates et aux nitrites dans la population française – Question 2 de la saisine**

#### **3.7.1. Conclusions relatives à l'exposition aux nitrates et aux nitrites**

Sur la base des données disponibles sur les concentrations en nitrates et en nitrites dans l'eau<sup>31</sup> et les aliments<sup>32</sup> entre 2010 et 2019, des données de consommation alimentaire dans la population française (adultes et enfants de plus de 3 ans en France métropolitaine hors corse)<sup>33</sup> et des données relatives à la présence des additifs nitrés dans les produits alimentaires vendus sur le marché français<sup>34</sup>, les travaux d'expertise ont conduit aux considérations suivantes.

Concernant les nitrates :

- ils sont en grande partie apportés par les aliments (75-80 %) tandis que l'eau, essentiellement l'eau destinée à la consommation humaine distribuée en réseau, contribue pour 20 à 25 % à l'exposition des consommateurs ;
- leur utilisation en tant qu'additifs représente moins de 4 % de l'exposition totale, toutes sources confondues ;
- ils sont toujours présents dans les végétaux ; cependant, certains les accumulent à des concentrations parfois très élevées. Ainsi, les légumes sont les contributeurs majoritaires (entre 62 et 69 %) à l'exposition totale aux nitrates. Chez les adultes, les légumes feuilles sont les principaux contributeurs alors que chez les enfants, les légumineuses, légumes feuilles, fruits ainsi que graines germées et pousses contribuent de manière similaire à l'exposition aux nitrates ;

---

<sup>31</sup> Données SISE-EAUX (source : Direction générale de la santé)

<sup>32</sup> Données CONTAMINE (source : plans de surveillance et de contrôle / Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes)

<sup>33</sup> ANSES. 2017. Avis et rapport de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatifs à l'Étude individuelle nationale des consommations alimentaires 3 (INCA 3)

<sup>34</sup> INRA et ANSES. 2019. Bilan et utilisation des additifs dans les produits transformés.

- pour moins de 1,5 % des adultes et des enfants, l'exposition totale dépasse la DJA des nitrates.

Concernant les nitrites :

- ils sont majoritairement apportés par les aliments (99 %) et en particulier par les produits carnés traités tels que le jambon cuit, les saucisses et les saucissons cuits qui représentent de 41 à 63 % des apports selon les consommateurs et/ou les hypothèses de censure ;
- leur utilisation en tant qu'additifs représentent entre 45 et 65 % de l'exposition totale, toutes sources confondues ;
- l'exposition totale aux nitrites dépasse la DJA chez moins de 0,4 % des enfants. Aucun dépassement de la DJA n'est observé chez les adultes.

Le groupe de travail a évalué l'exposition cumulée aux nitrates et aux nitrites par l'approche de la marge d'exposition (MOE). La MOE pour le NDMA endogène (basée sur la BMDL<sub>10</sub>) chez les adultes est supérieure à 10 000 au 97,5<sup>ème</sup> percentile (17 656 [15 258-20 153]). Chez les enfants de plus de 3 ans, la médiane de la distribution des 97,5<sup>ème</sup> percentile est inférieure à 10 000 (8 636 [5 170-13 870]), sans que cela soit significatif. Par ailleurs, l'approche utilisée chez les enfants, qui est basée sur un taux de conversion des nitrates en nitrites de 9 %, est jugée plus protectrice que le modèle cinétique utilisé chez les adultes.

### 3.7.2. Leviers d'action étudiés

#### 3.7.2.1. Levier « eau »

L'eau de boisson contribue entre 20 et 25 % à l'exposition alimentaire totale aux **nitrates**. L'impact d'un respect systématique de la limite de qualité pour les nitrates dans les EDCH distribuées a été testé en considérant qu'aucun individu ne consommait une eau contenant plus de 50 mg L<sup>-1</sup> de nitrates (toutes les concentrations en nitrates dans les EDCH dépassant cette limite ont été fixées à 50 mg L<sup>-1</sup>).

Cette simulation a un impact minime sur l'exposition alimentaire totale de la population française. Ceci s'explique par le faible nombre d'UDI<sup>35</sup> pour lesquelles la concentration moyenne en nitrates est supérieure à 50 mg L<sup>-1</sup>.

Cependant, pour les populations desservies par des UDI distribuant une eau dont la concentration en nitrates est supérieure à cette limite de qualité, le niveau d'exposition via les EDCH distribuées est plus de trois fois supérieur à celui du reste de la population. Pour ces populations, l'EDCH distribuée contribue à plus de 47 % à l'exposition alimentaire totale<sup>36</sup>.

L'eau, ne contribuant que très peu à l'exposition aux **nitrites** (0,6 % en *lower bound*), ne constitue pas un levier d'action pour réduire l'exposition totale aux nitrites.

<sup>35</sup> Unité de distribution d'eau destinée à la consommation humaine

<sup>36</sup> Ce scénario fait l'objet d'un avis spécifique (Anses 2022).

### 3.7.2.2. Levier « additif »

Les produits de charcuterie contribuent entre 42 et 63 % à l'exposition totale en nitrites. Sans préjuger des conséquences sur le risque microbiologique, un scénario théorique « sans nitrites ajoutés » dans les deux produits carnés traités qui contribuent le plus à l'exposition, c'est-à-dire le « jambon cuit » et les « saucisses et saucissons cuits » a été évalué.

Ce scénario réduit de 18 à 29 % l'exposition totale aux nitrites des adultes et de 25 à 40 % celle des enfants. Dans ce scénario, quelle que soit la population, aucun dépassement de la DJA pour les nitrites n'est alors observé.

Une réduction de l'utilisation de ces additifs constitue un levier dont les modalités de mise en œuvre doivent être précisées dans le but de déterminer les teneurs résiduelles dans les produits finis en fonction des quantités ajoutées. Faute de données sur les relations entre quantité ajoutée et quantité résiduelle, il n'a pas été possible de réévaluer les doses d'emploi de ces additifs qui permettent de limiter à la fois le risque microbiologique et le risque chimique associés à la consommation du produit, en priorité pour les contributeurs majeurs.

### 3.7.2.3. Levier « recommandation de consommation »

Dans ce scénario, la recommandation de limiter la consommation de charcuterie à 150\_g par semaine, comme recommandé par Santé publique France sur la base des travaux de l'Anses<sup>37,38</sup>, a été appliquée aux deux contributeurs majeurs que sont le « jambon cuit » et les « saucisses et saucissons cuits ».

On observe alors une réduction de l'exposition totale aux nitrites de 4 à 7 % chez les adultes et les enfants. Cette réduction permet de ne plus observer de dépassement de la DJA chez les enfants.

### 3.7.3. Recommandations

Au regard des résultats observés et des simulations effectuées, le GT et le CES ERCA recommandent de **réduire les apports en nitrates et en nitrites via l'eau et les aliments notamment en limitant les quantités d'additifs nitrés ajoutés dans les produits carnés traités.**

De plus, le GT et le CES ERCA recommandent :

- de suivre les recommandations de l'Anses en termes de consommation de charcuterie qui la limitent à 150 g par semaine<sup>32</sup>. Effectivement, cette recommandation permet de ne pas dépasser la dose journalière admissible pour les nitrites à savoir  $0,07 \text{ mg (kg pc)}^{-1} \text{ j}^{-1}$  ;

<sup>37</sup> Anses, 2016. Actualisation des repères PNNS : révision des repères de consommations alimentaires. Avis de l'Anses et Rapport d'expertise collective.

<sup>38</sup> Santé Publique France, 2019. Recommandations relatives à l'alimentation, à l'activité physique et à la sédentarité pour les adultes. 62 p.

[https://www.santepubliquefrance.fr/content/download/186841/document\\_file/42466\\_spf00000619.pdf](https://www.santepubliquefrance.fr/content/download/186841/document_file/42466_spf00000619.pdf)

- de poursuivre les études permettant de mieux caractériser les relations entre quantités ajoutées<sup>39</sup> et concentrations résiduelles<sup>40</sup> de nitrates et de nitrites dans les produits carnés traités afin d'évaluer plus précisément l'impact de leur réduction sur l'exposition des consommateurs ;
- de réévaluer la pertinence de la valeur dérogatoire maximale utilisée en gestion (100 mg L<sup>-1</sup>) pour les nitrates dans les eaux destinées à la consommation humaine ;
- de diversifier la consommation de légumes dans le régime alimentaire total. En effet, diverses denrées d'origine végétale, comme les légumes feuilles, peuvent montrer des concentrations élevées en nitrates. Cependant, du fait de leur richesse en fibres, vitamines et minéraux, les légumes assurent une protection à l'encontre de diverses maladies (cancer, diabète, maladies cardiovasculaires, etc.). L'Anses recommande de consommer 5 portions de fruits et légumes par jour à raison de 80 à 100 g par portion (Anses, 2016)<sup>32</sup>.

### 3.8. Conclusions et recommandations générales relatives aux risques liés à la consommation de nitrates et de nitrites

Au regard de l'expertise réalisée dans la présente saisine, le GT et les CES ERCA et BioRisk recommandent de **réduire les apports en nitrates et en nitrites via l'eau et les aliments**.

Concernant les produits carnés traités, le groupe de travail conclut :

- que les nitrites sont majoritairement apportés par les produits carnés traités et que leur utilisation en tant qu'additifs représente entre 45 et 65% de l'exposition totale toutes sources confondues ;
- que la consommation de produits carnés traités participe à la formation de composés nitrosés endogènes préoccupants (nitrosamines, nitrosothiols, nitrosylhème) ;
- que l'exposition aux nitrates et/ou aux nitrites par la consommation de produits carnés traités est associée positivement avec un risque de cancer colorectal, après analyse des données épidémiologiques issues d'une revue approfondie de la littérature ;
- que le nombre d'études est insuffisant pour confirmer ou infirmer l'association entre l'exposition aux nitrates et/ou aux nitrites par la consommation de produits carnés traités et le risque de cancer du pancréas, de l'estomac, de l'œsophage, du sein, de la vessie, de la prostate et de mortalité par cancer.

Par ailleurs, l'analyse des risques microbiologiques découlant de la réduction ou de la suppression des nitrates et des nitrites dans la charcuterie permet aux experts du GT et des CES ERCA et BIORISK de souligner que plus la réduction de l'emploi des nitrites est importante, plus le risque microbiologique pour les consommateurs augmente. Par conséquent, les mesures de maîtrise complémentaires à mettre en place par les opérateurs

<sup>39</sup> Quantités maximum autorisées d'additif dans un produit alimentaire (règlement (CE) n° 1333/2008).

<sup>40</sup> Teneur en résidus à la fin du processus de production, exprimée en NaNO<sub>2</sub> ou en NaNO<sub>3</sub> d'après le règlement (CE) n° 1333/2008 (et ses amendements), annexe II partie E.

devraient alors être drastiques et/ou plus nombreuses. Ils notent également que certains procédés qui se substituent à l'ajout direct de nitrites consistent à apporter des nitrates d'origine naturelle (extraits végétaux, bouillons de légumes, etc.) qui, sous l'effet d'enzymes bactériennes, sont convertis en nitrites. Ce type d'alternatives ne conduit donc pas à diminuer l'exposition des consommateurs aux nitrites.

Au vu de ces conclusions, le groupe de travail et les CES recommandent :

- de **limiter l'exposition alimentaire aux nitrates et aux nitrites via les produits carnés traités** en limitant l'utilisation des additifs nitrés ajoutés et en respectant les recommandations de consommation ;
- que la **suppression ou la réduction éventuelle de l'usage des nitrates/nitrites** soit systématiquement associée à des **mesures de maîtrise compensatrices** autorisées, validées, surveillées, vérifiées, partagées par les professionnels et par les autorités ;
- la poursuite des études permettant d'établir la relation entre la dose résiduelle de nitrates/nitrites et la dose d'additifs nitrés ajoutés dans les produits carnés ;
- que les mesures alternatives à l'emploi des nitrates/nitrites soient étudiées pour leur efficacité antimicrobienne, leur toxicité éventuelle et leur impact sur les propriétés organoleptiques des denrées alimentaires concernées ;
- d'améliorer l'information des consommateurs concernant l'utilisation d'alternatives à l'emploi des nitrates, nitrites telles que les bouillons de légumes, qui peuvent également être source d'exposition à ces composés ;
- que de nouvelles études épidémiologiques soient conduites pour améliorer les connaissances sur l'association entre l'exposition aux nitrates et aux nitrites via la consommation des produits carnés traités et les risques de cancer.

Concernant l'eau, le groupe de travail et le CES ERCA concluent :

- que les nitrates apportés par l'eau de boisson contribuent pour 20 à 25 % de l'apport total en nitrates ;
- à la mise en évidence, par les études épidémiologiques, d'une association entre l'exposition aux nitrates via la consommation d'eau de boisson et le risque de cancer colorectal ;
- que le nombre d'études est insuffisant pour confirmer ou infirmer l'association entre l'exposition aux nitrates via la consommation d'eau de boisson et le risque de cancer des reins, de la vessie, du sein et des ovaires ainsi que les cancers pédiatriques.

Le groupe de travail et le CES ERCA recommandent :

- de réévaluer la pertinence de la valeur dérogatoire maximale utilisée en gestion (100 mg L<sup>-1</sup>) pour les nitrates dans les eaux destinées à la consommation humaine ;
- afin de limiter les expositions aux nitrates *via* les EDCH distribuées en réseau :
  - de renforcer les actions visant à préserver la qualité des ressources en eau d'une contamination par les nitrates ;

- de poursuivre et renforcer les actions visant à restaurer la qualité de l'eau pour les ressources contaminées ;
- si les actions précédentes ne sont pas suffisantes, d'adapter les filières de production d'EDCH (mélange d'eau, mise en place de traitements adaptés, voire abandon de captages durablement contaminés) afin de garantir en permanence le respect de la limite de qualité dans les eaux distribuées ;
- de mener des études complémentaires, afin d'étudier l'association entre les nitrates dans l'eau de boisson et le risque de cancer (autre que colorectal) révélée par les études épidémiologiques. Il s'agit des cancers pédiatriques suite à une exposition périnatale et des cancers des reins, des ovaires, du sein et de la vessie chez les femmes ménopausées ;
- d'évaluer, à la lumière des nouvelles données épidémiologiques et toxicologiques, la pertinence de la limite de qualité de 50 mg L<sup>-1</sup> de nitrates dans les eaux destinées à la consommation humaine.

Concernant les végétaux, le groupe de travail et le CES ERCA concluent que :

- les légumes sont les contributeurs majoritaires (entre 62 et 69 %) à l'exposition totale aux nitrates ;
- certains végétaux, en particulier les légumes feuilles, peuvent accumuler des quantités importantes de nitrates.

Le GT et le CES ERCA recommandent de diversifier la consommation de légumes dans le régime alimentaire total.

Le GT et le CES ERCA ont noté un manque de données dans plusieurs domaines, concernant notamment :

- les composés nitrosés exogènes (dans la matrice alimentaire) ou endogènes (dans l'organisme du consommateur) formés suite à l'ingestion de nitrates et de nitrites via la consommation de l'eau et de l'alimentation :
  - car les mécanismes de formation et la toxicité associée à ces substances sont encore mal connus et doivent être étudiés ;
  - des méthodes d'analyses permettant d'identifier et de quantifier ces composés dans des matrices alimentaires et biologiques doivent ainsi être développées.
- l'établissement de valeurs toxicologiques de référence tenant compte de la co-exposition aux nitrates, aux nitrites et aux composés nitrosés endogènes et exogènes, et considérant les matrices alimentaires. A cette fin, des études expérimentales permettant d'identifier les effets critiques des nitrates, des nitrites dans des conditions reflétant la formation de composés nitrosés devraient être menées.

#### 4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

La présence de nitrates et de nitrites dans les aliments concerne à la fois l'eau de boisson, les produits végétaux et les produits carnés.

S'agissant de l'eau de boisson, la contamination des ressources en eau brute concerne essentiellement les nitrates. Les sources de nitrates sont liées, d'une part à des processus naturels associés au cycle de l'azote, d'autre part aux activités anthropiques, notamment celles liées aux activités agricoles, comme l'épandage de fertilisants minéraux ou d'effluents d'élevage.

Les nitrates dans les produits végétaux sont des constituants naturels essentiels à leur développement. Une bioaccumulation de nitrates, conduisant à des teneurs dépassant leurs besoins physiologiques, peut survenir en cas d'apport excessif de fertilisants azotés.

Pour les produits carnés transformés, la présence de nitrates et de nitrites résulte surtout de leur usage en tant qu'additifs pour leurs propriétés antioxydantes et antimicrobiennes, ainsi que pour leur effet sur la couleur des produits.

Après ingestion, une partie des nitrates est transformée en nitrites. Composés instables, les nitrites, lorsqu'ils sont en excès, génèrent la formation de composés nitrosés dans le tube digestif, en particulier lors de la consommation de produits carnés. Ces composés nitrosés sont connus pour leur caractère génotoxique et cancérigène.

La pluralité des sources d'exposition aux nitrates et aux nitrites et de leurs mécanismes de transformation en composés nitrosés au sein de l'organisme a nécessité une approche globale pour évaluer leurs effets sur la santé humaine, ce qui constitue une avancée vers la prise en compte de l'exposome. Cette approche globale a tenu compte par ailleurs de l'activité antimicrobienne des nitrates et des nitrites pour la sécurité sanitaire de certains aliments.

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail **endosse les conclusions et recommandations du GT et des CES ERCA et BIORISK**, lesquelles permettent de répondre à chacune des questions formulées dans la saisine, **et préconise de réduire l'exposition de la population aux nitrates et nitrites par des mesures volontaristes en limitant l'exposition par voie alimentaire.**

Au titre de la question traitant des **risques induits par la diminution des taux de nitrates/nitrites utilisés comme additifs** pour la préparation de produits carnés, il est à noter que cette utilisation, en particulier pour la charcuterie et les salaisons, permet une maîtrise efficace de la croissance de bactéries pathogènes à l'origine de toxi-infections alimentaires. Elle est prévue à ce titre dans les guides de bonnes pratiques d'hygiène. L'effet des nitrites est spécifique à l'aliment et au pathogène considérés et trois couples aliment-pathogène les plus pertinents ont été évalués dans cette expertise : jambon cuit-listeria, saucisson sec-salmonelle, jambon sec-*C. botulinum*. Bien que la réduction du taux d'additif soit de nature à accroître de façon significative le risque microbiologique associé à la consommation de ces produits, **l'Agence considère qu'elle peut être envisagée moyennant la mise en œuvre de mesures compensatrices validées de maîtrise de ce risque.** Ces mesures seront à prendre principalement au niveau des étapes de fabrication mais pourraient aussi, pour la

catégorie des pièces et morceaux cuits, se traduire par une réduction des durées de vie des produits (dates limites de consommation raccourcies). L'Agence souligne également que, plus la réduction est importante, plus le risque pour le consommateur augmente, appelant des mesures de maîtrise complémentaires plus drastiques et/ou plus nombreuses, y compris au-delà de la chaîne de fabrication - distribution. Aussi, pour le recours à des solutions alternatives à l'utilisation des nitrates/nitrites, l'Anses précise qu'elles nécessitent une évaluation spécifique (par couple aliment / danger) reposant sur des données d'impact concernant leur efficacité et leur innocuité pour la santé humaine. Par ailleurs, sans avoir procédé à une analyse systématique ou examiné d'alternative industrielle précise, les experts ont noté que certains procédés substituent à l'ajout direct de nitrites des apports en nitrates d'origine naturelle qui, sous l'effet d'enzymes bactériennes sont convertis en nitrites. Ces procédés ne constituent pas une diminution réelle de l'exposition du consommateur aux nitrites.

Concernant **l'actualisation des connaissances en cancérologie**, depuis les travaux réalisés par l'EFSA (2017) et le CIRC (2018), **l'analyse des données bibliographiques confirme l'existence d'une association entre le risque de cancer colorectal et l'exposition aux nitrates et nitrites**, qu'ils soient ingérés par l'eau de consommation, ou par la viande transformée. L'analyse rejoint la classification du Centre international de la recherche sur le cancer (CIRC). L'Anses note l'existence dans la littérature de travaux caractérisant, depuis les travaux mentionnés supra, un lien avec d'autres types de cancers, leur unicité ne permettant pas de conclure sur la qualification de ce lien. L'agence soutient fortement les recommandations de poursuite de travaux dans ce domaine afin de confirmer ou d'infirmer ces relations, en particulier s'agissant des expositions périnatales.

S'agissant de la question relative à l'actualisation des connaissances en matière de toxicologie, et notamment celles relatives aux mécanismes de transformation des nitrates et des nitrites en composés nitrosés, les experts ont retenu, en l'état actuel des connaissances, que le marqueur d'exposition associé au doublement de la méthémoglobinémie peut être identifié à la fois comme un marqueur précoce et comme l'effet observable à la plus faible dose d'une exposition aux nitrates et nitrites. Aussi, les DJA (dose journalière admissible) proposées par l'EFSA ont été endossées pour l'évaluation de risques dans le cadre de cet avis. Pour autant, si elles sont jugées pertinentes à ce jour, ces DJA sont aujourd'hui définies séparément pour chacune de ces substances, alors que les mécanismes biochimiques en jeu constituent une suite de transformations vers des composés nitrosés. Aussi, **l'Agence recommande de mener une réflexion pour établir une valeur toxicologique de référence prenant en compte la co-exposition aux nitrates, aux nitrites et aux composés nitrosés**. Dans l'attente, l'expertise a utilisé une démarche permettant de cumuler les quantités de nitrosamines endogènes formées après exposition combinée aux nitrates et aux nitrites au moyen d'une approche dite de marge d'exposition (MOE),

Enfin, l'Anses souligne que l'EFSA travaille actuellement dans le cadre d'une saisine de la Commission Européenne à une évaluation spécifique de la toxicité des différents composés nitrosés, susceptible d'approfondir les connaissances sur les mécanismes de transformation voire de faire évoluer la DJA, et qui devrait aboutir avant la fin 2022.

La question de **l'évaluation des leviers permettant de diminuer l'exposition globale des consommateurs** a nécessité de mener, à partir des bases de données et études disponibles, la reconstitution de l'ensemble des expositions aux nitrates et aux nitrites contenus dans un grand nombre d'aliments et d'ingrédients consommés. Pour les nitrates, 65% de l'exposition alimentaire est associée à la consommation de produits végétaux, en particulier de légumes feuilles, 25% à l'eau de boisson et moins de 4% provient d'aliments en contenant en tant qu'additifs. Pour les nitrites, plus de la moitié de l'exposition des adultes et des enfants provient de la consommation de produits carnés transformés, du fait des additifs nitrités utilisés pour leur préparation.

Toutes sources d'exposition confondues, **l'Agence note que près de 99% de la population (adultes et enfants) ne dépasse pas les doses journalières admissibles (DJA)**. La mise en œuvre de l'approche MOE conduit, avec des hypothèses conservatrices, à une marge supérieure à 10 000 au percentile 97,5% pour les adultes et légèrement inférieure à 10 000 pour environ 3% des enfants.

A la lumière de ces résultats d'exposition et des effets connus de l'exposition aux nitrates et nitrites, **l'Agence considère que la limitation de l'ajout intentionnel de ces composés dans l'alimentation dans une approche ALARA<sup>41</sup> constitue un objectif de sécurité sanitaire afin de diminuer autant que possible l'exposition globale de la population, et souligne que des leviers existent pour la mettre en œuvre.**

L'efficacité des différents leviers d'action proposés a été évaluée par les comités d'experts, conduisant à des résultats variables selon les populations, notamment pour le levier eau de boisson. La maîtrise des dépassements de la limite de qualité pour les nitrates observés dans certaines unités de distribution des eaux de boisson doit permettre de limiter l'exposition des utilisateurs concernés. D'une manière générale, la poursuite de l'optimisation de certaines pratiques, comme celle des pratiques agricoles liées à l'épandage de fertilisants et d'effluents d'élevage dans le cadre de la directive européenne relative à la protection des eaux contre la pollution par les nitrates à partir de sources agricoles, peut permettre de réduire, d'une part les concentrations en nitrates dans les eaux brutes et les eaux de boisson, d'autre part les teneurs en nitrates dans les produits végétaux. Un avis de l'Anses sur ce sujet spécifique des dépassements de limites de qualité dans l'eau de boisson, en réponse à une saisine de la Direction générale de la santé, est en cours de finalisation.

En complément, l'Agence rappelle ses recommandations et celles de Santé Publique France, dans le cadre du Programme national nutrition santé, d'une alimentation équilibrée et diversifiée, avec au moins cinq portions de fruits et légumes par jour d'origines diversifiées, et limitée à 150 grammes de charcuteries par semaine, qui constituent un levier d'action efficace à titre individuel.

Dr Roger Genet

---

<sup>41</sup> Aussi bas que raisonnablement possible

## MOTS-CLÉS

Français : Nitrates, nitrites, eau, aliment, produits carnés traités, microbiologie prévisionnelle, scénarios, risque microbiologique, exposition alimentaire, caractérisation du risque, valeur toxicologique de référence.

*Anglais: Nitrates, nitrites, water, food, processed meat, predictive microbiology, scenarios, microbiological risk, dietary exposure, risk characterization, toxicological value.*

## CITATION SUGGÉRÉE

Anses. (2022). Avis et rapport de l'Anses relatifs à l'évaluation des risques liés à la consommation de nitrates et de nitrites. (Saisine 2020-SA-0106). Maisons-Alfort : Anses, 26 p.

**ANNEXE 1****Suivi des modifications apportées à la version du 1<sup>er</sup> juillet 2022**

Numéro de page	Modification effectuée
Page 8	Correction apportée à la figure 1 sur le nom des additifs alimentaires
Page 14	Correction apportée à la figure 2 sur le nombre d'articles inclus pour conclusion (n=23 au lieu de n=22)
Page 24	Modification éditoriale <i>C. botulinum</i> (à la place de <i>botulinum</i> )

---

# **Évaluation des risques liés à la consommation de nitrates et nitrites**

---

**Saisine « 2020-SA-0106 »**

## **RAPPORT d'expertise collective**

**Comité d'experts spécialisé  
« Evaluation des risques chimiques dans les aliments » (CES ERCA)**

**Groupe de travail « Evaluation des risques liés aux nitrates et nitrites »  
(GT NiNa)**

**Juin 2022**

**Citation suggérée**

---

Anses. (2022). Evaluation des risques liés à la consommation de nitrates et nitrites. (Saisine 2020-SA-0106). Maisons-Alfort : Anses, 275 p.

**Mots clés**

---

Français : Nitrates, nitrites, eau, aliment, produits carnés traités, microbiologie prévisionnelle, scénarios, risque microbiologique, exposition alimentaire, caractérisation du risque, valeur toxicologique de référence.

Anglais: Nitrates, nitrites, water, food, processed meat, predictive microbiology, scenarios, microbiological risk, dietary exposure, risk characterization, Health based guidance value.

## Présentation des intervenants

### Présentation des intervenants

**PRÉAMBULE** : Les experts membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

### GROUPE DE TRAVAIL NITRATES-NITRITES (NINA)

---

#### Présidente

Mme Marie-Louise SCIPPO - Professeur ordinaire à l'Université de Liège - Contaminants, résidus, risques chimiques, sécurité sanitaire, qualité nutritionnelle

#### Vice-président

M. Pierre-Marie BADOT – Professeur des universités – Université de Franche Comté - compétences en transfert de contaminants et écotoxicologie

#### Membres

M. Gilles BORNERT - Praticien, professeur agrégé – Service de santé des armées - Eau, réglementation, microbiologie, gestion de crises, NRBC, technologie

Mme Noémie DESRIAC – Maître de conférences – Université de Bretagne Occidentale - Physiologie des bactéries sporulées, microbiologie prévisionnelle

Mme Florence DUBOIS-BRISSONNET – Professeur – AgroParisTech - Evaluation de l'efficacité antimicrobienne, conservateurs, antimicrobiens, effet bactéricide, effet bactériostatique, efficacité antimicrobienne dans des matrices alimentaires riches en lipides

M. Abraham ESCOBAR GUTIERREZ – Directeur de recherche – INRAE - Agronomie, bioclimatologie, nutrition végétale, écophysiologie végétale, modélisation

Mme Emmanuelle KESSE-GUYOT (à partir de novembre 2021) – Directeur de recherche – INRAE, UMR Inserm U1153 / INRAE U1125 / Cnam / Université Sorbonne Paris Nord — Epidémiologie, nutrition et pathologies, nutrition et santé publique, durabilité alimentaire

Mme Laïla LAKHAL – Ingénieure de recherche – INRAE - Perturbateurs endocriniens-Valeur sanitaire de référence-Evaluation de risque-Toxicologie

M. Georges C. LOGNAY – Professeur Ordinaire émérite - Chimie analytique / Chimie des eaux / Sciences agro-alimentaires

Mme Océane MARTIN – Maître de conférences – Université de Bordeaux - Toxicologie, Microbiologie, Nutrition, Système digestif, Stress oxydatif, Cancer

M. Jérôme SANTOLINI (jusqu'en septembre 2021) – Chercheur – CEA - Biochimie, Chimie, *Reactive Nitrogen Species* (RNS) – Oxydes d'Azote, Fer-hémunique – Hémoprotéine, Stress Oxydant/Nitrosant, Inflammation

Mme Régine TALON -Directrice de recherche – INRAE - Sciences des aliments, microbiologie, produits fermentés, ferments, bactéries pathogènes

Mme Paule VASSEUR (à partir de novembre 2021) - Professeur émérite - Université de Lorraine, CNRS -Toxicologie

### RAPPORTEURS

---

M. Claude ATGIE –Professeur des universités - ENSCBP Bordeaux INP - Additifs, procédés technologiques alimentaires.

M. Mickaël BONI - Chef d'unité - Institut de recherche biomédicale des armées, vétérinaire en chef –. Microbiologie, hygiène, salubrité et qualité des aliments, zoonose et infectiologie, sûreté sanitaire des aliments, inspection en sécurité sanitaire des aliments

M. Frédéric CARLIN – Directeur de recherche -INRAE - Bactéries sporulées, microbiologie prévisionnelle, appréciation quantitative des risques

Mme Martine CLAUW – Professeur des universités - Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - compétences en toxicologie

Mme Catherine CHUBILLEAU – Centre hospitalier de Niort, Chef de service - Épidémiologie, évaluation des risques sanitaires, hygiène

M. Steven DURET – Chargé de recherche - INRAE - Modélisation, génie des procédés, transfert thermique, appréciation quantitative des risques

Mme Anne-Sophie FICHEUX – Ingénieure de recherche - Université de Bretagne Occidentale –Toxicologie alimentaire, modélisation, exposition probabiliste

M. Michel JOYEUX - Docteur en Médecine, Docteur en Sciences – Retraité, Médecine, toxicologie, évaluation quantitative du risque sanitaire, méthodes d'analyse des dangers, chimie de l'eau, produits et procédés de traitement des EDCH, santé environnement.

M. Frédéric LIRUSSI – Professeur des Universités– Praticien Hospitalier (PU-PH) - UFR des Sciences de Santé & CHRU de Besançon - Toxicologie Clinique, toxicologie analytique, immunité innée, reprotoxicité

M. Jean-François MASFARAUD – Maître de conférences des universités –Université de Lorraine - Transfert de contaminants et écotoxicologie

M. David MAKOWSKI – Directeur de recherche - INRAE - Modélisation, appréciation des risques

Mme Francesca MANCINI – Chargée de recherche – INSERM - Epidémiologie

M. Damien MOULY – Epidémiologiste, responsable d'unité, en charge de surveillance des épidémies d'origine hydrique – Santé Publique France – Risques infectieux, risques chimiques, PGSSE, épidémiologie, évaluation des risques sanitaires, expologie, surveillance, alerte

M. Eric MARCHIONI - Professeur des universités - Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie - Chimie analytique, risques chimiques

Mme Anne PLATEL – Maître de conférences des universités –Institut Pasteur de Lille - Toxicologie, toxicologie génétique, toxicologie réglementaire

Mme Marie-Pierre SAUVANT-ROCHAT– Professeur - Université Clermont-Auvergne / Faculté de Pharmacie, Clermont-Ferrand – Santé publique et environnement, épidémiologie, évaluation de risques sanitaires

M. Olivier SORG – Chef de groupe de recherche - Université de Genève - Docteur es science en biochimie, toxicologie expérimentale, dermatotoxicologie.

## COMITÉ D'EXPERTS SPÉCIALISÉ

### COMITÉS D'EXPERTS SPÉCIALISÉS

---

Les travaux, objets du présent avis ont été suivis et adoptés par les CES suivants :

- 1) CES « Evaluation des risques physico-chimiques liés aux aliments »

### Président

M. Bruno LE BIZEC - Professeur des universités - Oniris, École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes- Atlantique - Evaluation du risque

**Vice-présidents**

M. Fabrice NESSLANY (jusqu'en décembre 2021) – Directeur de laboratoire - Institut Pasteur de Lille - Toxicologie

Mme Karine TACK (jusqu'en août 2021) - Chercheuse - IRSN - Chimie analytique et environnementale, évaluation des risques sanitaires

M. David MAKOWSKI (depuis décembre 2021) – INRAE, Directeur de recherche – Statistiques, modélisation

**Membres**

M. Claude ATGIE – Professeur des universités – ENSCBP Bordeaux INP - Toxicologie

M. Pierre-Marie BADOT – Professeur des universités – Université de Franche Comté - Transfert de contaminants et écotoxicologie

Mme Marie-Yasmine DECHRAOUI BOTTEIN – Chercheuse - Agence Internationale de l'Energie Atomique (AIEA) - toxicologie environnementale et biotoxines marines

Mme Martine CLAUW - Professeur des universités - Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - Toxicologie

M. Nicolas DELCOURT – Maître de conférences des universités, pharmacien hospitalier – Faculté de Pharmacie (Université Toulouse3) et CHU Toulouse (Centre Antipoison et de Toxicovigilance - Biochimie et toxicologie clinique

Mme Christine DEMEILLIERS – Maître de conférences des universités – Université Grenoble-Alpes - Toxicologie

M. Erwan ENGEL – Directeur de recherche – INRAE - Chimie analytique

Mme Anne-Sophie FICHEUX (depuis décembre 2021) – Ingénieure de recherche – Université de Bretagne Occidentale - Toxicologie alimentaire, modélisation et exposition probabiliste

M. Jérôme GAY- QUEHEILLARD - Maître de conférences des universités - Université de Picardie Jules Verne - Impacts digestifs, métabolisme, immunité et impacts des pesticides sur la santé

M. Petru JITARU – Responsable de Laboratoire - Anses - Laboratoire de sécurité des aliments – Chimie analytique

Mme Sonia KHIER – Maître de conférences des universités – Université de Montpellier - Pharmacocinétique

Mme Emilie LANCE – Maître de conférences des universités – Université Reims Champagne Ardennes - Ecotoxicologie et cyanotoxines

Mme Caroline LANIER – Maître de conférences des universités – Evaluation Université de Lille, Faculté d'Ingénierie et Management de la Santé - des risques sanitaires liés à l'environnement et l'alimentation

M. Michel LAURENTIE (depuis décembre 2021) – Directeur de recherche – ANSES, Unité « Expérimentation, modélisation et analyse des données » - Pharmacocinétique, modélisation mathématique

Mme Raphaële LE GARREC (jusqu'en août 2021) - Maître de conférences des universités - Université de Bretagne occidentale - Toxicologie

M. Ludovic LE HEGARAT – Responsable de laboratoire - Anses-Laboratoire de Fougères – Toxicologie

M. Nicolas LOISEAU – Chargé de recherche – INRAE - Toxicologie

Mme Francesca MANCINI (depuis décembre 2021) – Professeur des universités - INSERM - Chargée de recherche – Epidémiologie

M. Eric MARCHIONI - Professeur des universités - Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie - Chimie analytique

M. Jean-François MASFARAUD – Maître de conférences des universités – Université de Lorraine - Transfert de contaminants et écotoxicologie

M. César MATTEI - Maître de conférences des universités - Université d'Angers - Toxicologie

Mme Anne PLATEL (depuis décembre 2021) - Maître de conférences des universités - Institut Pasteur de Lille– Toxicologie, toxicologie génétique et toxicologie réglementaire

M. Alain-Claude ROUDOT - Professeur des universités - Université de Bretagne Occidentale - Modélisation mathématique et expologie

M. Yann SIVRY – Maître de conférences des universités – Institut de Physique du Globe et Université Paris Diderot - Chimie analytique  
Mme Paule VASSEUR - Professeur émérite - Université de Lorraine, CNRS - Toxicologie

2) CES « Évaluation des risques biologiques dans les aliments » (BIORISK)

**Président**

M. Philippe FRAVALO – Professeur - Conservatoire National des arts et métiers - Hygiène et microbiologie des aliments, méthodes de détection, de quantification et de caractérisation des micro-organismes, écologie des écosystèmes microbiens en agro-alimentaire

**Membres**

Frédéric AUVRAY – Ingénieur de recherche - École nationale vétérinaire de Toulouse - Biologie moléculaire, génétique microbienne, bactériologie

M. Mickaël BONI (à partir de juin 2021) – Chef d'unité - Institut de recherche biomédicale des armées, vétérinaire en chef - Microbiologie, hygiène, salubrité et qualité des aliments, zoonose et infectiologie, sûreté sanitaire des aliments et de l'eau, inspection en sécurité sanitaire des aliments, traitement et contrôle sanitaire des EDCH

M. Frédéric CARLIN – Directeur de recherche – INRAE - Bactéries sporulées, produits végétaux, microbiologie prévisionnelle

Mme Catherine CHUBILLEAU – Chef de service - Centre hospitalier de Niort -. Épidémiologie, évaluation des risques sanitaires, hygiène

Mme Florence DUBOIS-BRISSONNET – Professeur de l'enseignement supérieur agricole – AgroParisTech - Microbiologie des aliments, biofilms, mécanismes d'adaptation des microorganismes au stress (conservateurs, désinfectants)

M. Steven DURET – Ingénieur de recherche – Irstea - Modélisation, génie des procédés, transfert thermique

M. Michel FÉDÉRIGHI – Professeur de l'enseignement supérieur agricole et vétérinaire - Oniris (École vétérinaire de Nantes) - Microbiologie, hygiène et qualité des aliments, analyse des dangers

Mme Michèle GOURMELON (à partir de juin 2021) – Chargée de recherche - IFREMER - Bactériologie, biologie moléculaire, écologie microbienne – *Campylobacter*, bactéries du continuum terre-mer et bactéries marines

M. Michel GAUTIER – Professeur de l'enseignement supérieur agricole - Agrocampus Ouest, - Microbiologie et hygiène des aliments, biologie moléculaire, bactériophages, aliments fermentés

M. Stéphane GUYOT – Maître de conférences - AgroSup Dijon - Procédés de destruction des bactéries pathogènes, mécanismes d'adaptation aux stress environnementaux

Mme Nathalie JOURDAN-DA SILVA – Chargée de projet scientifique - Santé publique France - Épidémiologie des maladies entériques et zoonoses

M. Renaud LAILLER – Chef de projet - Anses, Laboratoire de sécurité des aliments – Surveillance, *Salmonella*, hygiène des aliments

M. Bertrand LOMBARD (à partir de juin 2021) – Chef de projet - Anses, Direction de la Stratégie et des Programmes - Analyse microbiologique des aliments, activités de référence, normalisation

Mme Sandra MARTIN-LATIL – Chargée de projet scientifique - Anses, Laboratoire de sécurité des aliments - Virologie, méthodes de détection

Mme Florence MATHIEU – Professeur des universités - Toulouse-INP/ENSAT - Moisissures et mycotoxines, microbiologie des aliments

Mme Jeanne-Marie MEMBRÉ – Ingénieur de recherche – INRAE - Appréciation quantitative du risque microbiologique, statistiques appliquées

M. Éric OSWALD – Professeur des universités - CHU Toulouse - Infectiologie clinique, écologie microbienne, *E. coli*

M. Pascal PIVETEAU (à partir de juin 2021) – Professeur des universités – INRAE - Écologie microbienne, Écologie des bactéries pathogènes dans les agroenvironnements

Mme Sabine SCHORR-GALINDO – Professeur des universités - Université Montpellier, Mycologie, écologie microbienne, biotechnologie

Mme Nalini RAMA RAO – Directrice de recherche – INRAE - Microbiologie, interaction hôte/pathogène, microbiote intestinal

Mme Régine TALON – Directrice de recherche – INRAE - Microbiologie des aliments, écologie microbienne, aliments fermentés d'origine animale

Mme Muriel THOMAS – Directrice de recherche - INRAE - Microbiote intestinal et santé humaine, physiologie

Mme Isabelle VILLENA – Professeur des universités - CHU Reims, Parasitologie, infectiologie

## **PARTICIPATION ANSES**

---

La coordination scientifique du projet a été assurée par l'Unité d'Évaluation des Risques liés aux Aliments (UERALIM) sous la direction de : M. Moez Sanaa, chef d'unité jusqu'en septembre 2021, Mme Nathalie Arnich, cheffe d'unité par intérim d'octobre 2021 à mars 2022 puis Mme Hélène Gayon, cheffe d'unité depuis avril 2022.

### **Coordination et contribution scientifique**

Mme Nawel BEMRAH – Coordinatrice d'expertise scientifique - Unité évaluation des risques liés aux aliments

Mme Géraldine CARNE – Coordinatrice d'expertise scientifique - Unité d'évaluation des risques liés aux aliments

M. Keyvin DARNEY – Coordinateur d'expertise scientifique - Unité évaluation des risques liés aux aliments

### **Contribution scientifique**

Mme Frédérique AUDIAT-PERRIN - Coordinatrice d'expertise scientifique - Unité évaluation des risques liés aux aliments

Mme Morgane BACHELOT – Coordinatrice d'expertise scientifique - Unité évaluation des risques liés à l'eau

Mme Sandrine CARRILLO – Chargée de projets scientifiques et techniques - Unité méthodologie et études

M. Thomas CARTIER – Coordinateur d'expertise scientifique - Unité évaluation des risques liés à l'eau

Mme Aurore COUDRAY – Coordinatrice d'études et d'appuis scientifiques – Unité Observatoire des Aliments

Mme Juliana DE OLIVEIRA MOTA – Coordinatrice d'expertise scientifique - Unité évaluation des risques liés aux aliments

Mme Virginie DESVIGNES (jusqu'en septembre 2021) – Coordinatrice d'expertise scientifique - Unité évaluation des risques liés aux aliments

Mme Carine DUBUISSON – Adjointe au chef de l'Unité méthodologie et études

Mme Françoise GAUCHARD – Adjointe au chef de l'Unité Observatoire des Aliments

Mme Julie GAUVREAU-BEZIAT – Chef de l'Unité Observatoire des Aliments

M. Laurent GUILLIER – Coordinateur d'expertise scientifique - Unité évaluation des risques liés aux aliments

Mme Sonia POISSON – Chargée de projets scientifiques et techniques - Unité méthodologie et études

M. Jean-Cédric RENINGER – Coordinateur d'études et d'appuis scientifiques – Unité Observatoire des Aliments

M. Alexander WALSH – Chargé de projets scientifiques et techniques- Unité méthodologie et études

### **Secrétariat administratif**

Mme Angélique LAURENT

## **AUDITION DE PERSONNALITÉS EXTÉRIEURES**

---

### **Association pour le développement de l'industrie de la viande (ADIV)**

Mme Souad CHRISTEANS – Co-Responsable d'activité Technologies & Microbiologie

M. Laurent PICGIRARD – Co-Responsable d'activité Technologies & Microbiologie

### **Fédération française des industriels charcutiers, traiteurs et transformateurs de viandes (FICT)**

M. Thierry GREGORI – Directeur Scientifique et Technique

### **Institut du porc (IFIP)**

Mme Martine CARLIER – Experte en normes et réglementation des produits carnés - Etiquetage - Droit alimentaire

M. Bastien FREMEAUX – Expert en microbiologie alimentaire et environnementale

M. Etienne PIERRON – Expert en hygiène des procédés et sécurité des aliments en charcuteries (audits)

### **Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE)**

#### **Unité TOXicologie ALIMentaire (TOXALIM)**

M. Fabrice PIERRE – Responsable de l'équipe « Prévention & Promotion de la cancérogénèse par l'Alimentation »

#### **Unité Qualité des Produits Animaux (QUAPA)**

Mme Véronique SANTE-LOUTHELLIER – Directrice de l'unité QuaPA

### **Le réseau français des instituts techniques de l'agro-alimentaire (ACTIA)**

M. Didier MAJOU – Directeur Général de l'ACTIA

### **L'institut National Du Cancer (INCa)**

Mme Raphaëlle ANCELLIN -- Chargée des projets « nutrition » au département prévention des cancers

M. Jean-Baptiste MÉRIC – Directeur du pôle Santé publique et soins

Mme Sophie LE RICOUSSE - Responsable du département biologie, transfert et innovation.

### **Inserm-Equipe de recherche en épidémiologie nutritionnelle (EREN)- UMR 1153**

Mme Mathilde TOUVIER – Directrice de l'EREN

M. Bernard SROUR – Epidémiologiste à l'EREN et Coordinateur du réseau NACRE (réseau de recherche sur la nutrition, l'activité physique et le cancer)

## Table des matières

<b>Présentation des intervenants</b> .....	<b>3</b>
<b>Sigles et abréviations</b> .....	<b>15</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>17</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>20</b>
<b>1. Contexte, objet et modalités de réalisation de l'expertise</b> .....	<b>23</b>
<b>1.1. Contexte</b> .....	<b>23</b>
<b>1.2. Objet de la saisine</b> .....	<b>25</b>
<b>1.3. Organisation de l'expertise</b> .....	<b>25</b>
1.3.1. Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation.....	25
1.3.2. Prévention des risques de conflits d'intérêts .....	26
<b>2. Méthode d'expertise</b> .....	<b>26</b>
<b>2.1. Groupe de réflexion en amont de la saisine</b> .....	<b>26</b>
<b>2.2. Méthode du travail du GT</b> .....	<b>26</b>
<b>3. Substances d'intérêt traitées dans le cadre de la saisine</b> .....	<b>27</b>
<b>4. Réglementation</b> .....	<b>28</b>
<b>4.1. Réglementation applicable aux nitrates et aux nitrites dans les eaux de boisson consommées en France</b> .....	<b>28</b>
4.1.1. Réglementation française applicable aux EDCH distribuées en réseau.....	29
4.1.2. Réglementation française applicable aux eaux conditionnées .....	30
<b>4.2. Réglementation applicable aux nitrates dans les aliments d'origine végétale</b> .....	<b>31</b>
<b>4.3. Réglementation applicable aux nitrates et nitrites utilisés comme additifs alimentaires</b>	<b>32</b>
<b>5. Origine et devenir des nitrates et des nitrites dans les eaux et les aliments</b> .....	<b>35</b>
<b>5.1. Origine des nitrates, nitrites et nitrosamines dans les eaux de boisson</b> .....	<b>35</b>
5.1.1. Origine des nitrates et des nitrites dans les ressources en eau.....	35
<i>Concentrations en nitrates et nitrites dans les eaux continentales en France</i> .....	36
5.1.2. Origine et devenir des nitrates et des nitrites dans les filières de production et de distribution d'EDCH	37
5.1.2.1. Procédés utilisés pour réduire la concentration en nitrates et en nitrites dans les eaux	37
5.1.2.2. Nitrosamines dans l'eau .....	38
<b>5.2. Origine des nitrates, nitrites et espèces associées dans les denrées alimentaires</b> ....	<b>39</b>
5.2.1. Origine des nitrates, nitrites et espèces associées dans les denrées végétales .....	39
5.2.2. Origine et devenir des nitrates et nitrites dans les produits carnés.....	41
5.2.2.1. Inhibition de l'oxydation des lipides par le monoxyde d'azote (NO°) .....	42
5.2.2.2. Interaction des agents nitrosants avec les protéines : formation des composés nitrosés	43
<b>6. Dosage des ions nitrate et nitrite et des produits associés</b> .....	<b>47</b>

<b>6.1.</b>	<b>Ions nitrate et nitrite .....</b>	<b>47</b>
<b>6.2.</b>	<b>Composés néoformés .....</b>	<b>48</b>
<b>7.</b>	<b>Données disponibles utilisées dans le cadre de la saisine .....</b>	<b>51</b>
<b>7.1.</b>	<b>Données de consommation alimentaire : INCA3 .....</b>	<b>51</b>
<b>7.2.</b>	<b>Données relatives à la concentration des nitrates, nitrites et nitrosamines dans l'eau et des aliments .....</b>	<b>52</b>
7.2.1.	Base de données des concentrations des nitrates et nitrites dans les aliments (CONTAMINE) 52	
7.2.2.	Base de données des concentrations des nitrates et nitrites dans les eaux de boisson consommées en France (SISE-EAUX) .....	52
7.2.3.	Base de données des concentrations des nitrosamines dans l'eau du Laboratoire d'Hydrologie de Nancy (LHN).....	53
<b>7.3.</b>	<b>Données d'occurrence de l'observatoire de la qualité de l'alimentation (Oqali).....</b>	<b>53</b>
<b>8.</b>	<b>Evaluation de l'impact de la réduction ou du retrait des additifs nitrités sur les risques microbiologiques dans les aliments .....</b>	<b>55</b>
<b>8.1.</b>	<b>Utilisation et effet des nitrites et nitrates de sodium et potassium comme additifs alimentaires.....</b>	<b>55</b>
8.1.1.	Réglementation européenne et pratiques au niveau des industriels en France .....	55
8.1.3.	Effet antimicrobien des nitrites et nitrates utilisés comme additifs dans les principales catégories de produits alimentaires.....	60
<b>8.2.</b>	<b>Sélection des couples danger-aliment pour répondre à la question 1 .....</b>	<b>68</b>
8.2.1.	Quels dangers microbiologiques sont associés aux produits de charcuterie, de salaison et de conserves de viande ?.....	68
8.2.2.	Procédés de fabrication et rôle des nitrites .....	69
8.2.3.	Sélection des couples.....	71
<b>8.3.</b>	<b>Evaluation de l'impact de la réduction des nitrites pour les trois études de cas retenues</b> <b>72</b>	
8.3.1.	Evaluation de l'impact des nitrites sur le risque de listériose lié à la consommation de jambon cuit 73	
8.3.2.	Impact des nitrites sur la croissance de <i>L. monocytogenes</i> dans le jambon cuit au cours de sa conservation .....	76
8.3.3.	Evaluation de l'impact des nitrites sur le risque de salmonellose lié à la consommation de saucisson sec.....	82
8.3.4.	Evaluation de l'impact des nitrites sur la croissance de <i>Clostridium botulinum</i> dans le jambon sec 90	
8.3.5.	Conclusions relatives à la possibilité de réduire les nitrites d'après l'étude des trois couples 97	
<b>8.4.</b>	<b>Alternatives aux nitrites pour la conservation des produits carnés .....</b>	<b>99</b>
8.4.1.	Agents antimicrobiens naturels .....	99
8.4.2.	Technologies physiques innovantes en alternative aux nitrites .....	103
8.4.3.	Autres techniques .....	106
8.4.4.	Conclusion concernant les alternatives .....	107

<b>9.</b>	<b>Evaluation de l'exposition des consommateurs aux nitrates et aux nitrites .....</b>	<b>108</b>
<b>9.1.</b>	<b>Données de la littérature relative aux concentrations en nitrates et nitrites dans les denrées alimentaires.....</b>	<b>108</b>
9.1.1.	Contextualisation et description la recherche d'informations .....	108
9.1.2.	Résultats.....	108
<b>9.2.</b>	<b>Données de la littérature relatives à l'exposition aux nitrates et nitrites et contributeurs majoritaires à l'exposition .....</b>	<b>111</b>
9.2.1.	Exposition aux nitrites et nitrates : données de l'EFSA, 2017.....	111
9.2.2.	Exposition aux nitrites et nitrates en Europe : données de la littérature .....	114
9.2.3.	Exposition aux nitrites et nitrates hors Europe .....	118
<b>9.3.</b>	<b>Exploitation des bases de données relatives aux concentrations en nitrates et nitrites dans les eaux et les aliments consommés en France métropolitaine .....</b>	<b>125</b>
9.3.1.	Traitement des données censurées .....	125
9.3.2.	Concentrations en nitrates et nitrites dans les eaux de boisson consommées en France .	126
9.3.2.1.	Concentrations en nitrates et nitrites dans les eaux destinées à la consommation humaine distribuées en réseau en France métropolitaine hors Corse entre 2010 et 2019 ....	126
9.3.2.2.	Concentrations en nitrates et nitrites dans les eaux embouteillées consommées en France métropolitaine hors Corse, produites entre 2010 et 2019.....	132
9.3.3.	Concentrations en nitrates et nitrites dans les denrées alimentaires.....	133
9.3.3.1.	Méthodes analytiques et limites analytiques .....	133
9.3.3.2.	Concentrations en nitrates et nitrites dans les aliments .....	134
<b>9.4.</b>	<b>Evaluation de l'exposition aux nitrates et aux nitrites dans la population française</b>	<b>139</b>
9.4.1.	Démarche de calcul de l'exposition .....	139
9.4.1.1.	Démarche du calcul de l'exposition pour les aliments.....	140
9.4.1.2.	Démarche du calcul de l'exposition pour l'eau de distribution .....	140
9.4.1.3.	Démarche du calcul de l'exposition pour l'eau conditionnée .....	141
9.4.2.	Exposition globale de la population française aux nitrates et aux nitrites toutes sources confondues .....	141
9.4.2.1.	Exposition aux nitrates.....	141
9.4.2.2.	Exposition aux nitrites.....	142
9.4.3.	Identification des contributeurs majoritaires à l'exposition aux nitrates et aux nitrites .....	143
9.4.3.1.	Contributeurs majoritaires par catégorie alimentaire.....	143
9.4.3.2.	Contributeurs majoritaires en fonction de la source .....	145
<b>9.5.</b>	<b>Incertitudes .....</b>	<b>146</b>
<b>10.</b>	<b>Caractérisation des dangers liés aux nitrates, nitrites et composés nitrosés .....</b>	<b>148</b>
<b>10.1.</b>	<b>Toxicocinétique des nitrates et des nitrites dans l'organisme.....</b>	<b>148</b>
<b>10.2.</b>	<b>Mécanismes de formation endogène de composés nitrosés dans le tractus gastro-intestinal après ingestion de nitrates et de nitrites .....</b>	<b>149</b>
10.2.1.	Généralités concernant la formation endogène de composés nitrosés après ingestion de nitrates et de nitrites .....	149
10.2.2.	Formation endogène de composés nitrosés lors de la consommation de produits carnés	152
10.2.2.1.	Etudes <i>in vitro</i> en digesteurs artificiels de la formation endogène de composés nitrosés et du rôle des nitrites dans les réactions d'oxydation des lipides .....	152

10.2.2.1.1.....	Etudes in vitro en digesteurs artificiels du rôle des nitrites dans les réactions d'oxydation des lipides .....	154
10.2.2.2.	Etudes <i>in vivo</i> en modèle animal de la formation endogène de composés nitrosés	156
10.2.2.2.1.	Etudes en modèle animal de la formation endogène de composés nitrosés suite à la consommation d'un régime alimentaire standard.....	156
10.2.2.2.2.	Etudes en modèle animal de la formation endogène de composés nitrosés suite à la consommation de viande blanche ou rouge non additionnée de nitrites .....	156
10.2.2.2.3.	Etudes en modèle animal de la formation endogène de composés nitrosés suite à la consommation de produits carnés nitrés.....	157
10.2.2.2.4.....	Etudes en modèle animal de l'excrétion fécale de composés nitrosés suite à l'ingestion de composés nitrosés partiellement purifiés .....	157
10.2.2.2.5.....	Etudes en modèle animal de l'impact de l'ingestion de produits carnés sur l'oxydation des lipides.....	158
10.2.2.3.	Etudes sur volontaires sains de la formation endogène de composés nitrosés suite à l'ingestion de nitrates et de nitrites .....	159
10.2.2.3.1...	Etudes sur volontaires sains de la formation endogène de composés nitrosés suite à la consommation de viande rouge.....	159
10.2.2.3.2...	Etudes sur volontaires sains de la formation endogène de composés nitrosés suite à la consommation de produits carnés nitrés.....	160
<b>10.3.</b>	<b>Toxicité aiguë des nitrates, des nitrites et des nitrosamines .....</b>	<b>162</b>
<b>10.4.</b>	<b>Toxicité court-terme et sub-chronique des nitrates, des nitrites et des nitrosamines</b>	<b>163</b>
<b>10.5.</b>	<b>Génotoxicité des nitrates, des nitrites, des nitrosamines et du fer nitrosylé et des nitrosothiols .....</b>	<b>164</b>
<b>10.6.</b>	<b>Génotoxicité en lien avec l'ingestion de nitrates et de nitrites .....</b>	<b>166</b>
10.6.2.	Génotoxicité des eaux fécales et formation d'adduits à l'ADN suite à la consommation de produits carnés nitrés .....	167
10.6.3.	Génotoxicité en lien avec l'ingestion de nitrates via l'eau de boisson.....	168
<b>10.7.</b>	<b>Toxicité chronique et cancérogénèse des nitrates, des nitrites et des composés nitrosés</b>	<b>168</b>
<b>10.8.</b>	<b>Reprotoxicité et toxicité du développement.....</b>	<b>171</b>
<b>10.9.</b>	<b>Effet perturbateur endocrinien des nitrates .....</b>	<b>171</b>
<b>11.</b>	<b>Données épidémiologiques - Lien entre exposition alimentaire aux nitrates et aux nitrites et incidence de cancer chez l'Homme.....</b>	<b>174</b>
<b>11.1.</b>	<b>Méthodologie - Revue systématique de la littérature .....</b>	<b>174</b>
<b>11.2.</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>175</b>
11.2.1.	Toutes localisations .....	176
11.2.2.	Tube digestif toutes localisations.....	177
11.2.3.	Intestin, colon et rectum .....	178
11.2.4.	Pancréas.....	181
11.2.5.	Foie et voies biliaires .....	182
11.2.6.	Estomac.....	184
11.2.7.	Œsophage .....	185
11.2.8.	Sein.....	186

11.2.9.	Ovaires .....	188
11.2.10.	Vessie .....	188
11.2.11.	Rein .....	190
11.2.12.	Cancers pédiatriques (SNC, lymphomes, leucémies).....	190
11.2.13.	Cancer de la prostate .....	191
11.2.14.	Autres localisations sans article depuis 2017.....	191
11.2.15.	Mortalité par cancer .....	192
11.2.16.	Analyse des biais et incertitudes .....	193
<b>12.</b>	<b>Conclusions relatives à l'examen des VTR de l'EFSA d'après les données toxicologiques et épidémiologiques révisées.....</b>	<b>195</b>
<b>12.1.</b>	<b>Valeurs toxicologiques de références recommandées par l'EFSA.....</b>	<b>195</b>
12.1.1.	Les nitrites .....	195
12.1.2.	Les nitrates .....	196
<b>12.2.</b>	<b>Evaluation de nouvelles connaissances justifiant le besoin de réexaminer les valeurs toxicologiques de référence recommandées par l'EFSA.....</b>	<b>197</b>
12.2.1.	Conclusions relatives au réexamen des VTR de l'Efsa .....	197
12.2.2.	Conclusions relatives aux mécanismes de transformation des nitrates/nitrites dans les denrées alimentaires et dans l'organisme.....	198
<b>13.</b>	<b>Caractérisation du risque .....</b>	<b>199</b>
<b>13.1.</b>	<b>Caractérisation du risque lié à l'ingestion de nitrates/nitrites en termes de dépassement des VTR 199</b>	
<b>13.2.</b>	<b>Caractérisation du risque lié à l'ingestion de nitrates/nitrites en termes de marge d'exposition.....</b>	<b>199</b>
<b>14.</b>	<b>Evaluation des leviers de réduction de l'exposition des consommateurs français aux nitrates et nitrites (et aux nitrosamines) quelle que soit l'origine.....</b>	<b>202</b>
<b>14.1.</b>	<b>Levier « eau » .....</b>	<b>202</b>
<b>14.2.</b>	<b>Levier « additif » .....</b>	<b>203</b>
<b>14.3.</b>	<b>Levier « recommandation de consommation » .....</b>	<b>203</b>
<b>15.</b>	<b>Conclusions et recommandations générales du GT et des CES ERCA et Biorisk.....</b>	<b>203</b>
<b>15.1.</b>	<b>Conclusions et recommandations relatives à la question 1 :.....</b>	<b>203</b>
15.1.1.	Conclusions .....	203
15.1.2.	Recommandations.....	204
<b>15.2.</b>	<b>Conclusions et recommandations relatives à la question 2.....</b>	<b>205</b>
15.2.1.	Conclusions .....	205
15.2.2.	Recommandations.....	206
<b>15.3.</b>	<b>Conclusions et recommandations relatives à la question 3.....</b>	<b>207</b>
15.3.1.	Conclusions .....	207
15.3.1.1.	Conclusions relatives au réexamen des VTR de l'Efsa.....	207
15.3.1.2.	Conclusions relatives aux mécanismes de transformation des nitrates/nitrites dans les denrées alimentaires et dans l'organisme .....	208
15.3.2.	Recommandations.....	209

<b>15.4.</b>	<b>Conclusions et recommandations relatives à la question 4</b> .....	<b>209</b>
15.4.1.	Conclusions .....	209
15.4.2.	Recommandations .....	210
<b>15.5.</b>	<b>Conclusions et recommandations générales relatives aux risques liés à la consommation de nitrates et de nitrites</b> .....	<b>210</b>
<b>16.</b>	<b>Bibliographie</b> .....	<b>213</b>
<b>Annexe 1.</b>	<b>Lettre de saisine</b> .....	<b>237</b>
<b>Annexe 2.</b>	<b>Présentation des positions divergentes</b> .....	<b>240</b>
<b>Annexe 3.</b>	<b>Suivi des actualisations du rapport</b> .....	<b>241</b>
<b>Annexe 4.</b>	<b>Données Oqali sur l'usage des nitrates et des nitrites en tant qu'additif alimentaire</b> <b>242</b>	
<b>Annexe 5.</b>	<b>Justification du caractère pertinent ou potentiel des couples danger / produits de charcuterie et de salaison</b> .....	<b>244</b>
<b>Annexe 6.</b>	<b>La microbiologie prévisionnelle et la modélisation de l'effet des nitrites</b> .....	<b>252</b>
<b>Annexe 7.</b>	<b>Modèle secondaire utilisé pour estimer le taux de croissance bactérienne dans le jambon cuit en fonction de neuf facteurs environnementaux (dont les nitrites)</b> .....	<b>257</b>
<b>Annexe 8.</b>	<b>Description du modèle d'appréciation des risques utilisés pour apprécier le risque de listériose associé à la consommation de jambon cuit</b> .....	<b>258</b>
<b>Annexe 9.</b>	<b>Modèle AQR pour évaluer le risque de salmonellose dans le saucisson sec</b> .....	<b>260</b>
<b>Annexe 10.</b>	<b>Modèle logistique utilisé pour évaluer la probabilité de croissance de <i>C. botulinum</i> non-proteolytique dans le jambon sec au cours du procédé de fabrication</b> .....	<b>262</b>
<b>Annexe 11.</b>	<b>Caractéristiques des extractions SISE-EAUX et modalités de traitement des données utilisées pour décrire les concentrations en nitrites et en nitrates dans les eaux consommées en France</b> 263	
<b>Annexe 12.</b>	<b>Niveaux de concentration en nitrites et nitrates dans les eaux distribuées en France - Répartition régionale</b> .....	<b>266</b>
<b>Annexe 13.</b>	<b>Revue de la littérature relative aux niveaux de concentration des nitrates et des nitrites dans les aliments</b> .....	<b>269</b>
<b>Annexe 14.</b>	<b>Nettoyage de base de données contaminé</b> .....	<b>271</b>
<b>Annexe 15.</b>	<b>Données de cytotoxicité des nitrosothiols</b> .....	<b>272</b>
<b>Annexe 16.</b>	<b>Définition d'un perturbateur endocrinien</b> .....	<b>274</b>

## Sigles et abréviations

ACTIA	: Association pour le développement de l'industrie de la viande
ADME	: Absorption, distribution, métabolisme et élimination
ADIV	: Association pour le développement de l'industrie de la viande
AINS	: Anti-inflammatoire non-stéroïdien
ANSES	: Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
AQR	: Appréciation Quantitative des Risques
ARS	: Agence régionale de santé
ATNC	: Composés nitrosés totaux apparents
BMD	: <i>Benchmark dose</i>
BMDL	: <i>Lower benchmark dose</i>
CEP	: Champs Electriques Pulsés
CES	: Comité d'experts spécialisé
CIRC	: Centre International de Recherche sur le Cancer
CNRL	: Centre National de Référence des Listeria
CONTAMINE	: Base de données des concentrations des nitrates et nitrites dans les aliments
CRC	: Cancer colorectal
CREDOC	: Centre de recherche pour l'étude et l'observatoire des conditions de vie
CSHPF	: Conseil supérieur d'hygiène publique de France
CSP	: Code de la santé publique
DCE	: Directive cadre sur l'eau
DGAL	: Direction générale de l'alimentation
DGCCRF	: Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes
DLC	: Date limite de consommation
DGS	: Direction générale de la santé.
DJA	: Dose Journalière Admissible
EDCH	: Eau destinée à la consommation humaine
EFSA	: Autorité européenne de sécurité des aliments ( <i>European Food Safety Authority</i> )
E249	: Nitrite de potassium
E250	: Nitrite de sodium
E251	: Nitrate de sodium
E252	: Nitrate de potassium
EMN	: Eau minérale naturelle
ERA	: Espèces Réactives de l'Azote
FeNO	: Fer héminique nitrosylé
FFQ	: Questionnaire de fréquence alimentaire
FICT	: Fédération française des industriels charcutiers, traiteurs et transformateurs de viandes
GT	: Groupe de Travail
HACCP	: <i>Hazard Analysis by Critical Control Points</i>
HPH	: Hautes pressions hydrostatiques
HR	: <i>Hazard ratio</i>

IFIP	: Institut du porc
INCa	: Institut National du Cancer
INCA	: Enquête Individuelle et Nationale des Consommations Alimentaires
INRAE	: Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement
Inserm	: Institut national de la santé et de la recherche médicale
IMC	: Indice de Masse Corporelle
LB	: Lower bound (hypothèse basse)
LHN	: Laboratoire Hydrologie de Nancy
LOD	: Limite de détection
LOQ	: Limite de quantification
MES	: Matières en suspension
MOE	: Marge d'exposition
NDEA	: <i>N</i> -Nitrosodiéthylamine
NDMA	: <i>N</i> -nitrosodiméthylamine
NO	: Monoxyde d'azote ou oxyde nitrique
NOAEL	: Dose sans effet nocif observé ( <i>no observed adverse effect level</i> )
NOCs	: Composés nitrosés
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	: Ion nitrite
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	: Ion nitrate
NTP	: National Toxicology Program
O6-C-MeG	: O6-carboxyméthylguanine
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
OQALI	: Observatoire de la qualité des aliments
OR	: <i>Odd-ratios</i>
PABV	: Produits à base de viande
PNAM	: Programme National de l'Alimentation et de la nutrition
PSPC	: Plans de surveillance, plans de contrôle
ROS	: Espèces réactives de l'oxygène ( <i>reactive oxygen species</i> )
RSNO	: Composés S-nitrosothiols
SCF	: Scientific Committee for Food
SISE-EAUX	: Base de données des concentrations des nitrates et nitrites dans les eaux de boisson consommées en France
SNC	: Système Nerveux Central
SpF	: Santé publique France
UB	: Upper bound (hypothèse haute)
UDI	: Unité de distribution (d'EDCH)
TIAC	: Toxi-infections alimentaires collectives
TTP	: Usine de potabilisation
VTR	: Valeur Toxicologique de Référence
NO <sub>3</sub>	: Nitrate
NO <sub>2</sub>	: Nitrite
FeNO	: Fer hémique nitrosylé, nitrosylhème

## Liste des tableaux

Tableau 1. Fréquence des analyses du contrôle sanitaire pour les nitrites et les nitrates dans les EDCH distribuées (Arrêté du 11 janvier 2007 modifié).....	30
Tableau 2. Teneurs maximales en nitrates dans les denrées alimentaires d'origine végétale (Règlement (CE) n°1258/2011).....	32
Tableau 3. Doses maximales d'emploi ou résiduelles (marquées par un astérisque) en nitrites et nitrates (exprimées en $\text{NaNO}_2$ ou en $\text{NaNO}_3$ ) dans différentes catégories d'aliments selon la réglementation européenne (règlement (CE) n°1333/2008).....	33
Tableau 4. Regroupement des ingrédients recherchés selon la catégorie Nitrates ou Nitrites .....	54
Tableau 5. Doses maximales d'emploi ou résiduelles (marquées par un astérisque) en nitrites et nitrates (exprimées en $\text{NaNO}_2$ ou en $\text{NaNO}_3$ ) dans différentes catégories d'aliments selon la réglementation européenne (règlement (CE) n°1333/2008).....	56
Tableau 6 : réponse des bactéries à un stress oxydant/nitrosant généré par l'ajout de $\text{NO}_3/\text{NO}_2$ dans les produits carnés (d'après Majou et Christieans, 2018).....	63
Tableau 7. Association entre les dangers microbiologiques et les produits de charcuterie, de salaison et de conserves de viandes concernés par la présence de nitrites et/ou de nitrates en tant qu'additifs ..	69
Tableau 8. Impact sur le dépassement du critère de sécurité (100 UFC de <i>L. monocytogenes</i> par gramme de produit), sur l'estimation du risque de listériose et sur l'estimation du taux de produits gaspillés de différents scénarios de réduction de l'ajout de nitrites dans les jambons cuits. L'ensemble des paramètres utilisés pour le scénario de référence sont présentés dans l'annexe 6.2. ....	81
Tableau 9. Impact sur le risque de salmonellose de différents scénarios de réduction en nitrites.....	89
Tableau 10 Liste des incertitudes de modélisation en lien avec les travaux du GT NiNa .....	98
Tableau 11. Etudes sur les nitrates/nitrites dans les légumes et aliments (période 1999-2020) répertoriées par Flores and Toldrá (2021) .....	109
Tableau 12. Principales bases de données analytiques récemment publiées sur les nitrates/nitrites dans les aliments.....	110
Tableau 13. Concentrations en nitrites et nitrates relevées dans la littérature pour des matrices alimentaires spécifiques, selon les pays (*) Valeurs moyennes (en gras) +/- écart-type ou valeurs minimales et maximales en $\text{mg kg}^{-1}$ masse fraîche. ....	111
Tableau 14. Exposition de la population européenne aux nitrites (exprimés en ions nitrite) et aux nitrates (exprimés en ions nitrate), en $\text{mg}$ par $\text{kg}$ de poids corporel et par jour ( $\text{mg (kg pc)}^{-1} \text{j}^{-1}$ ), en tenant compte de toutes les sources d'exposition (EFSA, 2017a; EFSA, 2017b).....	113
Tableau 15. Exposition aux nitrites (exprimés en ions nitrite), en $\text{mg}$ par $\text{kg}$ de poids corporel et par jour ( $\text{mg (kg pc)}^{-1} \text{j}^{-1}$ ), en tenant compte de toutes les sources d'exposition, pour la population française (d'après les données de l'EFSA (2017a)) .....	113
Tableau 16. Exposition aux nitrites (exprimée en $\text{mg ion NO}_2^- (\text{kg pc)}^{-1} \text{j}^{-1}$ ) d'enfants de 4 ans en Suède, via la consommation de viande porc/boeuf ou de volaille en fonction de la durée de vie du produit et du facteur de conversion des nitrates en nitrites au niveau salivaire ; Moyenne (P95) (d'après Merino et al. (2016)) .....	116
Tableau 17. Exposition aux nitrites (exprimée en $\text{mg ion NO}_2^- (\text{kg pc)}^{-1} \text{j}^{-1}$ ) en Europe : moyenne(P95). Les valeurs qui dépassent la DJA de $0,07 \text{ mg (kg pc)}^{-1} \text{j}^{-1}$ sont indiquées en gras et soulignées. ....	120
Tableau 18.Exposition aux nitrates (exprimée en $\text{mg ion NO}_3^- (\text{kg pc)}^{-1} \text{j}^{-1}$ ) : moyenne (P95). Les valeurs qui dépassent la DJA de $3,7 \text{ mg (kg pc)}^{-1} \text{j}^{-1}$ sont indiquées en gras et soulignées.....	123
Tableau 19. Concentrations en ions nitrate et nitrite dans l'eau distribuée en France métropolitaine hors Corse entre 2010 et 2019.....	126

Tableau 20. Concentrations en nitrates dans les EDCH distribuées en réseau en fonction de l'année de prélèvement.....	127
Tableau 21. Concentrations en nitrates dans les EDCH distribuées en réseau en fonction de la nature de l'eau alimentant l'unité de distribution.....	128
Tableau 22. Niveau de concentration en nitrates (mgL <sup>-1</sup> ) en fonction de la nature des UDI sous les hypothèses LB et UB.....	129
Tableau 23. Concentration en ions nitrate dans les EDCH distribuée en réseau en fonction de la taille de l'UDI (seuil : 5000 pers).....	129
Tableau 24. Répartition des unités de distribution (UDI) en fonction de leur concentration moyenne en nitrates dans les eaux distribuées sur la période 2010-2019 (en LB) et populations associées.....	130
Tableau 25. Répartition des unités de distribution (UDI) en fonction de leur concentration moyenne en nitrates dans les eaux distribuées sur la période 2010-2019 (en UB) et populations associées.....	131
Tableau 26. Répartition des unités de distribution (UDI) en fonction de leur concentration moyenne en nitrites dans les eaux distribuées sur la période 2010-2019 (en LB) et populations associées.....	131
Tableau 27. Répartition des unités de distribution (UDI) en fonction de leur concentration moyenne en nitrites dans les eaux distribuées sur la période 2010-2019 (en UB) et populations associées.....	132
Tableau 28. Niveaux de concentration en nitrates et nitrites dans les eaux embouteillées consommées.....	132
Tableau 29. Limites analytiques (mg kg <sup>-1</sup> ) en fonction de la méthode et de la substance.....	134
Tableau 30. Concentrations en nitrates dans les aliments (mg kg <sup>-1</sup> ) selon les hypothèses basse (LB) et haute (UB).....	136
Tableau 31. Concentration en nitrites dans les aliments (mg kg <sup>-1</sup> ) selon les hypothèses LB et UB...	138
Tableau 32. Teneurs en nitrates et en nitrites dans diverses denrées alimentaires sélectionnées. Comparaison des valeurs de la base de données CONTAMINE avec celles d'autres bases de données internationales récentes. Les valeurs notées en gras correspondent aux moyennes auxquelles sont associés les écart-types ou, entre parenthèses, les valeurs minimales et valeurs maximales.....	139
Tableau 33. Exposition alimentaire aux nitrates (intervalle de probabilité à 95% entre crochets) chez les adultes de 18 ans et plus (N=2121) en mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (kg pc) <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> .....	141
Tableau 34. Exposition alimentaire (intervalle de probabilité à 95% entre crochets) aux nitrates chez les enfants de 3 à 17 ans (N=1839) en mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (kg pc) <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> .....	142
Tableau 35. Exposition alimentaire (intervalle de probabilité à 95% entre crochets) aux nitrites chez les adultes de 18 ans et plus (N=2121) en mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (kg pc) <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> .....	142
Tableau 36. Exposition alimentaire (intervalle de probabilité à 95% entre crochets) aux nitrites chez les enfants de 3 à 17 ans (N=1839) en mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (kg pc) <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> .....	143
Tableau 37. Exposition moyenne et contribution à l'exposition totale aux nitrates chez les adultes de 18 ans et plus et les enfants de 3 à 17 ans calculées par catégorie alimentaire.....	144
Tableau 38. Exposition moyenne et contribution à l'exposition totale aux nitrites chez les adultes de 18 ans et plus et les enfants de 3 à 17 ans calculées par catégorie alimentaire.....	145
Tableau 39. Contribution à l'exposition totale aux nitrates chez les adultes et les enfants de 3 à 17 ans calculées selon la source d'apport.....	145
Tableau 40. Contribution à l'exposition totale aux nitrites chez les adultes et les enfants de 3 à 17 ans calculée selon la source d'apport.....	146
Tableau 41. Sources d'incertitudes et leur estimation sur l'estimation de l'exposition aux nitrates et aux nitrites.....	146
Tableau 42. Classement des nitrosamines selon leur potentiel cancérigène sur la base d'études chez le rat (SCCS, 2011).....	170

Tableau 43. Liste des mots clés utilisés lors de la revue systématique de la littérature.....	175
Tableau 44. Taux de dépassement de la DJA (intervalle de probabilité à 95% entre crochets) en nitrates de 3,7 mg (kg pc) <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> .....	199
Tableau 45. Taux de dépassement de la DJA (intervalle de probabilité à 95% entre crochets) en nitrites de 0,07 mg (kg pc) <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> .....	199
Tableau 46. Marges d'exposition pour la population adulte après exposition aux nitrates et aux nitrites (médiane et intervalle de confiance à 95% entre crochets) .....	200
Tableau 47. Marges d'expositions pour la population enfants après exposition aux nitrates et aux nitrites (médiane et intervalle de confiance à 95% entre crochets) .....	201
Tableau 48. Liste des 31 secteurs actuellement suivis par l'Oqali et effectifs de produits associés (données les plus récentes disponibles par secteur). .....	243
Tableau 49. Caractéristiques des extractions SISE-EAUX demandées par l'Anses dans le cadre de la saisine relative aux risques liés à la consommation de nitrites et de nitrates. ....	263
Tableau 50. Caractéristiques des données de la base SISE-EAUX retenues dans le cadre de la saisine relative aux risques liés à la consommation de nitrites et de nitrates. ....	264
Tableau 51. Description des concentrations en nitrate et en nitrite en fonction des régions Unités : mg L <sup>-1</sup> .....	266
Tableau 52. Pourcentage de dépassement de la limite de qualité en nitrate (50 mg L <sup>-1</sup> ) en fonction de la région sous les hypothèses LB et UB.....	267
Tableau 53. Pourcentage d'UDI dans lesquelles des dépassements de la valeur guide en nitrate ont été observés en fonction de la région sous les hypothèses LB et UB considérant la moyenne des analyses par UDI .....	268
Tableau 54. Valeurs initiales de toxicité du SNAP et de trois glyco-SNAP.....	272

## Liste des figures

Figure 1. Les substances d'intérêt traitées dans le cadre de la saisine : vue synoptique .....	28
Figure 2. Schéma simplifié du cycle biogéochimique de l'azote .....	40
Figure 3. Les agents nitrosants (NO°, NO <sup>+</sup> ) formés à partir des nitrites ajoutés lors de la fabrication de produits carnés conduisent à la formation de composés nitrosés (Skibsted, 2011). .....	42
Figure 4. Principe général de la réaction de Griess (D'après Bonifacie et al. 2021) .....	48
Figure 5. Principes réactionnels liés à la méthode de spectroscopie différentielle en vue du dosage des nitrites, des nitrates, des nitrosamines et des nitrosothiols dans les produits alimentaires. (D'après Bonifacie et al. (2021b)) .....	49
Figure 6. Mécanismes réactionnels impliqués dans la détection des produits nitrosés et permettant une quantification par chimioluminescence. (Source : <a href="https://www.chromatographyonline.com/view/gas-chromatography-detection-nitrosamines-food-and-beverages">https://www.chromatographyonline.com/view/gas-chromatography-detection-nitrosamines-food-and-beverages</a> - Consultée le 6 juin 2022.) .....	50
Figure 7. Volume de vente annuel des différentes catégories de produits de charcuterie, de salaison et des conserves de viandes (d'après (FranceAgriMer 2019)) et proportion de produits concernés par les nitrites ou nitrates en tant qu'additifs alimentaires (d'après (INRA et ANSES 2019)) (en rouge produits pour lesquels la proportion de produits concernés par l'usage des nitrites/nitrates est inconnue).....	59
Figure 8. Schéma simplifié du réseau des réactions intracellulaires d'une culture de E. coli en présence de monoxyde d'azote. D'après (Robinson and Brynildsen, 2013). .....	63
Figure 9. Etapes unitaires des procédés de fabrication des charcuteries, salaisons et conserves de viande. ....	71
Figure 10. Démarche d'appréciation quantitative d'évaluation des risques retenue pour évaluer l'effet des nitrites pour les couples L. monocytogenes/jambon cuit et Salmonella/saucisson sec. Les nitrites sont pris en compte à l'aide de la microbiologie prévisionnelle qui permet de quantifier son impact sur la prévalence et la concentration des pathogènes (P et C). Pour Clostridium botulinum/jambon sec, seuls les modèles de microbiologie prévisionnelle ont été utilisés en raison de l'absence de données de prévalence du danger. ....	73
Figure 11. Nombre de cas de listériose déclarés en France par année de 1999 à 2019. D'après les données de SpF (Santé Publique France, 2020). (Légende : les courbes représentent une analyse de tendance sur la période 2006-2015 (A) et sur la période 2015-2019 (B). L'analyse de tendance (la valeur de r caractérise le taux d'évolution annuel) a été réalisée à l'aide du package R incidence (Kamvar et al., 2019).....	74
Figure 12. Les étapes de fabrication du jambon cuit. D'après (Bombrun, 2013).....	76
Figure 13. Prévisions du modèle secondaire de Mejholm et al. (2010) illustrant l'impact de la concentration en nitrites sur la croissance de L. monocytogenes dans du jambon cuit (présentant les caractéristiques suivantes : pH=6, NaCl=1,8%, pas d'acide organique, atmosphère protectrice avec CO <sub>2</sub> =30%) conservé à +6°C.....	77
Figure 14. Comparaison des prévisions du modèle secondaire de Mejholm et al. (2010) (--- pour K=0 et K=5, cinétique sans et avec latence respectivement) à des données de croissance de L. monocytogenes observées dans du jambon cuit conservé à +4°C (A et B, données issues de (Horsch et al., 2014)) et à +4°C puis +8°C (C et D (Ifip, 2010)). .....	78
Figure 15. Caractéristiques des réfrigérateurs (temps et température) pour les jambons contaminés respectant le critère de sécurité (100 UFC de L. monocytogenes par gramme de produit) au moment de la consommation (A, C et E) et ne respectant pas ce critère (B, D, F). Cette répartition a été estimée en prenant en compte les différentes sources de variation (contamination initiale, durées et températures dans les différents équipements). 10 000 simulations ont été réalisées pour intégrer l'ensemble des sources de variation. ....	79

Figure 16. Les étapes de fabrication d'un saucisson sec. ....	85
Figure 17. Prévisions du modèle secondaire développé par le GT NiNa illustrant l'impact de la concentration en nitrite sur la croissance de Salmonella au cours de la fermentation (48 premières heures +22°C, pH=5,8 et activité de l'eau 0,97, valeur de K=3,3) et l'inactivation pendant le séchage du saucisson sec (+22°C, 80% de gras, 2,9% de NaCl, perte en eau au terme de 672h (24 jours) = 38%). ....	87
Figure 18. Comparaison des prévisions du modèle secondaire développé pour Salmonella au cours du procédé de fabrication (--- pour K=0 et K=5, cinétique sans et avec temps de latence respectivement) à des données d'évolution de Salmonella observées au cours des phases de fermentation et de séchage (A et B, données issues de (Hospital et al., 2014), C et D de (Christieans et al., 2018)). ....	88
Figure 19. Nombre de cas de botulisme humains d'origine alimentaire. D'après (Anses, 2021). ....	91
Figure 20. Répartition des foyers de botulisme alimentaire avec identification de la source alimentaire (N = 41. (Légende : l'épaisseur des traits est proportionnelle au nombre de cas) en fonction du type de préparation, de la nature de l'aliment, de l'origine des aliments et du type de toxine botulique. D'après (Mazuet et al., 2011; Mazuet et al., 2014; Mazuet et al., 2018)) ....	92
Figure 21. Principales étapes de fabrication du jambon sec (d'après Mirade 2016). (flèches vertes : transfert de sel, bleues : transfert d'eau. ....	93
Figure 22. Probabilité de croissance de C. botulinum psychrotrophe en fonction de la concentration en nitrites et du taux de sel dans la phase aqueuse pour différentes conditions de pH et de température. Les lignes pointillées blanches et grises matérialisent les probabilités de croissance de 0,01 et 0,5, respectivement. Les prévisions sont issues du modèle de Gunvig et al. (Gunvig et al., 2013) ....	94
Figure 23. Comparaison des prévisions du modèle de probabilité de croissance (les lignes pointillées blanches et grises matérialisent les probabilités de croissance de 0,01 et 0,5 respectivement) de C. botulinum (Gunvig et al., 2013) à des données observées de croissance (points rouges) ou de non croissance (points gris) au cours de challenge-tests réalisés à 20°C sur des jambons secs présentant différentes valeurs de taux de sel et de pH (Meriali et al., 2016). Les simulations présentées ont été réalisées pour une température de 13°C et des concentrations en nitrites égales à 0 mg kg <sup>-1</sup> . ....	94
Figure 24. Evolution de la teneur en sel dans le muscle entier (- - -), dans la grosse noix (-) et la sous-noix (-). D'après les simulations du modèle de jambon numérique (Harkouss et al., 2018). ....	95
Figure 25. Probabilité de croissance de C. botulinum non protéolytique dans la sous-noix pendant le repos à +4°C et le début de la phase d'affinage à 13°C (pour un pH=5,8 et en l'absence de lactate de sodium). ....	96
Figure 26. Règles de substitution des données censurées en fonction des recommandations de l'OMS (GEMS/Food-EURO, 1995). ....	125
Figure 27. Distribution des concentrations en nitrates (en mg L <sup>-1</sup> ) dans l'eau embouteillée en fonction de la nature et du type d'eau. Source : Ministère en charge de la santé, ARS - Traitement : Anses. ....	133
Figure 28. Distribution des concentrations en nitrites (en mg L <sup>-1</sup> ) dans l'eau embouteillée en fonction de la nature et du type d'eau. Source : Ministère en charge de la santé, ARS - Traitement : Anses. ....	133
Figure 29 : Schéma descriptif de la démarche de calcul de l'exposition individuelle aux nitrates et aux nitrites associés aux aliments par la méthode probabiliste ....	140
Figure 30. Schéma du métabolisme des nitrates/nitrites alimentaires et de la formation des composés nitrosés dans le tractus gastro-intestinal (d'après Kobayashi, 2018). NO : monoxyde d'azote ou oxyde nitrique, RN-NO (NOC) : N-nitroso-composés, RS-NO : S-nitroso-composés, iNOS : inductible oxyde nitrique synthase ....	150
Figure 31 : Formation d'adduits O6-carboxyméthyle et O6-méthylguanine à partir de la N-nitrosation de la glycine (Lewin et al., 2006) ....	151
Figure 32 : Mécanismes de transformation des nitrates, nitrites et composés nitrosés dans les aliments carnés et dans l'organisme. ....	152

Figure 33 : Mécanisme de formation de l'HNE par la peroxydation de l'acide arachidonique (Gentile et al., 2017).....	155
Figure 34. Hypothèses concernant l'activité de perturbation endocrinienne du nitrate (d'après Poulsen et al. (2017)) .....	174
Figure 35. Diagramme Prisma relatif à la recherche bibliographique sur les données épidémiologiques .....	176
Figure 36 Démarche de la microbiologie prévisionnelle .....	252
Figure 37 : A- Exemple d'ajustement d'un modèle primaire de croissance aux données obtenues lors d'un challenge test (d'après Delhalle et al., 2012 sur des données de test de croissance de <i>L. monocytogenes</i> dans de la viande hachée à 10°C) B- Ajustement d'un modèle primaire d'inactivation aux données de courbes d'inactivation thermiques obtenues à différentes températures (d'après Desriac et al., 2019, sur des données d'inactivation de <i>Bacillus pumilus</i> à 86°C (o), 92°C (Δ) et 98°C (*)).....	253
Figure 38 : A- Impact de la température sur le taux de croissance ( <a href="http://www.symprevius.eu">www.symprevius.eu</a> ). B- Impact de la température sur le temps de réduction décimale (adaptée de (Desriac et al., 2019)). .....	253

## 1. CONTEXTE, OBJET ET MODALITÉS DE RÉALISATION DE L'EXPERTISE

### 1.1. Contexte

Le contexte de cette expertise est présenté ci-après selon les termes de la saisine émanant de la DGAL, la DGS et la DGCCRF (en italique et entre guillemets).

*« La présence de nitrites dans l'organisme peut conduire à l'oxydation de l'hémoglobine réduisant la capacité des globules rouges à transporter l'oxygène. Elle peut également contribuer à la formation d'autres composés, tels que les nitrosamines, dont certains sont cancérogènes.*

*Il existe différentes sources d'exposition des consommateurs aux nitrites et notamment :*

*i) La conversion de nitrates présents dans certaines denrées alimentaires, en nitrites.*

*Les nitrates se retrouvent dans l'eau notamment en raison de leur utilisation en production primaire. Ils sont naturellement présents dans certaines denrées alimentaires, en particulier dans les légumes-feuilles comme les épinards ou la laitue. Chez l'Homme, une partie des nitrates consommés peut être convertie en nitrites par les bactéries présentes dans la cavité buccale.*

*ii) La présence non intentionnelle de nitrites dans les denrées alimentaires.*

*Les nitrites peuvent notamment être présents dans les légumes mais à des teneurs généralement très inférieures aux nitrates.*

*iii) L'utilisation de nitrites et de nitrates en tant qu'additifs dans les denrées alimentaires.*

*Les nitrites de potassium et de sodium (E249, E250) et les nitrates de sodium et de potassium (E251, E252) sont couramment utilisés pour préserver la viande et d'autres produits périssables. Ils contribuent également à limiter la prolifération de microorganismes nuisibles, en particulier *Clostridium botulinum*, responsable du botulisme. Il s'agit d'additifs alimentaires autorisés dans l'Union européenne. A ce titre, ils ont fait l'objet de travaux scientifiques d'évaluation pour caractériser les risques liés à leur utilisation.*

*Actuellement la réglementation européenne<sup>[1]</sup> prévoit une teneur maximale d'incorporation de 150 mg/kg pour les produits de viande transformés, hors produits traditionnels. Pour les produits traditionnels dont la production est moindre en volume que les produits fabriqués par les industriels et qui contribuent donc moins à l'exposition des consommateurs, la réglementation prévoit une teneur de nitrites et nitrates résiduels pouvant aller jusqu'à 250 mg/kg. La teneur résiduelle varie selon différents facteurs liés au procédé de transformation (température de transformation, pH, présence d'acide ascorbique, etc.) et ne dépend pas uniquement de la teneur initialement incorporée. Les autorités danoises ont, pour leur part, souhaité maintenir un niveau d'emploi plus faible, à 60 mg/kg, qu'ils avaient fixé avant l'harmonisation européenne.*

*L'association du fer-héminique avec les nitrites ajoutés a notamment été envisagée comme une explication du risque accru observé de développement de cancers du côlon ou du rectum lié à la consommation de certains produits carnés (données CIRC-INCa 2018)<sup>[2]</sup>. Le fer-*

<sup>[1]</sup> Règlement (CE) n°1333/2008 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 16 décembre 2008 sur les additifs alimentaires.

<sup>[2]</sup> Etude CIRC/INCa 2018 « Les cancers attribuables au mode de vie et à l'environnement en France métropolitaine ». Lyon : International Agency for Research on Cancer, 2018.

*héminique contenu dans la viande favoriserait la conversion des nitrites en nitrosamines, substances classées cancérigène probable (groupe 2A).*

*Pour répondre à la demande des consommateurs, l'industrie a développé des solutions qu'elle présente comme alternatives à l'utilisation de sels nitrés (raccourcissement des DLC, bouillons de légumes, extraits de végétaux, etc.). En outre, des opérateurs s'engagent de manière plus globale à diminuer l'utilisation des additifs conformément aux objectifs définis par le programme national de l'alimentation et de la nutrition (PNAN).*

*Dans le cadre de la réévaluation des additifs, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) a rendu des avis en juin 2017<sup>[3]</sup> et conclu, sur la base des éléments de preuve disponibles, que les niveaux de sécurité existants pour les nitrites et les nitrates ajoutés en tant qu'additifs à la viande et à d'autres aliments constituaient une protection adéquate pour les consommateurs.*

*Plus précisément :*

- *S'agissant des nitrates en tant qu'additif, et en ayant recours à des données dites réalistes (c'est-à-dire, les niveaux de concentration effectivement observés dans les aliments), les experts ont estimé que l'exposition des consommateurs aux nitrates utilisés comme additifs alimentaires était inférieure à 5% de l'exposition globale aux nitrates dans les aliments et ne dépassait pas la DJA ;*
- *S'agissant des nitrites en tant qu'additif, les experts ont estimé que l'exposition se situait dans des limites sûres pour tous les groupes de population, à l'exception d'un léger dépassement chez les enfants dont le régime alimentaire est riche en aliments contenant ces additifs.*

*De plus, le panel de l'EFSA soulignait, lorsque l'ensemble des sources d'expositions alimentaires (présence naturelle dans les aliments, contamination environnementale, utilisation en tant qu'additifs) étaient prises en compte :*

1. *pour les nitrates, des dépassements de la DJA pour l'ensemble des groupes d'âges (hypothèse d'exposition moyenne à haute) ;*
2. *pour les nitrites, des dépassements de la DJA pour l'ensemble des groupes d'âges sous l'hypothèse d'exposition haute, et pour des groupes d'âges spécifiques (nourrissons, jeunes enfants et enfants) sous l'hypothèse d'une exposition moyenne.*

*L'EFSA a également émis des recommandations pour pallier certaines incertitudes. »*

En ce qui concerne les nitrates, des travaux ont été engagés à l'Anses afin de caractériser les expositions par voie alimentaire (notamment légumes et eau destinée à la consommation humaine) propres à la France dans le cadre de la saisine 2015-SA-0029. Ces travaux résultent d'une saisie de l'Anses par l'association Eaux et rivières de Bretagne (le 15/01/2015), par la Coordination rurale (le 19/01/2015) puis par la FNSEA (le 26/01/2015) sur les impacts sanitaires des nitrates présents dans l'alimentation et dans l'environnement. En effet, les habitudes alimentaires, de même que la présence de nitrates dans les aliments (légumes

---

<sup>[3]</sup> EFSA, 2017a. Re-evaluation of potassium nitrite (E 249) and sodium nitrite (E 250) as food additives. EFSA J, 15(6): e04786 ; EFSA, 2017b. Re-evaluation of sodium nitrate (E 251) and potassium nitrate (E 252) as food additives. EFSA J, 15(6): e04787.

notamment) et l'eau, peuvent différer sensiblement des données européennes utilisées par l'EFSA. Cela est particulièrement vrai pour l'eau de consommation humaine distribuée dont les paramètres caractérisant sa qualité physico-chimique varient en fonction des ressources exploitées et des traitements mis en œuvre. Ces travaux avaient pour but d'apprécier, au plan national, la situation d'exposition de la population aux nitrates au regard des repères toxicologiques. Les résultats permettraient d'identifier les situations méritant attention, de façon à recommander des mesures, en particulier grâce à l'identification des aliments (y compris l'eau de boisson) les plus contributeurs à l'exposition aux nitrates en France. Ces travaux sont complétés par la présente expertise.

## 1.2. Objet de la saisine

Dans la continuité des travaux conduits par les différentes instances sanitaires, il est demandé à l'Anses dans le cadre de la présente expertise :

« 1) d'établir si possible, en prenant en compte les travaux de l'EFSA sur la préservation des produits carnés vis-à-vis du risque de contamination par *Clostridium botulinum*, les situations – y compris en cas d'usage de procédés présentés par l'industrie comme un moyen de remplacement des sels nitrés - dans lesquelles une diminution des taux de nitrites/nitrates présents dans les denrées est susceptible d'accroître de manière significative les risques liés à la prolifération de bactéries pathogènes dans certains aliments ;

2) de recenser les leviers d'action permettant de diminuer l'exposition globale des consommateurs, en fonction des caractéristiques propres à la France de l'exposition aux nitrites et nitrates par ingestion quelle que soit leur origine, et donc in fine aux nitrosamines ;

3) d'évaluer si de nouvelles connaissances scientifiques, notamment en réponse aux recommandations de l'EFSA, sont susceptibles de lever les incertitudes sur les mécanismes de transformation des nitrates et nitrites dans l'organisme et dans les denrées alimentaires, ainsi que de justifier le réexamen des DJA/VTR déterminées par l'EFSA ;

4) d'évaluer si, depuis la publication du CIRC/INCa de 2018, de nouvelles connaissances scientifiques sont susceptibles de mieux caractériser le lien entre cancérogénèse chez l'Homme et apport de fer-héminique associé aux nitrites via la consommation de produits carnés. Pour ce faire, l'Anses prendra l'attache de l'INCa, en tant que de besoin. »

## 1.3. Organisation de l'expertise

### 1.3.1. Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'expertise relève du domaine de compétences du comité d'experts spécialisé (CES) « Evaluation des risques physico-chimiques liés aux aliments » (ERCA). L'Anses a confié l'instruction de cette saisine au groupe de travail « Risques associés à la consommation de Nitrites et de Nitrates » (NiNa), rattaché au CES ERCA.

Les travaux d'expertise du groupe de travail NiNa ont été soumis régulièrement au CES ERCA (tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques) entre septembre 2020 et juillet 2022. Les travaux ont également été présentés aux experts du CES « Evaluation des risques biologiques dans les aliments » (Biorisk) pour ce qui concerne l'expertise se rapportant à la question 1. Les experts du CES « Eaux » et « Valeurs Sanitaires de Références » (VSR) ont également été consultés. Le rapport produit par le groupe de travail tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres des CES.

Ces travaux sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires. Ils ont été adoptés par le CES « ERCA » réuni le 17 juin 2022.

### 1.3.2. Prévention des risques de conflits d'intérêts

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet <https://dpi.sante.gouv.fr/>.

## 2. MÉTHODE D'EXPERTISE

### 2.1. Groupe de réflexion en amont de la saisine

En amont de la création du GT, un groupe de rapporteurs nommés en appui d'un travail préparatoire a procédé à une revue bibliographique ayant pour objectif de faire l'état des lieux des connaissances toxicologiques et épidémiologiques sur les nitrates et nitrites.

Ce groupe de rapporteurs a noté la complexité des mécanismes impliqués dans la cancérogénèse et leurs interactions, la nécessité de bien en comprendre le fonctionnement et de tenter d'en tenir compte dans l'expertise. Par ailleurs, ce groupe a mis en exergue l'implication possible de différents composés néoformés. Ce groupe de rapporteurs a fait part de ses réflexions aux membres du GT.

### 2.2. Méthode du travail du GT

Pour répondre aux questions de la saisine, le GT a identifié les axes de travail suivants :

- Evaluer l'impact de la réduction ou du retrait des additifs nitrités sur les risques microbiologiques liés à la présence de certains agents pathogènes dans les produits carnés et transformés (*Clostridium botulinum*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*) ;
- Collecter les données de concentrations en nitrates, nitrites et composés néoformés dans les aliments et l'eau ;
- Evaluer l'exposition aux nitrates et nitrites via les aliments et l'eau ;
- Identifier les composés nitrosés<sup>1</sup> formés dans les produits carnés traités par les nitrites et les nitrates ;
- Identifier les composés nitrosés formés dans l'organisme du consommateur en fonction de l'apport en nitrates/nitrites via les produits carnés, autres aliments et l'eau ;
- Inventorier les connaissances relatives à la toxicité des composés nitrosés ;
- Actualiser la revue des études épidémiologiques sur les liens entre cancérogénèse et exposition aux nitrates et aux nitrites via l'eau et les aliments ;
- Evaluer la pertinence des valeurs toxicologiques de référence utilisées par l'EFSA dans ses rapports de 2017 ;
- Caractériser le risque, pour la population française, lié à l'exposition alimentaire aux nitrates et aux nitrites ;

---

<sup>1</sup> Différents termes sont utilisés dans la littérature pour désigner les composés issus de la conversion des nitrites. Dans un souci d'harmonisation et d'homogénéité entre les différentes parties du document, le GT a choisi d'utiliser le terme « composés nitrosés ».

- Recommander des mesures de gestion des risques liés à la présence des nitrates et nitrites naturellement présents ou ajoutés dans les aliments et de leurs composés néoformés.

Pour mettre en œuvre l'approche méthodologique, trois sous-groupes de travail ont été formés au sein du GT pour travailler sur les volets :

- Microbiologie ;
- Chimie/Expologie ;
- Toxicologie/Epidémiologie.

En parallèle aux travaux, des auditions ont également été conduites dans le cadre de cette expertise, auprès d'industriels de la viande et de la charcuterie (ADIV<sup>2</sup>, IFIP<sup>3</sup>, FICT<sup>4</sup>, ACTIA<sup>5</sup>), d'équipes de recherche de l'INRAE<sup>6</sup> (QuaPA<sup>7</sup>, Toxalim<sup>8</sup>) et de l'Inserm (EREN<sup>9</sup>), ainsi que de l'INCa<sup>10</sup>.

Les résultats de chaque étape de l'approche méthodologique ont fait l'objet de discussions au sein des Comités d'experts spécialisés concernés durant l'expertise dans le cadre d'une validation scientifique et collective.

### 3. SUBSTANCES D'INTÉRÊT TRAITÉES DANS LE CADRE DE LA SAISINE

De manière générale, la présente saisine traite de la problématique des ions nitrate et nitrite dans l'alimentation ainsi que des substances néoformées, potentiellement délétères pour la santé du consommateur.

**Nitrates-Nitrites et composés nitrosés** sont donc les balises d'une approche holistique et pragmatique qui repose sur des faits concrets et documentés à la lumière des données scientifiques les plus pertinentes actuellement disponibles.

Les considérations précédentes situent la problématique et son approche dans une perspective à la fois descriptive et dynamique des ions nitrate et nitrite, incluant leur origine, leur métabolisme et leur transformation, comme le montre le synoptique ci-dessous (Figure 1).

L'occurrence des nitrates et des nitrites dans l'alimentation :

1. est liée à la contamination des ressources en eau par des activités anthropiques (utilisation d'engrais azotés, épandages de lisiers, rejets d'origine urbaine ou industrielle) ;
2. résulte d'une bioaccumulation dans les végétaux ;
3. résulte d'une utilisation intentionnelle (additifs nitrates et nitrites ajoutés en tant qu'agents de conservation aux denrées dont majoritairement les produits carnés).

<sup>2</sup> Association pour le développement de l'industrie de la viande

<sup>3</sup> Institut du porc

<sup>4</sup> Fédération française des industriels charcutiers, traiteurs et transformateurs de viandes

<sup>5</sup> Le réseau français des instituts techniques de l'agro-alimentaire

<sup>6</sup> Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement

<sup>7</sup> Unité Qualité des Produits Animaux

<sup>8</sup> Unité TOXicologie ALIMentaire

<sup>9</sup> Inserm-Equipe de recherche en épidémiologie nutritionnelle

<sup>10</sup> Institut National du Cancer

Les questions traitées dans le présent avis imposent de considérer de manière dynamique et la plus intégrative possible toutes les voies de transformation des ions nitrate et nitrite en composés nitrosés néoformés et d'en considérer les effets sur la santé humaine. En parallèle, il s'agit également d'évaluer les effets d'une réduction de l'utilisation des nitrites sur le risque microbiologique associé aux produits carnés.

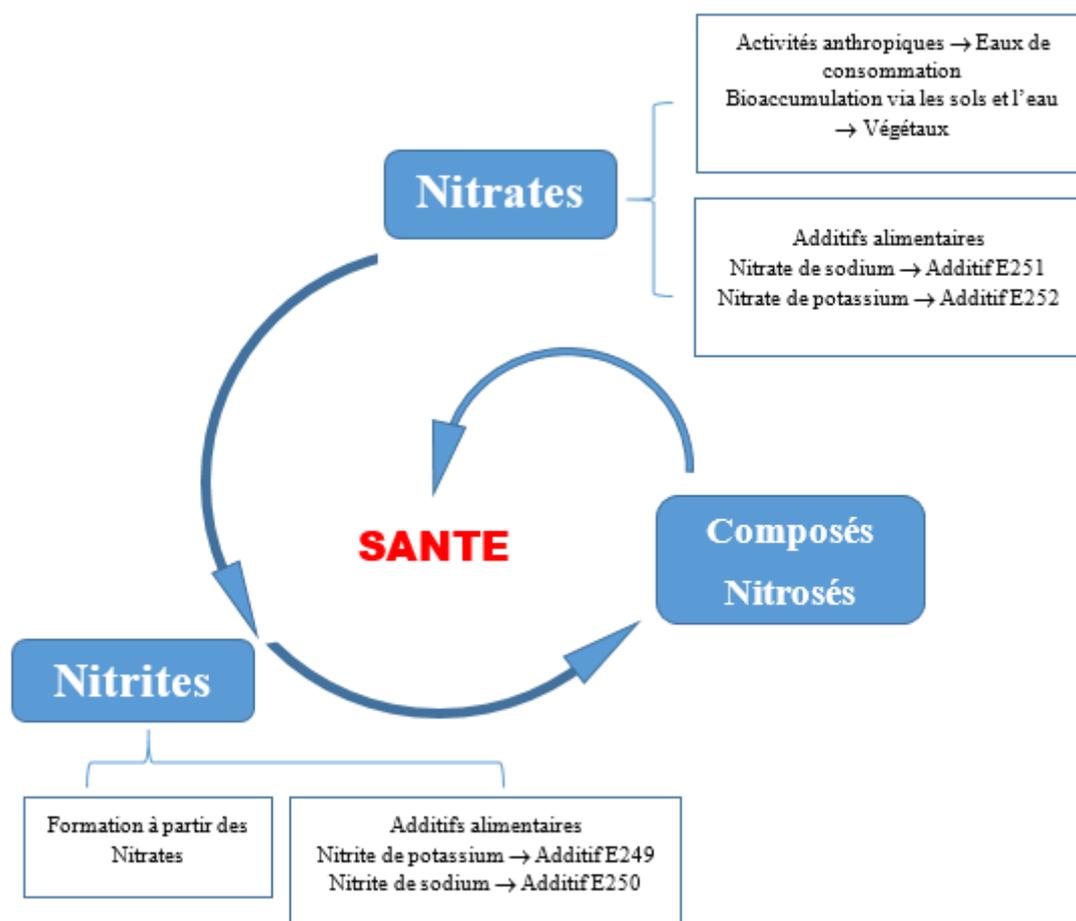


Figure 1. Les substances d'intérêt traitées dans le cadre de la saisine : vue synoptique

## 4. RÉGLEMENTATION

### 4.1. Réglementation applicable aux nitrates et aux nitrites dans les eaux de boisson consommées en France

Les eaux de boisson consommées en France sont de deux types : les eaux destinées à la consommation humaine (EDCH) distribuées en réseau (eaux du robinet) et les eaux embouteillées qui comprennent les eaux minérales naturelles (EMN), les eaux de source et les eaux rendues potables par traitement.

Au niveau européen, les EDCH distribuées en réseau, les eaux de source et les eaux rendues potables par traitement sont réglementées par la Directive 2020/2184 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2020 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation

humaine<sup>11</sup>, tandis que les eaux minérales naturelles sont réglementées par les Directives 2003/40/CE<sup>12</sup> et 2009/54/CE<sup>13</sup>.

#### 4.1.1. Réglementation française applicable aux EDCH distribuées en réseau

En France, la réglementation<sup>14</sup> relative aux EDCH fixe des limites de qualité, de 50 mg L<sup>-1</sup> pour les nitrates et de 0,50 mg L<sup>-1</sup> pour les nitrites, assorties de la condition que la somme de la concentration en nitrates divisée par 50 et de celle en nitrites divisée par trois soit inférieure à 1. De plus, en sortie des installations de traitement des EDCH, la concentration en nitrites doit être inférieure ou égale à 0,10 mg L<sup>-1</sup>. Ces prescriptions sont identiques à celles des Directives (UE) n°98/83/CE (abrogée en 2020) et n°2020/2184 relatives à la qualité des EDCH. Elles sont en accord avec les lignes directrices définies par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour les nitrates (WHO, 2017) et plus protectrices pour les nitrites puisque l'OMS recommande une valeur guide de 3 mg L<sup>-1</sup> pour ces derniers.

Un contrôle sanitaire régulier de la qualité des EDCH est assuré par les Agences régionales de santé (ARS). Les nitrates et les nitrites sont des paramètres pris en compte dans les programmes d'analyses réglementaires. Actuellement, la réglementation française<sup>15</sup> distingue deux types de programmes d'analyses pour les EDCH :

- *les programmes P1 et P2 mis en œuvre en fin de traitement de potabilisation de l'eau. Le programme P1, destiné aux analyses de routine (principalement centrées sur la microbiologie et quelques paramètres physico-chimiques), est complété par le programme d'analyses P2 réalisé à une fréquence moindre et couvrant tous les paramètres réglementés hormis ceux qui figurent dans le programme P1 ;*
- *les programmes D1 (routine) et D2 (complémentaire) mis en œuvre à l'étape de mise en consommation en réseau (au robinet).*

Pour chacun de ces programmes, les analyses sont réalisées selon un échancier fixé par la réglementation en fonction du débit et de la population desservie. Les fréquences d'analyses à réaliser pour les nitrites et les nitrates sont présentées dans le Tableau . Les résultats des analyses du contrôle sanitaire sont disponibles dans la base de données SISE-EAUX gérée par le ministère en charge de la Santé.

---

<sup>11</sup> Directive abrogeant la Directive 98/83/CE. La Directive 2020/2184 est en cours de transposition en droit français.

<sup>12</sup> Directive 2003/40/CE de la Commission du 16 mai 2003 fixant la liste, les limites de concentration et les mentions d'étiquetage pour les constituants des eaux minérales naturelles, ainsi que les conditions d'utilisation de l'air enrichi en ozone pour le traitement des eaux minérales naturelles et des eaux de source

<sup>13</sup> Directive 2009/54/CE du Parlement européen et du Conseil du 18 juin 2009 relative à l'exploitation et à la mise dans le commerce des eaux minérales naturelles

<sup>14</sup> Arrêté 11 janvier 2007 modifié relatif aux limites et références de qualité des eaux brutes et des eaux destinées à la consommation humaine mentionnées aux articles R. 1321-2, R. 1321-3, R. 1321-7 et R. 1321-38 du code de la santé publique.

<sup>15</sup> Arrêté 11 janvier 2007 modifié relatif au programme de prélèvements et d'analyses du contrôle sanitaire pour les eaux fournies par un réseau de distribution, pris en application des articles R. 1321-10, R. 1321-15 et R. 1321-16 du code de la santé publique.

**Tableau 1. Fréquence des analyses du contrôle sanitaire pour les nitrites et les nitrates dans les EDCH distribuées (Arrêté du 11 janvier 2007 modifié).**

Paramètres	Fréquence des analyses en sortie de traitement de potabilisation de l'eau par installation	Fréquence des analyses aux points d'usage en réseau par unité de distribution <sup>16</sup>
Nitrites	De 1 à 144 analyses par an (P1).	0,1 à plus de 12 par an (D2).
Nitrates	De 1 à 144 analyses par an (P1). L'analyse des nitrates peut être exclue de ces programmes sous certaines conditions, incluant le fait que les résultats obtenus pour les échantillons prélevés au cours d'une période d'au moins trois années successives sont tous inférieurs à 30 % de la limite de qualité de 50 mg L <sup>-1</sup> . Cette exclusion doit être réévaluée tous les 5 ans.	De 2 à plus de 800 analyses par an (D1) si au moins une ressource en eau alimentant l'unité de distribution présente une concentration en nitrates supérieure à 50 mg L <sup>-1</sup> .

Les critères réglementaires applicables aux nitrates étant des limites de qualité, tout dépassement doit faire l'objet de mesures correctives. La gestion des situations de non-respect des exigences de qualité des eaux distribuées au robinet est encadrée par le code de la santé publique (articles R1321-31 à 36), qui prévoit la possibilité d'un dépassement temporaire des limites de qualité, à titre dérogatoire. Dans son avis de 2008, l'Afssa indique qu'« *en raison des incertitudes scientifiques sur le rôle des seuls nitrates dans la survenue de la méthémoglobinémie du nourrisson et en l'absence de DJA suffisamment robuste, l'Afssa n'est pas en mesure d'évaluer le risque pour la population, en particulier pour les nourrissons, lors d'un dépassement de la limite de qualité de 50 mg L<sup>-1</sup> pour les nitrates et de ce fait, de proposer une valeur de dérogation* » (Afssa, 2008). Le ministère en charge de la santé fonde cependant son approche de gestion sur un avis antérieur du Conseil supérieur d'hygiène publique de France<sup>17</sup> (CSHPF, 1998). Les modalités de gestion qui en découlent ont été adressées aux ARS par le biais de l'instruction n°DGS/EA4/2018/79 du 21/03/18<sup>18</sup>. Les ARS appliquent de ce fait la stratégie suivante : une procédure de **dérogation** à la limite de qualité est mise en œuvre lorsque la concentration en nitrates dans les eaux distribuées est comprise entre 50 et 100 mg L<sup>-1</sup>, et cette dérogation est assortie de « *recommandation de non-consommation pour les femmes enceintes et les nourrissons* » (article R. 1321-36 du code de la santé publique). Pour des concentrations supérieures à 100 mg L<sup>-1</sup>, un **arrêté préfectoral fixant des restrictions d'usage** est à prévoir, interdisant les usages de l'eau « *à des fins alimentaires* » pour l'ensemble de la population.

#### 4.1.2. Réglementation française applicable aux eaux conditionnées

L'arrêté du 14 mars 2007 modifié<sup>19</sup> fixe :

<sup>16</sup> La notion d'unité de distribution (UDI) est définie au § 6.2.1.

<sup>17</sup> En 1998, le CSHPF observe que l'apparition de cas de méthémoglobinémie peut se manifester à partir de 50 mg L<sup>-1</sup> de nitrates mais plus particulièrement au-dessus de 100 mg L<sup>-1</sup>

<sup>18</sup> Instruction n°DGS/EA4/2018/79 du 21/03/18 relative aux modalités de gestion des non-conformités dans les eaux destinées à la consommation humaine prévues par notes d'information pour l'année 2018.

<sup>19</sup> Arrêté du 14 mars 2007 modifié relatif aux critères de qualité des eaux conditionnées, aux traitements et mentions d'étiquetage particuliers des eaux minérales naturelles et de source conditionnées ainsi que de l'eau minérale naturelle distribuée en buvette publique.

- des limites de qualité pour les EDCH conditionnées (eau de source et eau rendue potable par traitement) : de 50 mg L<sup>-1</sup> pour les nitrates et de 0,50 mg L<sup>-1</sup> pour les nitrites, assorties de la condition que la somme de la concentration en nitrates divisée par 50 et de celle en nitrites divisée par 3 soit inférieure à 1. De plus, pour les eaux rendues potables par traitement, en sortie des installations de traitement, la concentration en nitrites doit être inférieure ou égale à 0,10 mg L<sup>-1</sup> ;
- des limites de qualité pour les eaux minérales naturelles : de 50 mg L<sup>-1</sup> pour les nitrates et de 0,1 mg L<sup>-1</sup> pour les nitrites.
- des limites de qualité à respecter pour afficher une mention d'étiquetage relative à l'alimentation des nourrissons : de 10 mg L<sup>-1</sup> pour les nitrates<sup>20</sup> et de 0,05 mg L<sup>-1</sup> pour les nitrites.

L'arrêté du 22 octobre 2013 modifié<sup>21</sup> fixe la fréquence des analyses de contrôle sanitaire et de surveillance des eaux conditionnées à réaliser pour les nitrites et les nitrates de 1 à 3 analyses par an en fonction du volume total d'eau conditionnée par jour par l'installation. Les résultats du contrôle sanitaire sont disponibles dans la base de données SISE-EAUX gérée par le ministère en charge de la santé.

#### 4.2. Réglementation applicable aux nitrates dans les aliments d'origine végétale

Des inquiétudes suscitées par les concentrations en nitrates élevées dans certaines denrées alimentaires, y compris les produits maraîchers, ont conduit l'Union européenne à fixer des limites dans les denrées alimentaires dont certaines salades, dans le but de réduire l'ingestion des nitrates par les consommateurs (règlement CE n°194/1997 de la commission du 31 janvier 1997 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires ; règlement (CE) n° 466/2001 du 8 mars 2001 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires ; règlement (CE) n°1881/2006 de la commission du 19 décembre 2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires).

La réglementation européenne prend en compte les nitrates en tant que « contaminants » des denrées végétales et fixe des teneurs maximales autorisées exprimées en mg de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> par kg. Par contre, aucune valeur réglementaire n'est fixée en ce qui concerne les NO<sub>2</sub><sup>-</sup> dans le règlement européen concernant les contaminants dans les denrées alimentaires.

En 2011 (règlement (UE) n°1258/2011 de la commission du 2 décembre 2011), des modifications ont été apportées à ce cadre réglementaire pour prendre en compte notamment les difficultés rencontrées par certains Etats membres à respecter les limites réglementaires dans le cas des épinards frais et des laitues; les valeurs limites pour ces deux catégories de denrées ont été majorées. Par ailleurs, la roquette a été ajoutée à la liste des denrées réglementées, au vu de ses teneurs en nitrates parfois très élevées, afin d'encourager une évolution des pratiques agricoles. Actuellement, la réglementation prend en compte six catégories de produits végétaux, considérés à juste titre comme les plus préoccupants au regard des apports en nitrates : les épinards frais ou non (en conserve, surgelés, congelés), les laitues, les laitues « iceberg », la roquette et les préparations à base de céréales et aliments pour nourrissons et enfants en bas âge.

Les valeurs réglementaires actuelles figurent dans le tableau 2.

<sup>20</sup> Cette valeur n'est pas fondée sur des arguments toxicologiques mais établie au titre de la protection de la ressource.

<sup>21</sup> Arrêté du 22 octobre 2013 modifié relatif aux analyses de contrôle sanitaire et de surveillance des eaux conditionnées et des eaux minérales naturelles utilisées à des fins thérapeutiques dans un établissement thermal ou distribuées en buvette publique

**Tableau 2. Teneurs maximales en nitrates dans les denrées alimentaires d'origine végétale (Règlement (CE) n°1258/2011)**

Denrée alimentaire		Teneurs maximales (mg de NO <sub>3</sub> par kg de poids frais)
Épinards frais ( <i>Spinacia oleracea</i> )		3500
Épinards conservés, surgelés ou congelés		2000
Laitues fraîches ( <i>Lactuca sativa</i> L.) à l'exception des laitues « iceberg »	Récolte du 1er octobre au 31 mars : - laitues cultivées sous abri	5000
	- laitues cultivées en plein air	4000
	Récolte du 1er avril au 30 septembre : - laitues cultivées sous abri	4000
	- laitues cultivées en plein air	3000
Laitues de type "Iceberg"	- laitues cultivées sous abri	2500
	- laitues cultivées en plein air	2000
Roquette ( <i>Eruca sativa</i> , <i>Diplotaxis</i> sp, <i>Brassica tenuifolia</i> , <i>Sisymbrium tenuifolium</i> )	Récolte du 1er octobre au 31 mars :	7000
	Récolte du 1er avril au 30 septembre :	6000
Préparations à base de céréales et aliments pour nourrissons et enfants en bas âge		200

#### 4.3. Réglementation applicable aux nitrates et nitrites utilisés comme additifs alimentaires

Parmi les 27 catégories fonctionnelles d'additifs alimentaires prévues actuellement dans le règlement (CE) n° 1333/2008 du parlement européen et du conseil (EU, 2008), les nitrites de potassium ou de sodium (respectivement E249 ou E250) et les nitrates de sodium ou de potassium (respectivement E251 ou E252) font partie de la catégorie des « conservateurs » (« substances qui prolongent la durée de conservation des denrées alimentaires en les protégeant des altérations dues aux micro-organismes et/ou qui les protègent contre la croissance de micro-organismes pathogènes »).

En vertu de ce règlement européen, les nitrites sont autorisés dans certaines préparations de viande (au sens du règlement (CE) n° 853/2004) et dans les produits à base de viande, traités thermiquement ou non, tandis que les nitrates sont autorisés dans certains poissons (harengs au vinaigre et sprats), dans certaines catégories de fromages et dans les produits à base de viande non traités thermiquement. Les nitrites et les nitrates sont également autorisés dans certains produits traditionnels saumurés par immersion ou traités en salaison sèche. Le règlement (CE) n° 1333/2008 prévoit des doses maximales soit d'emploi, soit résiduelles (ces

dernières sont marquées d'un astérisque dans le tableau 3), de sels de nitrites et de nitrates pour les différentes catégories de produits dans lesquels ils sont autorisés (Tableau 3).

En France, en ce qui concerne l'utilisation de ces additifs dans les produits de viande transformée, les valeurs réglementaires sont prises en compte dans le « Code des usages de la charcuterie, de la salaison et des conserves de viande » établi par les professionnels (voir section 7.1.1) afin d'uniformiser les pratiques.

Dans les produits de viande transformée, ces additifs sont utilisés pour leur effet antimicrobien (voir section 7), leur effet sur la couleur (par la formation de NO-myoglobine qui confère une couleur rouge ou rose aux produits) et leur effet antioxydant vis-à-vis des lipides de la viande. Tous ces effets sont médiés par les nitrites. Dans le cas où ce sont des nitrates qui sont ajoutés, ceux-ci sont transformés en nitrites par l'ajout conjoint de bactéries produisant des nitrates réductases (Honikel, 2008; Majou and Christieans, 2018; Van Hecke et al., 2014).

Les nitrites présentent une toxicité aiguë pour l'homme (voir chapitre 10). Pour protéger le consommateur d'un surdosage, la réglementation européenne impose que « lorsqu'il est étiqueté « pour usage alimentaire », le nitrite peut uniquement être vendu en mélange avec du sel ou un substitut du sel » (EU, 2008). Un surdosage rendrait le produit de viande obtenu tellement salé qu'il serait immangeable. Le sel nitraté (NaCl contenant des nitrites) utilisé dans les industries agro-alimentaires contient 0,6% de nitrites.

**Tableau 3. Doses maximales d'emploi ou résiduelles (marquées par un astérisque) en nitrites et nitrates (exprimées en NaNO<sub>2</sub> ou en NaNO<sub>3</sub>) dans différentes catégories d'aliments selon la réglementation européenne (règlement (CE) n°1333/2008)**

Catégorie de produit	Dose maximale d'emploi ou résiduelle (*) mg kg <sup>-1</sup>		Restriction/exception
	Nitrites	Nitrates	
Fromages affinés	x	150	Uniquement fromage à pâte dure, semi-dure et semi-molle
Fromages de lactosérum	x	150	Uniquement lait de fromagerie pour fromage à pâte dure, semi-dure et semi-molle
Produits fromagers (à l'exclusion des produits relevant de la catégorie 16)	x	150	Uniquement produits affinés à pâte dure, semi-dure et semi-molle
Succédanés de produits laitiers, y compris blanchisseurs de boissons	x	150	Uniquement succédanés de fromage à base de produits laitiers
Préparations de viandes au sens du règlement (CE) no 853/2004	150	x	Uniquement lomo de cerdo adobado, pincho moruno, careta de cerdo adobada, costilla de cerdo adobada, Kasseler, Bräte, toorvorst, šašlōkk, ahjupraad, kielbasa surowa biala, kielbasa surowa metka et tatar wołowy (danie tatarskie)
Produits à base de viande non traités thermiquement	150	150	
Produits à base de viande traités thermiquement -non stérilisés	150	x	
Produits à base de viande traités thermiquement - stérilisés	100	x	
Produits traditionnels saumurés par immersion	175 *	250 *	Uniquement Wiltshire bacon et produits similaires : une saumure est injectée dans la viande qui est ensuite immergée dans la saumure pendant 3 à 10 jours. La saumure contient aussi des cultures microbiologiques à usage de levain.
Produits traditionnels saumurés par immersion	100 *	250 *	Uniquement Wiltshire ham et produits similaires : une saumure est injectée dans la viande qui est ensuite immergée dans la saumure pendant 3 à 10

			jours. La saumure contient aussi des cultures microbiologiques à usage de levain
Produits traditionnels saumurés par immersion	175 *	250 *	Uniquement entremada, entrecosto, chispe, orelheira e cabeca (salgados), toucinho fumado et produits similaires : immersion dans la saumure pendant 3 à 5 jours. Les produits ne subissent pas de traitement thermique et présentent une activité de l'eau (aW) élevée.
Produits traditionnels saumurés par immersion	50 *	10 *	Uniquement cured tongue: immersion dans la saumure pendant au moins 4 jours et précuisson.
Produits traditionnels saumurés par immersion	150	300	Uniquement kylmäsavustettu poronliha/kallrökt renkött: une saumure est injectée dans la viande qui est ensuite immergée dans la saumure. Le saumurage dure de 14 à 21 jours et est suivi d'une maturation avec fumage à froid pendant 4 à 5 semaines
Produits traditionnels saumurés par immersion	150	250	Uniquement bacon, filet de bacon et produits similaires : le produit est immergé dans la saumure pendant 4 à 5 jours à une température de 5 à 7 °C, soumis à une maturation habituellement pendant 24 à 40 heures à une température de 22 °C, éventuellement fumé pendant 24 heures à une température de 20 à 25 °C et entreposé pendant 3 à 6 semaines à une température de 12 à 14 °C
Produits traditionnels saumurés par immersion	50 *	250 *	Uniquement Rohschinken, nassgepökelt et produits similaires : la durée de saumurage dépend de la forme et du poids des morceaux de viande et s'élève approximativement à 2 jours/kg ; vient ensuite la stabilisation/maturation.
Produits traditionnels traités en salaison sèche	175 *	250 *	Uniquement dry cured bacon et produits similaires : salaison à sec suivie d'une maturation pendant au moins 4 jours.
Produits traditionnels traités en salaison sèche	100*	250 *	Uniquement dry cured ham et produits similaires: salaison à sec suivie d'une maturation pendant au moins 4 jours.
Produits traditionnels traités en salaison sèche	100 *	250 *	Uniquement jamón curado, paleta curada, lomo embuchado y cecina et produits similaires : salaison à sec suivie d'une période de stabilisation d'au moins 10 jours et d'une période de maturation supérieure à 45 jours.
Produits traditionnels traités en salaison sèche	100 *	250 *	Uniquement presunto, presunto da pá et paio do lombo et produits similaires : salaison à sec pendant 10 à 15 jours suivie d'une période de stabilisation de 30 à 45 jours et d'une période de maturation d'au moins 2 mois.
Produits traditionnels traités en salaison sèche	x	250 *	Uniquement jambon sec, jambon sel et autres pièces maturées séchées similaires : salaison à sec pendant 3 jours + 1 jour/kg suivie d'une semaine de post-salaison et d'une période de maturation/affinage de 45 jours à 18 mois.
Produits traditionnels traités en salaison sèche	50 *	250 *	Uniquement Rohschinken, trockengepökelt et produits similaires : la durée de salaison dépend de la forme et du poids des morceaux de viande et elle est approximativement de 10 à 14 jours; vient ensuite la stabilisation/maturation.
Autres produits saumurés de manière traditionnelle	50 *	250 *	Uniquement Rohschinken, trocken-/nassgepökelt et produits similaires : salaisons à sec et par immersion utilisées en combinaison (sans injection de saumure). La durée de salaison dépend de la forme et du poids des morceaux de viande et elle est approximativement de 14 à 35 jours ; vient ensuite la stabilisation/maturation.

Autres produits saumurés de manière traditionnelle	50 *	10 *	Uniquement jellied veal et brisket: une saumure est injectée dans la viande qui, après une période minimale de 2 jours, est cuite dans de l'eau bouillante pendant 3 heures au maximum.
Autres produits saumurés de manière traditionnelle	x	300	Uniquement Rohwürste (Salami et Kantwurst): le produit a une période minimale de maturation de 4 semaines et un rapport eau/protéines inférieur à 1,7.
Autres produits saumurés de manière traditionnelle	x	250	Uniquement salchichón y chorizo traducionales de larga curación et produits similaires : période de maturation d'au moins 30 jours.
Autres produits saumurés de manière traditionnelle	180	x	Uniquement vysočina, selský salám, turistický trvanlivý salám, poličan, herkules, lovecký salám, dunajská klobása, paprikáš et produits similaires : cuisson du produit sec à 70 °C, suivie d'un processus de séchage et de fumage de 8 à 12 jours. Les produits fermentés sont soumis à un processus de fermentation en trois étapes de 14 à 30 jours, suivi du fumage.
Autres produits saumurés de manière traditionnelle	x	250	Uniquement saucissons secs et produits similaires : saucissons sans ajout de nitrites, crus, fermentés et séchés. Le produit fermente à une température de 18 à 22 °C ou inférieure (10 à 12 °C) et a une période de maturation/d'affinage d'au moins 3 semaines. Le produit a un rapport eau/protéines inférieur à 1,7.
Poisson et produits de la pêche transformés, y compris mollusques et crustacés	x	500	Uniquement harengs au vinaigre et sprats

\*Dose résiduelle maximale : teneur en résidus à la fin du processus de production, exprimée en NaNO<sub>2</sub> ou en NaNO<sub>3</sub> d'après le règlement (CE) No 1333/2008, annexe II partie E.

x : usage non autorisé

## 5. ORIGINE ET DEVENIR DES NITRATES ET DES NITRITES DANS LES EAUX ET LES ALIMENTS

### 5.1. Origine des nitrates, nitrites et nitrosamines dans les eaux de boisson

#### 5.1.1. Origine des nitrates et des nitrites dans les ressources en eau

Les sources de nitrates dans les eaux brutes sont principalement liées à des processus naturels associés au cycle de l'azote (minéralisation de la matière organique), aux activités agricoles (par l'épandage de fertilisants minéraux, d'effluents d'élevage) et aux rejets d'origine urbaine ou industrielle. Certaines activités industrielles peuvent aussi conduire à un rejet d'eaux très riches en nitrates. Il s'agit notamment de l'industrie agroalimentaire, et plus particulièrement des abattoirs et des laiteries-fromageries, de l'industrie chimique et parachimique, et de l'industrie papetière.

L'absorption de l'ion nitrate par les végétaux réduit sa concentration dans les sols, mais sa grande solubilité et sa polarité (anion) favorisent sa lixiviation par les eaux drainées. Ainsi, les surplus sont facilement lessivés vers les eaux superficielles ou transférés vers les eaux souterraines.

Les concentrations en nitrates dans les ressources en eau varient au cours du temps en fonction de l'intensité des apports (saisonnalité de l'usage des engrais), des conditions météorologiques, de l'activité biologique et de la vitesse de renouvellement des masses d'eau. Dans les eaux souterraines, le type de sol et les conditions pédogéochimiques ont aussi une influence (Dubrovsky et al. 2010). La littérature scientifique internationale (Dubrovsky et al.,

2010; Nolan et al., 1997; Spalding and Exner, 1993) indique que le « bruit de fond » en nitrates dans des eaux souterraines non impactées par les activités humaines est le plus souvent inférieur à  $1 \text{ mg L}^{-1}$ .

Les nitrites sont assez rarement présents dans l'environnement car leur stabilité en milieu oxydant est très faible et ils sont rapidement transformés en nitrates. Ils peuvent cependant être présents si le milieu est anoxique.

### **Concentrations en nitrates et nitrites dans les eaux continentales en France**

La question des nitrates et nitrites dans les eaux concerne toutes les régions du monde, en particulier les grands bassins agricoles ; toutefois les niveaux de contamination observés peuvent varier considérablement en fonction des activités humaines, mais aussi des spécificités hydrologiques et climatiques.

En France, la qualité des eaux dans le milieu naturel fait l'objet depuis près de trente ans d'un suivi par les Agences de l'eau dans le cadre de la mise en œuvre de la Directive 91/676/CEE du 12 décembre 1991 concernant la protection des eaux contre la pollution par les nitrates d'origine agricole. Ce suivi n'est pas spécifique des ressources en eau exploitées pour la production d'EDCH. Il s'appuie sur un réseau de « stations » de surveillance réparties sur l'ensemble du territoire.

Pour les eaux souterraines (campagne 2018-2019<sup>22</sup>), près de la moitié des 2 582 sites échantillonnés présentent une concentration moyenne annuelle en nitrates inférieure à  $25 \text{ mg L}^{-1}$ , contre environ 13 % ayant une concentration supérieure à  $50 \text{ mg L}^{-1}$ . La situation reste globalement stable sur la période par comparaison aux données recueillies lors de la campagne 1992-93, mais des disparités existent : le Nord et l'Est de la France présentent une tendance généralement à la hausse. En revanche, le bilan pour l'Ouest (Bretagne) apparaît en amélioration. Les bassins hydrographiques encore les plus touchés par la pollution par les nitrates sont Loire-Bretagne (22,5 % d'eaux à plus de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de nitrates), Rhin-Meuse et Seine-Normandie. Pour 20 stations, la concentration en nitrates est supérieure à  $100 \text{ mg L}^{-1}$  ; le maximum pour cette campagne de mesures est présenté par la commune de Kintzheim en Alsace avec  $236,8 \text{ mg L}^{-1}$  de nitrates. On observe que le niveau de pollution des eaux souterraines par les nitrates n'est pas directement lié, pour les nappes libres, à leur profondeur. Ce constat est à relier à la grande mobilité des ions nitrate dans le sol. De plus, le contexte géologique et environnemental local constitue une source importante de variation du niveau de pollution des eaux souterraines.

Pour les eaux superficielles (campagne 2018-2019), les résultats sont par nature plus fluctuants et très fortement influencés, notamment, par le contexte climatique (marqué pour cette période par un fort déficit de précipitations). La concentration moyenne annuelle en nitrates est inférieure à  $25 \text{ mg L}^{-1}$  pour 81 % des 3 292 stations, contre 1,4 % des stations ayant une concentration annuelle moyenne supérieure à  $50 \text{ mg L}^{-1}$ . La situation apparaît globalement stable du point de vue des concentrations moyennes annuelles en nitrates, mais des variations régionales sont observées avec une tendance à la dégradation pour le Bassin Parisien et le Nord de la France et plutôt à l'amélioration pour une grande région Ouest, le Sud-Ouest, l'Alsace et la majeure partie du bassin rhodanien. La concentration mesurée la plus élevée est de  $296 \text{ mg L}^{-1}$  de nitrates (rivière Auxance à Chasseneuil-du-Poitou).

---

<sup>22</sup> Bilan de la mise en œuvre de la directive « nitrates » en France - période 2016-2019. Office français de la biodiversité, 2020, 318 pages.

### 5.1.2. Origine et devenir des nitrates et des nitrites dans les filières de production et de distribution d'EDCH

Les nitrates et les nitrites peuvent être formés à partir d'un excès d'ammoniac dans l'eau selon un processus de nitrification. Ce phénomène est observé lorsque l'eau est riche en ions ammonium d'origine naturelle, mais il est essentiellement décrit dans les systèmes où de l'ammoniac est ajouté dans l'eau en vue d'assurer une désinfection secondaire par formation de monochloramine. L'excès d'ammoniac peut alors être transformé en nitrites puis en nitrates (Santé Canada, 2013). Par ailleurs, la monochloramine peut être à l'origine de la formation de nitrosamines. Ce type de procédé n'est pas actuellement utilisé en France.

La formation de nitrites à partir de nitrates dans les eaux de réseau est possible, par action de bactéries, telles que *Nitrosomonas* sp., organisées en biofilm et en conditions de faible oxygénation. Ce phénomène est favorisé par la stagnation de l'eau et la richesse de l'eau en nitrates. Il est aussi possible d'observer l'oxydation des ions ammonium en nitrites et nitrates. En présence d'un résidu de désinfectant chimique dans les eaux (en général, en France, le chlore libre) au stade de la distribution, les nitrites sont très instables ; ils sont très rapidement oxydés en nitrates, de sorte qu'il est assez exceptionnel de retrouver des nitrites en quantité importante dans des eaux de réseau chlorées.

#### 5.1.2.1. Procédés utilisés pour réduire la concentration en nitrates et en nitrites dans les eaux

La meilleure approche pour limiter la présence de nitrates dans les eaux relève de la protection de l'environnement en général et de celle des ressources en eau vis-à-vis des apports d'origine anthropique. L'Union européenne s'est positionnée clairement dans la lutte contre la pollution des masses d'eau par les nitrates, dès 1991, au travers de la « Directive nitrates »<sup>23</sup>, qui engageait les États membres dans une démarche d'amélioration des pratiques agricoles, notamment la promotion d'un usage raisonné des fertilisants azotés (engrais chimiques, matières fertilisantes d'origine résiduaire, fumiers, lisiers, etc.). Actuellement, cette approche de préservation ou de reconquête de la qualité des masses d'eau a été élargie à d'autres polluants par la Directive 2000/60/CE<sup>24</sup> dite « DCE » (directive cadre sur l'eau). Dans le cas particulier des ressources en eau utilisées pour la production d'EDCH, la mise en place de périmètres de protection au niveau des captages (article L 1321-2 du code de la santé publique) complète ces mesures.

En présence de nitrates et/ou de nitrites dans les eaux brutes, les approches disponibles pour en réduire la concentration - si aucune ressource de substitution n'est disponible - sont soit le mélange avec des eaux contenant une faible concentration de nitrates et de nitrites, soit l'élimination des nitrates / nitrites par le recours à des traitements spécifiques. Dans ce domaine, les filières les plus courantes de potabilisation des eaux par coagulation, floculation, décantation et filtration sur sable ne permettent en effet pas l'élimination des nitrates car ces ions sont très stables et très solubles dans l'eau, et leur potentiel de coprécipitation ou d'adsorption est faible. L'étape de désinfection chimique, généralement mise en œuvre, peut transformer les nitrites en nitrates, mais ne contribue pas à l'élimination de ces derniers. Il est donc nécessaire, face à une contamination de l'eau brute, de faire appel à des procédés

<sup>23</sup> Directive 91/676/CEE du Conseil du 12 décembre 1991 concernant la protection des eaux contre la pollution par les nitrates à partir de sources agricoles.

<sup>24</sup> Directive 2000/60/CE du Parlement européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau

physico-chimiques spécifiques, à des techniques membranaires ou à la dénitrification biologique.

- **Procédés physico-chimiques**

Le procédé physico-chimique utilisable pour l'élimination des nitrates (dénitratation) dans l'eau est l'emploi de résine échangeuse d'anions fortement basique sous forme de chlorure. Des procédés de dénitratation par échange d'ions en cycle bicarbonate sont également commercialisés.

- **Procédés membranaires**

Parmi les procédés membranaires, l'osmose inverse permet d'obtenir les meilleures performances vis-à-vis des nitrates. Certaines membranes de nanofiltration permettent de retenir les nitrates avec un rendement supérieur à 50 %. Il s'agit de techniques coûteuses, qui ne se justifient pas si l'objectif est uniquement d'abattre la concentration en nitrates dans l'eau. L'électrodialyse utilisant une membrane sélective des nitrates présente les mêmes inconvénients que l'osmose inverse sur le plan économique<sup>25</sup>.

- **Procédés biologiques de dénitrification**

Les traitements biologiques sont largement utilisés pour éliminer les nitrates dans les eaux. Ils aboutissent à la réduction des nitrates en nitrites puis en azote gazeux ; ils ne font que reproduire des réactions biologiques de dénitrification, appelées aussi rétrogradation de l'azote minéral, observées communément dans le sol, les sédiments ou les aquifères, et qui contribuent au cycle de l'azote. De très nombreuses espèces de bactéries dénitrifiantes sont décrites, notamment au sein des genres *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. stutzeri*), *Paracoccus* (*P. denitrificans*), *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Bacillus* et *Micrococcus* (*Albina et al.*, 2019; Knowles R., 1982). Chez ces bactéries, les nitrates sont utilisés comme oxydants, en conditions microaérophiles. Les procédés sont qualifiés d'hétérotrophes quand on apporte aux bactéries des substrats organiques comme l'acide acétique ou l'éthanol, et d'autotrophes si le substrat à oxyder est inorganique (hydrogène, soufre, fer métallique, sulfures). Ces traitements doivent faire l'objet d'une autorisation délivrée par le ministère de la santé au titre de l'article R1321-50 du Code de la santé publique.

Les bactéries dénitrifiantes étant très sensibles aux faibles températures, seule la dénitrification biologique des eaux souterraines est autorisée en France<sup>26</sup> pour la production d'eau destinée à la consommation humaine (Afssa, 2008).

### 5.1.2.2. Nitrosamines dans l'eau

Les nitrosamines peuvent être présentes dans les eaux du fait d'une pollution environnementale, liée généralement à une activité industrielle (production de caoutchouc, industrie agro-alimentaire, fabrication de produits cosmétiques, usinage des métaux, etc.). Dans ce cas, la mise en évidence de nitrosamines dans l'eau n'a aucun lien avec la présence de nitrates ou de nitrites. Les rejets industriels peuvent aussi concerner des précurseurs de nitrosamines, comme par exemple, la morpholine, une amine secondaire utilisée notamment

<sup>25</sup> Document Technique - FNDAE - Hors série n°4 : Elimination des nitrates des eaux potables.

<sup>26</sup> Circulaire DGS/VS4 n°166 du 28 mars 2000 relative aux produits et procédés de traitement des eaux destinées à la consommation humaine.

dans l'industrie pharmaceutique comme intermédiaire de synthèse. Elle peut facilement être transformée en *N*-nitrosomorpholine en présence de nitrites, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Anses, 2012). On suspecte aussi certains matériaux (joints, membranes, etc.) de pouvoir libérer dans l'eau des précurseurs de nitrosamines, avec un risque plus important d'observer une contamination des eaux par des nitrosamines au moment de la mise en service d'installations neuves (Bruchet A. et al., 2012).

Différents composés *N*-nitrosés ont aussi été identifiés comme sous-produits de procédés de désinfection des eaux, principalement la chloramination. Ce procédé, d'usage très répandu en Amérique du Nord mais interdit en France, génère de la monochloramine qui peut participer à la formation de *N*-nitrosodiméthylamine ou NDMA (Mitch et al., 2003; Santé Canada, 2013), de *N*-nitrosomorpholine (Jurado-Sánchez et al., 2012; Wang et al., 2011; Zhao et al., 2008) et de *N*-nitrosopyrrolidine (Charrois et al., 2004). La formation de NDMA semble beaucoup plus rare dans les filières classiques de désinfection par le chlore actif, avec mise en jeu des ions nitrite (Santé Canada, 2011). Il a cependant été observé que l'ozonation, utilisée dans le cadre de la potabilisation des eaux, pouvait favoriser la formation de NDMA à partir de produits de dégradation (*N*-diméthylsulfamide) de produits phytopharmaceutiques contenant du tolylfluamide, fongicide à large spectre pour application foliaire en vigne, arboriculture fruitière et cultures légumières, désormais interdit à la mise sur le marché (Afssa, 2007a; Anses, 2018c).

D'une manière générale, les données disponibles (Santé Canada, 2011) témoignent du fait que la NDMA est la principale nitrosamine qui se forme durant le traitement des eaux, alors que d'autres nitrosamines comme la *N*-nitrosoéthylméthylamine et la *N*-nitrosodiéthylamine sont retrouvées plus rarement et en quantités sensiblement plus faibles (Sacher F. et al., 2008).

En France, la campagne nationale menée en 2013 par le LHN (299 sites, pour lesquels les couples eau brute/eau traitée ont été analysés, neuf molécules recherchées : NDMA, NMOR, NDEA, NPYR, NDBA, NPIP, NDPhA, NMEA, NDPA) donne un aperçu de la situation (Anses 2013). Seules trois molécules (NDMA, NMOR, NDEA) ont été mises en évidence au-delà de la limite de quantification (respectivement 5, 10 et 5 ng L<sup>-1</sup>). La NDMA et la NMOR ont été quantifiées dans les eaux brutes et traitées, alors que la NMOR n'a été quantifiée que dans les eaux traitées. Les sites contaminés sont très peu nombreux (entre 1 et 3 selon la molécule) ; les concentrations maximales mesurées sont de 14 ng L<sup>-1</sup> pour la NDMA, 1 222 ng L<sup>-1</sup> pour la NMOR et 32 ng L<sup>-1</sup> pour la NDEA, dans les eaux traitées. Un site a été identifié comme fortement contaminé par la NMOR en lien avec des activités industrielles induisant une pollution de l'environnement par la morpholine.

## 5.2. Origine des nitrates, nitrites et espèces associées dans les denrées alimentaires

### 5.2.1. Origine des nitrates, nitrites et espèces associées dans les denrées végétales

A l'échelle globale, les ions nitrate et nitrite sont des espèces qui participent au cycle biogéochimique de l'azote où elles sont susceptibles de subir de nombreuses transformations chimiques (Galloway et al., 2013). D'une façon succincte, la décomposition de la matière organique, quelle qu'en soit l'origine, par des organismes décomposeurs du sol, produit des petits peptides, des acides aminés, et finalement des ions ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). En fonction du pH et du potentiel redox du sol, l'ion ammonium peut perdre un proton et devenir ammoniac

( $\text{NH}_3$ ) qui éventuellement se volatilise dans l'atmosphère. En présence d'oxygène, l'ion  $\text{NH}_4^+$  est oxydé en ion nitrate  $\text{NO}_3^-$  par nitrification bactérienne.

Le  $\text{NO}_3^-$  ainsi généré peut : i) rester stable dans la solution du sol , ii) être transformé en azote moléculaire ( $\text{N}_2$ ) lors de la dernière étape de dénitrification microbienne (Albina et al., 2019; Knowles R., 1982; Payne W.J., 1986) ou iii) être absorbé par des plantes. En effet, l'ion nitrate est la principale forme d'azote absorbée à partir du sol par la plupart des plantes supérieures, y compris les légumineuses. Pour mémoire, les légumineuses peuvent par symbiose avec leur rhizobium fixer l'azote atmosphérique pour leur métabolisme (Figure 2).

Les plantes sont aussi capables d'absorber et utiliser l'azote sous forme de petits peptides, d'acides aminés et d'ion ammonium.

La présence de nitrites dans les sols, et plus largement dans l'environnement, résulte du cycle de l'azote selon deux voies : la première, par les bactéries nitrifiantes, en tant qu'intermédiaires de la formation de nitrates ; la seconde par les bactéries dénitrifiantes en tant qu'intermédiaires de la formation de l'azote ( $\text{N}_2$ ). Par conséquent, la concentration en nitrites libres dans l'environnement est très faible.

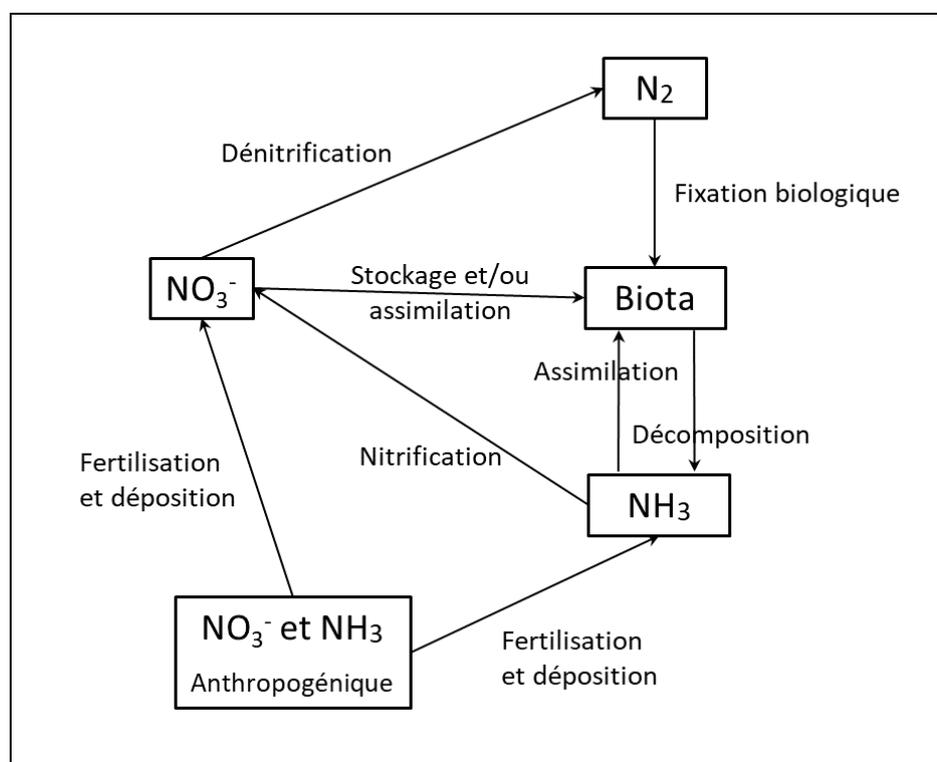


Figure 2. Schéma simplifié du cycle biogéochimique de l'azote

Une fois que le  $\text{NO}_3^-$  a été absorbé par les végétaux, il est, selon les espèces, soit préférentiellement stocké dans les racines où il sera métabolisé, soit transporté vers les parties aériennes où il sera stocké et métabolisé. Dans les cellules végétales, la première étape de la métabolisation du  $\text{NO}_3^-$  est une réduction en ion nitrite. Celui-ci est, à son tour, rapidement réduit en ammoniac. Ainsi, la concentration en nitrites libres dans les cellules végétales est très faible. L'ammoniac résultant du processus de réduction est immédiatement incorporé dans des acides aminés.

**En conclusion :**

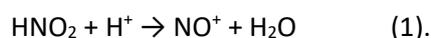
**Les nitrates dans les organes et produits végétaux ne doivent pas être considérés comme des contaminants mais comme des constituants naturels essentiels au développement du tissu végétal. Toutefois, des pratiques excessives de fertilisation azotée peuvent conduire à une accumulation de ces ions. Dès lors, les teneurs en nitrates des légumes-feuilles, les salades notamment, peuvent être très élevées et dépasser les besoins physiologiques des plantes (Escobar-Gutiérrez et al., 2002).**

**5.2.2. Origine et devenir des nitrates et nitrites dans les produits carnés**

Dans les viandes fraîches, les nitrites et les nitrates sont présents naturellement en très faible concentration pour les nitrites (moins de 4 mg kg<sup>-1</sup>) (Iacumin et al., 2019) et à des concentrations variant d'environ 10 à 36 mg kg<sup>-1</sup> pour les nitrates (Iacumin et al., 2019; Iammarino and Di Taranto, 2012). Comme indiqué plus haut, les nitrites et nitrates de sodium (NaNO<sub>2</sub> E250 ; NaNO<sub>3</sub> E251) ou de potassium (KNO<sub>2</sub> E249 ; KNO<sub>3</sub> E252) sont des additifs utilisés dans la fabrication de certains produits carnés. Au niveau européen, leur utilisation est régie par le règlement (CE) n° 1333/2008 (Tableau 3). Ce règlement prévoit des doses maximales soit d'emploi, soit résiduelles, de sels de nitrites et de nitrates pour les différentes catégories de produits dans lesquels ils sont autorisés (Tableau 3). Les concentrations résiduelles de nitrates et nitrites dans divers produits carnés sont répertoriées au paragraphe 9.3.3.2. L'EFSA (2017a) rapporte des concentrations résiduelles de nitrites de 11,3 mg kg<sup>-1</sup> de masse fraîche (n = 633) pour les produits crus, 11,6 mg kg<sup>-1</sup> (n=454) pour les produits cuits et 15,7 mg kg<sup>-1</sup> pour les produits traditionnels (n=2543) dans les pays européens, hormis le Danemark.

Les nitrites et nitrates sont ajoutés lors de la fabrication des produits carnés pour leur rôle de conservateur (antibactérien, antioxydant) et dans le développement de la couleur rouge. Ils vont interagir avec les composants de la viande. Le devenir des nitrites dans les produits carnés peut se résumer comme suit : 5 à 20% reste sous forme de nitrites libres (dit résiduels), 1 à 10% (voire 10 à 40% selon les auteurs) est oxydé en nitrates, 5 à 15% réagit avec la myoglobine, 1 à 15% se lie aux composés sulfhydriles (principalement peptides et acides aminés libres possédant un groupement thiol -SH), 20 à 30% se lie à d'autres protéines, 1 à 15% se lie aux lipides et 1 à 5% est émis sous forme de monoxyde d'azote ou oxyde nitrique NO°, gaz de nature radicalaire (Honikel, 2008). Cette réactivité dépend des procédés et de divers facteurs dont la température et le pH (Honikel, 2008 ; Skibsted, 2011).

Du fait de sa solubilité à pH 5,5 dans l'eau contenue dans la viande, le sel nitrité s'y dissout facilement (Honikel, 2008). Il est attendu que 99% de l'acide nitreux (HNO<sub>2</sub>), du fait de son pKa de 3,37, se trouve sous forme anionique NO<sub>2</sub><sup>-</sup> à pH 5,5. La faible proportion de HNO<sub>2</sub> restante est en équilibre avec sa forme anhydre, le trioxyde d'azote anhydre (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (Figure 3) (Skibsted, 2011). L'acide nitreux peut réagir avec un proton et conduire à l'ion nitrosonium (NO<sup>+</sup>) :



Toutefois, en milieu acide et réducteur (Honikel, 2008; Skibsted, 2011), comme dans les produits de charcuterie contenant de l'ascorbate (Asc) ajouté comme agent conservateur, l'acide nitreux forme majoritairement du monoxyde d'azote (NO°) :



[DHA = acide déshydroascorbique]

Dans la viande, ces dérivés des nitrites ( $\text{NO}^\circ$  et  $\text{NO}^+$ ) sont capables de réagir avec l'oxygène ou des dérivés oxygénés (anion superoxyde  $\text{O}_2^-$ ), le groupement thiol, les groupements amines, et avec des métaux de transition comme le fer et notamment le fer hémique de la myoglobine et de sa forme oxygénée l'oxymyoglobine (Figure 3) (Skibsted, 2011).

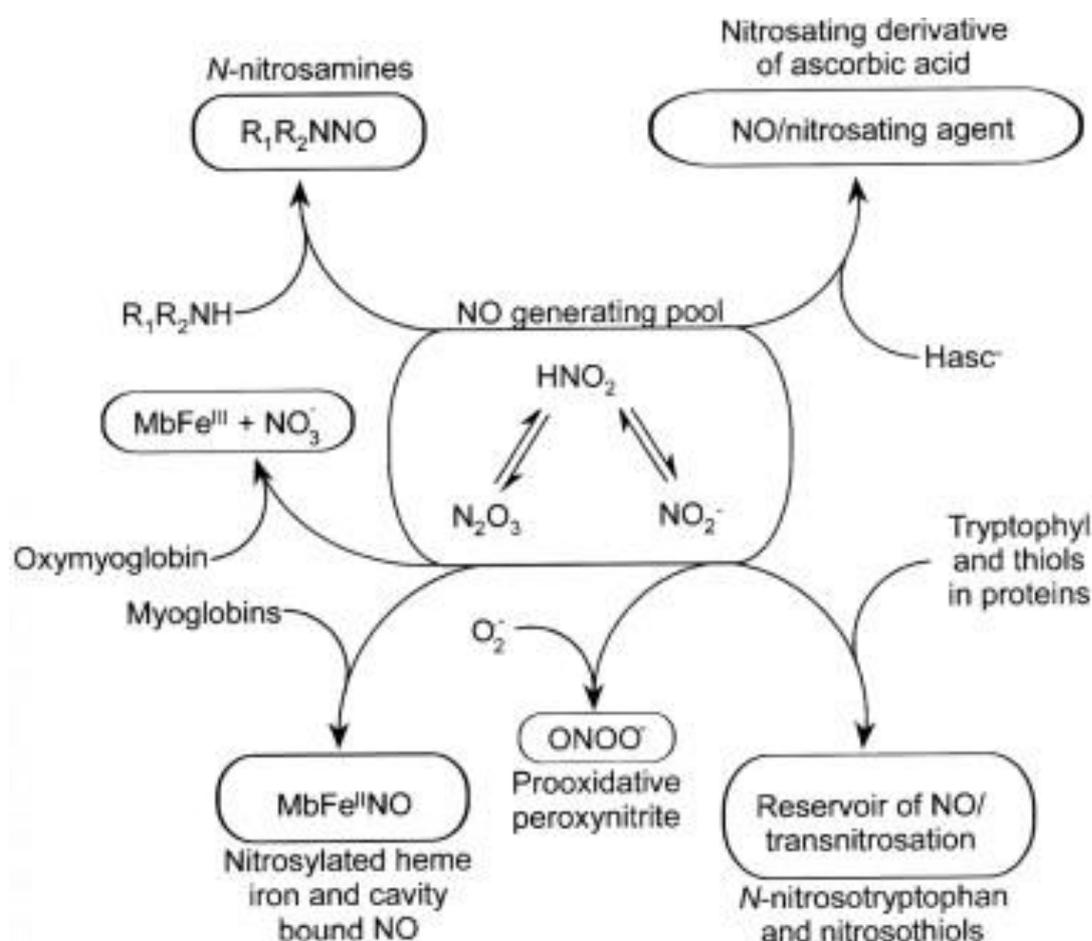


Figure 3. Les agents nitrosants ( $\text{NO}^\circ$ ,  $\text{NO}^+$ ) formés à partir des nitrites ajoutés lors de la fabrication de produits carnés conduisent à la formation de composés nitrosés (Skibsted, 2011).

### 5.2.2.1. Inhibition de l'oxydation des lipides par le monoxyde d'azote ( $\text{NO}^\circ$ )

Plusieurs mécanismes d'inhibition de l'oxydation des lipides par les agents nitrosants sont décrits. Le  $\text{NO}^\circ$ , en protégeant de l'oxydation le fer de la myoglobine, l'empêche de passer sous sa forme ferrique ( $\text{MbFe}^{3+}$ ) où il devient un oxydant puissant capable de peroxyder les lipides. Le  $\text{NO}^\circ$  peut également neutraliser les radicaux libres comme les espèces réactives de l'oxygène ( $\text{O}_2^-$ ) ; il interagit aussi avec les radicaux  $\text{L}^\cdot$  et  $\text{LOO}^\cdot$ , ce qui bloque la chaîne d'oxydation lipidique (Honikel, 2008; Stoica M., 2019).

L'ascorbate de sodium, l'acide ascorbique (vitamine C), l'érythorbate de sodium et l'acide érythorbique sont des antioxydants couramment utilisés en tant qu'additifs alimentaires dans les produits carnés. La présence d'antioxydants dans la viande joue un rôle important dans la cinétique des réactions des nitrites. L'ascorbate, en réduisant le fer hémique et l'acide nitreux

en NO°, contribue à la nitrosylation de l'hème et agit ainsi en tant qu'agent antioxydant (Honikel, 2008; Stoica M., 2019). Ainsi, dans les jambons cuits, une inhibition significative de l'oxydation des lipides est notée lors de l'ajout de nitrite de sodium dès la dose de 40 mg kg<sup>-1</sup> en présence d'ascorbate (concentration de malondialdéhyde (MDA) dans les lipides de 18,2 ± 0,5 µg g<sup>-1</sup> dans les contrôles, contre 9,2 ± 0,6 µg g<sup>-1</sup> dans les échantillons traités au nitrite de sodium) (Bonifacie et al., 2021b). Cet effet antioxydant est aussi noté dans des longes de porcs lors de l'incorporation d'ascorbate et du couple NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (sous forme de nitrite de sodium et de nitrate de potassium) dès les teneurs de 37,5/37,5 mg kg<sup>-1</sup> (Higuero et al., 2020). Concernant le saucisson sec, l'effet antioxydant est noté dès 80/80 mg kg<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub>/NaNO<sub>3</sub> avec un taux de MDA dans les lipides de 7,34 ± 0,41 µg g<sup>-1</sup>, significativement différent (p<0,01) par rapport à un témoin sans nitrites à 12,67 ± 0,39 µg g<sup>-1</sup> (Bonifacie et al., 2021a). L'oxydation des lipides a aussi été comparée dans des saucissons secs préparés soit avec 150/150 mg kg<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub>/NaNO<sub>3</sub> (C1), sans nitrites/nitrates (C2), sans nitrites/nitrates + 0,5% ou 1% de poudre de radis (R1 et R2) et sans nitrites/nitrates + 0,5% ou 1% de poudre de betterave rouge (B1 et B2) (Ozaki et al., 2021). Le contenu en nitrates des poudres de radis et de betterave rouge était de 16264 et 14038 mg kg<sup>-1</sup>, respectivement. Les teneurs en nitrates mesurées au jour 0 du procédé de fabrication étaient respectivement de 209, 424, 102, et 209 mg kg<sup>-1</sup> pour les conditions R1, R2, B1 et B2. Dans tous les cas, de l'ascorbate de sodium avait été ajouté. L'effet antioxydant était très marqué dès la fin du procédé de fabrication (35 jours) pour les saucissons secs préparés avec des poudres de légumes, avec des niveaux de MDA variant entre 0,38 ± 0,06 et 0,45 ± 0,04 mg kg<sup>-1</sup> dans les conditions R1, R2, B1 et B2 comparés à des taux de MDA allant de 0,72 ± 0,14 à 0,78 ± 0,17 mg kg<sup>-1</sup> (p<0,05 test de Tuckey) dans les saucissons secs sans ou avec nitrites/nitrates (conditions C1 et C2). Après 60 jours de stockage, les saucissons secs avec nitrates/nitrites avaient le même taux de MDA (0,91 ± 0,19 mg kg<sup>-1</sup>) que ceux avec les poudres de légumes, pour lesquels le taux de MDA variait entre 0,95 ± 0,02 et 1,09 ± 0,03 mg kg<sup>-1</sup> alors que le témoin sans nitrites/nitrates et sans poudre de légumes présentaient des teneurs en MDA de 1,29 ± 0,09 mg kg<sup>-1</sup> (p<0,05 test de Tuckey) (Ozaki et al., 2021).

#### 5.2.2.2. Interaction des agents nitrosants avec les protéines : formation des composés nitrosés

Les agents nitrosants (NO°, NO<sup>+</sup>) sont à l'origine de la formation des composés nitrosés en raison de leur réaction avec les différents constituants des protéines. Ces composés nitrosés peuvent être répartis en diverses classes :

- les *N*-nitroso-composés (nitrosamines et nitrosamides)<sup>27</sup> qui proviennent d'un processus de *N*-nitrosation d'amines et d'amides secondaires, respectivement ;

<sup>27</sup> Compte tenu du caractère instable des nitrosamides (Dietrich et al., 2005. IARC, 2010, Efsa, 2017), leur présence dans les aliments traités avec des sels nitrés est peu probable, et seules les nitrosamines seront discutées dans la suite.

Toutefois la formation de nitrosamides endogènes ne peut être exclue, du fait de la présence de précurseurs (N-alkylamides, N-alkylurées, N-alkylguanidines) dans la nourriture.

Ces nitrosamides sont des agents alkylant directement l'ADN (sans nécessiter de métabolisation à la différence des nitrosamines) très réactifs et responsables de cancérogénèse transplacentaire et de tumeurs cérébrales, expérimentalement.

Leur implication possible dans la cancérogénicité des dérivés *N*-nitrosés sera prise en compte dans la partie "incertitudes" du rapport, (à défaut d'éléments concrets permettant de quantifier leur formation endogène).

- les *S*-nitroso-composés (nitrosothiols) issus de *S*-nitrosation ;
- le nitrosylhème issu d'une *M*-nitrosation (réaction avec les métaux de transition dont le fer).

- **La *N*-nitrosation (formation de nitrosamines)**

Les nitrosamines sont formées selon une cascade de réactions mettant en jeu l'ion nitrosonium ( $\text{NO}^+$ ) et une amine. Seules les amines secondaires ( $\text{R}_2\text{-NH}$  ou  $\text{R-NH-R}'$ ) aboutissent à la formation de nitrosamines stables ( $\text{R}_2\text{-N-N=O}$ ). La plupart des amines dans la viande sont des amines primaires ( $\text{R-NH}_2$ ) qui ne conduisent pas à la formation de nitrosamines (Honikel, 2008 ; Stoica, 2019). L'efficacité de la réaction de *N*-nitrosation dépend de l'abondance des précurseurs (nitrites, amines secondaires, amines biogènes), des conditions d'acidité (pH acide idéal : 2,5-3,5), de température ( $T^\circ > 130^\circ\text{C}$ ), et de l'abondance de catalyseurs chimiques (métaux de transition : fer héminique) (EFSA, 2017a). L'acide ascorbique, ajouté lors de la fabrication de produits carnés, diminue la formation de nitrosamines due à la présence de nitrites en réduisant les nitrites en monoxyde d'azote  $\text{NO}^\circ$  qui ne pourra pas réagir avec les amines pour former des nitrosamines (Honikel, 2008; Stoica M., 2019).

Des nitrosamines volatiles et non-volatiles peuvent être générées dans les produits carnés traités avec des nitrites (EFSA, 2017a).

Les nitrosamines volatiles retrouvées dans les produits carnés sont la *N*-nitrosodiméthylamine (NDMA), *N*-nitrosodiéthylamine (NDEA), *N*-nitrosopipéridine (NPIP), *N*-nitrosopyrrolidine (NPYR) et *N*-nitrosomorpholine (NMOR). La NDMA et la NDEA sont les plus préoccupantes sur le plan toxicologique en termes de cancérogenèse et de génotoxicité (EFSA, 2017a). Cependant, dans les produits carnés, elles sont soit non détectées, soit en concentrations très faibles : sur un total de 286 produits carnés européens analysés, les teneurs en NDMA et NDEA oscillaient respectivement entre 0,7 et 2,7  $\mu\text{g kg}^{-1}$  et 0,04 et 0,9  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (EFSA, 2017a). Les moyennes des concentrations individuelles en *N*-nitrosamines étaient inférieures à 1,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  dans les échantillons de produits carnés prélevés sur le marché danois, inférieures à 5,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  sur le marché belge, inférieures à 5,0  $\mu\text{g kg}^{-1}$  sur le marché espagnol, inférieures à 7,7  $\mu\text{g kg}^{-1}$  sur le marché turc et inférieures à 3,0  $\mu\text{g kg}^{-1}$  pour le contenu total en nitrosamines pour des produits carnés prélevés sur le marché estonien (Flores and Toldrá, 2021).

La température et le mode de cuisson jouent un rôle clé dans la formation des nitrosamines volatiles (EFSA, 2017a). Des saucissons secs contenant 5,31  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de nitrosamines avaient été cuits à la poêle à  $150^\circ\text{C}$  sans huile (5 min) ou avec de l'huile (10 min), bouillis ( $90^\circ\text{C}$ , 30 min) ou chauffés au micro-onde ( $89^\circ\text{C}$ , 4 min-700 W). Les deux modes de cuisson à  $150^\circ\text{C}$  conduisent à des produits ayant les teneurs les plus élevées en nitrosamines volatiles (exprimées par kg de matière sèche étant donné les pertes d'eau à la cuisson) à savoir 6,88 (cuisson sans huile) et 6,92  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (cuisson avec huile) par rapport aux autres modes de cuisson qui conduisaient à des teneurs entre 4,95 et 5,58  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Li et al., 2012). Une synthèse récente sur plus de 1800 produits carnés transformés et de viande de volaille révèle que les concentrations totales en nitrosamines volatiles variaient entre 0,4  $\mu\text{g kg}^{-1}$  et 35,6  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , la majorité de produits ayant une concentration inférieure à 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Lee, 2019). Les niveaux les plus élevés de *N*-nitrosamines volatiles totales ont été trouvés dans la graisse de bacon frit (35,6  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), dans du gras de porc frit (25,9  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) et du poulet frit (22,4  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) (Lee, 2019).

Parmi les nitrosamines non volatiles, la NTCA (*N*-nitroso-thiazolidine-4-carboxylic acid) et la NMTCA (*N*-nitroso-2-méthyl-thiazolidine-4-carboxylic acid) sont les plus fréquemment

détectées dans les produits carnés traités aux nitrites (EFSA, 2017a). Ces nitrosamines sont peu susceptibles d'être cancérigènes selon l'EFSA (2017a). Des concentrations moyennes de 120 et 300 µg kg<sup>-1</sup> ont été mesurées dans des produits danois et belges respectivement, les valeurs maximales des concentrations atteignant 2 et 4 mg.kg<sup>-1</sup> (EFSA, 2017a).

Pour la NMTCA, les concentrations moyennes sont de 8,1 et 8,9 µg kg<sup>-1</sup> pour les produits danois et belges respectivement, les valeurs des concentrations pouvant atteindre 39 µg kg<sup>-1</sup> (EFSA, 2017a). Des nitrosamines sont détectées à un niveau de 8 mg kg<sup>-1</sup> dans des saucissons secs français fabriqués avec 200 mg kg<sup>-1</sup> de NaNO<sub>3</sub> et à un niveau de 4 mg kg<sup>-1</sup> dans les mêmes produits fabriqués avec 120/120 mg kg<sup>-1</sup> de NaNO<sub>2</sub>/NaNO<sub>3</sub>. Ces nitrosamines ne sont pas détectées dans les saucissons secs fabriqués avec des concentrations de 80/80 mg kg<sup>-1</sup> de NaNO<sub>2</sub>/NaNO<sub>3</sub> (Bonifacie et al., 2021a). La température de cuisson joue un rôle dans la formation de ces nitrosamines non volatiles. Une étude récente montre qu'elles ne sont pas formées dans du jambon cuit à 68°C fabriqué avec 40 à 120 mg kg<sup>-1</sup> de nitrites et ajout d'ascorbate (Bonifacie et al., 2021b). Cependant, la re-cuisson (120°C, 180°C et 260°C) de ce jambon peut entraîner la formation de nitrosamines non volatiles à des concentrations variant de 20 à 45 mg kg<sup>-1</sup> (Bonifacie et al., 2021b).

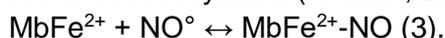
- **La S-nitrosation (formation de S-nitrosothiols)**

L'oxydation du groupement thiol (R-SH) d'un acide aminé soufré des protéines et du glutathion par le NO<sub>2</sub> conduit à la formation d'un radical thiyle (R-S<sup>•</sup>). La fixation covalente de l'oxyde nitrique (NO°) sur le thiyle génère les S-nitrosothiols (RS-N=O) (Skibsted, 2011). L'ion nitrosonium (NO<sup>+</sup>) peut également réagir avec des groupements thiols libre (R-SH) pour former des nitrosothiols. Pour cette réaction, l'ion nitrosonium est en compétition avec l'oxyde nitrique, un pH acide favorisant la réactivité de ce dernier (Skibsted, 2011). Les nitrosothiols agissent comme un réservoir d'ions nitrosonium (NO<sup>+</sup>) ou nitrosyl (NO<sup>-</sup>) et de NO° (Stamler et al., 1992) ; ils pourraient les relarguer au cours du temps, notamment durant le stockage, pendant la cuisson des produits carnés traités aux nitrates/nitrites et quand l'acide ascorbique a complètement réagi (Skibsted, 2011).

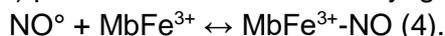
Des concentrations variant de 0,5 à 4 mg kg<sup>-1</sup> de nitrosothiols ont été mesurées dans des jambons cuits fabriqués sans nitrites ou avec des concentrations de nitrite de sodium de 40, 80 et 120 mg kg<sup>-1</sup> et sans ou avec de l'ascorbate à une teneur maximale de 80 mg kg<sup>-1</sup> (Bonifacie et al., 2021b). Dans cette étude, la comparaison des concentrations en nitrosothiols entre les jambons traités avec 120 mg kg<sup>-1</sup> de nitrites avec de l'ascorbate et sans ascorbate révèle une concentration 6 fois supérieure (12 mg kg<sup>-1</sup>) en l'absence d'ascorbate. Ces résultats indiquent que la formation de nitrosothiols dans les produits traités aux nitrites est majoritairement due à la réaction de S-nitrosation par le NO<sup>+</sup> plutôt que par le NO° en présence d'ascorbate (Bonifacie et al., 2021b). Dans une autre étude, des concentrations de nitrosothiols variant entre 17 nmol g<sup>-1</sup> pour de la viande de porc traitée aux nitrites à 357 nmol g<sup>-1</sup> pour du bacon fumé traité aux nitrites sont rapportées (Joosen et al., 2009).

- **La M-nitrosation : réaction avec les métaux de transition (formation de nitrosylhème)**

L'oxyde nitrique (NO°) possède une très forte affinité pour le fer hémique. Une molécule d'oxyde nitrique se fixe sur l'ion ferreux (Fe<sup>2+</sup>) de la myoglobine pour former la nitrosomyoglobine selon la réaction de nitrosylation (Honikel, 2008) :



Ce pigment rouge, stable, est appelé nitrosomyoglobine ; il renferme du fer héminique nitrosylé, aussi appelé nitrosylhème. L'oxyde nitrique peut également se fixer sur la forme oxydée du fer héminique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) pour former la nitrosometmyoglobine, suivant la réaction :



Cependant, l'oxyde nitrique se fixe préférentiellement sur la forme réduite du fer héminique ( $\text{MbFe}^{2+}$ ) (Honikel, 2008). L'acide ascorbique en favorisant la production de  $\text{NO}^\circ$  favorise la réaction de nitrosylation (Skibsted, 2011).

Diverses études ont conclu que des doses de nitrites entre 25 et 50  $\text{mg kg}^{-1}$  sont en général suffisantes pour obtenir dans la majorité des produits saumurés la couleur rouge proche de celle obtenue avec des doses de nitrites de 120  $\text{mg kg}^{-1}$  (Honikel, 2008; Sindelar and Milkowski, 2011). Cependant, des doses supérieures sont nécessaires pour développer et maintenir la couleur typique dans le cas des produits saumurés à longue conservation (Sindelar and Milkowski, 2011; Stoica M., 2019).

Lors d'un traitement thermique dépassant  $65^\circ\text{C}$ , la chaîne protéique de la nitrosomyoglobine est dénaturée et transformée en nitrosylmyoglobine, pigment rouge thermostable. C'est le pigment formé dans les charcuteries cuites, qui donne la couleur rose bien connue que l'on retrouve, par exemple, dans le jambon cuit (Skibsted, 2011).

Dans des saucissons secs fabriqués avec 80/80 ou 120/120  $\text{mg kg}^{-1}$   $\text{NaNO}_2/\text{NaNO}_3$ , 66% et 74% de fer héminique sont sous forme nitrosylée respectivement, contre 21% de nitrosylation dans les produits sans nitrites (Bonifacie et al., 2021a). La nitrosylation du pigment a été comparée dans des saucissons secs préparés soit avec des nitrates/nitrites (C1), sans nitrites/nitrates (C2), avec des poudres de légumes : radis ( $\text{R1}=0,5\%$  de poudre,  $\text{R2}=1\%$  de poudre) ou betterave rouge ( $\text{B1}=0,5\%$ ,  $\text{B2}=1\%$ ) (Ozaki et al., 2021). A la fin du procédé de fabrication (35 jours), les concentrations de nitrosomyoglobine sont proches et varient entre 25 et 30  $\text{mg kg}^{-1}$  de myoglobine dans tous les échantillons excepté B2 où l'on retrouve 53  $\text{mg kg}^{-1}$  de myoglobine. A la fin du stockage (60 j), seul l'échantillon avec nitrites/nitrates présente une concentration de nitrosomyoglobine supérieure (15,73  $\text{mg kg}^{-1}$ ) alors que les échantillons témoin et avec poudre de végétaux ont des valeurs qui varient entre 3,84 to 9,43  $\text{mg kg}^{-1}$  (Ozaki et al., 2021).

La concentration en nitrosomyoglobine (28  $\text{mg kg}^{-1}$  d'hématine) est identique dans des longes de porcs, produits crus et secs, traitées avec un mélange 37,5/37,5, 75/75 ou 150/150  $\text{mg kg}^{-1}$   $\text{NaNO}_2/\text{NaNO}_3$  (Higuero et al., 2020).

L'étude de jambons cuits fabriqués sans nitrites ou avec des concentrations de nitrites de 40, 80 et 120  $\text{mg kg}^{-1}$  et avec de l'ascorbate révèle un pourcentage de nitrosylation du fer héminique entre 50 et 59% contre quelques pourcents seulement dans les produits sans nitrites (Bonifacie et al., 2021b). La quantité de nitrosylhème formé semble dépendre de la nature du muscle de porc. Les muscles *supra-* et *infra-spinatus* contenaient 40 à 51  $\text{mg kg}^{-1}$  de nitrosylhème alors que les muscles *longissimus dorsi* contenaient 17 à 21  $\text{mg kg}^{-1}$  de nitrosylhème après traitement aux nitrites (130  $\text{mg kg}^{-1}$ ) et chauffage à  $70^\circ\text{C}$  (Santarelli et al., 2010). Le muscle *musculus vastus intermedius* contenait 96 à 101  $\text{mg kg}^{-1}$  de nitrosylhème après traitement aux nitrites (131  $\text{mg kg}^{-1}$ ), chauffage à  $70^\circ\text{C}$  et exposition à l'air 5 jours à  $4^\circ\text{C}$  (Bastide et al., 2017).

Le devenir des nitrates, nitrites et composés nitrosés après l'ingestion des produits carnés est traité dans le chapitre 10.

Bien qu'un certain nombre de composés aient été identifiés dans les produits carnés, le présent rapport ne les traite pas dans leur totalité faute de données suffisantes.

**En conclusion :**

**Dans les produits carnés, la présence de nitrates et de nitrites résulte surtout de leur usage en tant qu'additifs pour leurs propriétés antioxydantes et antimicrobiennes et leur effet sur la couleur des produits.**

**Les nitrates et les nitrites participent à la production d'agents nitrosants ( $\text{NO}^\circ$ ,  $\text{NO}^\circ$ ) qui conduisent, dans les denrées, à la formation de composés nitrosés dont :**

- les nitrosamines en particulier dans les produits cuits ou frits à haute température ;
- les nitrosothiols ;
- le nitrosylhème.

## **6. DOSAGE DES IONS NITRATE ET NITRITE ET DES PRODUITS ASSOCIÉS**

### **6.1. Ions nitrate et nitrite**

De nombreuses méthodes d'analyse ont été développées en vue du dosage des nitrates et des nitrites dans les denrées alimentaires et dans l'environnement. Deux revues très exhaustives dues à Wang et al. (2017b) – 169 articles de référence - et Singh et al. (2019) – plus de 200 articles référencés- les répertorient de manière systématique et critique faisant ressortir les performances, limites et domaines d'application de chacune. Les techniques analytiques sont également discutées dans l'avis de l'EFSA (2017a).

Dans le cadre du présent rapport, seules les techniques de routine, largement utilisées en chimie alimentaire et en analyse des eaux sont brièvement présentées. Les détails méthodologiques plus spécifiques sont fournis par les revues précitées. Le plus généralement, le dosage des nitrites dans les aliments est relativement aisé et rapide, permettant une productivité analytique importante par des techniques de quantification robustes, très souvent normalisées. Le principe de la préparation des échantillons est simple et systématique : après homogénéisation, les échantillons sont extraits à l'eau ou par une solution aqueuse tamponnée à température ambiante puis ils subissent une clarification de Carrez (déprotéinisation – élimination de la turbidité et des émulsions) puis une séparation de phase (filtration et/ou centrifugation). Les eaux filtrées sont quant à elles analysées directement. Les ions nitrate et nitrite sont dosables après formation d'un dérivé « azo » par diazotation d'une amine aromatique (Réaction de Griess) présentant un chromophore spécifique absorbant dans le spectre visible (Figure 4).

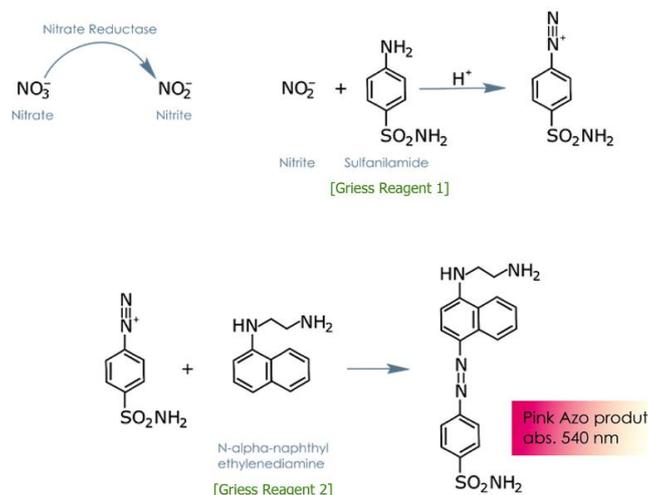


Figure 4. Principe général de la réaction de Griess (D'après Bonifacie et al. 2021)

Cette méthode de spectrométrie d'absorption moléculaire dans le visible est la plus fréquemment utilisée. Elle est applicable au dosage des nitrites et des nitrates cependant, pour évaluer ces derniers, une réduction préalable en nitrite s'impose. La technique est automatisable (FIA : flow injection analysis). L'analyse chromatographique constitue une alternative fréquente à la spectroscopie. Dans ce cas, les ions nitrite et nitrate sont séparés soit par chromatographie d'échange d'anion (avec détection conductimétrique) soit par chromatographie en phase inverse avec détection dans l'UV. En France, la norme NF EN 12014-5 (2005) applicable aux produits carnés peut aussi s'appliquer aux légumes et aux aliments pour bébés. Elle fait aussi appel à la chromatographie ionique. D'autres techniques analytiques aux performances variées ont été développées mais sont moins largement répandues voire anecdotiques. Pour ce qui concerne la présente saisine, des valeurs de LOD/LOQ (matrices-dépendantes) sont précisées dans la base de données CONTAMINE (chapitre 9.3.3.1) en fonction des méthodes quantitatives mises en œuvre par les laboratoires.

## 6.2. Composés néoformés

Pour ce qui concerne le dosage des nitrosamines totales et des nitrosothiols, une méthode par spectroscopie différentielle est décrite par Bonifacie et al. (2021b). Elle permet d'atteindre une LOD de l'ordre de la  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Elle repose sur le principe général suivant :

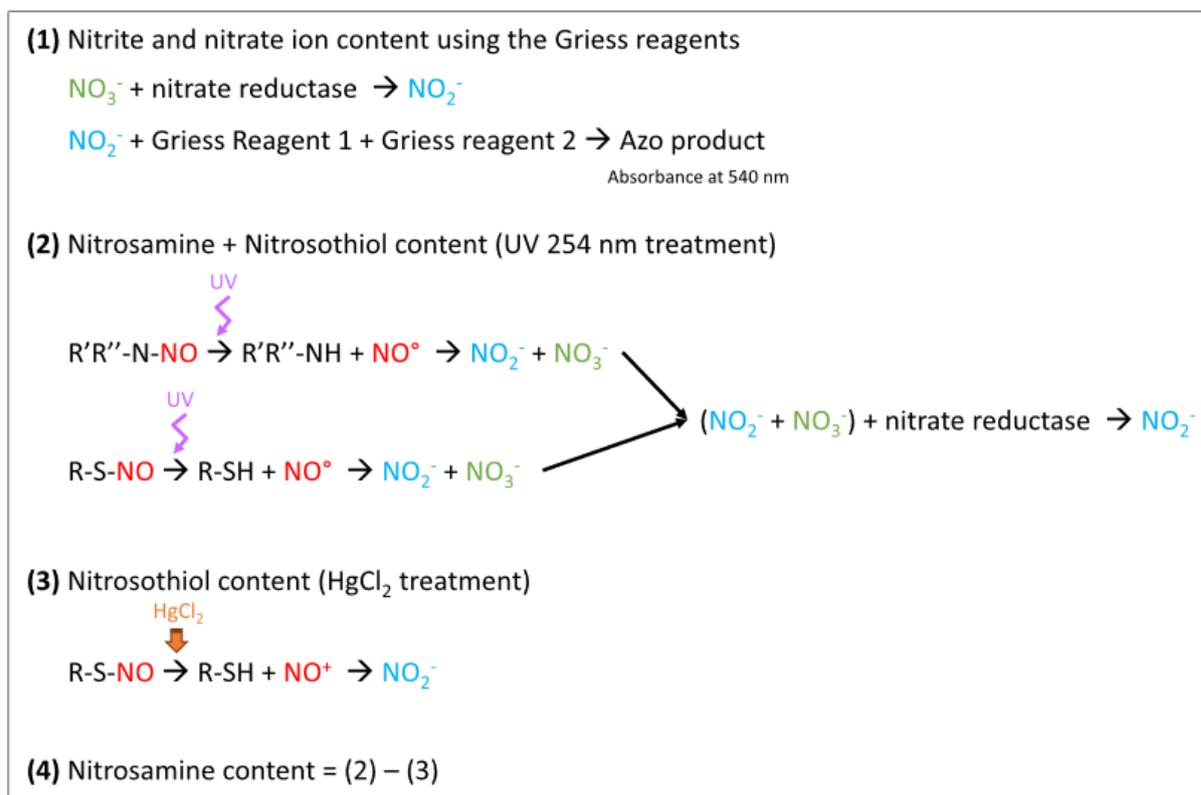
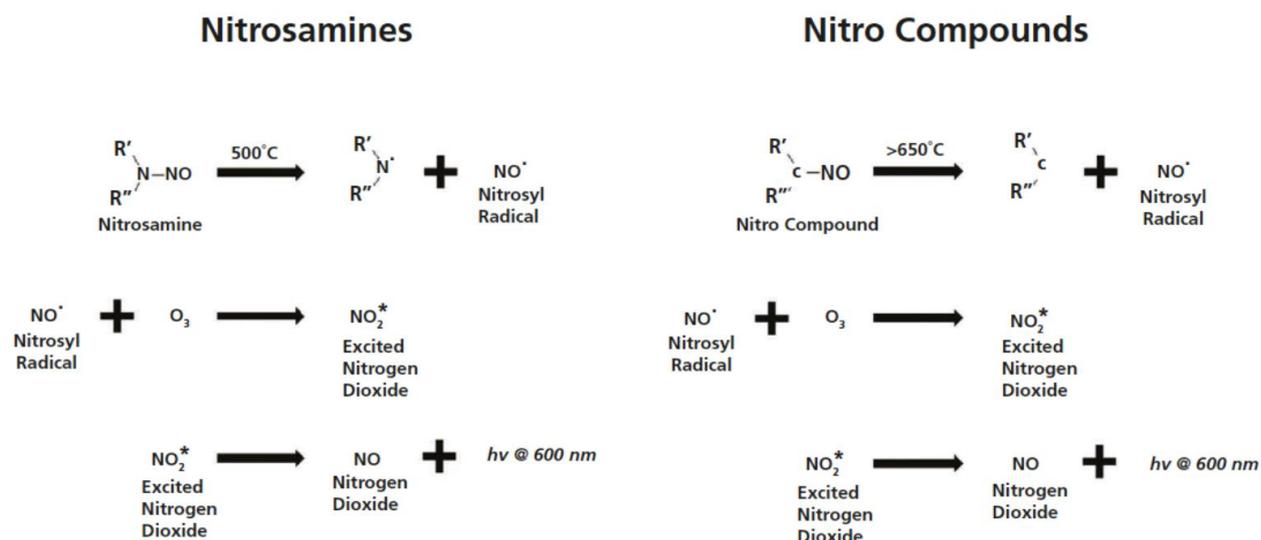


Figure 5. Principes réactionnels liés à la méthode de spectroscopie différentielle en vue du dosage des nitrites, des nitrates, des nitrosamines et des nitrosothiols dans les produits alimentaires. (D'après Bonifacie et al. (2021b))

La méthode de spectroscopie différentielle décrite ci-dessus donne accès à des données quantitatives « globales ». En effet, du fait des réactions induites, toutes les molécules appartenant à une même famille sont dosées. L'information obtenue est purement quantitative et ne permet pas une quantification molécule par molécule et encore moins leur identification.

Toutes les réactions conduisent à la formation d'ions nitrites dosés à l'aide du réactif de Griess. Les composés nitrosés (ATNC) sont aussi dosables par chimioluminescence par un analyseur TEA (Thermal Energy Analysis) avec possibilité de séparation préalable des divers composés par analyse chromatographique. Le principe réactionnel est le suivant :



**Figure 6. Mécanismes réactionnels impliqués dans la détection des produits nitrosés et permettant une quantification par chimioluminescence. (Source :<https://www.chromatographyonline.com/view/gas-chromatography-detection-nitrosamines-food-and-beverages> - Consultée le 6 juin 2022.)**

La concentration en espèces réactives est liée à l'intensité de la lumière émise à la longueur d'onde de 600 nm qui est mesurée. Lorsque la TEA est couplée à une séparation chromatographique, il est envisageable de proposer une tentative d'identification moléculaire sur base de données de rétention par rapport à des molécules témoins.

Kuhnle et al. (2007) ont suggéré une technique de chemiluminescence pour le dosage des nitrosothiols et du fer nitrosylé. Les premiers sont déterminés quantitativement par différence entre le signal obtenu pour les extraits traités au chlorure de mercure II et ceux qui ne le sont pas. Pour le fer nitrosylé, c'est le ferricyanure de potassium qui est ajouté aux extraits. Dans ce cas une mesure différentielle est aussi effectuée.

Herrmann et al. (2014) utilisent une méthode de dosage des nitrosamines volatiles et des nitrosamines non volatiles par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à triple quadrupole (LC-MS/MS) avec une LOD annoncée inférieure à 1 mg kg<sup>-1</sup> avec diverses exceptions notamment pour la NDMA la NTCA dans le bacon (LOD respectivement de 3,3 et 4,9 mg kg<sup>-1</sup> et des LOD encore plus importantes pour le salami (LOD égales ou supérieures à 10 mg kg<sup>-1</sup>).

La O6-carboxyméthylguanine est quant à elle quantifiée par dilution isotopique (à l'aide O6 - methyl-d3-guanine comme standard interne) en chromatographie liquide à ultrahaute performance couplée à la spectrométrie de masse à triple quadripôle U-HPLC-MS/MS (Vanden Bussche et al., 2012).

L'examen de la littérature relative aux données de concentrations en composés nitrosés dans les denrées alimentaires révèle deux questions non résolues : a. les méthodes quantitatives mises en œuvre sont-elles applicables systématiquement à tout type d'échantillon (effet de matrice) et b. la réactivité, dès lors l'instabilité potentielle, des composés nitrosés est-elle de nature à influencer les résultats quantitatifs obtenus ?

## 7. DONNÉES DISPONIBLES UTILISÉES DANS LE CADRE DE LA SAISINE

Afin de répondre au mieux aux questions posées dans le cadre de cette saisine, plusieurs types de données ont été collectées. Ces bases de données sont présentées ci-dessous :

### 7.1. Données de consommation alimentaire : INCA3

La troisième étude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires (INCA3) est une enquête transversale de référence visant à estimer les consommations alimentaires et les comportements en matière d'alimentation des personnes vivant en France (Anses, 2017b). L'étude INCA3 a été menée entre février 2014 et septembre 2015 auprès d'un échantillon représentatif d'individus vivant en France métropolitaine (hors Corse). Au total, 5 855 individus, soit 2 698 enfants (de la naissance à 17 ans) et 3 157 adultes (de 18 à 79 ans), ont participé à l'étude. Les individus ont été sélectionnés selon un plan de sondage aléatoire à trois degrés (unités géographiques, logements puis individus), à partir du recensement annuel de la population de 2011, en respectant une stratification par région et par taille d'agglomération afin d'assurer la représentativité géographique de l'ensemble du territoire. Deux échantillons indépendants ont été constitués : un échantillon « Enfants » (0-17 ans) et un échantillon « Adultes » (18-79 ans).

Les consommations alimentaires individuelles ont été recueillies sur 3 jours non consécutifs (2 jours de semaine et 1 jour de week-end) répartis sur environ 3 semaines, par la méthode des rappels de 24 heures pour les individus âgés de 15 à 79 ans et par la méthode des enregistrements de 24h (à l'aide d'un carnet alimentaire) pour les individus âgés de 0 à 14 ans. Pour les 3 jours sélectionnés, les individus devaient décrire leur consommation alimentaire en identifiant tous les aliments et boissons consommés dans la journée et la nuit précédentes. Ils devaient les décrire de façon aussi détaillée que possible et les quantifier à l'aide notamment d'un cahier de photographies de portions alimentaires et de mesures ménagères. Quel que soit l'âge, les interviews étaient conduites par téléphone, à l'aide du logiciel standardisé GloboDiet, par des enquêteurs professionnels spécifiquement formés aux méthodes mises en œuvre et à l'utilisation du logiciel. Parmi les 5 855 individus inclus dans l'étude, 4 114 (2 121 adultes et 1 993 enfants) ont validé le volet consommation en répondant à au moins 2 interviews alimentaires. L'échantillon des enfants de moins de 3 ans (N=154) étant insuffisamment représenté, seul l'échantillon des enfants de plus de 3 ans a été pris en compte dans le cadre de cette saisine. Les calculs d'exposition ont donc porté sur 3 960 individus : 2 121 adultes de 18 à 79 ans et 1 839 enfants et adolescents de 3 à 17 ans.

Afin d'assurer la représentativité nationale des résultats présentés, les données relatives aux individus ont fait l'objet d'un redressement<sup>28</sup>. Ce redressement a été réalisé séparément pour les enfants et pour les adultes en tenant compte de variables géographiques et socio-économiques. A chaque individu est donc associé une pondération prise systématiquement en compte pour les analyses.

En parallèle de l'étude INCA3, une convention de recherche et de développement a été mise en place avec le centre de recherche pour l'étude et l'observatoire des conditions de vie (CREDOC) pour décomposer en ingrédients les aliments complexes déclarés « faits maison » les plus cités dans l'étude INCA3 (exemple : tarte aux pommes = pâte à tarte, crème pâtissière, pommes). Chaque recette fournie par le CREDOC correspond à une recette générique

<sup>28</sup> Le redressement des données consiste à appliquer un facteur de pondération en fonction de la région/CSP/âge/sexe afin d'assurer la représentativité de l'échantillon par rapport à la population générale.

moyenne résultant de la combinaison des cinq recettes les plus consultées sur internet. Le choix des ingrédients et leur quantification dans la recette générique ont fait l'objet d'une méthodologie précise définie par l'Anses, afin de standardiser la décomposition des recettes en ingrédients et d'obtenir des recettes génériques représentatives de ce que pourraient être les recettes maison de ces aliments.

## **7.2. Données relatives à la concentration des nitrates, nitrites et nitrosamines dans l'eau et des aliments**

### **7.2.1. Base de données des concentrations des nitrates et nitrites dans les aliments (CONTAMINE)**

Les données utilisées proviennent de la base de données Contamine, qui recense l'ensemble des résultats d'analyses issus de la DGAL et de la DGCCRF et transmis annuellement à l'Anses.

Cette base de données recense au total 5 155 280 résultats d'analyses, tous contaminants et toutes sources de données confondues.

L'extraction a été effectuée en prenant les critères de sélection suivants :

- Paramètre(s) retenu(s) : nitrates et nitrites, tant en qualité d'additifs que de constituants de l'environnement ;
- Matrice(s) retenue(s) : toutes ;
- Année(s) des plans : 2008-2019 ;
- Type(s) de données : plans de surveillance et de contrôle des tutelles.

### **7.2.2. Base de données des concentrations des nitrates et nitrites dans les eaux de boisson consommées en France (SISE-EAUX)**

Les données utilisées proviennent de la base de données SISE-EAUX du ministère en charge de la santé. Cette base de données centralise les résultats du contrôle sanitaire des eaux (analyses d'eaux rendues obligatoires par la réglementation et réalisées sous le contrôle des ARS - voir Chapitre 4.1).

Chaque exploitant bénéficiant d'une autorisation pour produire et distribuer des EDCH (distribuées en réseau, eaux de source ou eaux rendues potable par traitement) ou des EMN est assujéti à ce contrôle sanitaire. Pour les eaux distribuées, un plan d'échantillonnage s'applique à chaque entité fonctionnelle, qualifiée d'unité de distribution d'eau potable (UDI), définie comme tout ou partie d'un réseau de distribution, dès lors que l'on peut estimer que la qualité de l'eau distribuée est identique au niveau de tous les points d'usage desservis. La taille des UDI varie selon les sites ; elle est généralement évaluée en termes de population alimentée par le réseau de distribution.

Des extractions de la base de données SISE-EAUX concernant les concentrations en nitrites et nitrates mesurées dans les eaux de boisson consommées (eaux distribuées en réseau et eaux embouteillées) en France ont été obtenues auprès du ministère en charge de la santé.

Les données exploitées dans le cadre de ce travail concernent la période 2010-2019.

Les données disponibles ont été examinées afin notamment :

- de mettre en adéquation les données reçues avec les besoins pour répondre à la saisine (par exemple, suppression des données qui ne concernent pas les eaux de boisson) ;
- d'éliminer les résultats inexploitable par manque d'information, mal renseignés ou peu cohérents avec la réglementation et/ou les performances des laboratoires d'analyses agréés pour le contrôle sanitaire des eaux;
- de supprimer les doublons.

Afin d'être cohérent avec les données de consommation d'INCA3, seules les données relatives aux eaux consommées en France métropolitaine hors Corse ont été exploitées dans le cadre de ce travail.

Les caractéristiques des extractions SISE-EAUX et les traitements appliqués aux données sont détaillés dans l'annexe 11.

Lorsque qu'un résultat d'analyse effectuée en sortie d'usine de potabilisation (TTP) pouvait être répercuté sur plusieurs UDI en aval direct de cette installation, deux modalités de traitement des données ont été retenues :

- Pour la description globale des concentrations dans les eaux de boisson, les résultats n'ont été conservés qu'une seule fois ;
- Pour la description des concentrations des EDCH par UDI et pour l'évaluation de l'exposition, les résultats obtenus en TTP ont été répercutés sur chaque UDI en aval direct de l'installation.

### **7.2.3. Base de données des concentrations des nitrosamines dans l'eau du Laboratoire d'Hydrologie de Nancy (LHN)**

Peu de données sont disponibles en France. Une étude menée en 2013 par l'ANSES (299 échantillons analysés – 9 nitrosamines recherchées) témoigne de la rareté et de la très faible contamination des eaux brutes (traces de nitrosamine dans 5 % des échantillons ; concentration supérieure à 10 ng L<sup>-1</sup> dans moins de 1% des échantillons). La présence de nitrosamines dans les eaux traitées est plus fréquemment détectée, du fait de la synthèse de ces molécules lors des procédés de potabilisation : 18% des échantillons contiennent une nitrosamine à l'état de traces ; dans 1 % des échantillons, une nitrosamine à une concentration supérieure à 10 ng L<sup>-1</sup> est mise en évidence. L'Anses (2013b) conclut à une faible occurrence des nitrosamines dans les EDCH en France, sauf cas particuliers de sites très fortement pollués par des activités industrielles. De ce fait, cette base de données n'a pas été utilisée dans le cadre de cette saisine.

### **7.3. Données d'occurrence de l'observatoire de la qualité de l'alimentation (Oqali)**

Dans le cadre des travaux relatifs à cette saisine, l'Unité « Observatoire des Aliments » (UOA) de l'Anses a été sollicitée pour fournir des données concernant la présence de nitrates et de nitrites au sein des produits transformés disponibles sur le marché français.

Les données utilisées proviennent de la base de données de l'Oqali.

Ce projet, mené conjointement par l'Anses et INRAE, a pour objectif de suivre, au cours du temps, la qualité nutritionnelle de l'offre alimentaire de produits transformés disponibles sur le marché français. Ce suivi est réalisé au niveau des références produit (produit de marque). Cette base de données, intégrant notamment les listes des ingrédients des produits, permet

de réaliser un état des lieux des ingrédients utilisés dans les produits transformés disponibles sur le marché français.

La recherche a été effectuée sur 34 812 produits dont l'étiquetage mentionnait une liste d'ingrédients<sup>29</sup>. Les produits ont été répartis en 31 secteurs alimentaires et récoltés entre 2009 et 2018 (Tableau 48, en annexe 4). L'ensemble des données présentées est issu des emballages des produits.

Il est important de noter que la base de données de l'Oqali ne comprend qu'un seul conditionnement par recette dès lors que l'ensemble des informations disponibles sur les emballages, à l'exception du code barre et du poids, sont identiques. Ainsi par exemple, si la recette de yaourt de la marque X existe sous format 4\*100g et 8\*100g (les informations présentes étant strictement identiques), la base de données Oqali ne comprendra qu'un seul enregistrement, pour l'un d'entre eux.

Il faut également noter que seuls les produits considérés dans les suivis sectoriels les plus récents sont pris en compte. Ainsi, si certains produits pris en compte lors des premiers suivis sectoriels ne sont plus disponibles sur le marché, ceux-ci ne sont pas intégrés dans le présent état des lieux.

Les listes d'ingrédients des produits étudiés sont saisies et structurées dans la base de données de l'Oqali. Afin de pouvoir les traiter (puisque un même ingrédient peut être nommé de différentes manières), une nomenclature standard a été développée.

A partir des listes d'ingrédients ainsi codifiées et de la liste des ingrédients recherchés, 6 ingrédients ont été recherchés et regroupés en deux catégories (Tableau 4).

**Tableau 4. Regroupement des ingrédients recherchés selon la catégorie Nitrates ou Nitrites**

Regroupement	Nitrates	Nitrites
Ingrédients recherchés	E251_NITRATE DE SODIUM	E249_NITRITE DE POTASSIUM
	E252_NITRATE DE POTASSIUM	E250_NITRITE DE SODIUM
	E251_E252_NITRATES	SEL NITRITE

Parmi les 34 812 produits inclus, répartis en 31 secteurs, eux-mêmes sous-divisés en 690 familles, 734 références mentionnent l'utilisation de nitrates et 3 041 de nitrites.

Le fichier Excel (en annexe 4) reprend :

- Le code famille Oqali correspondant à l'identifiant unique et chiffré pour une famille Oqali donnée. Il servira pour faire le lien entre les occurrences fournies et le fichier d'appariement des données Oqali aux données INCA3 par famille Oqali ;
- Le nombre total de produits considérés pour le secteur et la famille Oqali ;
- Le nombre et le pourcentage de produits mentionnant au moins l'un des trois ingrédients regroupés dans la catégorie des nitrates, par secteur et famille Oqali ;

Le nombre et le pourcentage de produits mentionnant au moins l'un des trois ingrédients regroupés dans la catégorie des nitrites, par secteur et famille Oqali. Il est à noter que les effectifs de produits contenant des nitrites (respectivement des nitrates) par famille peuvent être sommés pour calculer le nombre de produits présentant des nitrites (respectivement des nitrates) à l'échelle d'un ou de plusieurs secteur(s). A l'inverse, additionner le nombre de

<sup>29</sup> Dans le cas particulier des fromages, tous les produits du secteur ont été considérés car il est possible de ne pas afficher de listes d'ingrédients dès lors que ceux-ci ne comportent que des produits lactés, des enzymes alimentaires et des micro-organismes.

produits présentant des nitrites avec le nombre de produits présentant des nitrates ne donnera pas le nombre de produits présentant des nitrites ou des nitrates car un même produit peut contenir à la fois des nitrites et des nitrates.

Ainsi, 9 secteurs présentent au moins un produit contenant des nitrates dont les secteurs :

- Charcuterie pour lequel plusieurs familles présentent plus de 69% de produits contenant des nitrates notamment les familles “Préparations à base de jambon cru” (100% des produits), “Pavé / Rosette” (94,6%), “Saucissons secs et saucisses sèches pur porc” (93,9%), “Spécialités de saucissons” (88,9%), “Jambon sec” (87,8%), “Chorizo” (79,7%) et “Jambon cru” (69,5%) ;
- Produits traiteurs frais, notamment la famille “Sandwiches charcuterie” avec 62,2% de produits présentant des nitrates ;
- Fromages, notamment la famille “Gouda” avec 58,5% des produits contenant des nitrates.

De même, 10 secteurs présentent au moins un produit contenant des nitrites. Pour les 3 secteurs présentés ci-dessous, la totalité des produits d'une ou plusieurs familles contiennent des nitrites :

- Charcuterie (les familles de « Jambon cuit et épaule cuite choix », de « Jambon cuit et épaule cuite standard », de « Jambon et rôti de volaille standard », de « Lardons de volaille », de « Préparations à base de jambon cuit et d'épaule cuite standard », de « Préparation à base de volaille choix », « Préparations à base de volaille supérieures » et de « Saucisses à pâte fine de volaille ») ;
- Plats cuisinés frais (famille « Choucroutes ») ;
- Produits traiteurs frais (les familles « Croques », « Salades de museau / cervelas », « Pizzas fraîches jambon fromage et Autres sandwiches »).

## 8. EVALUATION DE L'IMPACT DE LA RÉDUCTION OU DU RETRAIT DES ADDITIFS NITRITÉS SUR LES RISQUES MICROBIOLOGIQUES DANS LES ALIMENTS

### 8.1. Utilisation et effet des nitrites et nitrates de sodium et potassium comme additifs alimentaires

#### 8.1.1. Réglementation européenne et pratiques au niveau des industriels en France

Les nitrites et nitrates de sodium ( $\text{NaNO}_2$  - E250 ;  $\text{NaNO}_3$  - E251) ou de potassium ( $\text{KNO}_2$  - E249 ;  $\text{KNO}_3$  - E252) sont des additifs utilisés dans de nombreuses catégories d'aliments.

Au niveau européen, leur utilisation est régie par le règlement européen (CE) n° 1333/2008. Ce règlement prévoit des doses maximales soit d'emploi, soit résiduelles, de sels de nitrites et de nitrates (exprimées en  $\text{NaNO}_2$  ou  $\text{NaNO}_3$ ) pour les différentes catégories de produits dans lesquels ils sont autorisés (Tableau 5). Si les nitrites ainsi que les nitrates sont autorisés dans certaines catégories de produits à base de viande, avec des quantités maximales différentes allant de 10 à 250  $\text{mg kg}^{-1}$ , selon les spécificités des produits (traitement thermique ou non, type de saumurage, etc.), seuls les nitrites sont autorisés dans les préparations de viande.

Les nitrates sont également autorisés dans certaines catégories de fromages ou produits fromagers à des quantités maximales de 150  $\text{mg kg}^{-1}$  ainsi que dans les harengs au vinaigre et sprats à hauteur de 500  $\text{mg kg}^{-1}$ .

Il existe deux exceptions à ce cadre réglementaire européen. La première concerne les produits issus de l'agriculture biologique qui disposent d'une réglementation particulière. Seul le nitrite de sodium (E250) et le nitrate de potassium (E252) sont autorisés pour ces produits. Le règlement (CE) 889/2008<sup>30</sup> prévoit dans les produits à base de viande, une dose indicative d'incorporation de 80 mg kg<sup>-1</sup> et une dose réglementaire résiduelle de 50 mg kg<sup>-1</sup>. La réglementation adoptée par le Danemark est la deuxième exception (Adler-Nissen et al., 2014). Ce pays a retenu une dose d'incorporation de 60 mg kg<sup>-1</sup> de nitrites dans les produits à base de viande traités ou non thermiquement et dans les produits à base de viande saumurés de manière traditionnelle. Cependant, la réglementation danoise prévoit des exceptions à cette dose de 60 mg kg<sup>-1</sup> autorisant dans certains produits des teneurs maximales de 100 ou 150 mg kg<sup>-1</sup>, ou au contraire interdisant leur utilisation dans les boulettes de viande et pâté de foie traditionnels danois (décision UE 2021/741)<sup>31</sup>. La dérogation accordée au Danemark est régulièrement réévaluée par la Commission sur la base de la transmission de données relatives à la consommation et les importations de produits carnés, l'exposition aux nitrites, l'analyse des nitrites dans les produits carnés et la prévalence du botulisme<sup>32</sup>.

En France, les entreprises se réfèrent au « Code des usages de la charcuterie, de la salaison et des conserves de viande » établi par les professionnels. Ce document fixe les règles de composition pour 450 produits. Il permet de gérer les dénominations de vente et sert de base de contrôle aux autorités, en particulier pour ce qui concerne la conformité des produits aux usages. La version en cours de ce document (en date de 2017) fournit des indications sur les teneurs en nitrites pour 12 catégories de produits différents. Pour la plupart, les teneurs en nitrites sont plus basses que celles préconisées par le règlement européen (CE) n°1333/2008. Les informations fournies au cours des auditions réalisées dans le cadre de cette saisine indiquent que ce Code des usages est en cours de révision et que les teneurs recommandées seraient revues à la baisse.

**Tableau 5. Doses maximales d'emploi ou résiduelles (marquées par un astérisque) en nitrites et nitrates (exprimées en NaNO<sub>2</sub> ou en NaNO<sub>3</sub>) dans différentes catégories d'aliments selon la réglementation européenne (règlement (CE) n°1333/2008)**

Catégorie de produit	Dose maximale d'emploi ou résiduelle (*) mg kg <sup>-1</sup>		Restriction/exception
	Nitrites	Nitrates	
Fromages affinés	x	150	Uniquement fromage à pâte dure, semi-dure et semi-molle
Fromages de lactosérum	x	150	Uniquement lait de fromagerie pour fromage à pâte dure, semi-dure et semi-molle
Produits fromagers (à l'exclusion des produits relevant de la catégorie 16)	x	150	Uniquement produits affinés à pâte dure, semi-dure et semi-molle
Succédanés de produits laitiers, y compris blanchisseurs de boissons	x	150	Uniquement succédanés de fromage à base de produits laitiers
Préparations de viandes au sens du règlement (CE) no 853/2004	150	x	Uniquement lomo de cerdo adobado, pincho moruno, careta de cerdo adobada, costilla de cerdo adobada, Kasseler, Bräte, toorvorst, šašlökk, ahjupraad, kielbasa surowa biała, kielbasa surowa metka et tatar wołowy (danie tatarskie)
Produits à base de viande non traités thermiquement	150	150	

<sup>30</sup> RÈGLEMENT (CE) No 889/2008 de la Commission du 5 septembre 2008 portant modalités d'application du règlement (CE) No 834/2007 du Conseil relatif à la production biologique et à l'étiquetage des produits biologiques en ce qui concerne la production biologique, l'étiquetage et les contrôles.

<sup>31</sup> DÉCISION (UE) 2021/741 de la Commission du 5 mai 2021 relative aux dispositions nationales notifiées par le Danemark concernant l'adjonction de nitrites à certains produits à base de viande.

<sup>32</sup> Décision (UE) 2018/702 de la Commission du 8 mai 2018 relative aux dispositions nationales notifiées par le Danemark concernant l'adjonction de nitrites à certains produits à base de viande.

Produits à base de viande traités thermiquement - non stérilisés	150	x	
Produits à base de viande traités thermiquement - stérilisés	100	x	
Produits traditionnels saumurés par immersion	175 *	250 *	Uniquement Wiltshire bacon et produits similaires : une saumure est injectée dans la viande qui est ensuite immergée dans la saumure pendant 3 à 10 jours. La saumure contient aussi des cultures microbiologiques à usage de levain.
Produits traditionnels saumurés par immersion	100 *	250 *	Uniquement Wiltshire ham et produits similaires : une saumure est injectée dans la viande qui est ensuite immergée dans la saumure pendant 3 à 10 jours. La saumure contient aussi des cultures microbiologiques à usage de levain.
Produits traditionnels saumurés par immersion	175 *	250 *	Uniquement entremada, entrecosto, chispe, orelheira e cabeça (salgados), toucinho fumado et produits similaires : immersion dans la saumure pendant 3 à 5 jours. Les produits ne subissent pas de traitement thermique et présentent une activité de l'eau (aW) élevée.
Produits traditionnels saumurés par immersion	50 *	10 *	Uniquement cured tongue: immersion dans la saumure pendant au moins 4 jours et pré cuisson.
Produits traditionnels saumurés par immersion	150	300	Uniquement kylmäsavustettu poronliha/kallrökt renkött: une saumure est injectée dans la viande qui est ensuite immergée dans la saumure. Le saumurage dure de 14 à 21 jours et est suivi d'une maturation avec fumage à froid pendant 4 à 5 semaines.
Produits traditionnels saumurés par immersion	150	250	Uniquement bacon, filet de bacon et produits similaires : le produit est immergé dans la saumure pendant 4 à 5 jours à une température de 5 à 7 °C, soumis à une maturation habituellement pendant 24 à 40 heures à une température de 22 °C, éventuellement fumé pendant 24 heures à une température de 20 à 25 °C et entreposé pendant 3 à 6 semaines à une température de 12 à 14 °C.
Produits traditionnels saumurés par immersion	50 *	250 *	Uniquement Rohschinken, nassgepökelt et produits similaires : la durée de saumurage dépend de la forme et du poids des morceaux de viande et s'élève approximativement à 2 jours/kg ; vient ensuite la stabilisation/maturation.
Produits traditionnels traités en salaison sèche	175 *	250 *	Uniquement dry cured bacon et produits similaires : salaison à sec suivie d'une maturation pendant au moins 4 jours.
Produits traditionnels traités en salaison sèche	100*	250 *	Uniquement dry cured ham et produits similaires: salaison à sec suivie d'une maturation pendant au moins 4 jours.
Produits traditionnels traités en salaison sèche	100 *	250 *	Uniquement jamón curado, paleta curada, lomo embuchado y cecina et produits similaires : salaison à sec suivie d'une période de stabilisation d'au moins 10 jours et d'une période de maturation supérieure à 45 jours.
Produits traditionnels traités en salaison sèche	100 *	250 *	Uniquement presunto, presunto da pá et paio do lombo et produits similaires : salaison à sec pendant 10 à 15 jours suivie d'une période de stabilisation de 30 à 45 jours et d'une période de maturation d'au moins 2 mois.
Produits traditionnels traités en salaison sèche	x	250 *	Uniquement jambon sec, jambon sel et autres pièces maturées séchées similaires : salaison à sec pendant 3 jours + 1 jour/kg suivie d'une semaine de post-salaison et d'une période de maturation/affinage de 45 jours à 18 mois.
Produits traditionnels traités en salaison sèche	50 *	250 *	Uniquement Rohschinken, trockengepökelt et produits similaires : la durée de salaison dépend de la forme et du poids des morceaux de viande et elle est approximativement de 10 à 14 jours; vient ensuite la stabilisation/maturation.
Autres produits saumurés de manière traditionnelle	50 *	250 *	Uniquement Rohschinken, trocken-/nassgepökelt et produits similaires : salaisons à sec et par immersion utilisées en combinaison (sans injection de saumure). La durée de salaison dépend de la forme et du poids des morceaux de viande et elle est approximativement de 14 à 35 jours ; vient ensuite la stabilisation/maturation.
Autres produits saumurés de manière traditionnelle	50 *	10 *	Uniquement jellied veal et brisket: une saumure est injectée dans la viande qui, après une période minimale de 2 jours, est cuite dans de l'eau bouillante pendant 3 heures au maximum.
Autres produits saumurés de manière traditionnelle	x	300	Uniquement Rohwürste (Salami et Kantwurst): le produit a une période minimale de maturation de 4 semaines et un rapport eau/protéines inférieur à 1,7.

Autres produits saumurés de manière traditionnelle	x	250	Uniquement salchichón y chorizo tradicionales de larga curación et produits similaires : période de maturation d'au moins 30 jours.
Autres produits saumurés de manière traditionnelle	180	x	Uniquement vysočina, selský salám, turistický trvanlivý salám, poličan, herkules, lovecký salám, dunajská klobása, paprikáš et produits similaires : cuisson du produit sec à 70 °C, suivie d'un processus de séchage et de fumage de 8 à 12 jours. Les produits fermentés sont soumis à un processus de fermentation en trois étapes de 14 à 30 jours, suivi du fumage.
Autres produits saumurés de manière traditionnelle	x	250	Uniquement saucissons secs et produits similaires : saucissons sans ajout de nitrites, crus, fermentés et séchés. Le produit fermente à une température de 18 à 22 °C ou inférieure (10 à 12 °C) et a une période de maturation/d'affinage d'au moins 3 semaines. Le produit a un rapport eau/protéines inférieure à 1,7.
Poisson et produits de la pêche transformés, y compris mollusques et crustacés	x	500	Uniquement harengs au vinaigre et sprats

\*Dose résiduelle maximale : teneur en résidus à la fin du processus de production, exprimée en NaNO<sub>2</sub> ou en NaNO<sub>3</sub> d'après le règlement (CE) No 1333/2008 annexe II partie E.

X : usage non autorisé

### 8.1.2. Données de l'observatoire de la qualité des aliments concernant l'usage des nitrates et des nitrites en tant qu'additifs

Les données collectées par l'Observatoire de la qualité des aliments (Oqali) permettent d'établir un état des lieux descriptif des fréquences de présence des additifs alimentaires dans les produits transformés. Les données de l'observatoire publiées en 2019 montrent une large gamme d'aliments concernés par l'usage des nitrites et nitrates (Aurore A. Coudray et al., 2019). Les nitrites et nitrates de sodium et de potassium sont retrouvés dans dix des 30 secteurs étudiés par l'observatoire : les charcuteries et les salaisons, les produits de type « *snacking* surgelé », les produits traiteurs frais, les plats cuisinés appertisés, les plats cuisinés frais et les plats cuisinés surgelés. Parmi ces différents secteurs, les produits de charcuterie, de salaison et les conserves de viande présentent le plus fort pourcentage d'utilisation (71% des produits de charcuterie et de salaison sont concernés). Les autres produits sont concernés à des degrés moindres. On retrouve notamment les additifs nitrités dans les aliments composés (pizzas, plats cuisinés) en raison de la présence dans la recette de produits de charcuterie contenant ces additifs.

Au sein du secteur de la charcuterie et de la salaison, l'Oqali recense la fréquence d'utilisation des nitrites et nitrates pour 33 catégories de produits. L'annexe 4 rapporte les pourcentages d'utilisation des nitrites et nitrates pour ces catégories (et les catégories associées telles que définies par les professionnels dans le Code des usages).

Il est à noter que la base de données de l'Oqali ne couvre pas l'ensemble des produits de charcuterie, de salaison et des conserves de viande. Quatre catégories de produits (andouilles/andouillettes, les produits à base de tête, les conserves de viande de bœuf et le foie gras) parmi les douze catégories d'intérêt du Code des usages, ne sont pas prises en compte dans cette étude. Les données de vente de produits indiquent toutefois que ces produits sont moins consommés que les catégories suivies par Oqali.

Selon le règlement européen (CE) n°1333/2008, l'usage des nitrates en tant qu'additifs est autorisé dans la seule catégorie de fromages de type Edam, Gouda et mimolette. D'après les données de l'Oqali seuls 27% des produits de cette catégorie mis sur le marché sont concernés par l'usage des nitrates.

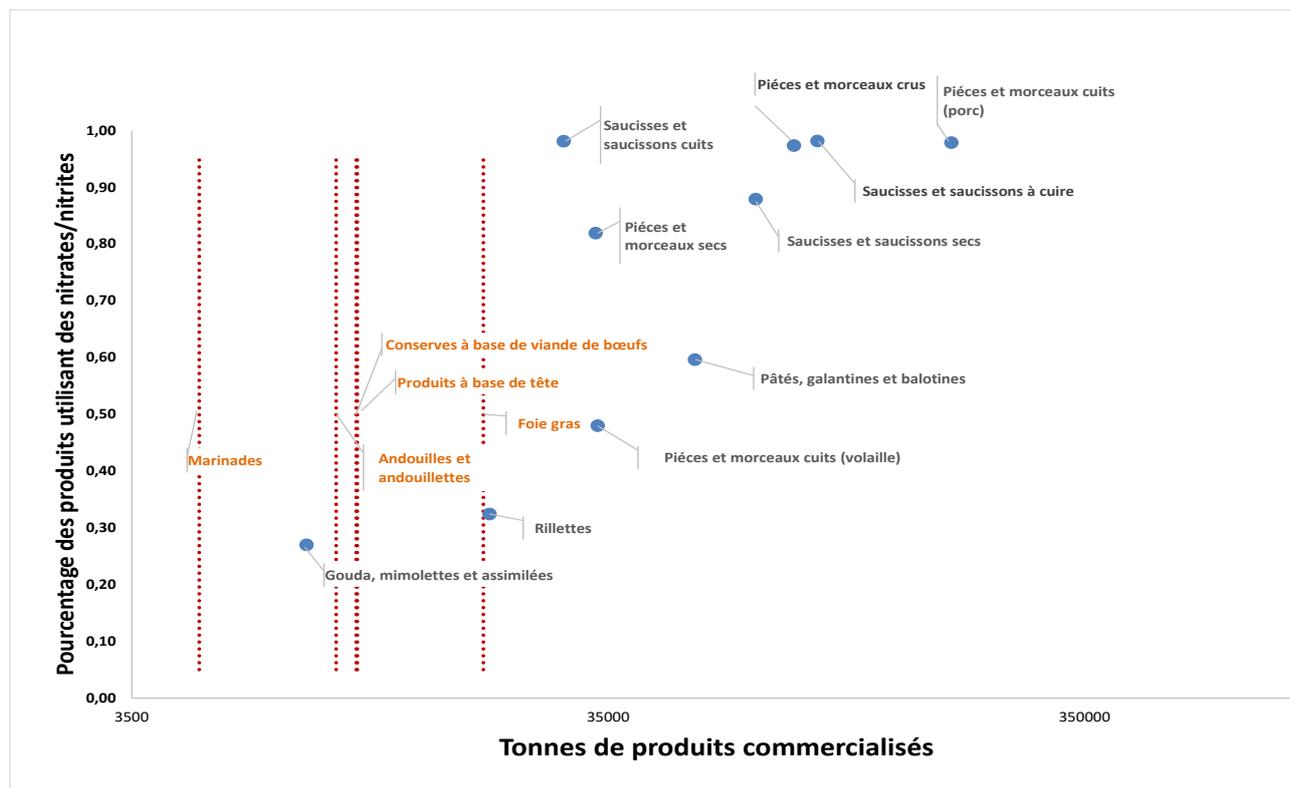


Figure 7. Volume de vente annuel des différentes catégories de produits de charcuterie, de salaison et des conserves de viandes (d'après (FranceAgriMer 2019)) et proportion de produits concernés par les nitrites ou nitrates en tant qu'additifs alimentaires (d'après (INRA et ANSES 2019)) (en rouge produits pour lesquels la proportion de produits concernés par l'usage des nitrites/nitrates est inconnue)

La Figure 7 représente le pourcentage de produits utilisant des nitrates/nitrites en fonction de la part de marché pour les catégories de produits utilisant ces additifs. Si l'on considère les volumes de ventes et le niveau d'utilisation des nitrites et nitrates, les principales catégories de produits concernées sont les « pièces et morceaux cuits », « saucisses et saucissons à cuire », les « pièces et morceaux crus » et les « saucisses et saucissons secs ».

**Bilan sur les nitrites et nitrates de sodium et potassium comme additifs alimentaires**

Les doses maximales d'emploi ou résiduelles des sels de nitrite et nitrate dans les aliments (en particulier, produits de viande non cuits, produits cuits, produits de charcuterie, fromages, harengs au vinaigre) sont fixées par le règlement européen (CE) n°1333/2008. Les produits biologiques ont une réglementation particulière. En France le Code des usages établi par les professionnels préconise des teneurs plus basses de 20% par rapport au règlement européen et celles-ci sont en cours de révision à la baisse.

D'après les données de la base Oqali donnant la fréquence d'utilisation des nitrites par catégories de produits et les informations de tonnages de produits commercialisés pour chacune de ces catégories, il s'avère que les pièces et morceaux cuits (porcs), les saucisses et saucissons à cuire, les pièces et morceaux crus et les saucisses et saucissons secs seraient les quatre catégories de produits les plus concernées par un éventuel impact d'une modification des niveaux de nitrites sur le risque microbiologique.

**8.1.3. Effet antimicrobien des nitrites et nitrates utilisés comme additifs dans les principales catégories de produits alimentaires***Mode d'action des dérivés du nitrite sur les bactéries*

Le nitrite ajouté dans un milieu de culture ou dans un produit carné va subir différentes réactions chimiques d'oxydoréduction en fonction des propriétés physicochimiques du milieu et de la nature des molécules présentes (Honikel, 2008; Majou and Christieans, 2018; Skibsted, 2011). Ces réactions vont conduire, entre autres, à la formation de monoxyde d'azote  $\text{NO}^\circ$ , molécule radicalaire, un gaz liposoluble traversant facilement les membranes cellulaires.

La présence d'un électron non apparié confère au  $\text{NO}^\circ$  une forte réactivité avec de nombreuses molécules organiques et inorganiques. Le  $\text{NO}^\circ$  réagit ainsi avec le dioxygène  $\text{O}_2$  ou avec des espèces réactives de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*) comme l'ion superoxyde  $\text{O}_2^{\circ-}$  pour former des espèces réactives de l'azote (ERA, RNS reactive nitrogen species) (Jones et al., 2010; Robinson and Brynildsen, 2013).

Ces ERA sont notamment le dioxyde d'azote ( $\text{NO}_2$ ), l'anhydride nitreux ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) et l'ion peroxyntrite ( $\text{ONOO}^\circ$ ). Elles peuvent être produites dans la cellule bactérienne, comme montré chez *Escherichia coli* cultivé en milieu de laboratoire en présence d'un donneur de  $\text{NO}^\circ$  (Figure 8) (Robinson and Brynildsen, 2013)). Elles peuvent aussi être formées dans le milieu, comme dans les produits carnés traités au sel nitrité (Honikel, 2008; Skibsted, 2011) puis diffuser dans la cellule bactérienne (Majou and Christieans, 2018).

Les ERA interagissent avec une multitude de cibles cellulaires bactériennes, notamment les métaux de transition et clusters fer-soufre, les thiols, les tyrosines ou encore l'ADN (Robinson and Brynildsen, 2013). Nous donnerons ici quelques exemples.

- Réaction avec les métaux de transition et clusters fer-soufre

Le  $\text{NO}^\circ$  peut se fixer au fer formant un complexe inactif métal nitrosyl DNIC (*dinitrosyl-iron complex*). Il se lie de façon réversible au fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ou au fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) avec une affinité plus importante pour le fer ferreux (Cooper, 1999).

Lorsque le groupement fer auquel se lie le  $\text{NO}^\circ$  est associé à une protéine hémique, le  $\text{NO}^\circ$  fragilise la liaison de l'hème au squelette peptidique et induit sa libération contribuant à l'effet

bactériostatique (Ren et al., 2008). C'est un inhibiteur de nombreuses métalloprotéines comme les cytochrome P450, les catalases, ... (Cooper, 1999; Pacher et al., 2007).

A titre d'exemple, le NO° inhibe la chaîne respiratoire des bactéries en se fixant de façon réversible sur l'hème de la cytochrome-oxydase, cytochrome bo et bd chez *E. coli* (Figure 8) (Giuffrè et al., 2012). Cette enzyme a plusieurs fonctions biologiques ; son inhibition bloque la croissance de *E. coli* (Cooper, 2002; Giuffrè et al., 2012).

Le NO° a également la capacité de se lier aux centres fer-soufre des protéines (Figure 8). Il perturbe la configuration spatiale des clusters fer-soufre de certaines enzymes en formant un complexe métal nitrosyl DNIC ou une formation dimérique de DNIC (*Roussin's red ester, RRE*) inhibant ainsi leur activité (Lu et al., 2008; Ren et al., 2008; Robinson and Brynildsen, 2013). A titre d'exemple, la dihydroxyacide déshydratase (IlvD), essentielle pour la synthèse des acides aminés à chaîne latérale, est inactivée en présence de NO° avec la formation concomitante de IlvD-DNIC (Ren et al., 2008). De même, en agissant sur le cluster fer-soufre, le NO° inhibe l'aconitase du cycle de Krebs dans les cellules, comme cela a été montré chez *Burkholderia mallei*, entraînant un effet antimicrobien vis-à-vis de cette bactérie pathogène (Jones-Carson et al., 2008).

Le NO° perturbe l'homéostasie du fer ; il se lie au fer du régulateur transcriptionnel Fur impliqué dans l'acquisition et l'utilisation du fer (Spiro, 2006).

- Réaction avec les noyaux aromatiques

La présence de NO° peut engendrer la nitration de noyaux aromatiques. La tyrosine peut être oxydée en radical tyrosyl (Tyr) par des radicaux tels que NO<sub>2</sub>° puis ce radical Tyr va interagir avec NO° ou NO<sub>2</sub>° pour former les composés 3-nitrosotyrosine et 3-nitrotyrosine respectivement (Figure 8) (Alvarez and Radi, 2003). Cette nitration peut affecter un acide aminé libre ou sous forme de résidu, intégré dans une chaîne polypeptidique, modifiant alors la structure et/ou le fonctionnement de ces protéines. A titre d'exemple, les ERA vont interagir avec le résidu tyrosine des enzymes impliquées dans diverses voies enzymatiques telles que la glutamine synthase, la succinyl CoA transférase, la superoxyde dismutase, la nicotinamide nucléotide transhydrogénase, la ribonucléotide réductase, la glutathione réductase et inhiber leur activité (Alvarez and Radi, 2003; Radi, 2018). La nitration de ces complexes enzymatiques va conduire à l'inhibition d'un très grand nombre de processus physiologique et est à ce titre considérée comme une des voies principales de la toxicité de NO° et des ERA.

- Réaction avec les thiols

Une exposition au NO° entraîne des modifications des groupements thiols des résidus cystéines par une réaction de S-nitrosation pour former des composés S-nitrosothiols (RSNO) et des radicaux thiyl RS° (Seth et al., 2012; Smith and Marletta, 2012). Les RSNO peuvent être générés par différentes réactions dont la principale est celle entre les composés NO<sub>2</sub> et N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et le groupement thiol (Figure 8). Les thiols tels que le glutathion (GSH) chez *E. coli* peut servir de protection contre les ERA mais la modification des thiols liés aux protéines peut affecter cette fonction (Ford et al., 2002). Parmi les enzymes affectées par la S-nitrosation, on peut citer la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase, la parkin, la tyrosine phosphatase, la glutamine synthétase... (Alvarez and Radi, 2003).

- Réaction avec les acides nucléiques

Les ERA peuvent également causer des dommages à l'ADN ; on distingue trois types de mécanismes :

- une altération directe de la structure (oxydation, nitration, désamination, coupure simple ou double brins) ;
- une inhibition de la réparation de l'ADN ;
- une augmentation de la génération d'agents génotoxiques, comme l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou les agents alkylants, qui forment des liaisons covalentes avec les nucléotides de la chaîne ADN, inhibant ainsi la réplication (Szabó et al., 2007; Wink et al., 1991).

Le N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> induit une désamination des cytosines, adénines et guanines conduisant à des mutations et des cassures des brins (Wink et al., 1991) (Figure 8). Le peroxy-nitrite et le dioxyde d'azote NO<sub>2</sub> induisent entre autres des ruptures des brins d'ADN ou la formation de sites AP (apurinique/apirimidique) (Juedes and Wogan, 1996). Le peroxy-nitrite peut engendrer une oxydation du désoxyribose et des cassures simples brins (Burney et al., 1999).

#### **En conclusion :**

**Les flux d'espèces réactives de l'azote (ERA) induits par l'ajout de nitrite vont réagir avec un très grand nombre de cibles cellulaires bactériennes. Ce stress nitrosant et oxydant va conduire à l'altération de la structure de nombreuses biomolécules (ADN, protéines, ...). L'effet bactéricide /bactériostatique des ERA s'explique ainsi par l'inhibition de nombreuses fonctions physiologiques liées au métabolisme et à la croissance des bactéries (Szabó et al., 2007).**

#### *Les mécanismes de défenses des bactéries*

Les bactéries ont développé plusieurs types de réponses complexes et spécifiques à la présence des ERA, en particulier des facteurs de transcription senseurs de NO tels que NorR, SoxR, FNR, ou senseurs de nitrosothiols (OxyR), qui régulent l'expression de gènes codant des systèmes enzymatiques de détoxification (Spiro, 2006).

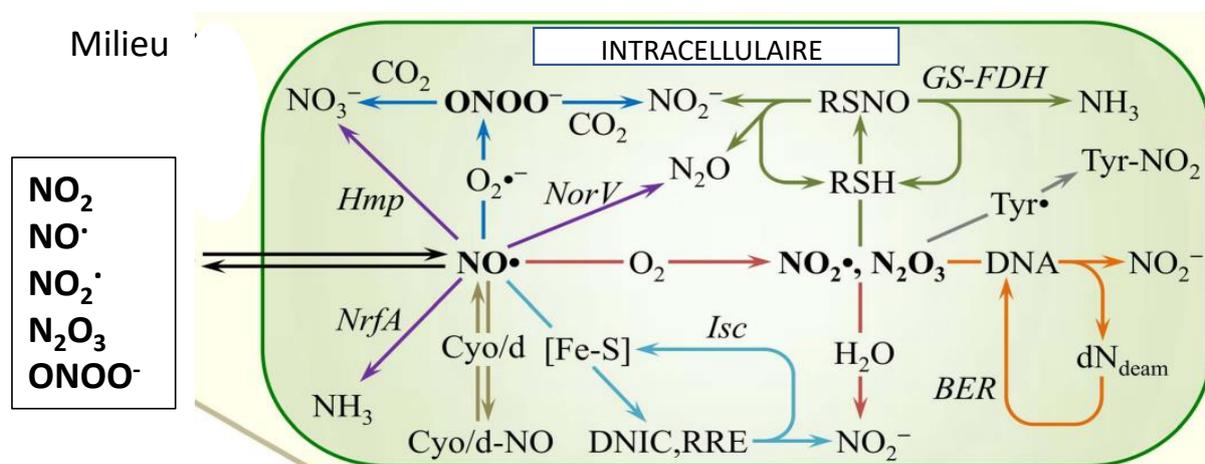
L'un des systèmes de détoxification du NO° le mieux caractérisé est la flavohémoglobine Hmp. Elle a été identifiée chez plusieurs bactéries pathogènes, telles que *E. coli* (Hausladen et al., 1998), *Salmonella* Typhimurium (Bang et al., 2006), et *Staphylococcus aureus* (Richardson et al., 2006) Elle n'est pas décrite chez *L. monocytogenes* et *C. botulinum* (Majou and Christieans, 2018). C'est une NO dioxygénase (EC 1.14.12.17) codée par le gène *hmpA* dont l'expression est induite en réponse à la présence de NO°, de NO<sub>2</sub> et de NO<sub>3</sub>. Hmp joue un rôle important dans la résistance au NO° en conditions aérobies en catalysant l'oxydation du NO° en nitrate mais elle peut aussi fonctionner en anaérobiose et réduire le NO° en N<sub>2</sub>O (Gardner and Gardner, 2002).

*E. coli* et *Salmonella* possèdent une nitrite réductase périplasmique NrfA (EC 1.7.2.2) impliquée dans la production de NH<sub>3</sub> à partir de NO° (Einsle et al., 2002; Robinson and Brynildsen, 2013). Ces deux espèces ont un autre système de détoxification du NO°: le complexe NorVW (flavorubrédoxines) qui a une activité NO° réductase (EC 1.18.98) permettant la réduction du NO° en oxyde nitreux (Robinson and Brynildsen, 2013). C'est une activité sensible à l'oxygène (Gardner and Gardner, 2002). *S. aureus* possède une NO réductase, ce qui ne semble pas être le cas pour *L. monocytogenes* et *C. botulinum* (Majou and Christieans, 2018) (Tableau 6).

Tableau 6 : réponse des bactéries à un stress oxydant/nitrosant généré par l'ajout de  $\text{NO}_3/\text{NO}_2$  dans les produits carnés (d'après Majou et Christieans, 2018)

	NARED	NIRED	NOR	SOD	CAT
<i>Salmonella</i> spp.	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	-	- ?	- ?	+	+
<i>C. botulinum</i>	-	+	- ?	+	-

D'autres mécanismes de résistance peuvent être mis en jeu, comme les systèmes Isc ou Suf impliqués dans la réparation des clusters fer-soufre des protéines ou la voie BER (*Base Excision Repair*) mettant en jeu plusieurs enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN chez *E. coli* (Robinson and Brynildsen, 2013). Chez *S. aureus*, il existe aussi des systèmes de réparation des clusters fer-soufre des protéines, tel que ScdA (Majou and Christieans, 2018).

Figure 8. Schéma simplifié du réseau des réactions intracellulaires d'une culture de *E. coli* en présence de monoxyde d'azote. D'après (Robinson and Brynildsen, 2013).

Les éléments en caractères gras représentent  $\text{NO}^\bullet$  et ses formes réactives d'azote. Les éléments en caractère italique indiquent les enzymes impliquées dans les voies. Les flèches violettes représentent la détoxification enzymatique du  $\text{NO}^\bullet$  par l'*Escherichia coli* flavohaemoglobine (Hmp), par l'oxyde nitrique réductase flavorubredoxine anaérobie (NorV) et par le Cytochrome c-552 nitrite réductase (NrfA). Les flèches rouges représentent l'auto-oxydation du  $\text{NO}^\bullet$  en  $\text{NO}_2^\bullet$  et en  $\text{N}_2\text{O}_3$ . Les flèches bleues indiquent la voie de la formation de  $\text{ONOO}^-$  et sa dégradation, les beiges l'inhibition des cytochromes, les bleues claires la nitrosylation des cluster Fe-S et leur réparation par des protéines d'échafaudage pour l'assemblage de ces clusters (Isc). Les flèches vertes indiquent la voie pour la nitrosation des composés soufrés et la denitrosation catalysée par le formaldéhyde déshydrogénase dépendante du glutathion (GS-FDH). Les flèches grises représentent la voie de la nitration de la tyrosine et les oranges la déamination de l'ADN et sa réparation par le système de réparation des bases par excision (BER).

### Conclusions relatives aux éléments clés sur le rôle du nitrite

**Le nitrite ajouté dans un produit carné subit diverses réactions chimiques pouvant conduire entre autres à la formation de monoxyde d'azote  $\text{NO}^\bullet$ .**

**Le NO° est une molécule radicalaire qui réagit avec le dioxygène O<sub>2</sub> ou des dérivés comme l'ion superoxyde O<sub>2</sub><sup>-</sup> pour former des espèces réactives de l'azote (ERA). Les ERA interagissent avec une multitude de cibles cellulaires bactériennes, notamment les métaux de transition et les associations clusters fer-soufre, les thiols, les tyrosines et l'ADN. Le stress nitrosant induit par les ERA va altérer la structure et le fonctionnement des principaux constituants/processus cellulaires conduisant à un effet bactéricide. Les bactéries possèdent un ensemble de systèmes complexes et spécifiques, mais plus ou moins efficaces, de réponse et de résistance au stress NO° ; elles sont donc plus ou moins sensibles à l'effet bactéricide des ERA.**

*Effets observés des nitrites et des nitrates au cours de « tests d'épreuves »*

Plusieurs outils peuvent être utilisés pour suivre l'altération et la sécurité microbiologique des aliments au cours du procédé de fabrication et de leur conservation. Les tests de vieillissement permettent de suivre l'évolution des micro-organismes dans des aliments naturellement contaminés. Ils consistent à réaliser des dénombrements à différents temps lors de la fabrication et/ou la conservation des produits. Les « tests d'épreuve » ou « *challenge-tests* » microbiologiques permettent de déterminer la capacité d'un aliment ou d'un procédé à favoriser la croissance ou l'inactivation des micro-organismes d'altération ou des pathogènes inoculés en début d'expérimentation (Bergis et al., 2019). Ces tests sont reconnus comme plus performants que les tests de vieillissement car les micro-organismes d'intérêt sont inoculés à des niveaux choisis et maîtrisés, qui peuvent être supérieurs à ceux retrouvés lors d'une contamination naturelle.

Ce choix est guidé par la limite de quantification et de détection des méthodes analytiques utilisées pour suivre l'évolution des micro-organismes. En travaillant avec des niveaux d'inoculation plus faibles que la limite de détection, l'estimation de la phase de latence est plus difficile. Les résultats des *challenge-tests* établis avec des niveaux de contamination supérieurs à la limite de détection fournissent des résultats mesurables. La vitesse de croissance ou le potentiel de croissance (différence entre le niveau final et le niveau initial de contamination) estimées dans ces conditions sont directement exploitables car la vitesse de croissance exponentielle ne dépend pas de l'inoculum de départ.

La littérature scientifique et plusieurs rapports techniques permettent de quantifier l'effet des nitrites sur les bactéries pathogènes dans les aliments.

- Nitrites et nitrates dans les produits à base de viande
  - Effets des nitrites et nitrates vis-à-vis des bactéries pathogènes dans les produits à base de viande

Le nitrate, employé seul aux concentrations utilisées dans les produits carnés, n'a pas d'effet bactéricide sur les bactéries pathogènes (Majou and Christieans, 2018).

❖ *Salmonella* spp.

Deux études ont été réalisées sur des saucissons inoculés par *Salmonella enterica* serovar Typhimurium à un niveau de 2,5-3 log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup> et fabriqués avec la dose maximale autorisée (selon la réglementation européenne) de nitrate de sodium et de nitrite de sodium (150 mg kg<sup>-1</sup> de chaque additif) ou la moitié de cette dose (75 mg kg<sup>-1</sup> de chaque additif (Christieans et al., 2018; Hospital et al., 2014). En l'absence de ces additifs, une croissance de 2 à 2,5 log<sub>10</sub> de la population bactérienne est observée pendant la phase de fermentation, suivie d'une inactivation pendant la phase de maturation et de stockage, mais cette décroissance est insuffisante pour éliminer totalement ces bactéries. En présence d'un mélange de nitrate et de nitrite, dès la dose de 75 mg kg<sup>-1</sup> de chaque additif, la croissance de *Salmonella* est faible (1 log) ou inexistante, puis une diminution de la population est observée pendant la phase de

maturation. *Salmonella* devient indétectable dans le produit après un stockage de 55 jours ( $a_w$  0,86 et pH 4,8) (Hospital et al., 2014) ou de 90 jours ( $a_w$  0,80 et pH 5,3) (Christieans et al., 2018).

Des tests de croissance dans des chorizos inoculés avec des *Salmonella* spp. ( $a$  2,5  $\log_{10}$  UFC  $g^{-1}$ ) ont montré une croissance de 1  $\log_{10}$  pendant la phase d'étuvage/fumage dans les témoins sans nitrate/nitrite, suivie d'une réduction de 4  $\log_{10}$  du nombre de bactéries en fin de procédé (30 jours,  $a_w$  0,81, pH 5,8). En présence de 150  $mg\ kg^{-1}$  de nitrite ou de 75  $mg\ kg^{-1}$  de nitrate et de 75  $mg\ kg^{-1}$  de nitrite, une absence de croissance est constatée pendant la fermentation ainsi qu'une réduction entre 5 et 6  $\log_{10}$  du nombre de *Salmonella* spp. en fin de procédé (Patarata et al., 2020).

#### ❖ *Staphylococcus aureus*

Des résultats variables sont rapportés dans la littérature concernant l'inhibition de *S. aureus* par les nitrites dont l'effet dépend des combinaisons avec d'autres facteurs (pH, disponibilité en oxygène,  $a_w$ , température) (Majou and Christieans, 2018).

#### ❖ *Listeria monocytogenes*

L'effet des nitrites vis-à-vis de *Listeria* (*L. innocua*, *L. monocytogenes*) a été testé dans des saucissons secs (Christieans et al., 2018; Hospital et al., 2012). En absence de nitrate et de nitrite, les deux espèces de *Listeria* se multiplient pendant la fermentation, puis leurs populations diminuent faiblement pendant la maturation. En présence d'un mélange de nitrate et de nitrite, la population de *L. innocua* ensemencé à un niveau de 5  $\log_{10}$  UFC  $g^{-1}$  diminue dès l'étuvage et une réduction de 2,5  $\log_{10}$  est atteinte en fin de maturation en présence de nitrate et de nitrite chacun à une concentration de 150  $mg\ kg^{-1}$  alors qu'une réduction d'1  $\log$  est notée en présence de concentrations de 112  $mg\ kg^{-1}$  de chaque additif  $NaNO_3$  et  $NaNO_2$  (Hospital et al., 2012). Dans les saucissons ensemencés avec *L. monocytogenes* à un niveau de 2  $\log_{10}$  UFC  $g^{-1}$ , l'ajout de 120 ou 80  $mg\ kg^{-1}$  de nitrate et de nitrite respectivement, empêche la croissance microbienne. De plus, une diminution de la population est observée 20 jours après la fin de la fabrication. En fin de stockage (90 jours), *L. monocytogenes* n'est plus détectée uniquement quand les saucissons ont été fabriqués avec au minimum 120  $mg\ kg^{-1}$  des deux additifs (Christieans, 2014; Christieans et al., 2018). Ces résultats ont conduit à une adaptation du Code des usages qui préconise actuellement d'ajouter 120  $mg\ kg^{-1}$  d'additif nitrite et nitrate au lieu de 150  $mg\ kg^{-1}$  (ADIV-FICT, 2014).

Dans les produits cuits tranchés (jambon, saucisson cuit, etc.) qui favorisent la croissance de *L. monocytogenes*, les concentrations en nitrite utilisées dans les produits (cf. Tableau 3) sont inférieures à la concentration minimale inhibitrice (estimée à 350  $mg\ kg^{-1}$ ) et ne permettent que de ralentir la vitesse de croissance (Mejlholm et al., 2010).

#### ❖ *Clostridium botulinum*

Le potentiel bactériostatique du nitrite contre *C. botulinum* est reconnu (Sofos et al., 1979). Son effet dépend de l'interaction entre le nitrite et divers facteurs tels que le pH, le sel, l' $a_w$ , la température (traitement thermique), le taux de spores et le microbiote présent, qui constituent des barrières additionnelles.

Les principaux groupes de *C. botulinum* impliqués dans les cas de botulisme humain présentent des différences de croissance et d'inactivation (Anses, 2021) :

- a. le groupe I protéolytique (toxines botuliques A, B, F) dont les spores sont résistantes à la chaleur ( $D_{121}^{33} = 0,21\text{min}$ ) et peuvent germer et proliférer à une  $a_w > 0,94$  (10% NaCl) et  $\text{pH} > 4,6$  ;
- b. le groupe II non protéolytique (toxines botuliques B, E, F) dont les spores sont sensibles à la chaleur ( $D_{80} = 0,6-1,25\text{ min}$ ), et peuvent germer et proliférer à une  $a_w > 0,97$  (5% NaCl) et  $\text{pH} > 5,0$ .

Les spores du groupe II peuvent se développer à partir de  $2,5^\circ\text{C}$  ce qui n'est pas le cas des souches protéolytiques (Anses, 2019). Il a été montré qu'un chauffage à  $+85^\circ\text{C}$  pendant moins d'une minute ne permet pas d'assainir suffisamment divers produits carnés (saucisses de type Wiener ou Bologne, jambon cuit)ensemencés avec des spores de *C. botulinum* du groupe II (Keto-Timonen et al., 2012).

La toxine botulique de type B est produite pendant le stockage à  $+8^\circ\text{C}$  dans les produits sans nitrite alors qu'aucune toxine n'est présente dans les produits préparés avec 75 ou 120  $\text{mg kg}^{-1}$  de nitrite au cours des 5 semaines de stockage.

Lebrun *et al.* (2020) ont inoculé du jambon de porc avec un mélange de spores de 3 souches de *C. botulinum* groupe II type B à un niveau de  $3,5 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ . Ce jambon a été préparé sans ou avec nitrite (doses de 30, 60 ou 80  $\text{mg kg}^{-1}$ ) et du NaCl (12 à 19  $\text{g kg}^{-1}$ ) et a été traité thermiquement (durant 520 minutes pour atteindre  $+67^\circ\text{C}$  à cœur). Ce jambon a été conservé 14 jours à  $+4^\circ\text{C}$ , puis une rupture de la chaîne du froid a été imposée (1 h à  $+20^\circ\text{C}$ ) suivie d'une conservation 20 ou 33 jours à  $+8^\circ\text{C}$ . Des concentrations de  $\text{NaNO}_2$  à plus de 30  $\text{mg kg}^{-1}$  empêchent la croissance et la production de toxine par *C. botulinum* indépendamment de la concentration en sel. En revanche, l'absence de nitrite permet la croissance et la production de toxine botulique (Lebrun et al., 2020).

Le potentiel de production de toxine botulique de *C. botulinum* du groupe I inoculé dans de la viande de porc broyée a été étudié en fonction de la concentration en nitrite (100, 200 ou 300  $\text{mg kg}^{-1}$ ) et d'autres facteurs tels que le pH, la présence d'ascorbate ou le protocole de traitement thermique ( $+80^\circ\text{C}$  pendant 7 min ou 1h). La probabilité de production de la toxine décroît avec l'augmentation de la concentration en nitrite (de 76% avec 100  $\text{mg kg}^{-1}$  à 3% avec 300  $\text{mg kg}^{-1}$  pour un pH 6 et un traitement thermique court), la baisse de pH (de 79% à pH 6,5 à 25% à pH 6 pour 200  $\text{mg kg}^{-1}$  de nitrite et traitement thermique court) et la présence d'ascorbate (de 86 % sans ascorbate à 8% pour 100  $\text{mg kg}^{-1}$  de nitrite avec un traitement thermique long) (Robinson et al., 1982). Il apparaît à partir des résultats de diverses études que l'ajout de 30-100  $\text{mg kg}^{-1}$  de nitrite est nécessaire pour inhiber la croissance de *C. botulinum* ainsi que la production de toxine dans différents produits carnés traités thermiquement.

Des *challenge-tests* ont été réalisés en ensemencant des spores de *C. botulinum* (groupes I, II) ou *C. sporogenes* ( $3,5 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ ) en présence ou non de nitrate et de nitrite dans des salaisons sèches (Hospital et al., 2016; Patarata et al., 2020). Aucune germination et donc aucune production de toxine n'a été observée pour *C. botulinum* en présence ou non de nitrate et de nitrite ( $\text{pH } 5,0-5,2$  ;  $a_w 0,88-0,90$ ) (Hospital et al., 2016). Une inactivation est observée pour *C. sporogenes* jusqu'à une non détection après 15 jours de séchage en présence ou non de nitrate et de nitrite ( $a_w 0,91$  ;  $\text{pH } 5,5-5,7$ ) (Patarata et al., 2020). L'effet conjugué (ou effet

---

<sup>33</sup>  $D_{121}$ , temps de réduction décimal à  $121^\circ\text{C}$ . Il correspond à la durée de traitement thermique, exprimé généralement en minutes, nécessaire à la température T (ici  $121^\circ\text{C}$ ) pour diviser par dix la charge microbienne.

« barrière ») du pH, de l' $a_w$  et des compétitions bactériennes (bactéries lactiques entre 8-9  $\log_{10}$  UFC  $g^{-1}$ ) permet de contrôler la germination et la croissance de *Clostridium* dans les produits carnés fermentés et séchés.

- Effet des nitrates observés dans les autres matrices alimentaires
  - Rôle des nitrates dans les fromages

En fromagerie, les nitrates ont essentiellement un rôle de prévention de l'altération des fromages, notamment le gonflement (Oliveira et al., 2016) qui est principalement lié à la présence de bactéries du genre *Clostridium* (*C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*) (Ávila et al., 2014). Les nitrates sont transformés en nitrites sous l'action de nombreux micro-organismes technologiques. L'intérêt des nitrates et des nitrites (issus de la transformation des nitrates) pour la maîtrise des pathogènes dans les fromages est peu documenté. Il a été montré que l'inhibition de la croissance de *L. monocytogenes* dans des fromages à pâte pressée non cuite était majoritairement liée à la présence d'acide lactique et que les nitrites n'avaient qu'un rôle limité (réduction de moins de 20% de la vitesse de croissance) (Wemmenhove et al., 2018).

- Rôle des nitrates dans les harengs marinés

Comme dans le cas du fromage, les nitrates ajoutés aux harengs marinés sont transformés en nitrites. Le rôle de l'ajout de nitrates dans ces produits est essentiellement de prévenir l'altération des propriétés organoleptiques (Knochel and Huss, 1984).

#### **Conclusions relatives aux résultats des tests d'épreuves**

**L'impact des nitrates et des nitrites sur la croissance de bactéries pathogènes a été étudié dans des matrices alimentaires lors de tests d'épreuve (« challenge-tests »). Ceux-ci contrairement aux tests de vieillissement permettent de mesurer la vitesse de croissance ou d'inactivation de pathogènes en fonction des conditions environnementales.**

**Les tests d'épreuve effectués dans des matrices carnées montrent que les nitrates employés seuls aux concentrations utilisées dans ces matrices, n'ont pas d'effet bactéricide sur les bactéries pathogènes.**

**En revanche, d'après les tests d'épreuve étudiés, les nitrites employés seuls ou en mélange avec des nitrates ont, au-delà d'une certaine concentration, un effet inhibiteur sur la croissance de *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* et *C. botulinum*. L'effet des nitrites sur la croissance de *S. aureus* est plus variable et très dépendant des autres facteurs environnementaux (pH,  $a_w$ , température, etc.).**

**Les tests d'épreuves effectués dans d'autres types de matrices alimentaires (fromages, harengs marinés) montrent que les nitrates autorisés et les nitrites issus de leur transformation ont essentiellement un impact inhibiteur de la croissance de la flore d'altération et peu ou pas sur celle des pathogènes étudiés.**

**Les résultats présentés sont spécifiques des conditions de chaque étude et ne peuvent être généralisés à l'ensemble des couples bactérie/aliment.**

## 8.2. Sélection des couples danger-aliment pour répondre à la question 1

La méthodologie mise en place pour répondre à la question 1 de la saisine consiste à évaluer l'impact de la réduction ou du retrait des additifs nitrités sur les risques microbiologiques liés à la présence de certains pathogènes dans les produits carnés et transformés.

Compte-tenu des données d'utilisation des nitrites et nitrates et des données de production présentées sur la Figure 7, le GT NiNa a choisi de se concentrer sur les produits à base de viandes (PABV).

Or, de nombreux dangers pouvant être associés aux différentes catégories de PABV l'évaluation ne peut être réalisée pour l'ensemble des combinaisons dangers/PABV. Le GT a donc fait le choix de sélectionner un nombre restreint de couples matrice/danger pour lesquels l'impact des nitrites/nitrates sur le risque microbiologique sera évalué (section 8.3).

Le choix des couples est basé sur la liste des dangers associés aux différentes catégories de PABV (cf. section 8.1) et sur l'importance des additifs nitrités au regard d'autres leviers de maîtrise de la sécurité microbiologique des différents PABV (cf. section 8.2).

### 8.2.1. Quels dangers microbiologiques sont associés aux produits de charcuterie, de salaison et de conserves de viande ?

Le choix des couples bactérie/matrice retenus dans ce rapport pour illustrer le rôle des nitrites et nitrates vis-à-vis des bactéries pathogènes dans les produits à base de viande est basé sur le classement des couples bactérie/matrice établi dans des travaux précédents de hiérarchisation des dangers biologiques et chimiques dans les aliments (Anses, 2020a). La méthode développée au cours de ces travaux permet de définir trois classes de couples : les couples « exclus », « potentiels » ou « pertinents ».

Les couples « exclus » sont ceux pour lesquels l'aliment n'est pas issu des réservoirs connus du danger microbiologique et sans possibilité significative de contamination secondaire avant la remise au consommateur, ou ceux pour lesquels l'aliment est issu d'un procédé de fabrication comportant une étape d'assainissement sans possibilité de recontamination secondaire avant remise au consommateur.

Les couples « potentiels » sont ceux pour lesquels il existe peu ou pas de données relatives à la présence du danger dans l'aliment. Ils présentent un niveau de risque jugé faible. Contrairement aux couples pertinents, ils sont associés à un nombre très faible de malades.

Les critères permettant de définir les couples comme « pertinents » s'appuient sur (i) des données récentes concernant les épidémies à l'échelle européenne, (ii) des données issues des rapports de l'EFSA concernant les zoonoses et du bilan des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) en France (2006-2015), (iii) des données relatives aux épidémies survenues hors de l'Europe, (iv) des arguments fondés sur des travaux relatifs à l'attribution des sources et (v) la réglementation sur les critères microbiologiques de sécurité.

Il est important de noter que ce classement est réalisé en l'état actuel des connaissances et selon les procédés de fabrication usuels en France. Des modifications de procédés pourraient conduire à un passage de certains couples de la catégorie « exclus » ou « potentiels » à la catégorie « pertinents », et inversement.

La justification du classement des couples dangers/aliments dans les catégories « exclus », « potentiels » et « pertinents » s'appuie sur l'argumentaire fourni dans l'annexe 3. La catégorisation des 12 dangers microbiologiques pour les 11 catégories de produits de charcuterie, de salaison et de conserves de viande est présentée dans le Tableau 7.

**Tableau 7. Association entre les dangers microbiologiques et les produits de charcuterie, de salaison et de conserves de viandes concernés par la présence de nitrites et/ou de nitrates en tant qu'additifs**

Catégories de produits définis dans le Code des usages concernés par les nitrites	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Campylobacter</i> spp.	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Clostridium botulinum</i>	EHEC	<i>Yersinia entéropathogènes</i>	VHE	<i>Trichinella</i>	<i>Toxoplasma</i>
Pièces et morceaux crus (exemple lardons)	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	2
Saucisses et saucissons crus à cuire (ex. chipolatas)	1	2	1	1	2	1	1	1	2	2	0	2
Pièces et morceaux cuits (exemple jambon cuit)	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	0	1
Rillettes	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	0	1
Pâtés, galantines et ballotines	2	1	1	2	1	1	2	1	1	1	0	1
Saucisses et saucissons cuits	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	0	1
Produits à base de tête	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	0	1
Pièces et morceaux secs (ex. jambon sec)	1	2	1	1	1	1	2	1	1	1	0	1
Saucisses et saucissons secs	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	0	1
Conserves de viande bovine	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Foie gras	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

Un score de 0 indique un couple « exclu », 1 indique un couple « potentiel » ; un score de 2 indique un couple « pertinent »

VHE = virus de l'hépatite E

EHEC = *Escherichia coli* entérohémorragiques

### 8.2.2. Procédés de fabrication et rôle des nitrites

Les procédés de fabrication des différents produits de charcuterie, de salaison et des conserves de viande sont présentés sur la Figure 9. L'ensemble des produits comporte une étape de préparation des matières premières et une étape de salaison au cours de laquelle les nitrites et nitrates sont apportés. Quatre grandes catégories de produits peuvent être établies en fonction des autres étapes unitaires du procédé. Une analyse de la littérature scientifique a été réalisée afin d'identifier l'importance relative des nitrites au regard d'autres facteurs environnementaux pour ces quatre catégories de produits. Elle complète l'analyse bibliographique de la partie 8.2.1 concernant la mesure de la présence de nitrites au cours de *challenge-tests*.

La première catégorie concerne les pièces et morceaux crus. Pour cette catégorie, la maîtrise du risque microbiologique repose sur la maîtrise de la croissance pendant la conservation ainsi que sur la maîtrise de la cuisson par les consommateurs (Anses, 2018b; Gonzales-Barron et al., 2010a; Gonzales-Barron et al., 2010b). Pour le virus de l'hépatite E (VHE) et *Toxoplasma*, aucune croissance n'est possible. Pour *Campylobacter*, aucune croissance n'est possible pendant la réfrigération (même pour des températures supérieures à 10°C) et ce même en l'absence de nitrite. Une cuisson à cœur est suffisante pour la maîtrise du risque pour ces pathogènes (Baer et al., 2013; Wolff et al., 2020; Zdolec and Kiš, 2021). La présence de nitrites n'influence pas l'efficacité de la cuisson pour le VHE (Wolff et al., 2020). La présence de nitrates et nitrites ne semblent également pas avoir d'effet significatif sur la viabilité de *Toxoplasma* (Guo et al., 2015). Pour *Campylobacter*, la perte de viabilité observée au cours de la conservation à 4°C est plus importante dans les saucisses avec nitrite que sans nitrite (Hong et al., 2016).

La croissance de *Salmonella* dans les saucisses à cuire est possible quand les conditions de réfrigération ne sont pas correctement appliquées par les consommateurs (Gonzales-Barron

et al., 2010a). La cuisson à cœur (à des températures supérieures à 70°C) par les consommateurs permet de maîtriser le risque de salmonellose (Cleide et al., 2015; Gonzales-Barron et al., 2010b). Les *Yersinia* entéropathogènes sont également capables de se multiplier dans ces produits même si les recommandations de température de stockage sont respectées (Van Damme et al., 2017). Une cuisson à cœur permet cependant de maîtriser le risque de yersiniose pour les produits destinés à être cuits (Zdolec and Kiš, 2021). Pendant la réfrigération, la présence de nitrites réduit significativement la croissance de *Yersinia enterocolitica* (Bhaduri et al., 1995) et de *Salmonella* (Lamas et al., 2016) pour des températures supérieures à 6°C.

La deuxième catégorie de produits concerne les produits comprenant une étape de cuisson au cours du procédé de fabrication. Pour ces produits, les nitrites peuvent contribuer à prévenir la germination des bactéries sporulées (*B. cereus*, *C. perfringens* et *C. botulinum*) au cours de l'étape de refroidissement (FSIS, 2017; Juneja et al., 2013; Myers et al., 2016). Le rôle des nitrites est également de prévenir la croissance de *C. botulinum* psychrotrophe au cours de la conservation au froid (EFSA, 2003; Gunvig et al., 2013; Lebrun et al., 2020) et de limiter la croissance de *L. monocytogenes* (Mejlholm et al., 2010).

La troisième catégorie comprend les produits utilisant le séchage. Les nitrites ont alors un rôle d'inhibition de la germination des spores de *C. botulinum* ou de réduction de la croissance pour *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Y. enterocolitica* au cours de l'étape d'étuvage (Gunvig et al., 2016). Il permet également d'améliorer l'inactivation de ces pathogènes au cours du séchage (Gunvig et al., 2016).

Enfin, on retrouve la catégorie des produits subissant une appertisation. Le nitrite permet de réduire la probabilité de germination des spores de *C. botulinum* au cours du stockage à température ambiante pour les produits avec des valeurs stérilisatrices faibles (de l'ordre de 0,6 minutes) comme les conserves foie gras (Membré et al., 2015).

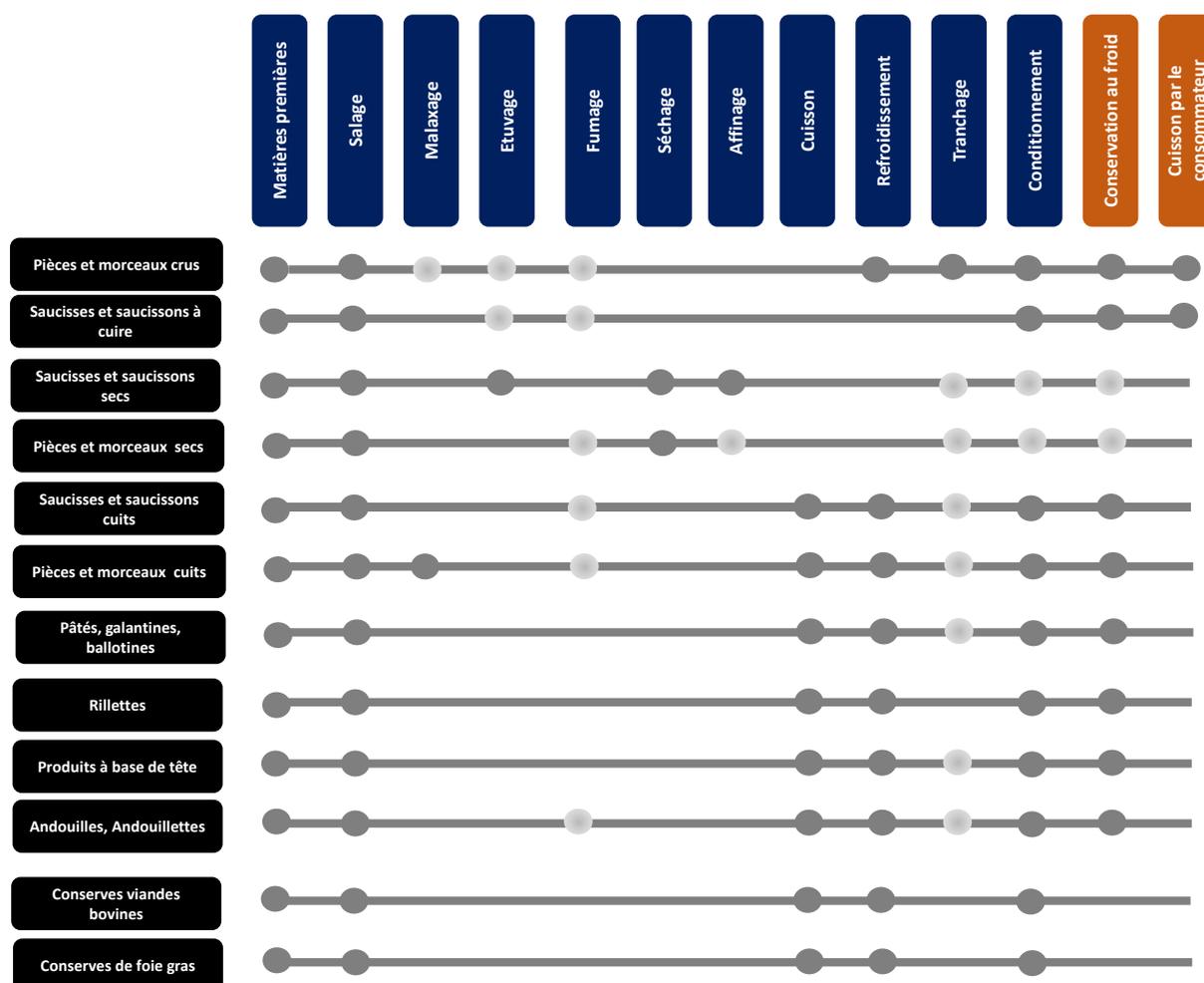


Figure 9 Etapes unitaires des procédés de fabrication des charcuteries, salaisons et conserves de viande.

Les cercles gris clairs correspondent à des étapes facultatives des procédés de fabrication.

### 8.2.3. Sélection des couples

Dans les pièces et morceaux crus, et les saucisses et saucissons à cuire, les dangers *Salmonella*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *T. gondii* et VHE apparaissent comme pertinents. Cependant, la maîtrise de ces pathogènes dans les produits crus est principalement dépendante de l'étape de cuisson réalisée par le consommateur. Ainsi, l'impact des nitrites est mineur pour ces produits.

*Salmonella* est également identifiée comme danger pertinent dans les pièces et morceaux secs et les saucisses et saucissons secs. Ici, l'impact des nitrites sur l'inhibition de ce pathogène lors de l'étape d'étuvage peut être significatif et le GT NiNa a sélectionné le **saucisson sec** comme représentant de ces catégories associées à *Salmonella* pour la suite du travail.

*L. monocytogenes*, ubiquitaire, est un danger pertinent car elle peut recontaminer les produits cuits permettant sa croissance. Le GT a sélectionné le **jambon cuit** comme exemple de cette catégorie d'aliment.

D'après les données épidémiologiques, *C. botulinum* est considéré comme pertinent pour les pâtés ainsi que sur pour les pièces et morceaux secs. Les produits secs étant la principale catégorie d'aliment à l'origine de foyers de botulisme, le GT NiNa a retenu le **jambon sec** pour la suite de son travail.

*S. aureus* est un danger considéré comme pertinent dans les produits cuits mais la perte de maîtrise s'effectue majoritairement par une contamination des produits finis par les opérateurs ou les consommateurs. Le rôle de la température (maintien aux températures de réfrigération) est l'élément essentiel pour prévenir la croissance et la production de toxine au stade de la consommation, et rend mineur l'impact des nitrites.

Les pièces et morceaux secs ainsi que les saucisses et saucissons secs sont considérés comme pertinents au regard du risque *Toxoplasma gondii*. Cependant, il n'y a pas lieu de penser que la teneur en nitrate et/ou nitrite ait un impact sur la maîtrise de ce danger dans ce type de produits.

**Conclusion sur les couples danger-aliment relatifs à la question 1.**

**Sur la base de la classification des couples bactérie/matrice, du procédé de fabrication et du rôle des nitrites dans les matrices considérées, les trois couples suivants ont été retenus par le GT pour la suite du travail : *Listeria monocytogenes*/jambon cuit, *Salmonella* spp./saucisson sec et *Clostridium botulinum*/jambon sec.**

### **8.3. Evaluation de l'impact de la réduction des nitrites pour les trois études de cas retenues**

Les travaux du groupe de travail ont permis d'identifier les couples danger/aliment pour lesquels des mesures de réduction des nitrites pourraient potentiellement conduire à l'augmentation du risque. Le GT NiNa a utilisé la démarche d'appréciation quantitative des risques (AQR) pour évaluer l'impact de la réduction des nitrites et l'adoption de solutions alternatives pour les couples *L. monocytogenes* dans le jambon cuit et *Salmonella* dans le saucisson sec. L'appréciation quantitative des risques (AQR) est une démarche scientifique visant à quantifier un risque et l'influence de différents facteurs sur ce(s) risque(s). La démarche est présentée sur la Figure 10.

La méthodologie d'AQR se décompose en quatre étapes successives (FAO & WHO, 2021) :

- identification du danger : identification des agents pouvant causer des effets néfastes sur la santé et liés à certaines denrées ou certains groupes de denrées.
- appréciation de l'exposition : appréciation de l'occurrence et de la concentration de l'agent pathogène dans la denrée au moment de sa consommation. Cette étape fournit une estimation de la dose ingérée par les personnes exposées. Elle nécessite d'une part des données de prévalence et de concentration du danger dans les matières premières et d'autre part l'utilisation de modèle de microbiologie prévisionnelle (cf. Annexe 6) pour apprécier l'évolution du danger jusqu'au moment de la consommation.
- appréciation des effets : appréciation des effets néfastes sur la santé résultant de l'ingestion d'une certaine quantité d'agent pathogène. Cette étape vise à construire des modèles dose réponse.
- estimation du risque : estimation de la probabilité et de la gravité des effets néfastes sur la santé, liés à la consommation d'un aliment ou d'un groupe d'aliments au niveau d'une population spécifiée. Cette étape s'appuie sur les trois premières.

Le développement d'une AQR utilise des modèles basés sur : (i) la connaissance de la chaîne alimentaire décrite, (ii) la caractérisation du danger étudié, c'est-à-dire la description de son comportement dans les aliments notamment par des modèles de microbiologie prévisionnelle, et (iii) la probabilité d'apparition de l'effet néfaste (modèles dose réponse).

La démarche AQR n'a pas pu être retenue pour le couple *C. botulinum* dans le jambon sec en raison de l'absence de données de prévalence et de concentration du pathogène dans les matières premières. En revanche le GT NiNa a évalué l'effet du procédé de fabrication sur le potentiel d'évolution de *C. botulinum* afin de déterminer les conditions garantissant l'absence de croissance (et donc l'absence de risque).

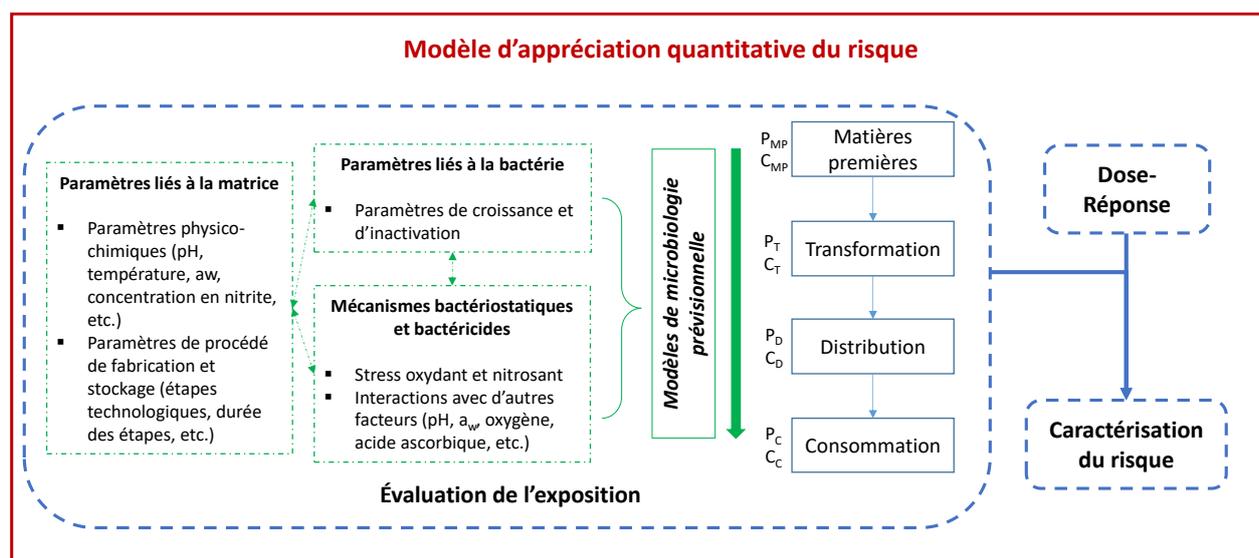


Figure 10. Démarche d'appréciation quantitative d'évaluation des risques retenue pour évaluer l'effet des nitrites pour les couples *L. monocytogenes*/jambon cuit et *Salmonella*/saucisson sec. Les nitrites sont pris en compte à l'aide de la microbiologie prévisionnelle qui permet de quantifier son impact sur la prévalence et la concentration des pathogènes (*P* et *C*). Pour *Clostridium botulinum*/jambon sec, seuls les modèles de microbiologie prévisionnelle ont été utilisés en raison de l'absence de données de prévalence du danger.

### 8.3.1. Evaluation de l'impact des nitrites sur le risque de listériose lié à la consommation de jambon cuit

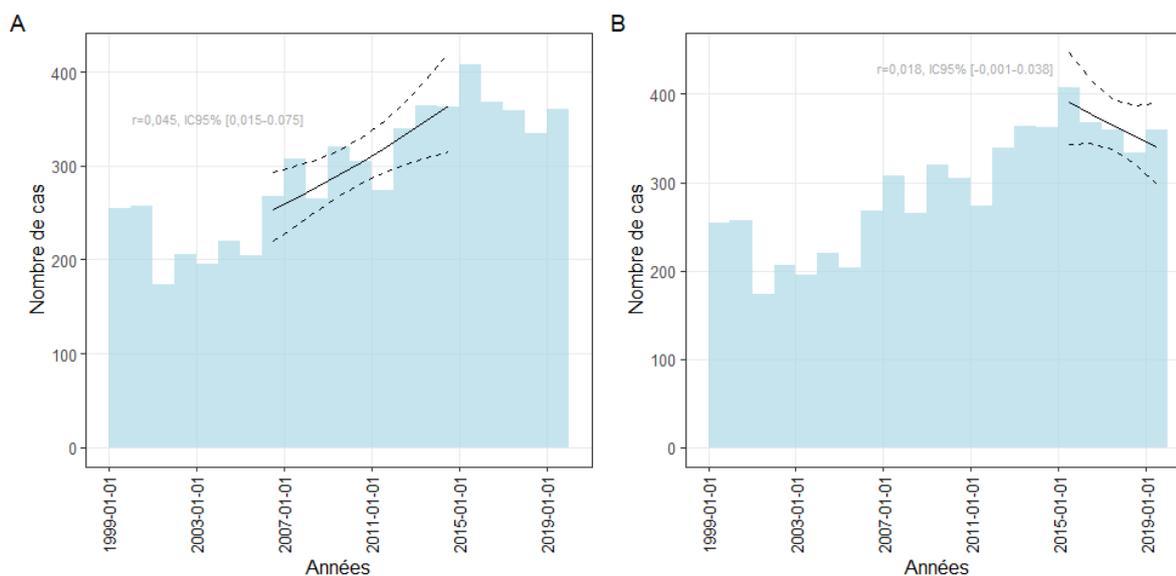
#### • Listériose et jambon cuit

- La listériose en France

La listériose est une infection d'origine alimentaire causée par l'ingestion d'aliments contaminés par *Listeria monocytogenes*. Les personnes chez qui le diagnostic de listériose est confirmé présentent une forme invasive de la maladie, c'est-à-dire une diffusion de la bactérie au-delà du tube digestif. L'infection peut prendre différentes formes comme une atteinte neurologique, une bactériémie ou atteinte materno-fœtale chez la femme enceinte.

La surveillance nationale des cas de listériose est établie depuis 1982 en France. La maladie fait l'objet d'une déclaration obligatoire. Le Centre National de Référence des *Listeria* (CNRL), coordonne le recensement des cas (Leclercq et al., 2019). Les données annuelles de cas de listériose sont communiquées par Santé publique France (SpF). Compte-tenu de la gravité de la maladie et de l'efficacité de la surveillance, les cas de listériose recensés tendent à l'exhaustivité (Leclercq et al., 2019). Les populations à haut risque sont les personnes âgées de plus de 65 ans, les personnes immunodéprimées et les femmes enceintes (Pouillot et al., 2015). Le taux de mortalité des listérioses invasives est compris entre 20% et 30% (EFSA and ECDC, 2021; Tourdjman et al., 2014).

La Figure 11 présente l'évolution des cas de listériose en France sur les 20 dernières années (Santé Publique France, 2020). Une augmentation significative a été observée entre 2006 et 2015 (Afssa, 2009; EFSA, 2018). Cette augmentation a également été observée au niveau européen (EFSA, 2018). Les causes de cette augmentation des cas n'ont pas pu être identifiées au niveau français (Afssa, 2009) comme au niveau européen (EFSA, 2018). Depuis 2015, le nombre de listériose en France reste stable, autour de 366 cas en moyenne par an (EFSA and ECDC, 2021).



- Epidémies et cas sporadiques de listériose attribuables à la consommation de jambon cuit

La majeure partie des cas de listériose sont des cas sporadiques<sup>34</sup> (Tourdjman et al., 2014). Les enquêtes alimentaires réalisées auprès de ces cas ne permettent pas, la plupart du temps, l'identification de l'aliment à l'origine de l'exposition du consommateur à *L. monocytogenes*. En Europe, entre 2008 et 2015, seuls 3 à 5% des 14002 cas de listériose étaient des cas associés à des épidémies (EFSA, 2018). Au cours de cette période en Europe, 11 épidémies ont été causées par les produits carnés dont 5 par des charcuteries cuites à base de viande de porc (EFSA, 2018) dont le jambon cuit (Hächler et al., 2013). A l'extérieur de l'Union Européenne, plusieurs épidémies de listériose ont été causées par des produits similaires dans leur composition au jambon cuit (Cartwright et al., 2013; Currie et al., 2015; Mead et al., 2006).

Les méthodes d'attribution des sources permettent d'estimer la part relative des cas associés à différents aliments et/ou réservoirs animaux (Mughini-Gras et al., 2019). Une démarche récente s'appuyant sur une approche ascendante d'appréciation quantitative des risques a permis d'estimer, au niveau européen, la part relative des principaux aliments prêt-à-consommer impliqués dans les cas sporadiques de listériose (EFSA, 2018). Les produits

<sup>34</sup> Les cas des maladies infectieuses d'origine alimentaire peuvent être sporadiques ou épidémiques. Un cas sporadique est un cas isolé sans lien identifié avec d'autres cas de la même maladie.

carnés prêt-à-consommer (comportant l'ensemble des couples pertinents de la partie 3.2) représentaient 67 % des cas de listériose, les produits de la mer 32 % et les fromages à pâte molle et pâte pressée non cuite 1 % (EFSA, 2018).

La part relative des produits de type jambon cuit dans les cas de listériose peut être estimée en tenant compte du fait que celui-ci représente 50% des produits carnés prêts-à-consommer produits (Afssa, 2010). Ainsi, parmi les 366 cas annuels observés en France, 123 cas de listériose pourraient être associés à la catégorie des jambons cuits.

- **Procédé de fabrication du jambon cuit**

Pour la fabrication du jambon cuit, les opérateurs utilisent comme matière première des jambons bruts issus de la découpe des carcasses de porcs. Le pH est en principe contrôlé à la réception dans un des muscles des jambons (*Musculus semimembranosus*). Les cahiers des charges utilisés par les professionnels autorisent des valeurs de pH entre 5,5 et 6,2 (Bombrun, 2013). La Figure 12

présente les grandes étapes de fabrication du jambon cuit. Après réception, les jambons subissent l'opération des « 5D » : ils sont découennés, désossés, dénervés, dégraissés et dépiécés.

Les muscles du jambon sont ensuite saumurés. La saumure contient différents ingrédients, selon la recette, en particulier du chlorure de sodium, du nitrite de sodium (E250), des antioxydants, de(s) sucre(s) et des arômes naturels ou bouillon (Ifip, 2020). Le sel joue un rôle important dans la tenue de tranche (adhésion des muscles entres eux) (Bombrun et al., 2014). Le nitrite de sodium est ajouté sous forme de sel nitrité. Outre son utilisation en tant qu'agent bactériostatique (*cf.* ci-après), il participe au développement des propriétés organoleptiques comme le développement de composés aromatiques (Thomas et al., 2013) et de la couleur (Alahakoon et al., 2015). Les antioxydants ajoutés sont l'érythorbate de sodium (E316) ou l'ascorbate de sodium (E301). Le sucre (souvent le dextrose) joue également un rôle dans les propriétés organoleptiques (Resconi et al., 2015). La saumure est injectée dans le muscle à l'aide d'aiguilles.

Les muscles saumurés sont ensuite malaxés dans des barattes. Le malaxage se déroule sous vide et alterne des phases de rotation et de repos.

Après malaxage, les muscles sont assemblés, avec éventuellement ajout de couenne en surface, conditionnés sous vide et placés sous vide dans des moules de cuisson. La cuisson du jambon se déroule pendant des durées comprises entre 9 et 24 h et à des températures comprises entre +65 et +75°C (Bombrun, 2013). Le refroidissement dure entre 6 h et 3 jours. Au niveau technologique, le traitement thermique influence la tenue de tranche, les propriétés organoleptiques (couleur, goût) et le rendement technologique (Steen et al., 2020).

Les jambons sont ensuite stockés au froid entre l'étape de refroidissement et le conditionnement. Les grosses pièces destinées à l'industrie ou à la restauration collective sont commercialisées dans leur conditionnement de cuisson ; les produits destinés à la grande distribution sont tranchés à des températures inférieures à +4°C. Les jambons prétranchés sont conditionnés en barquettes sous atmosphère protectrice (mélange CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>) ou, plus rarement, sous vide.

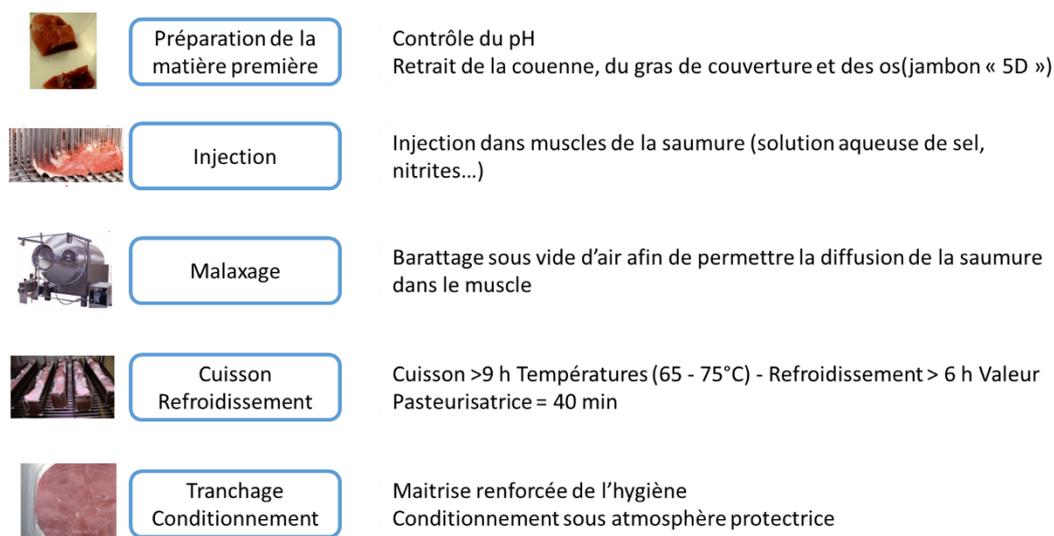


Figure 12. Les étapes de fabrication du jambon cuit. D'après (Bombrun, 2013)

- **Procédés de fabrication et occurrence de *L. monocytogenes***

*L. monocytogenes* est présente tout au long de la chaîne de production alimentaire. On retrouve cet agent pathogène au niveau des fermes, des animaux (portage intestinal), des abattoirs, des ateliers de découpe et de transformation des produits alimentaires (Félix et al., 2018; Thévenot et al., 2006).

Près de 10% des produits de découpe de porc sont contaminés par *L. monocytogenes* (Denis et al., 2011). Les barèmes de cuisson/refroidissement appliqués pendant le procédé de fabrication des jambons cuits garantissent des valeurs pasteurisatrices F0 supérieures à 30 min correspondant à des réductions logarithmiques supérieures à 12 log<sub>10</sub>. Compte-tenu de ces barèmes, l'origine de la contamination par *L. monocytogenes* dans les jambons cuits n'est vraisemblablement pas la contamination des jambons crus utilisés comme matière première.

*L. monocytogenes*, en raison de sa capacité à se multiplier aux températures de réfrigération et à former des biofilms, présente la particularité de persister dans la plupart des ateliers agro-alimentaires malgré l'application des opérations d'hygiène (Carpentier and Cerf, 2011).

Les jambons cuits peuvent être contaminés au moment du tranchage juste avant le conditionnement (Chaitiemwong et al., 2014). Au-delà de l'application des procédures d'hygiène renforcées au niveau des surfaces au contact dans les ateliers de tranchage du jambon cuit et de la formulation de la composition des produits (par exemple la quantité de nitrites ajoutés cf. ci-après), la principale mesure de maîtrise utilisée par les professionnels est le choix de la date limite de consommation. Cette date, établie sous la responsabilité des professionnels, est de l'ordre de trois semaines. Elle est considérée comme un facteur important pour limiter l'exposition des consommateurs aux agents pathogènes (EFSA, 2018).

### 8.3.2. Impact des nitrites sur la croissance de *L. monocytogenes* dans le jambon cuit au cours de sa conservation

De nombreux modèles secondaires de microbiologie prévisionnelle décrivant l'influence des facteurs environnementaux intrinsèques et extrinsèques (température et atmosphère protectrice) sur la vitesse de croissance de *L. monocytogenes* sont disponibles notamment pour les produits carnés (Augustin et al., 2005; Mejlholm et al., 2010). Ces modèles secondaires ont fait l'objet de validation (cf. Annexe 4 pour la validation des modèles de microbiologie prévisionnelle) dans les matrices alimentaires. Une étude internationale a permis

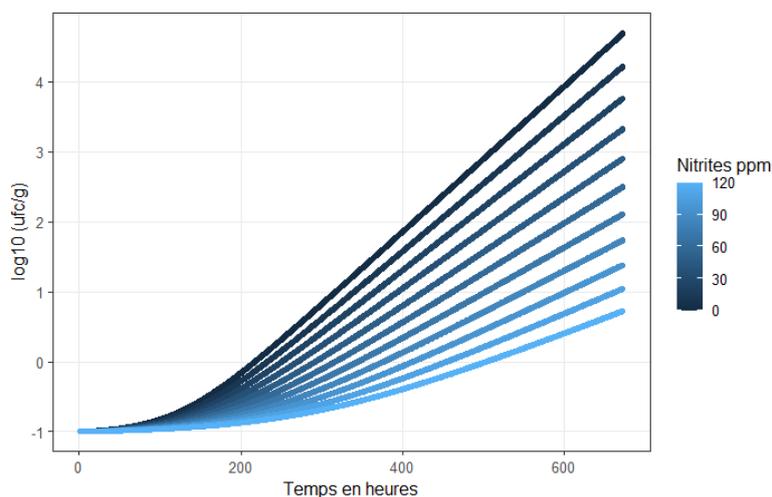
de comparer et valider les modèles sur plus de 1014 cinétiques. La performance des modèles secondaires testés était étroitement liée aux nombres de facteurs environnementaux qu'ils prennent en compte.

Le modèle de Mejlholm *et al.* (Mejlholm et al., 2010), incluant l'effet de neuf paramètres environnementaux, présente les meilleures performances de prévision du taux de croissance spécifique maximal dans les aliments prêt-à-consommer. Ce modèle est présenté en détail dans l'Annexe 6.

Ce modèle secondaire associé à un modèle primaire de croissance permet de simuler la croissance de *L. monocytogenes* dans différentes conditions environnementales.

Le temps de latence est inversement proportionnel au taux de croissance et dépend d'un paramètre caractérisant l'état physiologique (K) de *L. monocytogenes*. Si les cellules au moment de la contamination ne sont pas stressées, K=0 et les cellules démarrent la croissance exponentielle sans latence. L'état physiologique de *L. monocytogenes* au moment de la contamination des jambons n'est pas connu. Ce paramètre K peut prendre des valeurs comprises entre 0 et 5, voire des valeurs plus élevées si les bactéries ont subi un stress (cellules bactériennes ayant subies un procédé de nettoyage désinfection dans les usines, stress nutritionnel associé à la survie sur les surfaces,...) important avec la contamination des produits (Augustin et al., 2011).

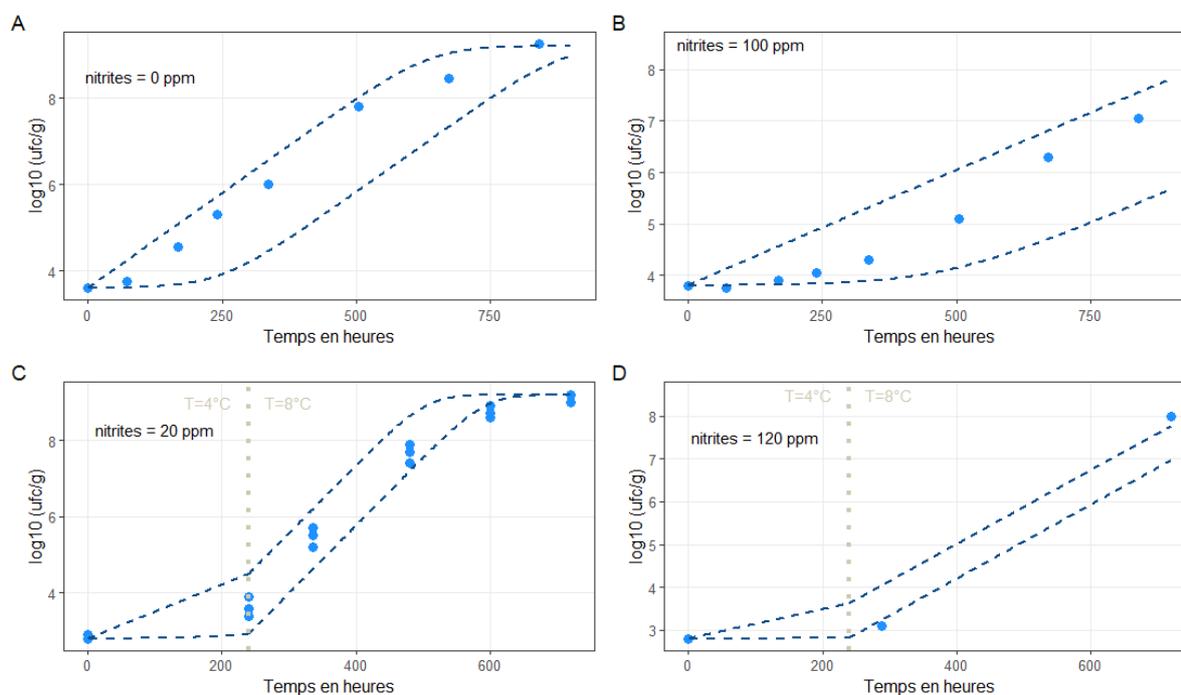
La Figure 13 illustre l'impact de la concentration en nitrites sur la croissance de *L. monocytogenes* prévue par le modèle secondaire pour une valeur initiale de K=3, une température de conservation de +6°C, et par un modèle primaire pour une contamination initiale de 1 UFC de *L. monocytogenes* dans 10 g de jambon (soit -1 log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup>). Dans ces conditions, au bout de 14 jours (336 heures), les niveaux de contamination sont 60 fois plus élevés dans les jambons ne contenant pas de nitrites par rapport aux jambons en contenant 120 mg kg<sup>-1</sup>. Au terme de 28 jours de conservation (valeur observée lors de l'enquête de consommation INCA 3), les niveaux de contamination sont 10 000 fois plus élevés.



**Figure 13. Prévisions du modèle secondaire de Mejlholm *et al.* (2010) illustrant l'impact de la concentration en nitrites sur la croissance de *L. monocytogenes* dans du jambon cuit (présentant les caractéristiques suivantes : pH=6, NaCl=1,8%, pas d'acide organique, atmosphère protectrice avec CO<sub>2</sub>=30%) conservé à +6°C.**

Ce modèle secondaire a fait l'objet d'une validation (Mejlholm et al., 2010), et une comparaison additionnelle a été réalisée sur des données spécifiques au jambon cuit dans le cadre de ce travail. Pour ce faire, le niveau de contamination initial utilisé dans le modèle a été adapté aux niveaux d'inoculation choisis dans deux études identifiées (Horsch et al., 2014; Ifip, 2010), et

les prévisions du modèle secondaire prenant en compte les conditions expérimentales (nitrites, température de conservation pH, NaCl ...) ont été comparées aux données observées pour K=0 et K=5. Ces comparaisons sont présentées à la Figure 14. Il existe une bonne adéquation entre les prévisions et les observations expérimentales, ce qui confirme l'intérêt du modèle retenu par le GT NiNa pour modéliser le comportement de *L. monocytogenes* en présence de nitrites dans le jambon cuit.



**Figure 14. Comparaison des prévisions du modèle secondaire de Meijholm *et al.* (2010) (--- pour K=0 et K=5, cinétique sans et avec latence respectivement) à des données de croissance de *L. monocytogenes* observées dans du jambon cuit conservé à +4°C (A et B, données issues de (Horsch *et al.*, 2014)) et à +4°C puis +8°C (C et D (Ifip, 2010)).**

- **Impact des nitrites sur l'exposition des consommateurs à *L. monocytogenes***

L'exposition des consommateurs à *L. monocytogenes* dépend directement des propriétés physico-chimiques des jambons cuits (Figure 13). L'exposition des consommateurs doit également tenir compte de la variabilité des scénarios de contamination, de la variabilité biologique (variabilité associée aux comportements des différentes souches), de la variabilité des conditions de conservation, et de la variabilité associée aux comportements des consommateurs (respect de la durée de vie du produit, réglage de la température du réfrigérateur, ...). Duret *et al.* (Duret *et al.*, 2014) ont caractérisé ces différentes sources de variation pour le jambon cuit en s'appuyant notamment sur des données expérimentales concernant les itinéraires des produits (Derens *et al.*, 2004). L'analyse de sensibilité des différentes sources de variabilité a montré la plus grande importance de l'itinéraire thermique et logistique des produits.

L'Annexe 7 présente en détail les paramètres du modèle d'appréciation de l'exposition. Des simulations de Monte-Carlo (n=10 000) ont été utilisées pour estimer la variabilité de contamination au moment de la consommation en prenant en compte l'ensemble des paramètres de variation.

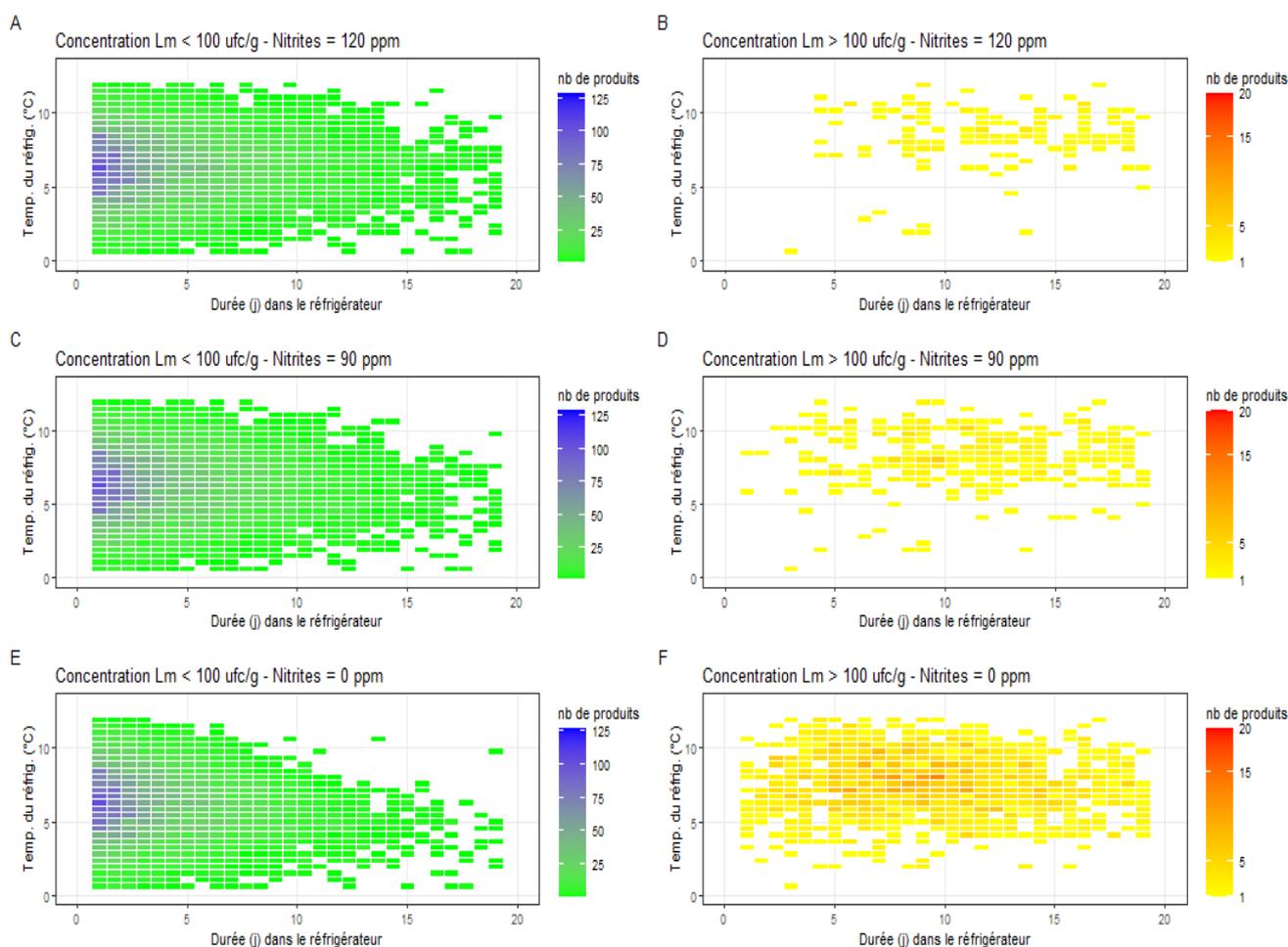
La Figure 15 illustre l'impact des deux principales sources de variation (la température des réfrigérateurs domestiques et la durée de stockage dans ces équipements) sur le niveau de

contamination au moment de l'exposition du consommateur. Il faut d'abord noter que la plupart des produits sont stockés dans des réfrigérateurs présentant des températures proches de +6°C et sont consommés rapidement. Les panels A, C, E de la Figure 15 illustrent les conditions de conservation associées au respect du critère de sécurité défini par la réglementation européenne (CE 2073/2005) de 100 UFC de *L. monocytogenes* par gramme de produit ; les panels B, D, F illustrent la situation pour les produits dépassant ce critère de sécurité.

Au moment de la consommation, la proportion de produits contaminés à un niveau dépassant le critère de sécurité passe de 1,9% pour les produits contenant 120 mg kg<sup>-1</sup> de nitrite, à 14,1% pour les jambons ne contenant pas de nitrites.

Pour la concentration de 120 mg kg<sup>-1</sup>, les produits concernés par ce dépassement sont principalement ceux conservés à plus de +6°C pour des durées de séjour dans les réfrigérateurs supérieures à 5 jours (Figure 15B). En l'absence de nitrites, seuls les produits conservés à des températures inférieures à +4°C et/ou conservés moins de 3 jours ne dépassent pas le critère de sécurité (Figure 15F).

Le Tableau 8 présente plus en détail l'impact de différents scénarios de réduction des nitrites sur la probabilité de respect du critère de sécurité pour *L. monocytogenes* dans le jambon cuit.



**Figure 15. Caractéristiques des réfrigérateurs (temps et température) pour les jambons contaminés respectant le critère de sécurité (100 UFC de *L. monocytogenes* par gramme de produit) au moment de la consommation (A, C et E) et ne respectant pas ce critère (B, D, F). Cette répartition a été estimée en prenant**

en compte les différentes sources de variation (contamination initiale, durées et températures dans les différents équipements). 10 000 simulations ont été réalisées pour intégrer l'ensemble des sources de variation.

- **Impact des nitrites sur le risque de listériose**

Le modèle d'exposition à *L. monocytogenes* a ensuite été complété selon la démarche proposée par Duret *et al.* (Duret *et al.*, 2019). Afin de calculer le risque de survenue d'un cas de listériose, le modèle considère que seuls les produits non-altérés sont consommés par les consommateurs. Pour cela, le modèle simule, conjointement à *L. monocytogenes*, le comportement des bactéries lactiques d'altération en utilisant un modèle secondaire validé dans les aliments. L'hypothèse du modèle est la suivante : quand la concentration en bactéries lactiques devient trop élevée, les propriétés organoleptiques sont modifiées, ce qui est perçu par les consommateurs. Le produit n'est donc pas consommé.

Pour les produits non-altérés, le risque de provoquer une listériose est calculé à partir des doses ingérées par les consommateurs. Les doses dépendent des niveaux de contamination simulées à l'aide du modèle d'exposition et de la taille des portions. Le calcul de risque par portion s'effectue en utilisant une relation dose-réponse qui calcule la probabilité de listériose en fonction de la dose ingérée. Le modèle dose-réponse retenu prend en compte, en plus du niveau de contamination, la sensibilité des populations. Quatre types de populations sont définis par rapport à leur sensibilité : la population générale, les populations immunodéprimées (cancer, diabète, ...), les femmes enceintes et les personnes âgées de plus de 65 ans. Le risque au niveau de la population est estimé en tenant compte du risque par portion ainsi que de la proportion de la population consommant du jambon cuit et de la fréquence de consommation.

L'ensemble du modèle est décrit dans la publication de Duret *et al.* (Duret *et al.*, 2019). L'Annexe 6.2 précise les adaptations réalisées par le GT NiNa pour évaluer les scénarios du Tableau 8.

Comme dans tout modèle d'appréciation quantitative des risques, les résultats sont associés à une forte incertitude (FAO & WHO, 2021). A titre d'exemple, le nombre de cas de listériose est influencé par l'incertitude sur la proportion de produits rejetés par les consommateurs, ou encore l'incertitude sur la relation dose-réponse. L'incertitude est également associée à la définition de la situation de référence, que le GT a fixé à 110 mg kg<sup>-1</sup> de nitrites ajoutés. Ce niveau conduit à une estimation de 8 cas de listériose par an. Si l'on considère la gamme de concentration allant de 100 à 120 mg kg<sup>-1</sup> de nitrites ajoutés (c'est-à-dire que tous les produits sur le marché ont été produits avec la dose maximale d'emploi autorisée), le nombre de cas de listériose varie entre 2 et 43 cas par an. Ces estimations sont compatibles avec la situation épidémiologique décrite précédemment.

Compte-tenu de cette incertitude, les résultats sont exprimés en facteur d'augmentation ou de réduction du risque par rapport à la situation de référence ( $\text{Risque}_{\text{scénario}}/\text{Risque}_{\text{ref}}$ ).

Le Tableau 8 illustre le rôle des nitrites. En jouant sur ce seul paramètre technologique, le niveau de risque de listériose est fortement impacté. Le risque est multiplié par plus de 1000 en absence d'ajout de nitrite. Les paragraphes suivants présentent des solutions qui pourraient être apportées pour compenser une réduction de la quantité de nitrite ajoutée pour la fabrication du jambon cuit.

**Tableau 8. Impact sur le dépassement du critère de sécurité (100 UFC de *L. monocytogenes* par gramme de produit), sur l'estimation du risque de listériose et sur l'estimation du taux de produits gaspillés de différents scénarios de réduction de l'ajout de nitrites dans les jambons cuits.** L'ensemble des paramètres utilisés pour le scénario de référence sont présentés dans l'annexe 6.2.

Scénarios	Augmentation relative du non-respect du critère de sécurité (<100 UFC g <sup>-1</sup> )	Augmentation relative du risque de listériose	Augmentation relative du gaspillage
#Référence (Nitrites = 110 mg kg <sup>-1</sup> )	-*	-**	-***
Nitrites = 90 mg kg <sup>-1</sup>	x2	x25,4	x1,1
Nitrites = 60 mg kg <sup>-1</sup>	x3,3	x124,6	x1,2
Nitrites = 0 mg kg <sup>-1</sup>	x7,4	x1202,5	x1,3
Nitrites = 90 mg kg <sup>-1</sup> + pH = 5,8	x1,6	x5,3	x1
Nitrites = 90 mg kg <sup>-1</sup> + aw=0,973	x1,7	x8,1	x0,9
Nitrites = 90 mg kg <sup>-1</sup> + T moy réduit de 1°C	x1,3	x0,6	x0,7
Nitrites = 90 mg kg <sup>-1</sup> - DLC réduite de 3 jours	x1,2	x0,2	x0,6
Nitrites = 0 mg kg <sup>-1</sup> - DLC réduite de 7 jours	x2,2	x0,9	x0,1

\* Le modèle utilisé pour le scénario de référence choisi prévoit un non-respect du critère de sécurité au moment de la consommation dans 0,24% des jambons consommés

\*\* Le modèle d'appréciation des risques de listériose pour le scénario de référence choisi est de 7,9 cas par an

\*\*\* Le modèle utilisé pour le scénario de référence prévoit que 2,4% des produits seraient gaspillés

DLC = date limite de consommation

- **Quelles mesures alternatives pour compenser la réduction de l'emploi des nitrites pour le jambon cuit ?**

La prévention de la contamination des produits carnés après la cuisson est une étape essentielle de la maîtrise du risque de listériose (Forauer et al., 2021; Gallagher et al., 2016; Hoelzer et al., 2012). *L. monocytogenes* est une bactérie qui présente une excellente capacité de persistance sur les surfaces dans les environnements de production de la plupart des ateliers de fabrication alimentaire (Carpentier and Cerf, 2011). Elle s'installe rapidement dans les ateliers et peut y perdurer pendant de nombreuses années (Gray et al., 2021). La maîtrise passe par l'application des bonnes pratiques d'hygiène et notamment, l'application de protocoles efficaces de nettoyage et désinfection, et par des équipes bien formées à la culture de la sécurité des aliments (Forauer et al., 2021). Malgré les nombreux travaux conduits sur la persistance de *L. monocytogenes* dans l'environnement de production, peu de mesures de maîtrise ont montré quantitativement leur efficacité sur la réduction de la prévalence de contamination du produit fini. L'identification de l'origine de la contamination, et la détermination de la présence de mécanismes d'adaptation grâce aux études génomiques (Lee et al., 2019a; Nielsen et al., 2017), ainsi que le meilleur contrôle des conditions environnementales dans les ateliers (réduction de l'humidité) (Overney et al., 2017) ouvrent des perspectives pour une meilleure maîtrise du risque de listériose dans les années à venir. Les paramètres physico-chimiques peuvent être utilisés pour limiter la croissance de *L. monocytogenes*. Le Tableau 8 illustre l'impact potentiel d'une réduction du pH et d'une diminution de l'activité de l'eau pour des jambons fabriqués avec 90 mg kg<sup>-1</sup> de nitrites. Il faut noter que la marge de manœuvre est limitée pour ces paramètres. Le pH des jambons crus

mis en œuvre pour la fabrication peut être un critère mais il est difficile de disposer de jambon présentant des pH inférieurs à 5,8.

Pour l'activité de l'eau, un effort important a été réalisé par les opérateurs pour réduire le taux de sel. L'activité de l'eau testée dans le Tableau 8 correspond à une situation où tous les fabricants utiliseraient le taux de sel le plus haut observé. Cette alternative n'est pas souhaitable compte-tenu des risques associés à la surconsommation de sel (Anses, 2016).

Ces deux approches ne permettent toutefois pas d'atteindre le niveau de risque initial estimé pour des jambons contenant 110 mg kg<sup>-1</sup> de nitrite (Tableau 8). D'autres leviers associés aux procédés de fabrication peuvent être envisagés ; ils sont décrits en détail dans la partie 3.4 de ce rapport. A ce stade, il apparaît difficile de quantifier leur efficacité sur le risque compte-tenu du manque de données et de modèles sur ces nouvelles alternatives\options technologiques. Les autres leviers de maîtrise du risque reposent sur la température des réfrigérateurs des consommateurs et sur la durée de vie microbiologique des produits. La température des réfrigérateurs ménagers est un facteur important du risque de listériose (Duret et al., 2014). Cependant, l'analyse du comportement des consommateurs et de la susceptibilité de modifier les pratiques actuelles conduisent à conclure que, si la réduction d'un degré de la température est une mesure efficace, il est peu probable de la voir suivie par les consommateurs (Anses, 2014; Anses, 2015).

La diminution de la durée de vie est également efficace. Le Tableau 8 montre qu'une réduction de trois jours de la durée de vie peut compenser une réduction d'utilisation d'ajout de nitrites (90 mg kg<sup>-1</sup> au lieu de 110). Dans les jambons sans nitrite, la réduction doit être de 7 jours pour garder le même niveau de risque que la situation de référence (jambons avec 110 mg kg<sup>-1</sup> de nitrite).

#### **Conclusion concernant l'utilisation des nitrites dans le jambon cuit et le risque de listériose lié à la consommation de cette denrée.**

Les produits de charcuterie cuits prêts à être consommés comme le jambon cuit sont à l'origine de cas de listériose en France.

La modélisation montre que les nitrites jouent un rôle essentiel pour limiter la croissance de *L. monocytogenes* pendant la phase de conservation de ces produits. En l'absence de mesures de maîtrise compensatrices, l'estimation du risque de listériose serait considérablement augmentée si les niveaux de nitrites devaient être revus à la baisse.

La modification des autres paramètres physico-chimiques du jambon ( $a_w$ , pH) n'apparaît pas comme des mesures de maîtrises suffisantes pour compenser la réduction des nitrites.

Des réductions partielles des ajouts de nitrites restent envisageables à condition d'adopter certaines mesures de maîtrise supplémentaires pour limiter l'exposition des consommateurs à des niveaux élevés de *L. monocytogenes*. Seule la diminution de la durée de vie de ces produits apparaît comme une mesure efficace pour compenser le sur-risque associé à la réduction ou à l'éviction des nitrites.

### **8.3.3. Evaluation de l'impact des nitrites sur le risque de salmonellose lié à la consommation de saucisson sec**

- **Salmonellose et saucissons secs**

- La salmonellose en France

*Salmonella enterica subsp. enterica* (non typhique) est un agent pathogène majeur d'origine alimentaire qui provoque une gastro-entérite auto-limitante, de légère à modérée (Guillier et al., 2021). La salmonellose se caractérise généralement par l'apparition d'une fièvre aiguë, de douleurs abdominales, de diarrhées, de nausées et parfois de vomissements. L'apparition des

symptômes de la maladie se produit 6 à 72 heures après l'ingestion de *Salmonella*, et la maladie dure de 2 à 7 jours. Les patients se rétablissent sans traitement spécifique dans la plupart des cas.

La salmonellose est la deuxième zoonose la plus fréquemment signalée dans de nombreux pays européens (EFSA and ECDC, 2021). En France, le dispositif de surveillance des infections à *Salmonella* est basé d'une part sur la déclaration obligatoire des TIAC et d'autre part sur les données du CNR. Il permet de suivre l'évolution des infections à *Salmonella*. Les cas recensés par ce système de surveillance ne reflètent pas l'incidence réelle de la maladie. Une fraction importante des malades ne consulte pas lors du développement de la maladie. Même en cas de consultation, l'agent étiologique n'est pas toujours recherché et l'information n'est pas toujours transmise au CNR. Dans ce contexte, une enquête épidémiologique a permis d'estimer tous les facteurs de sous-estimation de l'incidence des salmonelloses. Le taux d'incidence communautaire annuel a été ainsi estimé à 307 cas pour 100 000 pour la salmonellose (Van Cauteren et al., 2017). Le nombre associé de cas de salmonellose est estimé à 192 450 cas avec un intervalle de crédibilité à 90% compris entre 108 445 et 383 362 (Van Cauteren et al., 2015).

- Cas sporadiques et épidémies attribuables aux saucissons secs

Les investigations microbiologiques et épidémiologiques permettent parfois d'identifier les foyers et de remonter à l'aliment à l'origine des cas humains (Bone et al., 2010; Gossner et al., 2012). Bien que des épidémies de salmonellose soient identifiées, une majorité des cas de salmonellose n'est associée à aucune épidémie connue (Glass et al., 2016) ; ces infections sont alors classées comme des cas sporadiques.

Plusieurs méthodes d'attribution des sources permettent d'estimer l'origine des cas sporadiques. Pour *Salmonella*, l'attribution de sources est le plus souvent basée sur le sous-typage microbien et sur les méthodes de comparaison de fréquences (Anses, 2017a). Dans ce cadre, l'attribution est le plus souvent réalisée en étudiant les réservoirs, sans information sur les véhicules de la contamination. Les attributions des cas sporadiques réalisées selon cette approche donnent souvent une place importante aux réservoirs porcins (entre 21 et 41%) et aux volailles (David et al., 2013; Mughini-Gras and van Pelt, 2014).

Récemment, on a assisté à l'émergence des méthodes d'attribution basées sur les données génomiques (Munck et al., 2020a). Ces études d'attribution sont réalisées au niveau d'un sérovar, et concernent essentiellement le sérovar Typhimurium (Merlotti et al., 2020; Munck et al., 2020b; Zhang et al., 2019b). Elles montrent que le réservoir porcin est le plus important et qu'une très faible part serait attribuable aux ruminants (Munck et al., 2020b). En France, l'attribution des cas sporadiques de salmonellose aux porcins est estimée à 25,7% (IC95%, 20,7–31,1) (David et al., 2013). Compte-tenu de l'estimation du nombre de cas annuel de salmonellose sporadiques en France, les produits alimentaires à base de viande de porc représenteraient donc plus de 48 305 cas. Les travaux publiés par l'ANSES en 2018 (Anses, 2018b) indique que 53% de ces cas (soit environ 26 000 cas de salmonellose) seraient associés aux salaisons sèches, les autres cas étant attribuables aux produits à base de chair à saucisse et aux découpes de viandes destinées à être cuites.

- **Procédé de fabrication du saucisson sec**

Le saucisson sec est une préparation essentiellement à base de viande maigre de porc et de gras de porc. Elle peut se résumer en trois étapes : la préparation de la mûlée, l'étuvage ou fermentation et le séchage (Figure 16).

La mûlée est obtenue par hachage, plus ou moins fin selon les produits, à une température voisine de 0°C, d'environ 20% de gras et 80% de viande maigre de porc. Divers ingrédients sont ajoutés, tels que des épices, du sel (2 à 3%), un mélange nitrate/nitrite ( $\text{KNO}_3/\text{NaNO}_2$ , 120 mg  $\text{kg}^{-1}$  de chacun ou 250 mg  $\text{kg}^{-1}$  de  $\text{KNO}_3$ ) et du sucre (0,3 à 0,5 %). L'activité de l'eau ( $a_w$ ) du produit est élevée, comprise entre 0,95 et 0,97. La mûlée estensemencée par un mélange de ferments (staphylocoques et bactéries lactiques) de manière à obtenir  $10^6$  UFC  $\text{g}^{-1}$  de mûlée. *Lactobacillus sakei* associé à *Staphylococcus carnosus* ou/et *Staphylococcus xylosus* sont fréquemment utilisés. La mûlée est embossée dans des boyaux naturels ou à base de collagène. Cette mûlée embossée peut êtreensemencée en surface par la moisissure *Penicillium nalgiovensis* en mélange ou non avec la levure *Debaryomyces hansenii*.

La mûlée embossée est étuvée à des températures variant en France entre +22 et +25°C pendant 48 à 72h à une humidité relative (HR) de 75 à 90%. Cette étape permet la multiplication des micro-organismes, en particulier des ferments qui vont devenir majoritaires et atteindre jusqu'à  $10^8$  UFC  $\text{g}^{-1}$  de mûlée en particulier pour les bactéries lactiques. Les glucides ajoutés sont catabolisés par les bactéries lactiques en acide lactique, ce qui conduit à une acidification de la mûlée. L'acidification dépend de la nature et de la concentration du glucide utilisé, des bactéries lactiques et de la température de l'étuvage. Pour les saucissons produits en France, le pH de la matière première est d'environ 5,8 et, il ne descend pas en-dessous de pH 5,0 lors de cette étape. L' $a_w$  de la matrice est alors comprise entre 0,92 et 0,94. Le nitrate est réduit en nitrite par la nitrate réductase des staphylocoques à cette étape.

Le produit est ensuite séché à des températures de +12 à +15°C pendant 3-4 semaines et à une humidité relative de 72 à 75%. A cette étape, la fleur (flores de surface) se développe, le pH remonte jusqu'à des valeurs qui peuvent atteindre la valeur initiale (pH 5,8). Le séchage permet d'obtenir un produit stabilisé dont l' $a_w$  finale se situe entre 0,85 et 0,90 selon le produit. C'est une étape propice au développement de la flaveur. Cette flaveur résulte de la dégradation, d'une part, des triglycérides et phospholipides par des réactions de lipolyse et d'oxydation, et, d'autre part, des protéines par la protéolyse qui englobe la dégradation des protéines en peptides et celle des peptides en acides aminés et le catabolisme des acides aminés.

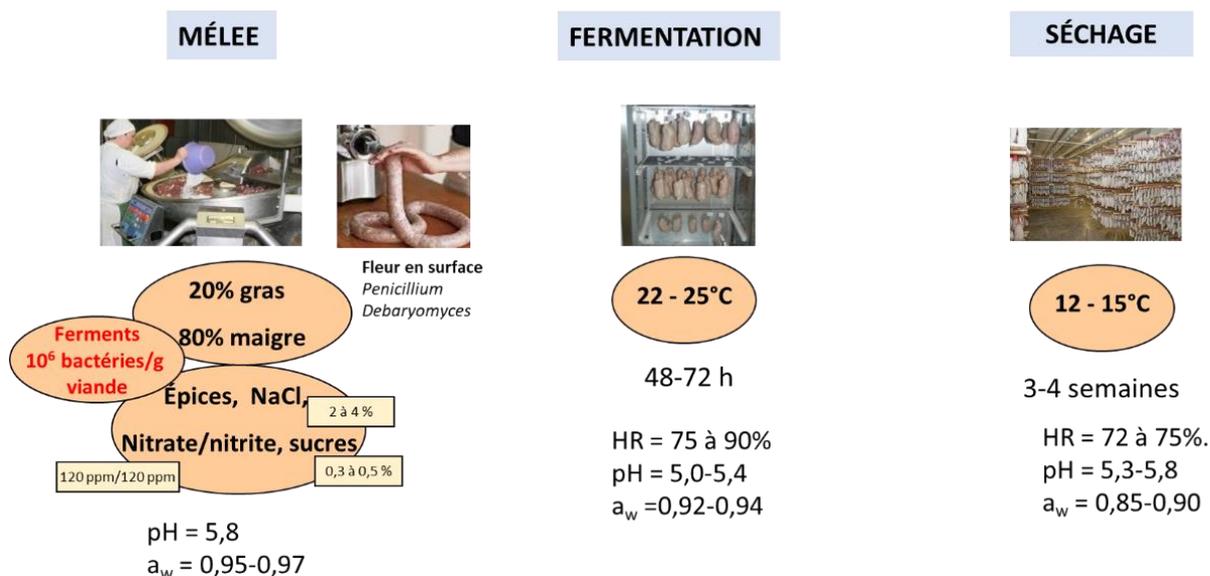


Figure 16. Les étapes de fabrication d'un saucisson sec.

- **Croissance et inactivation de *Salmonella* pendant la fabrication du saucisson**

Les modèles développés et utilisés actuellement pour simuler l'évolution de *Salmonella* lors de l'ensemble de la fabrication de saucisson sec ne permettent pas de prendre en compte et de faire varier la quantité de nitrite ajouté. En effet, le modèle de Coroller *et al.* (Coroller *et al.*, 2015) considère la croissance au cours de la fermentation puis la réduction pendant le séchage mais il ne permet pas de faire varier les quantités de nitrite. De la même manière, le modèle développé (Swart *et al.*, 2016) et utilisé dans les évaluations des risques de salmonellose pour les saucissons dans les avis de l'EFSA et de l'Anses (Anses, 2018b) ne considère pas la concentration en nitrite.

Ainsi, un nouveau modèle secondaire pour prévoir le comportement de *Salmonella* au cours de la fabrication du saucisson sec a été développé par le GT. La modélisation est construite de phases successives avec des modèles secondaires adaptés : une phase de croissance lors de la fermentation et une phase d'inactivation lors du séchage.

- Croissance pendant la fermentation

Les conditions de température, de pH, d'activité de l'eau et de concentration en acide lactique dans les mêlées peuvent être favorables à la croissance de *Salmonella* pendant les 48 premières heures de fabrication (Coroller *et al.*, 2015). La concentration en acide lactique et le pH dépendent des flores de fermentation utilisées (Coroller *et al.*, 2015; Swart *et al.*, 2016). Afin de prendre en compte l'impact des nitrites sur la croissance de *Salmonella* pendant cette phase de fermentation, le GT NiNa a utilisé le modèle secondaire de croissance proposé par le logiciel de microbiologie prévisionnelle *Combase*<sup>35</sup> (Baranyi and Tamplin, 2004). Ce modèle a été développé sur des données en milieu de culture. L'annexe 7 présente l'équation du modèle polynomial reliant la vitesse de croissance de *Salmonella* à la concentration en nitrite pour les conditions correspondant au procédé de fabrication pendant la phase de fermentation (c'est-à-dire, une température de +22°C, un pH de 5,8 et une activité de l'eau égale à 0,97).

<sup>35</sup> [www.combase.cc](http://www.combase.cc)

Le temps de latence pour *Salmonella* dépend de l'état physiologique des cellules bactériennes et est inversement proportionnel à la vitesse de croissance. L'état physiologique de *Salmonella*, quantifié par le paramètre  $K$ , en début de fabrication des saucissons n'est pas connu. Comme pour *L. monocytogenes*, il est considéré que le paramètre  $K$  peut prendre des valeurs comprises entre 0 et 5. La valeur proposée par défaut par le logiciel *Combase predictor* est  $K=3,3$ .

- Inactivation pendant le séchage

Concernant l'inactivation, le modèle secondaire *ConFerm* (version 3.0, novembre 2019) développé par le Danish Meat Research Institute (Gunvig et al., 2016) a été utilisé par le GT NiNa. Ce modèle permet de prévoir la cinétique d'inactivation de *Salmonella* pendant le séchage en fonction de la température, du pH, du taux de sel (NaCl ou KCl), du pourcentage de perte en eau, de la durée du procédé, et du taux de gras dans les mêlées et des apports en nitrites.

Les sorties du modèle secondaire *ConFerm* pour des conditions variables en nitrites et des conditions caractéristiques du procédé de fabrication des saucissons en France ( $T= +22^{\circ}\text{C}$ , pH initial = 5,8, durée de fabrication : 24 jours, NaCl = 2,9%, % perte en eau = 38%, % gras = 20%) ont été utilisées pour construire le modèle d'inactivation présenté dans l'annexe 7.

- Validation du nouveau modèle proposé

La sortie du modèle proposé par le GT NiNa est présentée sur la Figure 17. Cette figure montre l'impact de la concentration en nitrite sur la concentration de *Salmonella* en fin de la phase de fermentation. Une croissance de  $3,5 \log_{10}$  est prédite par le modèle en l'absence de nitrite, alors que la croissance prévue par le modèle est inférieure à  $0,5 \log_{10}$  quand les concentrations sont supérieures à  $60 \text{ mg kg}^{-1}$ . En considérant l'ensemble du procédé de fabrication (au cours des étapes de fermentation et séchage), le niveau final de contamination est inférieur au niveau initial pour des concentrations en nitrites supérieures à  $30 \text{ mg kg}^{-1}$ . Les niveaux atteints en l'absence de nitrites sont 40 000 plus élevés que pour une concentration de  $120 \text{ mg kg}^{-1}$ .

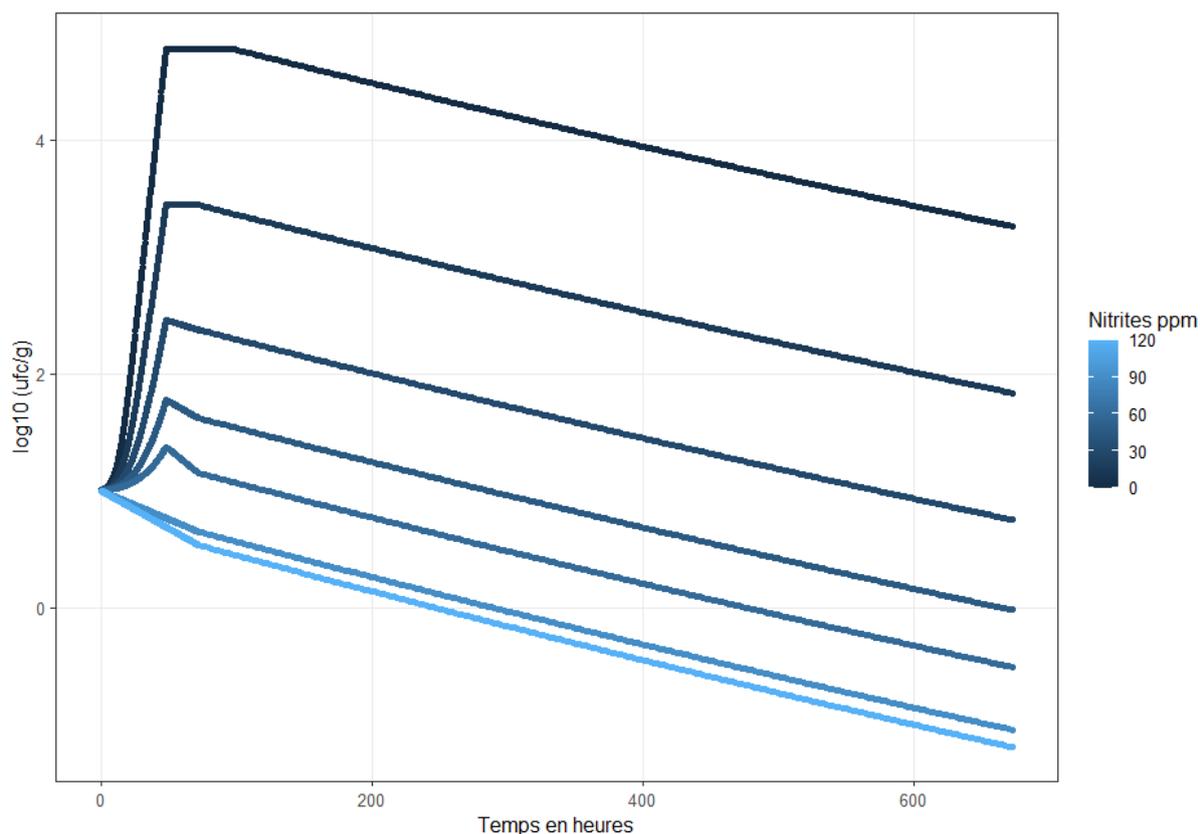


Figure 17. Prévisions du modèle secondaire développé par le GT NiNa illustrant l'impact de la concentration en nitrite sur la croissance de *Salmonella* au cours de la fermentation (48 premières heures +22°C, pH=5,8 et activité de l'eau 0,97, valeur de K=3,3) et l'inactivation pendant le séchage du saucisson sec (+22°C, 80% de gras, 2,9% de NaCl, perte en eau au terme de 672h (24 jours) = 38%).

La Figure 18 présente la confrontation des prévisions de ce modèle secondaire (pointillés) à des données observées (points) au cours de *challenge-tests* (Christieans et al., 2018; Hospital et al., 2014). Les prévisions du modèle réalisées en considérant des valeurs de *K* comprises entre 0 et 5 présentent une bonne adéquation avec l'évolution observée de la contamination initiale choisie pour réaliser les deux *challenge-tests*.

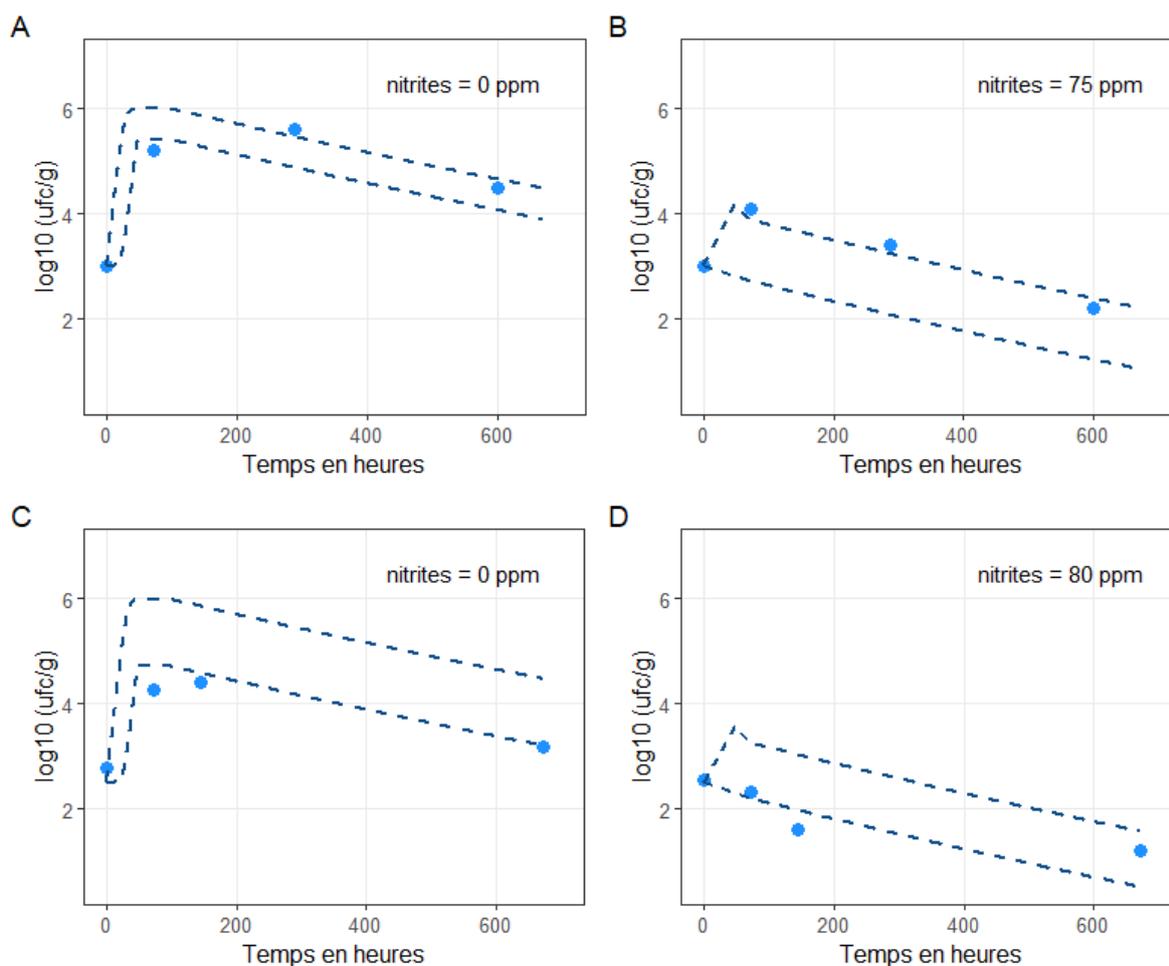


Figure 18. Comparaison des prévisions du modèle secondaire développé pour *Salmonella* au cours du procédé de fabrication (--- pour K=0 et K=5, cinétique sans et avec temps de latence respectivement) à des données d'évolution de *Salmonella* observées au cours des phases de fermentation et de séchage (A et B, données issues de (Hospital et al., 2014), C et D de (Christieans et al., 2018)).

#### • Impact des nitrites sur le risque de salmonellose

Le Tableau 9 présente le résultat de la réduction de la concentration en nitrite sur le risque de salmonellose en France associée à la consommation de saucisson sec. Pour la situation de référence (nitrite = 120 mg kg<sup>-1</sup>) le nombre annuel de cas de salmonellose estimé est de 3,9x10<sup>3</sup>. Ce résultat est sensible aux hypothèses de modélisation. Le nombre de cas de salmonellose est en effet influencé par l'incertitude sur la prévalence de portage dans les élevages de porc, les hypothèses de modélisation tout au long de la chaîne d'abattage ou encore la connaissance sur les pratiques industrielles concernant les conditions de séchage des saucissons. Si l'on considère la gamme de durée de séchage allant de 24 à 35 jours, le nombre de cas de salmonellose varie entre 2,6x10<sup>3</sup> et 9,8x10<sup>3</sup> cas par an. Ces estimations sont cohérentes avec la situation épidémiologique précédemment décrite.

Le nombre de cas de salmonellose estimé à l'aide du modèle AQR serait multiplié par un facteur de 344 si les produits étaient fabriqués sans nitrite, en l'absence de toutes nouvelles mesures de maîtrise complémentaires appliquées à l'élevage, à l'abattage et à la production.

Tableau 9. Impact sur le risque de salmonellose de différents scénarios de réduction en nitrites.

Scénarios	Augmentation relative du risque de salmonellose
#Référence (Nitrites = 120 mg kg <sup>-1</sup> )	_*
Nitrites = 90 mg kg <sup>-1</sup>	x1,6
Nitrites = 45 mg kg <sup>-1</sup>	x8,2
Nitrites = 30 mg kg <sup>-1</sup>	x22,6
Nitrites = 0 mg kg <sup>-1</sup>	x343,8
Nitrites = 90 mg kg <sup>-1</sup> + allongement de 3 jours de la durée de séchage	x1,1
Nitrites = 45 mg kg <sup>-1</sup> - diminution de 0,5 log <sub>10</sub> des niveaux de contamination à l'abattoir	x0,9
Nitrites = 0 mg kg <sup>-1</sup> - réduction de 0,5 log <sub>10</sub> à l'élevage + 0,5 log <sub>10</sub> à l'abattoir + de 0,5 log <sub>10</sub> pendant le procédé de fabrication + abattage logistique des porcs + alimentation liquide des porcs à la ferme	X1,9

\*\* Le modèle d'appréciation des risques de salmonellose pour le scénario de référence choisi est de 3900 cas par an

- **Quelles mesures alternatives pour compenser la réduction en nitrites pour le saucisson sec ?**

L'Anses a exploré en détail les différentes mesures de maîtrise applicables à l'élevage, pendant le transport des animaux, à l'abattage, pendant la fabrication et la distribution des produits (Anses, 2018b). Le Tableau 9 montre un exemple des mesures de maîtrise qui pourraient compenser une diminution partielle ou totale des ajouts de nitrites.

Il est possible d'agir au niveau des matières premières pour maîtriser ce sur-risque. Par exemple, comparé à la situation de référence avec 120 mg kg<sup>-1</sup> de nitrite, le risque pour des saucissons ne contenant que 45 mg kg<sup>-1</sup> de nitrite dans les mêlées est multiplié par 8,2. Or, une réduction de 0,5 log<sub>10</sub> de la concentration en *Salmonella* sur les carcasses à l'abattoir permettrait de revenir à un niveau de risque proche de la situation de référence avec 45 mg kg<sup>-1</sup>.

Le modèle permet également de mesurer l'effet de la durée de séchage lors de la fabrication des saucissons. D'après les résultats, une augmentation de 3 jours de la durée de séchage de saucisson contenant 90 mg kg<sup>-1</sup> de nitrites permet de garantir un niveau de risque équivalent à la situation de référence. Le séchage sur des durées plus longues n'a pas été exploré, compte-tenu de l'incertitude liée à la modélisation du procédé de séchage en situation industrielle.

En revanche, en l'absence de nitrite, le risque de salmonellose ne semble pouvoir être ramené à la situation de référence même en appliquant l'ensemble des mesures les plus protectrices envisagée dans l'avis de l'Anses en 2018 (à savoir : une amélioration de l'efficacité des mesures de maîtrise de 0,5 log<sub>10</sub> pour l'élevage, l'abattage, la fabrication ainsi que l'application de l'abattage logistique).

D'autres mesures de maîtrise sont potentiellement envisageables comme l'optimisation de la phase de fermentation avec l'utilisation de bactéries lactiques présentant une acidification plus efficace ou une croissance importante même à des températures de fermentation plus basses. Ces mesures n'ont pas pu être évaluées en l'absence de modèles disponibles pour modéliser la croissance des flores lactiques en fonction de la concentration en nitrites.

Les conditions de conservation des saucissons pourraient également être une mesure de maîtrise applicable au niveau des consommateurs. L'inactivation de *Salmonella* pendant la conservation est plus importante quand les produits sont conservés à température ambiante comparée à une conservation au réfrigérateur (Serra-Castelló et al., 2021).

**Conclusion concernant l'utilisation des nitrites dans les saucissons secs et le risque de salmonellose lié à la consommation de cette denrée**

**Les saucissons secs sont à l'origine de nombreux cas de salmonellose en France. Les nitrites jouent un rôle essentiel dans la maîtrise de *Salmonella*, notamment pour limiter sa croissance pendant la phase de fermentation.**

**En l'absence de mesures de maîtrise compensatrices, le risque de salmonellose serait considérablement augmenté si les niveaux de nitrites devaient être revus à la baisse.**

**Des réductions partielles des ajouts de nitrites sont envisageables à condition d'adopter des mesures de maîtrise pour diminuer la contamination des matières premières ou augmenter l'inactivation pendant le séchage.**

**Le retrait total des nitrites dans les saucissons conduirait à une augmentation du risque même avec l'adoption de plusieurs mesures de maîtrise compensatoires proposées par l'Anses dans son rapport de 2018 pour lutter contre le risque de salmonellose.**

#### **8.3.4. Evaluation de l'impact des nitrites sur la croissance de *Clostridium botulinum* dans le jambon sec**

- **Part des cas de botulisme associée aux jambons secs**

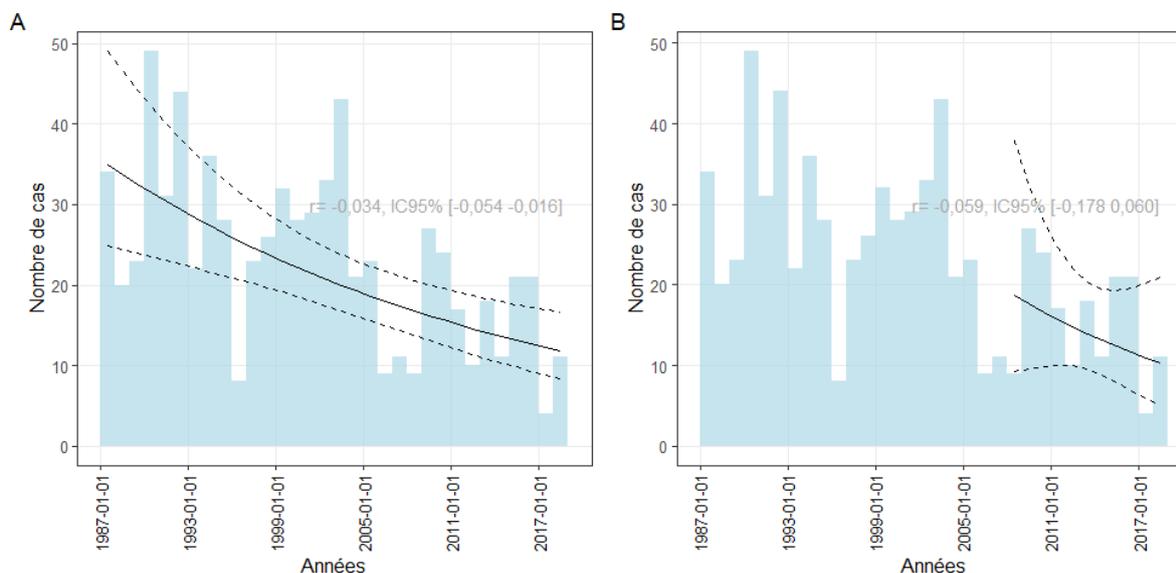
- Foyers et nombre de cas de botulisme recensés en France

Bien que le botulisme humain soit une maladie rare, il est régulièrement observé en France et fait l'objet d'une surveillance attentive par les autorités de santé grâce à la mise en place du Centre National de Référence (CNR) du botulisme depuis 1978 et à la déclaration obligatoire de la maladie à SpF depuis 1986. Le botulisme est une affection neurologique rare mais grave, qui se caractérise par des paralysies flasques descendantes. Elle est due à des neurotoxines appartenant à sept types (A à G). Les signes cliniques les plus fréquemment rapportés sont une paralysie oculomotrice et laryngée, une paralysie des membres et du diaphragme, pouvant évoluer vers une détresse respiratoire et la mort du patient.

Ce bilan présente la situation du botulisme humain en France à partir des données épidémiologiques de SpF et des investigations biologiques du CNR botulisme et révèle que le botulisme d'origine alimentaire est celui qui est très majoritairement observé sur notre territoire. Ainsi, parmi les 100 foyers de botulisme humain recensés sur la période 2008-2018, 82 % des foyers (89,8 % des cas) étaient d'origine alimentaire. Les autres cas sont principalement des cas de botulisme infantile (17 % des foyers et 9,6 % des cas) ainsi que des cas de botulisme par blessure (1 % des foyers et 0,6 % des cas).

En France, le nombre de foyers comme le nombre de cas de botulisme humain d'origine alimentaire a significativement diminué au cours de la période 1987-2018 (Figure 19). L'information relative au nombre de foyers et de cas avant cette période est disponible mais l'évolution importante du système de surveillance sur cette période rend toute comparaison difficile. En considérant uniquement la période de 2008 à 2018 le nombre de cas et de foyers reste stable (Figure 19). Au cours de cette période, on observe de 3 à 13 foyers (incidence

annuelle de 7,5 foyers/an) et 4 à 25 cas (incidence annuelle de 14,5 cas/an) de botulisme humain d'origine alimentaire en France.



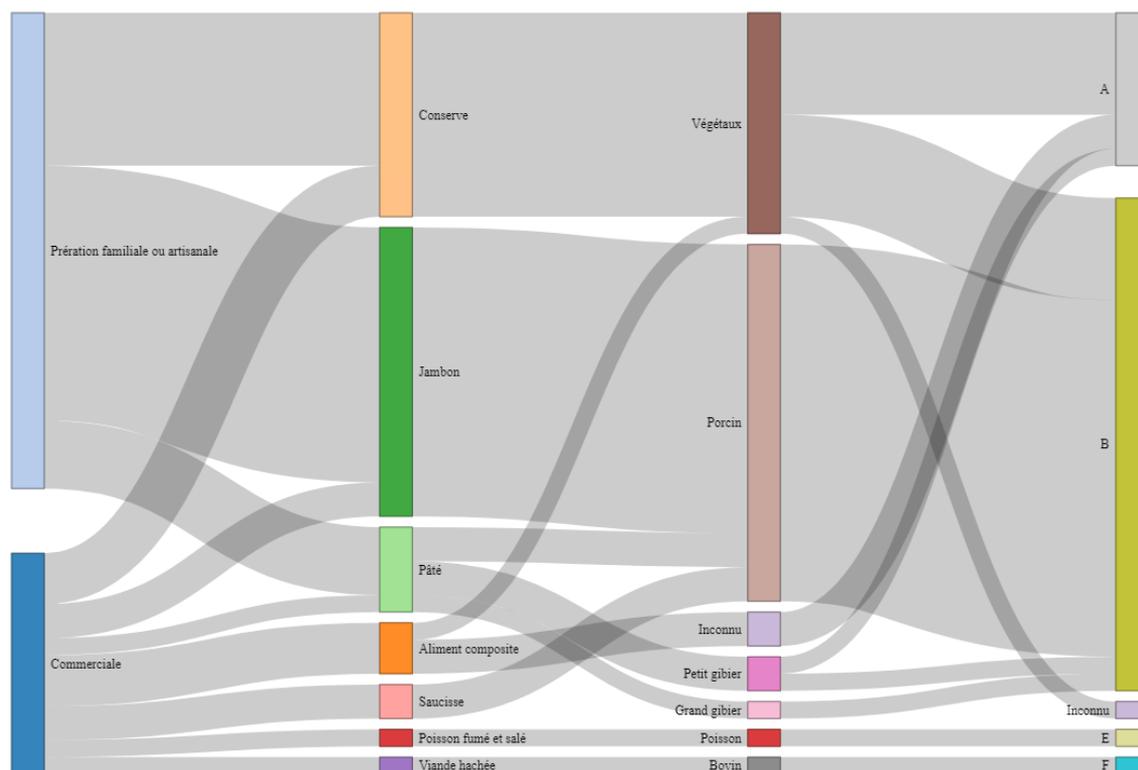
**Figure 19. Nombre de cas de botulisme humains d'origine alimentaire. D'après (Anses, 2021).**

(Légende : les courbes représentent une analyse de tendance sur la période 1987-2018 (A) et sur la période 2008-2018 (B). L'analyse de tendance (la valeur de  $r$  caractérise le taux d'évolution annuel) a été réalisée à l'aide du package R incidence (Kamvar et al., 2019).

Au cours de la période 2008-2018, 82 foyers de botulisme humain d'origine alimentaire ont été recensés en France. Ces 82 foyers représentent un total de 159 cas (le nombre maximal de personnes impliquées dans un foyer est de 6). Plusieurs types de toxines botuliques ont été identifiés lors des investigations microbiologiques. Le type B est responsable de 53 foyers (et 106 cas) soit 64 % des foyers et 67 % des cas, le type A de 15 foyers (30 cas) soit 18 % des foyers et 19 % des cas. Les types E (deux foyers) et F (deux foyers) sont à l'origine de quatre foyers impliquant quatre et cinq cas, respectivement. Enfin, pour 10 foyers (14 cas) il n'a pas été possible de déterminer le type toxinique à l'origine des foyers ou des cas (prélèvements biologiques absents, insuffisants ou trop tardifs, aliment non identifié ou indisponible). Faute d'absence de restes alimentaires disponibles pour analyse, l'aliment responsable n'a pu être identifié que dans 41 foyers (soit 50 %).

- Part des cas de botulisme attribuable au jambon sec

La Figure 20 présente les caractéristiques des foyers de botulisme humain sur la période 2008-2018 pour lesquels la source alimentaire a été identifiée. Parmi les 41 foyers, 28 foyers ont pour origine des préparations familiales et 13 des préparations commerciales (6) et/ou artisanales (7). Les deux sources principales d'aliment sont le jambon cru/sec (N=17 dont 15 ayant une origine artisanale ou familiale) ainsi que les conserves de légumes (N=12). D'autres produits de charcuterie sont impliqués (N=7). Enfin, trois aliments composites, un poisson fumé et salé (8) et de la viande hachée ont également été à l'origine de foyers de botulisme. Les types A et B restent largement majoritaires en France.



**Figure 20. Répartition des foyers de botulisme alimentaire avec identification de la source alimentaire (N = 41.** (Légende : l'épaisseur des traits est proportionnelle au nombre de cas) en fonction du type de préparation, de la nature de l'aliment, de l'origine des aliments et du type de toxine botulique. D'après (Mazuet et al., 2011; Mazuet et al., 2014; Mazuet et al., 2018))

### • Procédé de fabrication du jambon sec

Le procédé de fabrication des jambons secs comporte plusieurs étapes : sélection du jambon, salage, post-salage, pré-maturation et séchage/maturation. Concernant l'étape de sélection des jambons, la valeur du pH est un facteur critique (Garcia-Rey et al., 2004). Il joue un rôle important sur les propriétés technologiques (élasticité, protéolyse) des jambons (Guerrero et al., 1999; Schivazappa et al., 2002). Les jambons utilisés pour la fabrication de jambon sec présentent des pH compris entre 5,6 et 5,9 (Harkouss, 2014). Le poids est également un critère de tri des jambons.

Pour l'étape de salage, il existe deux procédures (Martuscelli et al., 2015). Les jambons sont entièrement recouverts de sel pendant une durée de salage allant de 1 à 1,5 jour par kg de viande crue, ou ils sont salés uniquement sur la partie musculaire (sans saler la couenne). Le sel peut être apporté en plusieurs étapes. La durée du processus de salage est variable avec des durées généralement comprises entre une à deux semaines. Le salage des jambons est généralement réalisé dans une chambre froide (+1 / +3°C à 80-90% d'humidité relative). Au cours de cette étape, le sel commence à diffuser dans les premiers centimètres de profondeur. Les nitrites et nitrates sont apportés au cours de la phase de salage. Ils sont utilisés pour la conservation et les propriétés organoleptiques (Mirade, 2019)

L'étape de repos, ou post-salage, permet la distribution du sel dans les zones internes du jambon. Les jambons salés sont ainsi conservés à +2 / +5°C pour limiter le risque microbiologique, à une humidité relative de 70-80%, pendant 60-80 jours (Harkouss, 2014).

Une étape d'étuvage peut être appliquée (pour les fabrications de type « bayonne »). Après le post-salage, la température est portée à +22/+24°C pendant 7 à 10 jours pour accélérer l'évolution biochimique de la phase de séchage du produit.

Enfin, la phase de séchage (ou phase de maturation) intervient en fin de procédé de fabrication et dure généralement 6 mois minimum, à des températures comprises entre +13 et +16°C et une humidité relative de 60-70%. Les jambons perdent de l'eau au cours de cette étape, ce qui a pour conséquence une diminution de l'activité de l'eau. L'étape de séchage favorise la mise en place de mécanismes biochimiques, tels que la protéolyse et la lipolyse, qui sont responsables des caractéristiques sensorielles et de la production de composés aromatiques (Harkouss et al., 2015). A l'issue de cette étape, les produits peuvent être conservés à température ambiante.

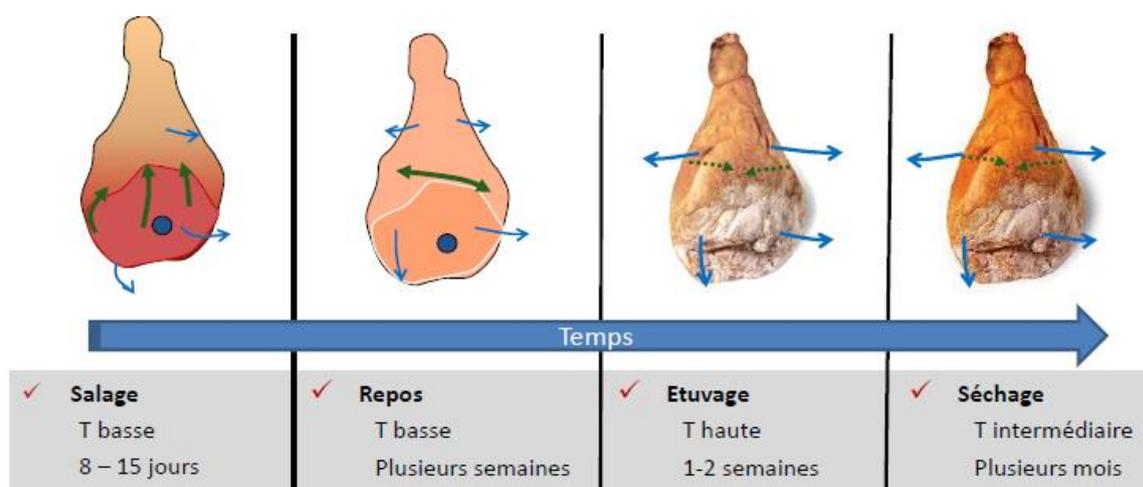
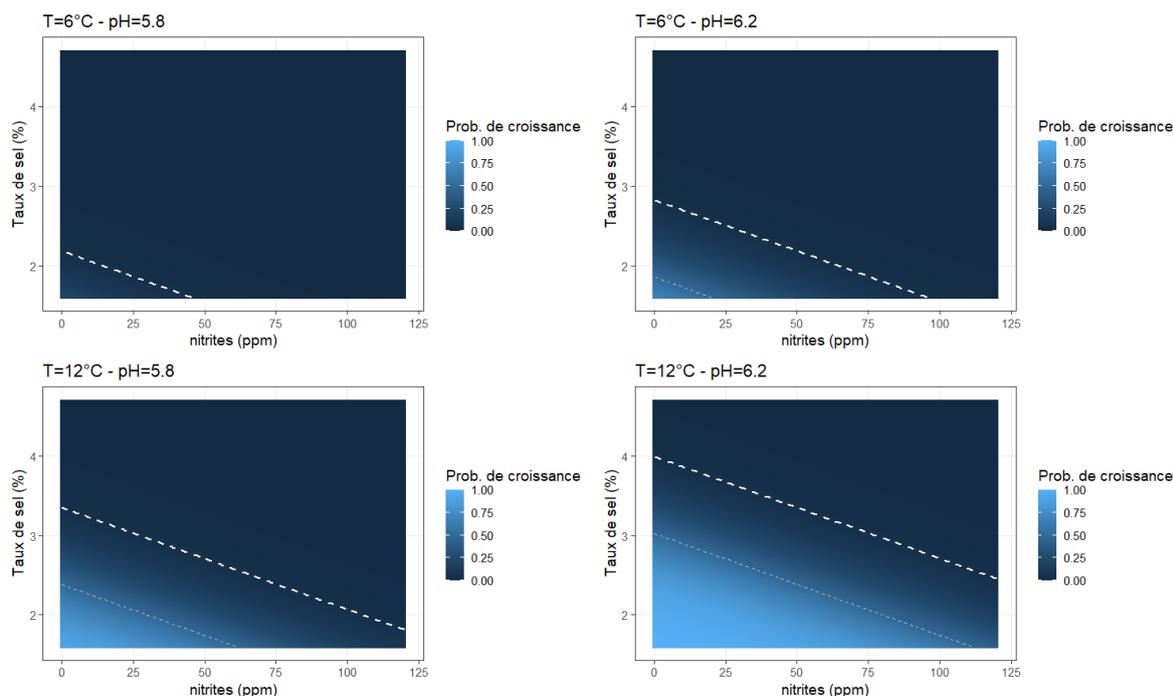


Figure 21. Principales étapes de fabrication du jambon sec (d'après Mirade 2016).  
(flèches vertes : transfert de sel, bleues : transfert d'eau.)

#### • Impact des nitrites sur la croissance de *C. botulinum*

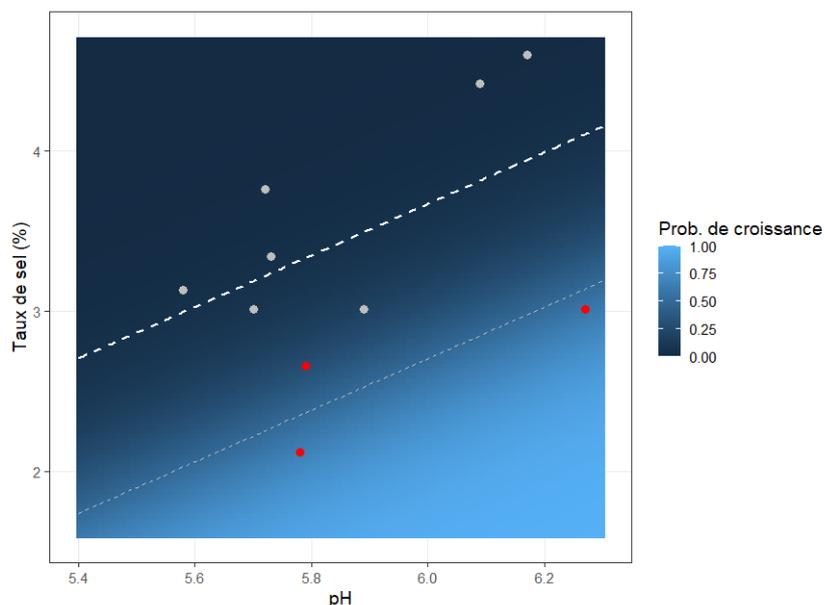
Les conditions de température, de pH, d'activité de l'eau, la présence d'acides organiques et de nitrites sont des facteurs clés dans la maîtrise de la germination des spores de *C. botulinum* dans les viandes (Anses, 2021; Gunvig et al., 2013; Koukou et al., 2021). Pour les jambons secs, la phase de risque maximal pour la production de toxine botulique a été identifiée lors de la transition entre la fin de la période de repos au froid et la première phase à température plus élevée (étuvage ou séchage) (Meriali et al., 2016).

Afin de prendre en compte l'impact des nitrites sur la probabilité de croissance de *C. botulinum* pendant la phase de salage, de repos et le début de la phase de séchage, le GT NiNa a utilisé le modèle secondaire développé par le *Danish Meat Research Institute*. Ce modèle a été développé et validé avec des données obtenues en milieu de culture. L'annexe 8 présente l'équation du modèle logistique reliant la probabilité de croissance de *C. botulinum* non protéolytique en fonction de la concentration en nitrite pour les conditions correspondant au procédé de fabrication. La probabilité de croissance de *C. botulinum* estimée à l'aide de ce modèle dans les jambons secs est représentée sur la Figure 22 pour différentes combinaisons de température (6°C ou 12°C) et de pH (5,8 ou 6,2) en fonction du taux de sel et de la quantité de nitrites ajoutés.



**Figure 22. Probabilité de croissance de *C. botulinum* psychrotrophe en fonction de la concentration en nitrites et du taux de sel dans la phase aqueuse pour différentes conditions de pH et de température.** Les lignes pointillées blanches et grises matérialisent les probabilités de croissance de 0,01 et 0,5, respectivement. Les prévisions sont issues du modèle de Gunvig et al. (Gunvig et al., 2013)

La Figure 23 présente la confrontation des prévisions de ce modèle secondaire à des données observées au cours de *challenge-tests* réalisés sur des jambons de parme (Merliardi et al., 2016). Les prévisions du modèle présentent une bonne adéquation avec l'évolution observée de la contamination initiale choisie pour réaliser les deux *challenge-tests*.



**Figure 23. Comparaison des prévisions du modèle de probabilité de croissance** (les lignes pointillées blanches et grises matérialisent les probabilités de croissance de 0,01 et 0,5 respectivement) de *C. botulinum* (Gunvig et al., 2013) à des données observées de croissance (points rouges) ou de non croissance (points gris) au cours de *challenge-tests* réalisés à 20°C sur des jambons secs présentant différentes valeurs de taux de sel et de pH (Merliardi et al., 2016). Les simulations présentées ont été réalisées pour une température de 13°C et des concentrations en nitrites égales à 0 mg kg<sup>-1</sup>.

- **Impact des nitrites sur la probabilité de croissance de *C. botulinum* non protéolytique au cours du procédé de fabrication du jambon sec**

Bien que *C. botulinum* soit une bactérie ubiquiste, circulant activement dans les réservoirs animaux, notamment chez les porcins (Anses, 2021), la littérature scientifique et les données de surveillance ne permettent pas de déterminer la prévalence et les niveaux de contamination par *C. botulinum* des jambons utilisés comme matières premières.

Une démarche d'appréciation quantitative des risques ne peut donc pas être appliquée à ce couple. En revanche, il est possible de quantifier l'impact des nitrites sur *C. botulinum* au travers de sa probabilité de croissance en fonction de différentes conditions rencontrées au cours du procédé de fabrication des jambons secs.

La migration du sel dans les jambons au cours des étapes de salage et de repos génère des gradients de taux de sel (Harkouss et al., 2018). L'emplacement des muscles au sein du jambon est donc un facteur à prendre en compte dans le calcul de la probabilité de croissance de *C. botulinum*. La Figure 24 permet de comparer l'impact de la nature du muscle sur le taux de sel dans la phase aqueuse. Un écart important est observé entre la « sous-noix » (muscles « biceps femoris » et « semitendinosus ») et la « grosse » noix (muscle « semimembranosus ») après 70 jours de fabrication.

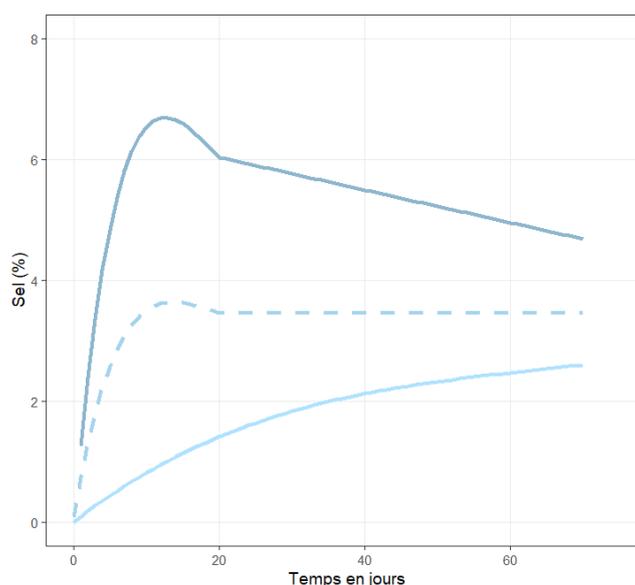


Figure 24. Evolution de la teneur en sel dans le muscle entier (---), dans la grosse noix (-) et la sous-noix (·). D'après les simulations du modèle de jambon numérique (Harkouss et al., 2018).

La Figure 25 présente l'impact des nitrites sur la probabilité de croissance de *C. botulinum* non protéolytique pendant la phase de repos et de début d'affinage pour la sous-noix. La probabilité de croissance est supérieure à 0,01 en début de phase de repos pour les jambons contenant moins de 60 mg kg<sup>-1</sup> de nitrite. En début de phase d'affinage seul les jambons ne contenant pas de nitrites sont susceptibles de présenter des probabilités de croissance de *C. botulinum* supérieures à 0,01.

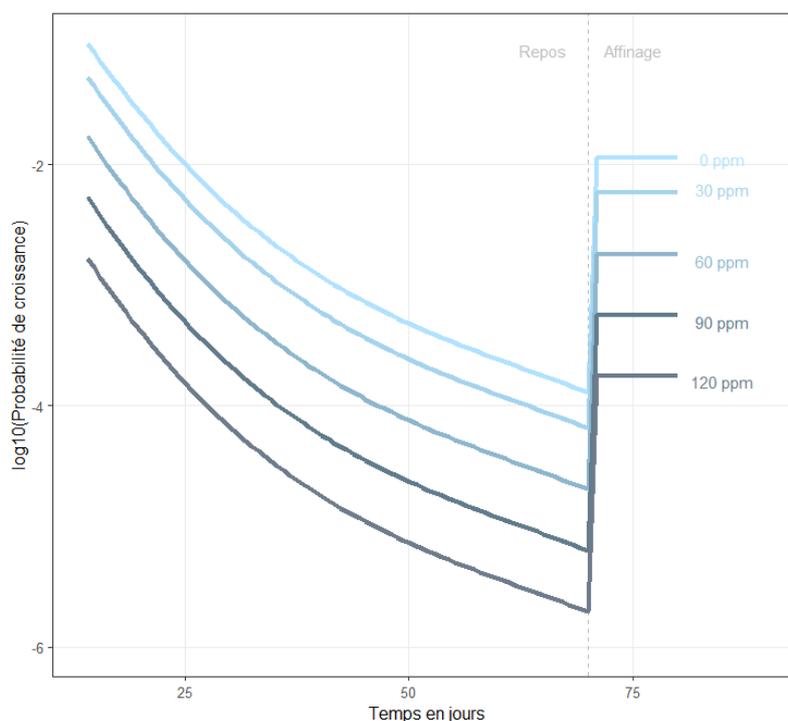


Figure 25. Probabilité de croissance de *C. botulinum* non protéolytique dans la sous-noix pendant le repos à +4°C et le début de la phase d'affinage à 13°C (pour un pH=5,8 et en l'absence de lactate de sodium).

Les valeurs de taux de sel atteintes dans les jambons secs dans la sous-noix au moment de la remontée en température pour la phase d'affinage correspondent à des valeurs d'activité de l'eau inférieures à 0,97 (Harkouss et al., 2018). Merialdi *et al.* (Merialdi et al., 2016) ont rapporté qu'aucune croissance et aucune production de toxine n'ont eu lieu dans les jambons secs avec des activités de l'eau inférieure 0,97 inoculés avec des souches de *C. botulinum* protéolytiques et non protéolytiques, au moment de la transition de la phase de repos à la phase d'affinage à température ambiante. À cet égard, le plan de contrôle HACCP (*Hazard Analysis by Critical Control Points*) adopté pour le jambon de parme, stipule que la sécurité du procédé de fabrication du jambon est conditionnée par la réduction de l'activité de l'eau interne en-dessous de 0,97 pendant la période de repos à froid ; réalisation requise avant de commencer la phase de maturation à température plus élevée (Pinna et al., 2020).

- **Quelles mesures alternatives pour compenser la réduction des ajouts de nitrites pour le jambon sec ?**

Le niveau de contamination à l'abattoir est un facteur important pour la maîtrise du risque lié à *C. botulinum* dans le jambon sec. Il est cependant difficile de pouvoir apporter des recommandations particulières en l'absence d'une quantification de l'efficacité des différentes mesures pouvant être mises en place pour limiter cette contamination.

Le tri des jambons sur la base du pH apparaît comme une mesure importante. Les résultats du modèle indiquent que si le pH est inférieur à 5,6 la probabilité de croissance de *C. botulinum* non protéolytique sera inférieure à 0,01 même en l'absence de nitrites. Cette mesure conduirait au retrait d'un nombre important de jambon.

Une autre mesure de maîtrise repose sur les concentrations en sel au début de la phase de repos. Ainsi, une concentration en sel d'au moins 2,5% dans la phase aqueuse (soit 1,8% dans le muscle entier) permet d'obtenir des probabilités de croissance inférieures à 0,01 des

*C. botulinum* non protéolytique. De la même façon, une concentration en sel dans la phase aqueuse supérieure à 3% en début de la phase d'affinage permet d'inhiber la croissance même en absence de nitrite des formes protéolytiques et non-protéolytiques de *C. botulinum* (Merialdi et al., 2016).

**Conclusion concernant l'utilisation des nitrites dans le jambon sec et le risque de botulisme lié à la consommation de cette denrée :**

**La consommation de jambons secs peut être à l'origine de rares cas de botulisme. Les investigations épidémiologiques indiquent que les productions familiales et artisanales sont responsables de la majorité de ces cas.**

**L'évaluation quantitative du risque de botulisme par consommation de jambon sec n'est pas possible aujourd'hui compte-tenu de l'absence de données de prévalence et de concentration de *C. botulinum* dans les matières premières.**

**Au cours du procédé de fabrication, la maîtrise des étapes de salage et de repos est essentielle pour la prévention de la croissance des *C. botulinum* protéolytiques et non protéolytiques.**

**Les modèles montrent que le respect de certaines conditions de température, pH et taux de sels permet de prévenir la croissance des *C. botulinum* non protéolytiques même en l'absence de nitrites.**

**La maîtrise de l'activité de l'eau en début de phase d'affinage permet de prévenir la croissance des formes protéolytiques.**

### **8.3.5. Conclusions relatives à la possibilité de réduire les nitrites d'après l'étude des trois couples**

Les résultats de la modélisation doivent être considérés au regard des incertitudes qui les accompagnent. Celles-ci sont liées à la disponibilité et à la qualité des données nécessaires pour la modélisation (notamment la disponibilité de données quantitatives) ainsi qu'aux hypothèses de modélisation.

Une analyse d'incertitude est disponible pour les deux modèles AQR utilisés (Anses, 2018b; Duret et al., 2019). Le GT NiNa a identifié les sources d'incertitude associées aux modifications apportées aux modèles pour mesurer l'impact des nitrites. Le Tableau 10 présente ces sources d'incertitude et présente l'analyse des conséquences sur l'appréciation des risques de listériose de salmonellose ainsi que sur les résultats présentés de probabilité de croissance de *C. botulinum*.

Tableau 10 Liste des incertitudes de modélisation en lien avec les travaux du GT NiNa

Couple	Paramètre concerné	Incertitude	Conséquence
<i>L. monocytogenes</i> / jambon cuit	Niveau auquel l'altération des flores lactiques intervient	Le modèle considère que l'altération intervient quand la concentration est de 8,6 log <sub>10</sub> CFU/g or cette valeur est incertaine. En outre il existe une diversité importante au niveau des flores lactiques présentes sur les produits (Geeraerts et al., 2017).	Le risque de listériose du modèle AQR peut être sous ou surestimé.
	Concentration de nitrites pour la situation de référence (110 mg kg <sup>-1</sup> )	Il n'existe pas de données sur les doses d'apport actuellement utilisées par les professionnels de la filière. On connaît la concentration maximale d'apport (120 mg kg <sup>-1</sup> ) inscrite dans le code des usages et la valeur maximale autorisée pour les produits biologiques (80 mg kg <sup>-1</sup> ).	Le risque de listériose du modèle AQR peut être sous ou surestimé.
<i>Salmonella</i> / saucisson sec	Croissance durant la phase de fermentation et inactivation dans la phase de séchage	En l'absence de modèle secondaire publié pour prédire l'évolution de <i>Salmonella</i> au cours de la fabrication de saucisson en tenant en compte des nitrites, le GT NiNa a construit un modèle original. Les prévisions de ce modèle sont cohérentes avec des données expérimentales indépendantes. Cependant une validation avec plus de données permettrait de vérifier les capacités du modèle à prévoir le comportement de <i>Salmonella</i> dans une plus large gamme de conditions (autres températures de fermentation, paramètres de séchage, etc.)	La croissance de <i>Salmonella</i> est potentiellement surestimée (utilisation d'un modèle sécuritaire basé sur des données en milieu de culture)
	Croissance durant la phase de fermentation	Les paramètres pour la phase de fermentation ont été considérés comme fixes (T=22°C, aw=0,97, pH=5,8). Les conditions sont cependant dynamiques et la fermentation conduit à une diminution du pH (Coroller et al. 2015)	La croissance de <i>Salmonella</i> est potentiellement surestimée car les valeurs utilisées sont proches des conditions initiales des mêlées de viandes
	Rôle des nitrites	Le modèle considère uniquement les nitrites. Il est considéré que les nitrites ajoutés ne sont convertis en nitrites qu'après la fin de phase de fermentation.	La croissance de <i>Salmonella</i> est potentiellement surestimée
<i>Clostridium botulinum</i> / jambon sec	Validation du modèle utilisé pour prévoir les probabilités de croissance	Le modèle a été construit sur des gammes de température comprises entre 2 et 13°C. Les conditions de températures au cours du repos peuvent être supérieures à cette valeur.	Pour des températures de repos supérieures à 13°C, la probabilité de croissance de <i>C. botulinum</i> présentée dans le rapport est potentiellement sous-estimée

Pour autant, ces résultats permettent de tester des hypothèses d'interventions dans la filière. Tous ces résultats devront être confirmés par la conduite d'études sur le terrain, notamment au moment de la mise en place de mesures de maîtrise par les professionnels.

Les travaux de modélisation réalisés ont permis d'évaluer les conséquences de la réduction de l'ajout de nitrites uniquement sous l'angle de leurs conséquences sur trois pathogènes ; les scénarios testés ont un impact potentiel sur d'autres micro-organismes ainsi que sur les propriétés organoleptiques. Ces impacts n'ont pas été évalués.

Les aliments choisis représentent une part significative du fardeau sanitaire lié aux trois dangers biologiques. Les produits de charcuterie cuite représentent 50% des cas de listériose, le saucisson sec 12% des cas de salmonellose et le jambon sec (de fabrication artisanale/familiale) 40% des foyers de botulisme.

Les travaux de modélisation ont permis de montrer que la réduction de l'ajout de nitrites sans adoption de mesures de maîtrise supplémentaires conduirait à une augmentation significative des risques.

Les mesures de maîtrise capables de compenser une réduction partielle ou totale de l'ajout de nitrites sont spécifiques aux différents couples. La réduction de la durée limite de consommation semblerait être la mesure la plus adaptée afin de maîtriser le risque dans des produits de charcuterie cuite à teneur réduite en nitrite. La réduction de l'ajout de nitrites dans les saucissons secs serait difficilement envisageable sans action de lutte contre *Salmonella*

dans la filière porcine. Le suivi des paramètres physico-chimiques au cours de la fabrication des jambons secs permettrait de prévenir la croissance de *C. botulinum* même en l'absence de nitrite.

D'autres mesures de maîtrise pourraient être mises en œuvre (cf. notamment la partie 3.4) sous réserve de leur validation/vérification/surveillance.

#### 8.4. Alternatives aux nitrites pour la conservation des produits carnés

De nombreuses stratégies sont envisagées dans la littérature scientifique pour remplacer partiellement ou totalement l'usage du nitrite dans les produits à base de viande. Il s'agit en particulier de l'ajout d'ingrédients naturels aux effets antimicrobiens, de l'application de technologies innovantes ou d'une combinaison de facteurs. Quelques exemples non exhaustifs sont décrits ci-dessous.

##### 8.4.1. Agents antimicrobiens naturels

- **Extraits végétaux bruts riches en nitrate**

Une littérature très fournie existe sur la possibilité d'utiliser des extraits de végétaux riches en nitrate en remplacement du nitrite ajouté (Jackson et al., 2011; Ko et al., 2017; Rivera et al., 2019; Sindelar et al., 2007; Yong et al., 2020).

C'est une alternative déjà appliquée par certains industriels pour la fabrication de jambon cuit. L'activité antimicrobienne de ces extraits végétaux s'explique par la conversion du nitrate en nitrite par des micro-organismes, dont *Staphylococcus carnosus*, espèce la plus citée (Yong et al., 2020), ou par d'autres espèces de *Staphylococcus* (Hwang et al., 2020).

Ainsi, la poudre de céleri (Eisinaïté et al., 2020; Golden et al., 2017; Ramachandraiah and Chin, 2021), le chou (Ko et al., 2017), la betterave, le persil ou divers autres extraits de fruits et légumes (Rivera et al., 2019; Yong et al., 2020) sont des végétaux largement étudiés pour leur efficacité dans la conservation du jambon ou des saucisses.

Le céleri, qui contiendrait plus de 2500 mg de nitrate par 100 g de poids frais (Yong et al., 2020), est le légume le plus utilisé dans ce contexte. De la poudre de céleri (1%) ajoutée à des saucisses de porc a un effet inhibiteur proche du nitrite de sodium (150 mg kg<sup>-1</sup>) sur les micro-organismes totaux ou les entérobactéries, malgré l'effet limité des deux conservateurs (moins d'une unité log<sub>10</sub> UFC/g de différence par rapport à l'échantillon témoin sans conservateur) (Ramachandraiah and Chin, 2021). De la poudre de céleri (68,1 g pour 18 kg de jambon) associée au levain de *S. carnosus* a le même effet inhibiteur que le nitrite de sodium (156 mg kg<sup>-1</sup>) sur la croissance de *L. monocytogenes* pendant 21 jours à 4°C (Sullivan et al., 2012). En revanche, une reprise de croissance est ensuite notée, contrairement à l'échantillon contenant du nitrite, sauf si un antimicrobien à base de vinaigre est ajouté au mélange (~ population inférieure de 3 log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup> au bout de 35 jours en comparaison du produit sans agent antimicrobien, comme avec le nitrite) (Sullivan et al., 2012).

Une poudre de légumes ou de jeunes radis (250 g kg<sup>-1</sup>) ajoutée à des saucisses cuites permet également de ralentir le développement de *L. monocytogenes* à 4°C de manière similaire au nitrite de sodium (87 mg kg<sup>-1</sup>) (~ population inférieure de 2 log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup> au bout de 15 jours en comparaison du produit sans agent antimicrobien) (Ko et al., 2017). L'efficacité légèrement supérieure du jeune radis par rapport à la poudre de légumes peut être expliquée par une concentration supérieure en nitrate (3931 mg kg<sup>-1</sup> versus 740 mg kg<sup>-1</sup>) (Ko et al., 2017).

- **Huiles essentielles, herbes et composés aromatiques**

Les extraits de plantes et en particulier les huiles essentielles, épices, herbes aromatiques ou certains de leurs composés volatils peuvent avoir un pouvoir antimicrobien intrinsèque, indépendamment de la présence de nitrate comme vu précédemment. Il s'agit d'extraits riches en phytophénols, flavonoïdes, ou acides phénoliques (Burt, 2004; Pernin et al., 2019b).

Les phytophénols, tels que le carvacrol, le thymol, l'eugénol, sont des molécules hydrophobes ( $\log P \sim 2-4$ ) ayant la capacité de s'insérer dans la membrane bactérienne qu'ils déstructurent, ce qui provoque la perturbation du gradient de protons et la mort cellulaire (Burt, 2004). Parmi ces composés aromatiques extraits de plantes, les acides phénoliques ont un mode d'action plus complexe, certains tels que les acides vanillique ou caféique, agissant comme de simples acides organiques, et d'autres comme l'acide férulique, ayant également une action sur la membrane bactérienne (Pernin et al., 2019b).

Il existe de très nombreuses études récentes comparant l'évolution de populations microbiennes avec nitrite ou divers mélanges d'extraits aromatiques ou d'huiles essentielles dans des produits à base de viande.

A titre d'exemple, l'évolution de la population des micro-organismes totaux est similaire ( $+ 1 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$  en 29 jours de stockage à 4°C) dans trois types de saucisses cuites préparées soit avec du nitrite de sodium ( $120 \text{ mg kg}^{-1}$ , témoin), soit avec un extrait d'écorces de grenade (EEG,  $1250 \text{ mg kg}^{-1}$ ), riche en acides phénoliques et flavonoïdes, ou encore un extrait de coques de pistache verte (ECPV,  $1250 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Aliyari et al., 2020). Par ailleurs, les huiles essentielles peuvent avoir une certaine efficacité sur l'inhibition ou l'inactivation de bactéries pathogènes. L'huile essentielle d'arbre à thé (0,05%) a une activité bactériostatique sur la croissance de *L. monocytogenes* dans des pâtés de dindes stockés à 4°C pendant 4 semaines (similaire au traitement traditionnel contenant  $156 \text{ mg kg}^{-1}$  de nitrite de sodium) (McDonnell et al., 2013). Une huile essentielle de thym (1,56%) introduite dans des saucisses de type mortadelle permet d'obtenir une réduction de  $\sim 2 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$  supplémentaires de *C. perfringens* par rapport au témoin sans antimicrobien en 30 jours à 25°C, ce qui est similaire à l'action de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de nitrite ajouté (De Oliveira et al., 2011). L'aldéhyde cinnamique ( $1000 \text{ mg kg}^{-1}$ ) permet également une réduction de  $\sim 2 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$  supplémentaires de la population d'*E. coli* ou de *S. aureus* dans des saucisses en comparaison d'un témoin sans antimicrobien au bout de 10 jours à 4°C (Karim et al., 2020).

L'efficacité des huiles essentielles encapsulées ou en nano-émulsions a également été étudiée dans la littérature. Par exemple, l'aldéhyde cinnamique encapsulée dans des nanofibres de maïs montre une réduction de la population d'*E. coli* ou de *S. aureus* dans des saucisses légèrement supérieure au même composé non encapsulé (Karim et al., 2020). De même, l'huile essentielle de thym ( $1000 \text{ mg kg}^{-1}$ ) encapsulée dans des nanofibres de gélatine-chitosan a permis une réduction de *C. perfringens* supérieure au témoin de plus de  $4 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$  en deux jours à 4°C (Vafania et al., 2019).

- **Agents biologiques ou composés extraits d'agents biologiques**

Des levains protecteurs, principalement composés de bactéries lactiques, peuvent aussi être utilisés pour inhiber la croissance des pathogènes dans les produits à base de viande en remplacement partiel ou total du nitrite. Ces levains produisent des composés antimicrobiens, tels que des acides lactique ou acétique, du peroxyde d'hydrogène ou des bactériocines, ces dernières étant en particulier actives pour la maîtrise de *L. monocytogenes*, *Clostridium* spp, *B. cereus*, *Salmonella* et *Escherichia coli* O157:H7 (Fraqueza et al., 2021). L'ensemencement

d'une souche de *Lactobacillus curvatus* productrice de bactériocine dans une matrice modèle à base de viande permet d'inhiber la croissance de *L. monocytogenes* ( $-5 \log_{10}$  UFC  $g^{-1}$  au bout de 2 semaines par rapport au témoin non ensemencé avec la souche productrice de bactériocine). En revanche, cet effet protecteur est moindre en présence de 20 mg  $kg^{-1}$  de nitrite ou dans une matrice modèle à base de viande riche en lipides (Kouakou et al., 2009). Ceci pourrait s'expliquer dans le premier cas par un effet inhibiteur du nitrite sur la souche productrice de bactériocine, ce qui induirait une moindre production de bactériocine, et dans le deuxième cas par des interactions hydrophobes entre les bactériocines et les lipides qui induiraient une baisse de la disponibilité de la bactériocine. Par ailleurs, un extrait éthanolique de « levure de riz rouge » (2%), qui se trouve être en fait une moisissure *Monascus* cultivée sur du riz, inhibe la germination des spores de *Clostridium*, contrairement au nitrite de sodium (300 mg  $L^{-1}$ ) (Husakova et al., 2021).

- **Limites de l'utilisation des agents antimicrobiens naturels**

Malgré l'activité antimicrobienne constatée de certains composés extraits de plantes, herbes aromatiques ou épices dans des produits carnés, tels que des saucisses, cette activité est généralement difficile à prévoir dans les matrices complexes car elle dépend largement des interactions des composés actifs avec les constituants de la matrice (Weiss et al., 2015). Par exemple, la simple présence d'agents tensio-actifs, tels que les protéines de viande ou de lactosérum, réduit l'activité inhibitrice de certains composés d'huile essentielle (Hammer and Carson, 2011; Pernin et al., 2019a). De plus, la présence de lipides peut inhiber très fortement l'activité antimicrobienne de divers composés aromatiques notamment les composés hydrophobes qui peuvent migrer vers les parties grasses du fait de leur plus grande affinité pour les lipides. Ils ne sont donc plus disponibles en quantité suffisante dans la partie aqueuse où se localisent les bactéries. Ainsi, l'eugénol ( $\log P = 2,61$ ) perd totalement son activité inhibitrice de *L. monocytogenes* dans une matrice modèle émulsionnée simulant un aliment riche en lipides. A l'inverse, l'acide férulique, acide phénolique moins hydrophobe ( $\log P = 1,67$  pour la forme non dissociée) garde son activité anti-*Listeria* dans ces mêmes matrices émulsionnées (Pernin et al., 2019a). De la même façon, alors que l'ajout d'huile essentielle de menthe (2%) permet une réduction plus importante de la population de *Salmonella* dans le tzatziki lors du stockage à 10°C en comparaison avec un témoin sans agent antimicrobien, ce n'est pas le cas dans du pâté conservé dans les mêmes conditions, où une croissance bactérienne identique au témoin est observée (Tassou et al., 1995). Un gel contenant de l'huile essentielle de coriandre (6%) déposé sur les tranches de jambon emballées sous vide et conservées à 10°C n'est pas non plus efficace vis-à-vis de *L. monocytogenes* par rapport au témoin sans traitement (Gill et al., 2002). Par ailleurs, si des extraits de plantes sont ajoutés sous forme de marinade, le pouvoir tampon de la viande neutralise l'acidité de la marinade, limite la dissociation des acides lipophiles, ce qui entraîne une perte de leur effet inhibiteur de croissance de *Campylobacter* (Björkroth, 2005).

En outre, ces composés aromatiques d'huiles essentielles ne sont pas forcément très faciles à utiliser au niveau industriel. La première des raisons est que les extraits végétaux ont une variabilité considérable en termes de composition et qu'il est donc difficile de les utiliser de manière reproductible (Rivera et al., 2019). Ensuite, la plupart possède un fort pouvoir aromatique ou apporte une couleur non souhaitée, ce qui peut altérer les propriétés organoleptiques du produit (Kim et al., 2011b; Rivera et al., 2019). Ce phénomène peut être limité en utilisant l'encapsulation des composés dans des nanofibres, puisque certaines ne

montrent aucun effet néfaste sur la couleur, la texture ou les propriétés sensorielles de saucisses (Karim et al., 2020; Vafania et al., 2019).

- **Combinaisons d'agents antimicrobiens naturels**

Dans le cadre d'une recherche d'alternatives pour remplacer partiellement ou totalement l'usage du nitrite dans les produits à base de viande, certaines études scientifiques envisagent des combinaisons appliquant la théorie des barrières ou conservation multifactorielle (Leistner, 2000). Le principe est d'obtenir l'inhibition de la croissance bactérienne avec le cumul de plusieurs facteurs chacun ajouté à faibles doses mais agissant ensemble avec des effets additifs voire synergiques. Ainsi, utilisant de faibles doses pour chaque composé, cette méthode permet de limiter les inconvénients organoleptiques de certains composés au fort pouvoir aromatique ou colorés.

Des composés antimicrobiens naturels peuvent être combinés avec une dose de nitrite réduite par rapport aux valeurs données dans le Code des usages. Ainsi, parmi 90 herbes aromatiques et épices, il semblerait que l'ajout d'un extrait éthanolique de muscade (0,05%), de sauge (0,02%) ou d'un extrait à l'eau bouillante de clou de girofle (0,05%) en association avec 10 mg kg<sup>-1</sup> de nitrite permet d'obtenir l'inhibition de la croissance de *C. botulinum* dans un produit modèle à base de viande sans compromettre les propriétés organoleptiques (Cui et al., 2010). L'ajout d'huile essentielle de coriandre (0,12 mg kg<sup>-1</sup>) combinée à 60 mg kg<sup>-1</sup> de nitrite permet de stabiliser la population de micro-organismes totaux dans des saucisses de porc cuites pendant le stockage au froid pendant 52 jours (Šojić et al., 2019). Dans des saucisses cuites de bœuf, l'ajout de 90 mg kg<sup>-1</sup> d'extrait de cassis associé à 60 mg kg<sup>-1</sup> de nitrite au moment de la préparation permet de réduire plus efficacement la croissance microbienne en comparaison du même produit préparé avec 120 mg kg<sup>-1</sup> de nitrite (+ 1,9 *versus* + 2,5 log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup>) (Khaleghi et al., 2016). Dans des mortadelles, l'ajout combiné de 75 mg kg<sup>-1</sup> de nitrite et d'un mélange d'huiles essentielles (en particulier le mélange organ 2,5% - thym 0,3% - clou de girofle 0,6%) limite le potentiel de croissance de *C. perfringens* à moins de 1 log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup> lors d'un stockage à 25°C pendant 20 jours, alors que suite à l'ajout de 150 mg kg<sup>-1</sup> de nitrite, une augmentation de la population de 3 log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup> est observée dans les mêmes conditions (Dias et al., 2015). Il est aussi possible d'obtenir une activité bactéricide. Dans des saucisses préparées avec 100 mg kg<sup>-1</sup> de nitrite, l'utilisation d'un mélange d'huiles essentielles à base de cannelle (0,05%) en combinaison avec des sels d'acides organiques (1,55%) et de la nisine (12,5 mg kg<sup>-1</sup>) permet de réduire la population de *L. monocytogenes* de 2,6 log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup> au bout de 7 jours à 4°C par rapport au témoin sans antimicrobien (Ghabraie et al., 2016). Un mélange de trois huiles essentielles (cannelle, cardamome, poivre chinois) en nano-émulsion ajouté à de la mortadelle en association au nitrite (75 mg kg<sup>-1</sup>) augmente le niveau de réduction de la population de cellules végétatives de *Clostridium sporogenes* mais n'a aucun effet sur la probabilité de germination des spores (Pinelli et al., 2021). Enfin, de façon plus anecdotique, un extrait de caroténo-protéines de crabe bleu (0,5%) associé à 36 mg kg<sup>-1</sup> de nitrite pour la préparation de saucisses de viande de dinde a le même effet sur la croissance des microorganismes totaux après 10 jours à 4°C que l'ajout de 72 mg kg<sup>-1</sup> de nitrite (Hamdi et al., 2018).

Ainsi, il peut exister des combinaisons, notamment celles utilisant des extraits végétaux avec une dose réduite de nitrite, permettant d'obtenir une efficacité antimicrobienne équivalente à 120 mg kg<sup>-1</sup> de nitrite. Ces combinaisons, à l'inverse d'alternatives utilisant uniquement des huiles essentielles et/ou composés aromatiques, préservent également les qualités sensorielles des produits. Par exemple, les propriétés sensorielles d'une combinaison de 60

mg kg<sup>-1</sup> de nitrite et 750 mg kg<sup>-1</sup> d'extraits végétaux (EEG ou ECPV) ne sont pas différentes de celles du produit contenant 120 mg kg<sup>-1</sup> de nitrite (Aliyari et al., 2020).

Il existe également une littérature, bien que moins fournie, sur les alternatives utilisant les antimicrobiens naturels sans aucun apport de nitrite. Un mélange de 500 mg kg<sup>-1</sup> d'extraits végétaux (thé vert, orties et feuilles d'olive) incorporé dans la mée de saucisses de Frankfort avec des nanoparticules de 0,2% de  $\epsilon$ -polylysine montre un effet similaire à 120 mg kg<sup>-1</sup> de nitrite sur l'évolution de population des micro-organismes totaux, de *C. perfringens*, *S. aureus*, et des levures/moisissures sur 45 jours à 4°C, avec une bonne acceptabilité sensorielle du mélange (Alirezalu et al., 2021a).

#### 8.4.2. Technologies physiques innovantes en alternative aux nitrites

Diverses technologies d'inactivation des micro-organismes agissant à des températures inférieures à 40°C et applicables en industries agro-alimentaires ont été développées. Parmi celles-ci, certaines ont été testées ou sont utilisées sur des produits carnés comme des stratégies pour réduire le taux de NaCl et de phosphate dans ces produits (Kim et al., 2021; Pinton et al., 2021).

- **Hautes pressions hydrostatiques (HPH)**

Les HPH avec des intensités des pressions variant de 200 à 900 MPa sont utilisées dans l'industrie agroalimentaire, dont celle des produits carnés (Bolumar et al., 2021). Les limites au développement de cette technique sont le coût de l'équipement et le fait que les hautes pressions peuvent accélérer l'oxydation des lipides et des protéines ainsi qu'affecter la couleur des viandes (Bolumar et al., 2021). Les HPH agissent sur les membranes cellulaires (modification de la perméabilité, de la fluidité) et le métabolisme (dénaturations protéiques, inhibitions d'activités enzymatiques) des micro-organismes entraînant leur mort (Alahakoon et al., 2015; Bolumar et al., 2021; Horita et al., 2018). La sensibilité des microorganismes est variable : bactéries, levures, champignons sont détruits par des pressions pouvant aller jusqu'à 600 MPa (Bolumar et al., 2021). Les spores bactériennes peuvent résister à des pressions de 1 GPa à température ambiante. Cependant l'association des HPH avec des températures supérieures à 60°C modifie la membrane interne des spores conduisant à leur inactivation (Reineke and Mathys, 2020). Les HPH sont souvent utilisées en tant que traitement de décontamination *post* procédé dans un objectif de conservation et d'extension de la durée de vie des produits carnés. Leur efficacité dépend du niveau de la pression, de la température, du temps de traitement et de la matrice (Alahakoon et al., 2015; Bolumar et al., 2021; Horita et al., 2018). Ainsi, les micro-organismes totaux du jambon cuit tranché (1,5 log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup>) et des saucisses de Francfort (2,5 log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup>) restent à leur niveau initial lors de la conservation sous vide pendant 49 jours à 4°C après un traitement aux HPH (600 MPa, 3 min, 10°C) alors que ces populations augmentent dans les échantillons non traités (10 log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup> pour le jambon et 7 log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup> pour les saucisses) (Botsaris and Taki, 2015). Des *challenge-tests* ont permis de montrer que des pressions entre 400 et 600 MPa avec des temps courts de 5 à 10 min et des températures ambiantes (autour de 20°C) ou froides (< 6°C) ont permis des réductions de 3 à 7 log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup> de bactéries à Gram négatif (*Salmonella*, *E. coli* dont *E. coli* O157:H7, *Campylobacter*) et de 1 à 4 log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup> de bactéries à Gram positif (*L. monocytogenes*, *S. aureus*) dans divers produits carnés tels que des filets de poulet, des saucissons secs, du bœuf haché, du bœuf séché, du porc haché, du jambon cru, du jambon cuit ou des produits carnés prêts à consommer (Alahakoon et al., 2015; Barba et al., 2017;

Durantanton et al., 2012; Horita et al., 2018; Hygreeva and Pandey, 2016; Pinton et al., 2021). L'ANSES a émis plusieurs avis sur cette technologie et sur les paramètres à prendre en compte pour évaluer la sécurité des denrées traitées, notamment un avis concernant les traitements par hautes pressions hydrostatiques sur des aliments emballés (Anses, 2010).

- **Les ultra-sons**

Les ultrasons (US, 20 kHz à 10 MHz) détruisent les micro-organismes essentiellement par effet mécanique. Il s'agit d'un phénomène de cavitation qui crée des cisaillements très importants et répétitifs au niveau des cellules et entraîne une dislocation des parois (Barba et al., 2017; Kim et al., 2021). Ils sont combinés à la chaleur (thermosonication, combinaison vapeur-sonication, 90-94°C, 30-40 kHz) pour traiter les carcasses de poulets sur une chaîne d'abattage. Ce traitement entraîne une réduction de 1 log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup> pour *Campylobacter* (contamination initiale entre 2,0-2,6 log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup>) et de 0,7 log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup> pour les micro-organismes totaux (contamination initiale entre 3,5-4,8 log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup>) (Musavian et al., 2014). Les ultrasons inhibent la croissance des bactéries mésophiles et des bactéries lactiques (25 KHz, 10 min, 74°C) dans des saucisses emballées (Barba et al., 2017; Cichoski et al., 2015). Les ultrasons se sont montrés efficaces pour réduire les populations de *E. coli* O157:H7 (3 log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup>) et de cellules végétatives de *B. cereus* (1,5 log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup>) dans de la saumure (Alarcon-Rojo et al., 2019). Les US influencent positivement la diffusion du sel lors du saumurage mais ils peuvent entraîner des modifications chimiques des composants de la viande dues à la formation de radicaux libres, donc accélérer l'oxydation des lipides, et modifier les propriétés sensorielles (Horita et al., 2018).

- **Les champs électriques pulsés (CEP)**

Les CEP consistent en l'application d'un champ électrique pendant un temps très court (de l'ordre de quelques nanosecondes à quelques microsecondes) à une amplitude pulsée de 0,1 à 80 kV cm<sup>-1</sup> (Kim et al., 2021). Ils induisent une différence de potentiel électrique au niveau de la membrane cellulaire des bactéries entraînant la formation de pores (Barba et al., 2017; Gómez et al., 2019). Ce procédé impacte la membrane externe des spores bactériennes permettant un traitement enzymatique avec le lysozyme (Reineke and Mathys, 2020). Le traitement aux CEP a permis de réduire la charge microbienne de divers aliments liquides comme des jus de fruits ou de légumes, du lait (Gómez et al., 2019; Kim et al., 2021; Pinton et al., 2021). L'étude de morceaux de cuisses de poulets inoculés avec *Campylobacter jejuni* (4,4 log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup>), placés dans un tampon (pH 6,8) et traités par des champs électriques pulsés (1 kV cm<sup>-1</sup>) révèle une réduction d'environ 1 log<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup> (Clemente et al., 2020).

- **La lumière pulsée**

Le système de lumière pulsée utilise des flashes de lumière intense émis par une lampe à xénon, ces flashes ont des durées de 10<sup>-6</sup> à 10<sup>-1</sup> s et les longueurs d'ondes sont comprises entre 200 nm (UV) et 1 mm (IR). La lumière pulsée a un effet photochimique (UV) sur les liaisons ADN ou photothermique (IR) provoquant l'éclatement de la cellule. La lumière pulsée ultraviolette appliquée à 8,4 J cm<sup>-2</sup> réduit la population de *L. monocytogenes* de 1,8 log<sub>10</sub> UFC cm<sup>-2</sup> et 1,1 log<sub>10</sub> UFC cm<sup>-2</sup> sur des tranches de jambon cuit et des saucisses de Bologne cuites (Horita et al., 2018).

- **Les rayons UV**

Les rayons UV ont été utilisés pour diminuer la charge microbienne de  $1,7 \log_{10}$  UFC  $g^{-1}$  de *Campylobacter* sur les filets de poulet (dose de  $8 \text{ kJ m}^{-2}$ ) et du jambon tranché (dose de  $5 \text{ kJ m}^{-2}$ ) (Barba et al., 2017). Un traitement UV ( $8 \text{ kJ m}^{-2}$ ) réduit la population de *Salmonella* Typhimurium d'environ  $2 \log_{10}$  UFC  $g^{-1}$  dans du jambon tranché et de  $1,3 \log_{10}$  UFC  $g^{-1}$  dans de la poitrine de poulet ou du filet de poulet (Barba et al., 2017).

- **Le plasma froid**

Le plasma froid est un gaz partiellement ionisé à l'intérieur duquel l'énergie électronique se dissipe par collision mettant en jeu des électrons et les espèces réactives du gaz. Le plasma froid est ainsi un générateur de radicaux et d'espèces excitées très actives chimiquement (Barba et al., 2017; Horita et al., 2018). Il est utilisé pour décontaminer les surfaces. Des plasmas froids générés à partir d'hélium ou d'un mélange hélium/oxygène ont été testés sur des tranches de bacon inoculées avec *L. monocytogenes*, *E. coli*, ou *Salmonella* Typhimurium à un niveau de  $7-8 \log_{10}$  UFC  $g^{-1}$  (Kim et al., 2011a). Un traitement de 125 W pendant 90 secondes avec le plasma (hélium/oxygène) permet une réduction de  $2-3 \log_{10}$  UFC  $g^{-1}$  des bactéries pathogènes. Cependant des problèmes de changement de couleur et d'oxydation des lipides sont notés dans les échantillons traités (Kim et al., 2011a). Par ailleurs, lors de la génération du plasma, différentes espèces réactives de l'azote et de l'oxygène comme  $NO^\circ$ ,  $NO_2$ ,  $OH^\cdot$ ,  $O_2^\cdot$ ,  $ONOO^\cdot$  peuvent être générées (Siekman et al., 2021). Des mûelles de porc traitées au plasma développent une couleur rouge et présentent des concentrations de nitrites de  $46 \text{ mg kg}^{-1}$ , des saucisses et du jambon cru traités au plasma atteignent des concentrations de  $70 \text{ mg kg}^{-1}$  de nitrite et présentent des caractéristiques biochimiques et sensorielles proches des produits traités au nitrite (Jung et al., 2015; Siekman et al., 2021; Yong et al., 2017). Une étude a comparé des *jerky*<sup>36</sup> de porcs marinés dans de la saumure sans nitrite puis traités au plasma (jusqu'à 60 min, 4 kHz, air) à ceux saumurés en présence de nitrites (correspondant à un ajout de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  dans le produit) (Yong et al., 2019). Une même quantité de nitrite est observée dans les deux échantillons (environ  $28 \text{ mg kg}^{-1}$ ) après 40 min de traitement plasma et les échantillons ont les mêmes propriétés (couleur, oxydation des lipides). Le traitement plasma (40 min,  $28 \text{ mg kg}^{-1}$  nitrite) réduit les populations de *S. aureus* et *B. cereus* de  $0.6-0.7 \log_{10}$  UFC  $g^{-1}$  (inoculés à  $5,5-5,9 \log_{10}$  UFC  $g^{-1}$ ) alors que les nitrites aux mêmes niveaux n'ont pas d'effet (Yong et al., 2019).

- **Les rayonnements ionisants**

Trois types de rayonnements ionisants sont autorisés pour l'irradiation des aliments : les rayons gamma pour le traitement des aliments crus, cuits ou surgelés (les plus utilisés, car les moins onéreux), les rayons X et les électrons accélérés pour le traitement des emballages de taille réduite ou celui des céréales (Horita et al., 2018). Le *Codex alimentarius* indique que la dose d'irradiation ne doit pas excéder 10 kGy (Horita et al., 2018). Des doses de 1,5 à 2 kGy permettent une réduction de  $3 \log_{10}$  UFC  $g^{-1}$  de *L. monocytogenes* dans des produits carnés comme des saucisses de Bologne, du rôti de bœuf, de la dinde, des saucisses de Francfort et du jambon (Horita et al., 2018). Des doses inférieures à 3 kGy sont recommandées pour éviter une augmentation de l'oxydation des lipides. L'Afssa a émis plusieurs avis sur cette technologie et sur les paramètres à prendre en compte pour évaluer la sécurité des denrées

<sup>36</sup> viande séchée et salée de bœuf, découpée en fines lanières

traitées et matériaux au contact des aliments, notamment une revue sur les données disponibles à l'époque relatives à l'ionisation des denrées destinées à l'alimentation humaine (Afssa, 2007b).

### 8.4.3. Autres techniques

- **Combinaisons de techniques physiques et d'agents antimicrobiens naturels**

De nombreuses combinaisons peuvent faire intervenir des agents antimicrobiens naturels associés à des traitements physiques (Sebranek et al., 2012). Par exemple, le traitement par des hautes pressions hydrostatiques (HPH) (500 MPa) de saucisses avec 1 à 2% de vinaigre contenant un extrait de thé au jasmin permet une stabilisation de la population de *C. perfringens* pendant 5 semaines à 20°C (Lee et al., 2019b). L'ajout de composés phénoliques permet d'obtenir une meilleure inactivation de *L. monocytogenes* par les HPH (Vurma et al., 2006). Les HPH peuvent être combinés à d'autres antimicrobiens tels que des bactériocines ou du lactate de potassium augmentant ainsi leur efficacité (Alahakoon et al., 2015; Hygreeva and Pandey, 2016). Le comportement de bactéries pathogènesensemencées à  $10^8$  UFC  $g^{-1}$  dans une matrice modèle de viande additionnée ou non de bactériocines (entérocoque, sakacine K, pédiocine Ach ou nisine) puis traitée par HPH (400 MPa, 10 min, 17°C) et conservée à 4°C a été étudié (Garriga et al., 2002). Une inactivation importante d'*E. coli*, *L. monocytogenes* et *Salmonella* ( $>6 \log_{10}$  UFC  $g^{-1}$ ) est obtenue lors du traitement par les HPH en présence de bactériocines (Garriga et al., 2002). Après le traitement, aucune reprise de croissance n'est constatée pour *E. coli* jusqu'à la fin du stockage (61 jours, 4°C) en présence de nisine, à l'inverse des autres bactériocines. La nisine permet aussi le maintien du niveau des bactéries lactiques altérantes en-dessous du seuil de détection ( $<10^2$  UFC  $g^{-1}$ ). Après le traitement HPH, la population de *L. monocytogenes* est également maintenue sous le seuil de détection jusqu'à la fin du stockage en présence de sakacine, entérocoque ou pédiocine. La population de *Salmonella* après la pressurisation reste stable jusqu'à la fin du stockage indépendamment de la présence ou non de bactériocines. A l'inverse des 3 autres bactéries pathogènes, *S. aureus* est moins sensible à la pressurisation (diminution d'une unité  $\log_{10}$  UFC  $g^{-1}$  seulement) (Garriga et al., 2002). Les HPH combinées à du lactate de potassium ont un effet synergique sur l'inhibition de croissance de *L. monocytogenes* et *Salmonella* inoculées dans du jambon cuit tranché et stocké au froid (1°C) pendant 84 jours (Aymerich et al., 2005). Les effets combinés des champs électriques pulsés (CEP) avec le pH (3,5-7,0), la température (4-50°C) et la nisine (0-200  $\mu g mL^{-1}$ ) ont été étudiés sur *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella* Typhimurium et *E. coli* O157:H7 en conditions de laboratoire (Saldaña et al., 2011; Saldaña et al., 2012). L'inactivation bactérienne est plus importante à pH acide (en dessous de pH de 3,5 pour les deux espèces à Gram positif et pH de 5,25 pour les deux autres espèces). La température semble également un facteur clé : plus la température augmente sur une gamme de 4 à 50°C, plus l'inactivation bactérienne liée aux CEP est importante. Par exemple, un traitement de 30 kV/cm à pH 7 induit une réduction de la population d'*E. coli* de  $0,2 \log_{10}$  UFC  $g^{-1}$  à 4°C et de  $3,5 \log_{10}$  UFC  $g^{-1}$  à 50°C. L'ajout de nisine n'a pas d'effet sur les deux bactéries à Gram négatif. La combinaison d'un traitement CEP avec un pH acide (3,5), de la nisine (200  $\mu g mL^{-1}$ ) et une température de 50°C entraîne une réduction de  $4,5 \log_{10}$  UFC  $g^{-1}$  pour *S. aureus* et de  $5,5 \log_{10}$  UFC  $g^{-1}$  de *L. monocytogenes* (Saldaña et al., 2011). L'immersion de morceaux de cuisse de poulet dans une solution tampon contenant 15,6 mg  $kg^{-1}$  d'huile essentielle d'origan après le traitement avec les CEP entraîne une réduction supplémentaire de  $0,5 \log_{10}$  UFC  $g^{-1}$  de *Campylobacter jejuni* (Clemente et al., 2020).

- **Emballages actifs**

Une autre alternative pouvant être considérée est de maîtriser le développement des pathogènes par l'intermédiaire d'emballages actifs. Le principe est d'inclure un antimicrobien dans l'emballage. Soit l'emballage est au contact de l'aliment et l'antimicrobien libéré par l'emballage diffuse dans l'aliment, soit il n'y a pas contact mais il y a diffusion de l'antimicrobien dans l'espace de gaz au-dessus de l'aliment. Par exemple, un emballage actif constitué d'une nano-couche de chitosane contenant de la gomme de graine de cresson sur du bœuf a montré un effet inhibiteur sur des bactéries pathogènes, notamment *S. aureus* (Esmaeili et al., 2021). L'évolution des micro-organismes totaux, de *C. perfringens* ou *S. aureus* pendant 45 jours à 4°C est similaire pour une mûlée de saucisse de Francfort contenant des extraits de plantes (thé vert, ortie dioïque, et feuilles d'olive) et embossée dans un film contenant 500 ou 1000 mg kg<sup>-1</sup> de nanoparticules de  $\epsilon$ -polylysine ou pour une mûlée contenant les extraits végétaux et 120 mg kg<sup>-1</sup> de nitrite mais embossée dans un film sans nanoparticules (Alirezalu et al., 2021b). Un film contenant des nanoparticules de nisine est par ailleurs moins efficace (Alirezalu et al., 2021b).

#### 8.4.4. Conclusion concernant les alternatives

La littérature scientifique consultée s'intéressant aux alternatives à l'ajout de nitrites pour la conservation des produits carnés est extrêmement abondante et de nombreux traitements et techniques ont été rapportés. D'une manière générale leur efficacité spécifique est variable et nécessite une évaluation au cas par cas, limitant ainsi la possibilité d'une généralisation. En effet, l'utilisation d'agents antimicrobiens naturels dépendra de leur évaluation toxicologique celle-ci conditionnant les doses d'emploi qui peuvent être ajoutés aux aliments. Par exemple, le manque de données sur les compositions des huiles essentielles ne permet pas d'évaluer un risque sanitaire général qui peut s'appliquer à tous les huiles essentielles disponibles.

Le GT note également que certaines solutions alternatives relèvent de la réglementation des « Novel Food » et signale que toute mesure de maîtrise appliquée dans le cas du plan de maîtrise sanitaire (PMS) doit faire l'objet d'une validation, d'une vérification et d'une surveillance.

## 9. EVALUATION DE L'EXPOSITION DES CONSOMMATEURS AUX NITRATES ET AUX NITRITES

### 9.1. Données de la littérature relative aux concentrations en nitrates et nitrites dans les denrées alimentaires

#### 9.1.1. Contextualisation et description la recherche d'informations

La démarche a consisté essentiellement à la collecte de données relatives aux concentrations en nitrates et nitrites dans les denrées alimentaires, en privilégiant la recherche de bases de données les plus complètes possibles. Ce travail s'inscrit directement dans l'argumentaire lié à la question 2 visant le recensement des leviers d'action permettant de diminuer l'exposition globale des consommateurs aux nitrates/nitrites (et donc aux nitrosamines) par voie alimentaire quelle que soit la source. Il a pour buts essentiels :

1. De connaître les niveaux de contamination en nitrites/nitrates principalement en Europe afin d'évaluer la situation française par rapport à d'autres pays européens.
2. Le cas échéant, compléter la base de données CONTAMINE si celle-ci présente des lacunes.

Précisions sur les contours de la recherche d'informations :

- L'accent principal a été mis sur la recherche de bases de données centrées sur les nitrates et les nitrites en utilisant les descripteurs suivants : Data Base / nitrate / nitrite / food/,
- Les moteurs lens.org / Science direct / Web of Science ont été employés,
- La prospection a été réalisée sur 12 années consécutives entre 2010 et mai 2022 ; l'idée étant de recourir aux articles publiés avant et après les avis de l'EFSA de 2017,
- Dans un premier temps, la démarche a été centrée sur des bases de données européennes mais, par souci d'exhaustivité, dans un second temps, il a été décidé, à titre exploratoire, d'ouvrir cette recherche aux données du monde entier.

#### 9.1.2. Résultats

En considérant les mots clés définis ci-dessus, il ressort qu'il y a **peu d'articles complets contenant d'abondantes données analytiques relatives aux concentrations en nitrites/nitrates (produits végétaux et animaux). Des références sélectionnées, il ressort que :**

- l'occurrence de nitrates dans les denrées alimentaires concerne principalement les produits végétaux tandis que les nitrites se retrouvent essentiellement dans les produits d'origine animale.
- dans un article de revue exhaustive, Flores and Toldrá (2021) font état de diverses sources documentaires précisant des données chiffrées en nitrates/nitrites dans les aliments. Les articles cités figurent au tableau 11.

**Tableau 11. Etudes sur les nitrates/nitrites dans les légumes et aliments (période 1999-2020) répertoriées par Flores and Toldrá (2021)**

Compound	foods	Geographical area	Reference
Nitrite and nitrate	Vegetable products	Slovenia	<a href="#">Kmecl, Žnidarčič, Franić, and Ban (2019)</a>
Nitrate and nitrite	Meat, dairy, fish products and leafy vegetables	Italy	<a href="#">Iammarino et al. (2013)</a>
Nitrate and nitrite	Vegetable and dry cured meat	Italy	<a href="#">Roila et al. (2018)</a>
Nitrate	Vegetables, fruits, herbs, and mushrooms according to the nitrate content of edible products	Italy	<a href="#">Colla, Kim, Kyriacou, and Roupael (2018)</a>
Nitrate and nitrite	Cured meat and vegetables	Australia	<a href="#">Hsu, Arcot, and Lee (2009)</a>
Nitrate and nitrite	Vegetables	Hong Kong	<a href="#">Chung et al. (2011)</a>
Nitrate and nitrite	Cultivated vegetables (organic and conventional)	Spain	<a href="#">Matallana González, Martínez-Tomé, and Torija Isasa (2010)</a>
Nitrate and nitrite	Vegetables, variations among season	Denmark	<a href="#">Petersen and Stoltze (1999)</a>
Nitrate and nitrite	Pickle fruit and vegetables	USA	<a href="#">Ding et al. (2018)</a>
Nitrite and nitrate	Vegetables and meats products	Iran	<a href="#">Bahadoran, Mirmiran, Jeddi, Azizi, and Ghasemi (2016)</a>
Nitrate	Vegetables	Iran	<a href="#">Salehzadeh et al. (2020)</a>
Nitrate and nitrite	Food products	Worldwide	<a href="#">Kalaycloğlu and Erim (2019)</a>

**Seulement 24 articles de recherche contenant des bases de données ont été sélectionnés dont 17 trouvés après 2017. Parmi ces derniers, 7 sont des bases de données *sensu stricto* (Tableau 12).** Cependant, un examen de ces bases de données révèle que les « données nitrates » sont très abondantes. Par contre, celles qui concernent les nitrites le sont moins. Compte tenu du fait que ces travaux font état de très nombreuses informations quantitatives, il n'est pas opportun de les développer en détail dans le présent rapport néanmoins elles sont aisément consultables en accès ouvert.

**Tableau 12. Principales bases de données analytiques récemment publiées sur les nitrates/nitrites dans les aliments.**

Références
<b>Bases de données Nitrates / Nitrites</b>
1. Nitrate and Nitrites in Foods: Worldwide Regional Distribution in View of Their Risks and Benefits - Kalaycıoğlu Z. & F. Bedia Erim (2019) Journal of Agricultural and Food Chemistry 67 (26), 7205-7222 <a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278691520306098">https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278691520306098</a>
Tous les pays du monde - Période 2008-2018 - articles (N=838) répertoriés SCI journals. Les concentrations compilées concernent <b>8000</b> produits carnés - <b>11074</b> aliments d'origine végétale - <b>306</b> aliments pour bébé
2. Assessment of the combined nitrate and nitrite exposure from food and drinking water: application of uncertainty around the nitrate to nitrite conversion factor - A. Van den Brand, M. Beukers, M. Niekerk, Gerda van Donkersgoed, M. van der Aa, B. van de Ven, A. Bulder, H. van der Voet & C. Sprong (2020), food additives & contaminants: part a, 37:4, 568-582 <a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278691520306098">https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278691520306098</a>
Base de données néerlandaise. Campagne de contrôle sur la période 2012-2018 - <b>1144</b> légumes, nombre imprécisé de produits carnés
3. Contribution of vegetables and cured meat to dietary nitrate and nitrite intake in Italian population: Safe level for cured meat and controversial role of vegetables R. Roila, R. Branciaro, B. Staccini, D. Ranucci, D. Miraglia, M. S. Altissimi, M. L. Mercuri, N. Haouet (2018) Italian J. Food safety, 7(7692), 168-172 <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6240834/pdf/ijfs-7-3-7692.pdf">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6240834/pdf/ijfs-7-3-7692.pdf</a>
<b>900</b> échantillons représentatifs de diverses denrées alimentaires commercialisées sur le marché italien
4. Development of a Food Composition Database for Assessing Nitrate and Nitrite Intake from <b>Animal-based Foods</b> . L. Zhong, A. Liu, L. Blekkenhorst, N. Bondonno, M. Sim, R. Woodman, K. Croft, J. Lewis, J. Hodgson, C. Bondonno Mol Nutr Food Res. 2022 Jan;66(1):e2100272. doi: 10.1002/mnfr.202100272 <a href="https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/mnfr.202100272">https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/mnfr.202100272</a>
1921 entrées sur les nitrates et 2077 sur les nitrites à partir de <b>193</b> articles de <b>51</b> pays
<b>Bases de données Nitrates</b>
5. Development of a reference database for assessing dietary nitrate in vegetables; L. Blekkenhorst, R. Prince, N. Ward, K. Croft, J. Lewis, A. Devine, S. Shinde, R. Woodman, J. Hodgson, C. Bondonno (2017) Mol Nutr Food Res. 61(8). Doi: 10.1002/mnfr.201600982 <a href="https://ro.ecu.edu.au/tecuworkspost2013/3320/">https://ro.ecu.edu.au/tecuworkspost2013/3320/</a>
<b>4237</b> données de teneurs en nitrate réparties sur 255 publications et relatives à <b>178</b> légumes et <b>22</b> épices ont été recensées
Base de données australienne établie sur une recherche au départ des référentiels Medline, Agricola et CAB abstracts (1980-2016)
6. Nitrate in fruits and vegetables; G. Colla, H. Jikim, M. Kyriacou, Y. Roupael (2018) Scientia Horticulturae, 237, 221-238 <a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304423818302656">https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304423818302656</a>
Méta-analyse au niveau mondial (1975-2011): teneurs en nitrates dans <b>100</b> produits végétaux
7. Probabilistic risk assessment of nitrates for Austrian adults and estimation of the magnitude of their conversion into nitrites C. Vlachou, D. Hofstädter, E. Rauscher-Gabernig, A. Griesbacher, K. Fuchs, J. König (2021) Food and Chemical Toxicology Volume 145, 2020, 111719. <a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278691520306098">https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278691520306098</a>
Campagne autrichienne de contrôle (2010-2017)- <b>3031</b> éch. / 20 catégories de produits carnés, <b>1174</b> éch. / 33 catégories de légumes et jus; <b>2147</b> échantillons d'eau de consommation et <b>1008</b> échantillons d'eau potable

De nombreuses publications aux thématiques apparentées au sujet de la saisine présentent seulement quelques données très limitées et nécessaires aux argumentations développées par les auteurs des articles en question. Quelques références assorties de teneurs en nitrites/nitrates sont colligées à titre d'exemple dans le tableau 13.

**Tableau 13. Concentrations en nitrites et nitrates relevées dans la littérature pour des matrices alimentaires spécifiques, selon les pays (\*) Valeurs moyennes (en gras) +/- écart-type ou valeurs minimales et maximales en mg kg<sup>-1</sup> masse fraîche.**

Matrices alimentaires Spécifiques	Teneurs en nitrites mg/kg	Teneurs en nitrates mg/kg	Références	Pays
Piment	< 0.5	<b>325.0 ±115,0</b>	Colavita et al.(2014)	Italie
Roquette selon mode de culture	ND	(217-8100)	Cavaiolo M. & Ferrante A.(2014)	"
Pissenlit	ND	<b>195</b> (47-487)	Gorenjak A. et al. (2012)	Slovénie
Laitues de diverses origines	ND	<b>1196</b> (85-3237)	"	"
Bettes (Winter)	ND	<b>2399</b> (967-5999)	Menual-Puet S & Asencio E. (2015)	Espagne
Bettes ( Summer)	ND	<b>2186</b> (967-9093)	"	"
Choux (Spring)	ND	<b>603</b>	Brkic D. et al. (2017)	Croatie
Bettes (Spring)	ND	<b>972</b>	"	"
Bettes (Autumn)	ND	<b>1024</b>	"	"
Lait et poudres de lait	> 2 (5 éch/39)	<b>17 ± 12</b>	Genualdi S. et al (2020)	USA
Poissons -Bivalves-Crevettes	< LOQ (0,6)	(160 -440)	Chiesa L. et al. (2019)	Italie
Fruits-légumes marinés	<15	(<LOD - 1220)	Ding Z.et al. (2018)	USA
Poudre de radis	ND	16263,87	Ozaki M. et al (2021)	Brésil
Poudre de Betterave	ND	14037,82	"	Brésil
ND= non dosé				

#### En conclusion :

La présente investigation donne accès à diverses sources d'informations quantitatives. Compte tenu de la quantité d'informations recensées, les bases de données issues de la revue publiée par Kalaycioğlu and Erim (2019), celle de van den Brand et al. (2020) et la plus récente, exclusivement consacrée aux produits d'origine animale, dûe à Zhong et al. (2022) sont sans conteste les plus pertinentes. Le fait marquant résultant de l'examen des données est la grande variabilité des teneurs en nitrates/nitrites rapportées dans la littérature scientifique. Les facteurs justificatifs sont très nombreux, qu'ils soient liés aux conditions édaphiques et environnementales (nitrates dans l'environnement) ou aux pratiques phytotechniques pour les végétaux ou encore aux traitements appliqués aux produits carnés.

## 9.2. Données de la littérature relatives à l'exposition aux nitrates et nitrites et contributeurs majoritaires à l'exposition

Cette section a pour objectif de présenter les niveaux d'exposition du consommateur aux nitrates et aux nitrites via les aliments, principalement dans les pays européens, et d'identifier les principaux contributeurs à cette exposition. Les informations à ce sujet disponibles dans les avis de l'EFSA de 2017 (EFSA, 2017a; EFSA, 2017b) sont d'abord présentées, suivies de données collectées dans la littérature, hors rapports EFSA.

### 9.2.1. Exposition aux nitrites et nitrates : données de l'EFSA, 2017

Dans ses avis de 2017 concernant la réévaluation des additifs alimentaires nitrites et nitrates de sodium et de potassium (E249 à E251), l'EFSA donne un aperçu de l'exposition aux nitrates et nitrites via les aliments, en tenant compte de toutes les sources (utilisation comme additifs

alimentaires, présence naturelle ou contamination) (EFSA, 2017a; EFSA, 2017b). Ces niveaux d'exposition ont été calculés sur la base des données de concentration et de consommation alimentaire fournies pour les états membres de l'UE. Il a été tenu compte d'un scénario d'exposition où les consommateurs ne sont fidèles à aucune marque spécifique disponible sur le marché (scénario « non fidèle à la marque ») et sont exposés *via* l'alimentation où la concentration en nitrites ou en nitrates correspond à la moyenne des données analytiques.

Pour les **nitrates**, l'exposition a été calculée dans l'avis de l'EFSA (2017b) suivant deux approches. Dans une première approche, l'exposition globale a été calculée en tenant compte des données brutes de concentrations en nitrates dans les aliments. Dans une seconde approche, un facteur de réduction a été appliqué pour certaines denrées alimentaires selon le mode de préparation. Par exemple pour les épinards, il a été considéré qu'ils sont bouillis avant consommation ce qui conduit à une réduction de leur concentration en nitrates. A partir des données d'Ekart et al. (2013) cité dans l'avis de l'EFSA (EFSA, 2017b), un facteur de réduction de 0,47 a ainsi été appliqué. Pour les mêmes raisons, un facteur de réduction de 0,57 a été appliqué aux pommes de terre, et de 0,85 pour les légumineuses et les haricots. Un facteur de réduction de 0,75 a été appliqué aux légumes feuille, en considérant qu'ils sont lavés avant consommation.

Le tableau 14 résume l'exposition aux **nitrites et aux nitrates**, selon l'EFSA (EFSA, 2017a; EFSA, 2017b). Les valeurs indiquées en gras et soulignées indiquent un dépassement de la dose journalière acceptable (DJA)

Le tableau 15 montre l'exposition aux **nitrites** calculée à partir des bases de données françaises de concentrations mentionnées à l'annexe A de l'avis de l'EFSA concernant les nitrites (EFSA, 2017a). Les valeurs indiquées en gras indiquent un dépassement de la DJA. L'avis de l'EFSA concernant les nitrates (EFSA, 2017b) ne contient pas de données permettant d'évaluer l'exposition de la population française aux nitrates, en tenant compte de toutes les sources d'exposition alimentaires, ni de montrer les contributions à l'exposition aux nitrates des différentes catégories de denrées alimentaires.

**Tableau 14. Exposition de la population européenne aux nitrites (exprimés en ions nitrite) et aux nitrates (exprimés en ions nitrate), en mg par kg de poids corporel et par jour ( $\text{mg (kg pc)}^{-1} \text{ j}^{-1}$ ), en tenant compte de toutes les sources d'exposition (EFSA, 2017a; EFSA, 2017b)**

Population	Nitrites ( $\text{mg (kg pc)}^{-1} \text{ j}^{-1}$ )		Nitrates ( $\text{mg (kg pc)}^{-1} \text{ j}^{-1}$ ) (sans facteur de réduction)		Nitrates ( $\text{mg (kg pc)}^{-1} \text{ j}^{-1}$ ) (avec facteur de réduction)			
	Moyenne	P95	Moyenne	P95	Moyenne	P95		
Enfants sem. à 11 mois	12	Min	0,05	<b>0,10</b>	2,31	<b>4,67</b>	1,87	<b>3,75</b>
		Max	<b>0,10</b>	<b>0,18</b>	3,67	<b>8,90</b>	3,30	<b>6,93</b>
Enfants mois	12 à 35	Min	<b>0,10</b>	<b>0,16</b>	2,45	<b>3,85</b>	2,28	3,54
		Max	<b>0,15</b>	<b>0,19</b>	<b>4,62</b>	<b>9,17</b>	<b>4,15</b>	<b>7,82</b>
Enfants 3 à 9 ans		Min	0,07	<b>0,12</b>	2,27	<b>3,99</b>	2,18	<b>3,82</b>
		Max	<b>0,11</b>	<b>0,20</b>	<b>4,26</b>	<b>9,26</b>	<b>3,83</b>	<b>8,73</b>
Adolescents 10 à 17 ans		Min	0,04	0,07	1,27	2,36	1,21	2,17
		Max	0,07	<b>0,14</b>	2,47	<b>5,30</b>	2,22	<b>5,28</b>
Adultes 18 à 64 ans		Min	0,03	0,05	1,07	2,16	1,00	1,88
		Max	0,05	<b>0,10</b>	2,35	<b>5,12</b>	2,09	<b>4,68</b>
Adultes ≥ 65 ans		Min	0,03	0,05	1,13	1,93	0,97	1,59
		Max	0,05	0,08	2,47	<b>5,25</b>	2,08	<b>4,57</b>

Facteurs de réduction appliqués : 0,47 pour les épinards, 0,57 pour les pommes de terre, 0,85 pour les légumineuses, 0,75 pour les légumes feuilles. DJA nitrites :  $0,07 \text{ mg (kg pc)}^{-1} \text{ j}^{-1}$  ; DJA nitrates :  $3,7 \text{ mg (kg pc)}^{-1} \text{ j}^{-1}$ .

**Tableau 15. Exposition aux nitrites (exprimés en ions nitrite), en en mg par kg de poids corporel et par jour ( $\text{mg (kg pc)}^{-1} \text{ j}^{-1}$ ), en tenant compte de toutes les sources d'exposition, pour la population française (d'après les données de l'EFSA (2017a))**

	Enfants	Adolescents	Adultes	Personnes âgées
Moyenne	<b>0,09</b>	0,05	0,04	0,04
P95	<b>0,14</b>	0,08	0,07	0,07

D'après des données moyennes de concentration (calculées selon une approche « middle bound »). DJA nitrites :  $0,07 \text{ mg (kg pc)}^{-1} \text{ j}^{-1}$ .

La contribution des différentes catégories d'aliments à l'exposition aux **nitrites** varie en fonction de l'âge du consommateur (EFSA, 2017a). Chez les nourrissons (de 12 semaines à 11 mois), les catégories d'aliments qui représentent plus de 20% de la contribution de l'exposition aux nitrites sont dans l'ordre les fruits, les repas préparés pour bébés, le fromage, la volaille et les plats préparés à base de céréales. Ce sont la volaille, les fruits et le fromage chez les jeunes enfants de 12 à 35 mois : les plats préparés, la volaille, les fruits, la charcuterie et la viande chez les enfants de 3 à 9 ans et les plats préparés, la viande, la charcuterie la volaille et les fruits chez les adolescents (entre 10 et 17 ans). Les adultes (entre 18 et 64 ans) sont exposés majoritairement aux nitrites par la consommation de plats préparés, volaille, viande, charcuterie et fruits, tandis que les fruits viennent en tête pour les 65 ans et plus, suivis des plats préparés, de la viande, de la volaille, et de la charcuterie.

Dans son avis de 2008 sur l'évaluation des risques liés aux nitrates accumulés par les végétaux, l'EFSA a montré que les fruits et les légumes contribuaient pour 50 à 75% de l'exposition aux nitrates en France et au Royaume Uni. La source de nitrites principale semblait

être la conversion endogène des nitrates ingérés en nitrites (calculé en considérant que 7% des nitrates ingérés étaient convertis en nitrites (EFSA, 2008).

**En ce qui concerne l'utilisation des nitrites et des nitrates comme additifs alimentaires, les avis de l'EFSA de 2017 indiquent que cette utilisation contribue pour environ 17% à l'exposition totale aux nitrites via l'alimentation (EFSA, 2017a) et pour environ 2% à l'exposition totale aux nitrates via l'alimentation (EFSA, 2017b).**

## 9.2.2. Exposition aux nitrites et nitrates en Europe : données de la littérature

Les tableaux 17 et 18 résument les données de la littérature (revue bibliographique de 2005 à mars 2022) concernant l'exposition, dans les pays européens, aux nitrites et aux nitrates.

- **Nitrites**

En ce qui concerne les nitrites (Tableau 17), la plupart des études se sont focalisées sur l'**exposition aux nitrites via les produits carnés**. Cette exposition peut varier entre 0,001 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> (adultes entre 65 et 97 ans, en Italie) et 0,04 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> (enfants de 3 ans en Finlande). De manière générale, l'exposition moyenne aux nitrites via les produits carnés est d'environ 0,005 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> chez les adultes et est plus importante chez les enfants.

En **Belgique**, Temme et al. (2011) rapportent une exposition moyenne aux nitrites via les produits carnés de 0,003 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>, tandis qu'au **Danemark**, Leth et al. (2008) indiquent une exposition assez comparable de 0,002 et 0,005 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> pour les femmes et les hommes entre 15 et 75 ans, et un peu plus élevée pour les garçons de 4 à 5 ans (0,011 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>), alors que l'exposition des filles du même âge est plus faible (0,0009 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>). Cette dernière étude concerne l'exposition moyenne entre 1998 et 2006 au Danemark. Dans l'étude belge et l'étude danoise, diverses sortes de saucisses sont les contributeurs majoritaires à cette exposition.

Des niveaux d'exposition aux nitrites du même ordre de grandeur sont rapportés par Larsson et al. (2011) chez des enfants en **Suède**, sur la base de leur consommation de charcuterie : 0,013, 0,010 et 0,007 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> chez des enfants de 4 ans, 8 à 9 ans et 11 à 12 ans, respectivement.

L'étude de Elias et al. (2020) en **Estonie** mentionne, pour les enfants, une exposition aux nitrites plus élevée que les études citées plus haut, de 0,015 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> (enfants de 1 à 3 ans) et 0,016 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> (enfants de 3 à 11 ans) qui proviendrait majoritairement de la consommation de saucisses type Francfort pour les enfants de moins de 3 ans et de produits carnés fumés et prêts à manger pour ceux de plus de 3 ans. L'eau de boisson contribue très peu à cette exposition (0,0004 et 0,0003 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> chez les enfants de 1 à 3 ans et 3 à 11 ans, respectivement) (Elias et al., 2020).

En **Finlande**, une exposition aux nitrites encore plus élevée a été calculée par Suomi et al. (2016) pour des enfants de 3 et 6 ans, avec des valeurs de 0,04 et 0,03 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>, respectivement, exposition due également à la consommation de divers types de saucisses.

Parmi les études ayant mesuré l'**exposition aux nitrites à partir de toutes les sources alimentaires**, Jakszyn et al. (2006) rapportent une exposition aux nitrites de 0,014 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> en **Espagne**, pour des adultes, avec des contributions respectives de 32%, 22%, 16% et 12% pour les produits carnés, céréaliers, les légumes et les fruits. Étonnamment, le pain contribue beaucoup à cette exposition, en raison de sa consommation importante par la population espagnole (Jakszyn et al., 2006).

En **France**, deux études ont été publiées en 2008 concernant l'exposition aux nitrites par voie alimentaire. Menard et al. (2008), ont calculé une exposition moyenne aux nitrites par toutes les sources alimentaires, y compris l'eau de boisson, comprise entre 0,02 (LB<sup>37</sup>) et 0,04 (UB<sup>38</sup>) mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> pour les personnes de plus de 15 ans et de 0,04 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> (LB et UB) pour les enfants entre 3 et 14 ans. Au percentile 95, l'exposition varie entre 0,05 et 0,09 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>, tous âges confondus. Les principaux contributeurs à cette exposition sont les produits de viande industriels. Des niveaux d'exposition comparables sont rapportés par Bemrah et al. (2008), via la consommation de produits carnés (Tableau 17). Sur base de la deuxième étude française d'alimentation totale et de données analytiques en nitrites dans les aliments, Bemrah et al. (2012) rapportent des niveaux d'exposition moyenne aux nitrites compris entre 0,001 et 0,005 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> pour les enfants, et entre 0,001 et 0,003 pour les adultes c'est-à-dire plus faibles que ceux proposés par Menard et al. (2008). D'après les auteurs, ces niveaux d'exposition moindres seraient dus à une diminution de la consommation de produits à base de viande (qui sont les contributeurs majeurs à l'exposition aux nitrites) entre 1999 et 2007 combinée à une réduction de l'utilisation des nitrites dans ces produits en France après 2008 (Bemrah et al., 2012). Sur base des mêmes données, Mancini et al. (2015) ont estimé que l'exposition aux nitrites des enfants de moins de 3 ans était de l'ordre de 0,01 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>. Une étude récente (Chazelas et al., 2022) rapporte l'exposition d'adultes français de la cohorte NutriNet-Santé (106 489 individus de plus de 18 ans, pour la période 2009-2020) à 90 additifs alimentaires, dont les additifs E249 et E250 (nitrite de potassium et de sodium, respectivement). Les auteurs indiquent que 74% des individus étaient exposés au nitrite de sodium (E249) et seulement 1% au nitrite de potassium (E250). L'exposition moyenne au nitrite de sodium a été estimée à 0,28 mg par jour, avec un dépassement de la dose journalière acceptable de 0,07 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> pour 0,45% des individus pour l'ensemble de la cohorte ou 0,61% des individus pour les 74% des individus exposés au sein de la cohorte. Une analyse plus fine où la cohorte a été divisée en 6 clusters en fonction des habitudes alimentaires des individus montre que les plus grands consommateurs de sauces industrielles et de viande transformée (13 112 individus) sont plus exposés au nitrite de sodium (0,39 mg par jour) que l'ensemble de la cohorte (0,27 mg par jour) ou que les autres clusters.

En **Pologne**, l'exposition moyenne des adultes aux nitrites entre 2006 et 2012 a été estimée à 0,03 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> (Anzewska A. and A., 2014).

En 2013, Vin et al. (2013) ont publié une étude relative à l'exposition à divers additifs alimentaires, dont les nitrites, dans différents pays européens (**France, Irlande, Italie et Royaume-Uni**) en croisant des données de consommation alimentaire propres à chaque pays, et des données d'utilisation des nitrites fournies par l'industrie (Food Drink Europe). Les niveaux d'exposition ainsi calculés (Tableau 16) (Vin et al., 2013) sont comparables à ceux publiés par Bemrah et al. (2012), Jakszyn et al. (2006), Larsson et al. (2011), Temme et al. (2011) et Leth et al. (2008).

Dans une étude récente, (Vlachou et al., 2020b) ont examiné l'exposition de la **population autrichienne** aux nitrites suivant différents scénarios. Dans un premier scénario, ils ont utilisé uniquement les données nationales d'occurrence des nitrites dans l'eau de boisson et dans les produits carnés transformés pouvant contenir des nitrites comme additifs alimentaires. Dans un second scénario, ils ont combiné ces données nationales à des données de la

<sup>37</sup> LB : « Lower Bound » : Pour les aliments analysés dans lesquels les nitrites n'ont pas été détectés, cette approche considère la teneur en nitrites comme étant égale à 0.

<sup>38</sup> UB : « Upper Bound » : Pour les aliments analysés dans lesquels les nitrites n'ont pas été détectés, cette approche considère la teneur en nitrites comme étant égale à la limite de quantification.

littérature concernant les teneurs en nitrites dans les aliments dans lesquels le contenu en nitrite n'est pas réglementé (viande fraîche, produits laitiers, etc.). Le Tableau 17 indique les niveaux d'exposition ainsi calculés pour les adultes. Pour l'exposition aux nitrites via les produits carnés transformés et l'eau de boisson, on constate une nette différence entre l'exposition calculée selon l'approche « LB » (exposition moyenne de  $0,002 \text{ mg (kg pc)}^{-1} \text{ j}^{-1}$ ) ou « UB » (exposition moyenne de  $0,012 \text{ mg (kg pc)}^{-1} \text{ j}^{-1}$ ), due au fait que les nitrites n'ont pas été détectés dans un grand nombre d'échantillons d'eau. Les saucisses précuites à cuire avant consommation (Francfort et « Knackwurst ») sont les contributeurs majeurs à cette exposition. Dans le scénario impliquant toutes les sources alimentaires, l'exposition moyenne des adultes aux nitrites est de  $0,03 \text{ mg (kg pc)}^{-1} \text{ j}^{-1}$  et les produits carnés transformés contribuent pour moins de 10% à cette exposition, tandis que les principaux contributeurs sont la viande fraîche et les produits laitiers, suivis des produits céréaliers et des végétaux. En tenant compte d'un scénario "pire cas", où il est considéré que le contenu en nitrites dans l'eau correspond à la limite maximale autorisée, l'exposition moyenne des adultes aux nitrites s'élève à  $0,05 \text{ mg (kg pc)}^{-1} \text{ j}^{-1}$ .

Les mêmes auteurs, dans une autre publication (Vlachou et al., 2020a) ont évalué l'exposition aux nitrites en tenant compte de la **conversion des nitrates ingérés en nitrites au niveau salivaire**. Dans le scénario du pire cas évoqué plus haut, le fait de tenir compte d'un taux de conversion de 20% des nitrates ingérés a pour effet de quadrupler l'exposition moyenne aux nitrites des adultes (Tableau 17). Une étude suédoise (Merino et al., 2016) a également évalué l'exposition aux nitrites en tenant compte de cette conversion des nitrates en nitrites au niveau salivaire. Les auteurs se sont focalisés sur l'exposition des enfants de 4 ans, en considérant qu'il s'agissait du groupe de consommateurs le plus sensible, et sur des produits carnés transformés fréquemment consommés par les enfants : les saucisses porc/bœuf et les saucisses de volaille. Ces produits ont été analysés pour leur contenu en nitrites en sortie de production, à la moitié de leur durée de vie et en fin de durée de vie, afin d'évaluer l'impact de la diminution du taux de nitrites dans les produits au cours de la conservation sur l'exposition. Les auteurs ont utilisé les données de consommation de produits par les enfants suédois de 4 ans, mais en considérant qu'il s'agissait soit uniquement de saucisses de porc/bœuf, soit uniquement de saucisse de volaille. L'exposition aux nitrites a été calculée en croisant les données de concentration en nitrites dans les aliments et les données de consommation, mais aussi en ajoutant la contribution des nitrates ingérés via les fruits et les légumes (pour lesquels les données de concentration de la littérature ont été utilisées), en considérant un taux de conversion des nitrates ingérés en nitrites de 5 ou 20%. Le tableau 17 indique les résultats obtenus. Les valeurs indiquées dans le tableau indiquent que les nitrates ingérés et convertis en nitrites au niveau salivaire contribuent majoritairement à l'exposition des enfants de 4 ans, lorsqu'on considère le produit à la moitié ou à la fin de sa durée de vie (ce qui correspond au moment le plus probable de sa consommation).

**Tableau 16. Exposition aux nitrites (exprimée en  $\text{mg ion NO}_2^- \text{ (kg pc)}^{-1} \text{ j}^{-1}$ ) d'enfants de 4 ans en Suède, via la consommation de viande porc/boeuf ou de volaille en fonction de la durée de vie du produit et du facteur de conversion des nitrates en nitrites au niveau salivaire ; Moyenne (P95) (d'après Merino et al. (2016))**

Facteur de conversion (%) *	Sortie de Production Moy(P95)	Moitié de la durée de vie Moy(P95)	Fin de la durée de vie Moy(P95)
Porc/boeuf			

Facteur de conversion (%) *	Sortie de Production Moy(P95)	Moitié de la durée de vie Moy(P95)	Fin de la durée de vie Moy(P95)
0	0,15 (0,46)	0,04 (0,12)	0,03 (0,08)
5	0,19 (0,51)	0,08 (0,17)	0,07 (0,14)
20	0,31 (0,69)	0,19 (0,39)	0,18 (0,37)
Volaille			
0	0,14 (0,44)	0,08 (0,24)	0,06 (0,20)
5	0,18 (0,49)	0,12 (0,29)	0,11 (0,25)
20	0,31 (0,67)	0,24 (0,48)	0,23 (0,44)

\* facteur de conversion des nitrates en nitrites au niveau salivaire

Aux **Pays-Bas**, van den Brand et al. (2020) ont également réalisé une évaluation du risque lié à l'ingestion de nitrites en tenant compte de la conversion des nitrates en nitrites au niveau salivaire et en tenant compte de différents scénarios de contamination de l'eau potable. L'exposition moyenne de la population (de 1 à 79 ans) a été estimée entre 0,095 et 0,114 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> et l'exposition au percentile 95 entre 0,182 et 0,209 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>, en tenant compte d'un facteur de conversion des nitrates en nitrites de 23% (Tableau 17). Les auteurs ont classé les aliments qui contribuent à l'exposition combinée aux nitrates et aux nitrites en 12 catégories (y compris l'eau potable). Par ordre décroissant, ces contributions sont les suivantes : 41% de l'exposition est due aux légumes, 18% aux fruits et produits dérivés, 15% aux produits carnés pour lesquels l'utilisation des nitrates et nitrites en tant qu'additif n'est pas autorisée dans la réglementation européenne, 9% à l'utilisation des nitrates et nitrites comme additifs alimentaires, 5% aux céréales, 5% aux pommes de terre et autres tubercules, 3% à l'eau potable, 2% et 1%, aux fromages et poissons dans lesquels les nitrates et nitrites en sont pas autorisés comme additifs, respectivement, 1% à d'autres aliments et 0,2% aux noix et graines.

#### • Nitrates

En ce qui concerne les nitrates, les études se sont généralement focalisées sur l'exposition par la consommation de légumes uniquement, ou de produits carnés, légumes et eau de boisson, et un nombre plus limité d'études concerne l'exposition aux nitrates par la consommation de produits carnés uniquement (Tableau 18). Comme dans le cas des nitrites, les niveaux d'exposition varient en fonction des études, en raison des habitudes alimentaires différentes d'un pays à l'autre, mais aussi des niveaux de concentration en nitrates dans les aliments et dans l'eau de boisson qui peuvent varier en fonction de la zone géographique. Les différences entre études peuvent également être dues à différentes méthodologies utilisées pour calculer l'exposition.

L'exposition aux nitrates via les produits carnés (c'est-à-dire du fait de leur utilisation en tant qu'additif alimentaire) a été estimée, au **Danemark**, quel que soit l'âge de la population ciblée, à environ 1 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>, ce que les auteurs considèrent comme négligeable comparé à l'exposition totale via toutes les sources qui est de 61 mg par jour (Leth et al., 2008).

En **Belgique**, l'exposition des adultes (> 15 ans) aux nitrates a été évaluée à 0,013 et 0,043 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> (moyenne et P95) via les produits carnés et s'étend de 1,38 à 2,76 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> (valeur moyenne et P97,5) quand on considère toutes les sources alimentaires (Temme et al., 2011).

Dans le cadre d'une étude sur le lien entre le cancer colorectal et l'exposition aux nitrates, Espejo-Herrera et al. (2016a) ont évalué que l'exposition des adultes aux nitrates en **Espagne**

était de 0,09 et 1,46 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> pour la consommation, respectivement, de produits carnés et de légumes, et variait entre 0,05 et 0,28 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> pour la consommation d'eau de boisson.

Pour la consommation de légumes, des niveaux d'exposition du même ordre sont rapportés pour les adultes dans la région de Valence tandis que les jeunes enfants (moins de 2 ans) seraient exposés à environ 0,5 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> (Pardo-Marín et al., 2010). De manière intéressante, Quijano et al. (2017) rapportent des niveaux moyens d'exposition moins élevés dans la même région de Valence (0,28 et 0,38 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> pour les adultes et les enfants entre 6 et 15 ans, respectivement). Les auteurs attribuent cette différence au plus grand respect des Bonnes Pratiques Agricoles dans cette région après 2010. Toutefois, ces deux études désignent le même contributeur majeur à l'exposition aux nitrates : la laitue.

L'étude de Tamme et al. en **Estonie** (Tamme et al., 2006) indique une exposition aux nitrates via les légumes de 0,8 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> pour les adultes et de 1,5 et 1,7 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> pour des enfants de 4 à 6 ans et 1 à 3 ans respectivement. Pour les bébés de moins de 1 an, l'exposition est similaire à celle des adultes (0,8 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>).

**En France**, Chazelas et al. (2021) rapportent que 32% des individus de la cohorte NutriNet-Santé étaient exposés au nitrate de potassium (E252) et seulement 0,9% au nitrate de sodium (E251). L'exposition moyenne au nitrate de potassium a été estimée à 0,18 mg par jour (et à 0,01 mg par jour pour le nitrate de sodium). Aucun dépassement de la dose journalière acceptable de 3,7 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> n'a été constaté pour ces deux additifs.

Des niveaux d'exposition moyens aux nitrates un peu plus élevés sont rapportés dans une **étude italienne** pour la consommation de légumes (Tableau 18) (Roila et al., 2018).

Aux **Pays-Bas** (Zeegers et al., 2006) et en **Pologne** (Anyzewska A. and A., 2014), un niveau d'exposition similaire des adultes aux nitrates de l'ordre de 1,5 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> a été déterminé, par la consommation de produits carnés, de légumes et d'eau de boisson, tandis qu'une **étude suédoise** (Larsson et al., 2011) indique une exposition des enfants via ces mêmes voies alimentaires inférieure à 1 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>.

Comme pour les nitrites, (Vlachou et al., 2020a) ont estimé l'exposition de la **population autrichienne** aux nitrates sur base de différents scénarios. Dans le scénario impliquant toutes les sources alimentaires, l'exposition moyenne des adultes aux nitrates est de 3,24 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> pour les femmes et un peu moins pour les hommes, 2,66 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>, tandis que les végétariens sont exposés aux nitrates à raison de 3,96 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>. Les légumes feuille sont les contributeurs majeurs à l'exposition aux nitrates.

### 9.2.3. Exposition aux nitrites et nitrates hors Europe

Dans une revue systématique et une méta-analyse sur l'association entre les apports en nitrates et nitrites alimentaires et le cancer (de localisations diverses) (Said Abasse et al., 2022), les auteurs font référence à de nombreuses publications qui rapportent des niveaux d'exposition aux nitrates et aux nitrites. Par exemple, aux USA, il est rapporté des niveaux d'exposition aux nitrites alimentaires variant entre 0,7 et 1,7 mg par jour dans le cas d'étude cas/témoins (Aschebrook-Kilfoy et al., 2012; Ward et al., 2005). Également cités dans cette revue systématique, Barry et al. (2020) indiquent une exposition alimentaire aux nitrites de 0,5 à 0,7 mg par jour en Nouvelle-Zélande, tandis que Zhu et al. (2014) mentionnent pour le

Canada une exposition de 0,7 à 1,9 mg par jour aux nitrites alimentaires, toujours dans le cadre d'études cas/témoins.

Pour les nitrates alimentaires, les auteurs cités dans la revue de Said Abasse et al. (2022) rapportent une exposition variant de 63 à 186 mg par jour aux USA (Aschebrook-Kilfoya et al., 2012) ou de 57 à 264 mg par jour au Canada (Zhu et al., 2014).

Une étude néo-zélandaise récente (Cressey and Cridge, 2022) rapporte une exposition alimentaire aux nitrates (aliments et eau de boisson) de la population adulte (> 15 ans) de 0,74 et 1,64 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>, pour la médiane et la valeur P95, respectivement, et de 0,82 et 1,63 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> pour les enfants entre 4 et 15 ans. Cette étude mentionne les pommes de terre et la laitue comme contributeurs majeurs à l'exposition.

Babateen et al. (2018) ont publié une revue systématique concernant l'exposition alimentaire aux nitrates, dans laquelle ils concluent, sur base de 43 articles consultés (provenant de 15 pays différents), que l'exposition médiane aux nitrates alimentaires dans une population en bonne santé est de 108 mg de nitrates par jour. Les auteurs mentionnent également que l'exposition aux nitrates est comparable entre les études qui tiennent compte de la contribution de l'eau (104 mg de nitrates par jour) et celles qui n'en tiennent pas compte (115 mg de nitrates par jour) (Babateen et al., 2018).

**En conclusion :**

**Les niveaux d'exposition du consommateur aux nitrates et/ou aux nitrites peuvent varier en raison d'habitudes alimentaires différentes d'un pays à l'autre, de concentrations en nitrates et nitrites dans les aliments et l'eau de boisson différentes d'une étude à l'autre, de réglementations différentes concernant l'usage des nitrites et nitrates en tant qu'additifs alimentaires, mais aussi en raison de la méthodologie utilisée pour le calcul de l'exposition.**

**Globalement, l'exposition moyenne aux nitrites en Europe par la consommation de produits carnés ou les aliments en général est inférieure à la dose journalière acceptable (DJA) de 0,07 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> (exprimée en ion nitrite) confirmée par l'EFSA en 2017 (EFSA, 2017a). Deux études montrent cependant que cette exposition dépasse la DJA lorsqu'il est tenu compte que 20 à 23% des nitrates ingérés sont transformés en nitrites au niveau salivaire.**

**De même que pour les nitrites, l'exposition moyenne aux nitrates en Europe est inférieure à la DJA de 3,7 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> confirmée par l'EFSA en 2017 (EFSA, 2017b).**

**En ce qui concerne les contributeurs majeurs à l'exposition aux nitrites et aux nitrates, il s'agit des produits carnés pour les nitrites (lorsqu'il n'est pas tenu compte de la conversion salivaire des nitrates en nitrites) et des légumes feuilles pour les nitrates.**

**Tableau 17. Exposition aux nitrites (exprimée en mg ion NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>) en Europe : moyenne(P95). Les valeurs qui dépassent la DJA de 0,07 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> sont indiquées en gras et soulignées.**

Pays	Produits carnés	Produits carnés et eau de boisson Moy(P95)	Aliments (hors eau de boisson) Moy(P95)	Aliments et boissons Moy(P95)	Référence
Autriche		0,002 (0,012) (adultes, LB <sup>39</sup> )		0,03 (0,06) (☒ 18–64 ans, UB <sup>40</sup> )	Vlachou et al., 2020b
		0,012 (0,027) (adultes, UB)		0,03 (0,07) (☒ 18-64 ans, UB) 0,05 ( <b>0,08</b> ) (adultes) <sup>41</sup>	
Belgique				0,07 ( <b>0,134</b> ) (adultes) <sup>1,42</sup>	Vlachou et al., 2020a
				0,193 ( <b>0,294</b> )(adultes) <sup>1,43</sup>	
Belgique	0,003 (> 15 ans)				Temme et al., 2011
Danemark	0,0009 (☒ 4–5 ans)				Leth et al., 2008
	0,005 (☒ 6–14 ans)				
	0,002 (☒ 15–75 ans)				
	0,011 (☒ 4-5 ans)				
	0,006 (☒ 6-14 ans)				
	0,005 (☒ 15-75 ans)				
Espagne			0,014 (29-69 ans) *		Jakszyn et al., 2006

<sup>39</sup> UB : “Upper Bound” : Pour les aliments analysés dans lesquels les nitrites n’ont pas été détectés, cette approche considère la teneur en nitrites comme étant égale à la limite de quantification.

<sup>40</sup> LB : « Lower Bound » : Pour les aliments analysés dans lesquels les nitrites n’ont pas été détectés, cette approche considère la teneur en nitrites comme étant égale à 0.

<sup>41</sup> Scénario du pire en considérant que le contenu en nitrites dans l’eau correspond à la limite maximale permise

<sup>42</sup> En tenant compte d’un taux de conversion des nitrates ingérés en nitrites au niveau salivaire de 5%

<sup>43</sup> En tenant compte d’un taux de conversion des nitrates ingérés en nitrites au niveau salivaire de 20%

Pays	Produits carnés	Produits carnés et eau de boisson Moy(P95)	Aliments (hors eau de boisson) Moy(P95)	Aliments et boissons Moy(P95)	Référence
Estonie	0,015 (1-3 ans) 0,016 (3-11 ans)				Elias et al., 2020
Finlande	0,016 (1 an) 0,040 (3 ans) 0,033 (6 ans) 0,005 (adultes)				Suomi et al., 2016
France				0,02 (0,05) (LB, > 15 ans) 0,04 ( <b>0,08</b> ) (UB, > 15 ans) 0,04 ( <b>0,09</b> ) (LB, 3-14 ans) 0,04 ( <b>0,09</b> ) (UB, 3-14 ans)	Menard et al., 2008
	0,034 ( <b>0,093</b> ) <sup>44</sup> (adultes) 0,058 ( <b>0,165</b> ) <sup>30</sup> (enfants) 0,05 ( <b>0,134</b> ) <sup>45</sup> (adultes) 0,088 ( <b>0,250</b> ) <sup>31</sup> (enfants)				Bemrah et al., 2008
France			0,003 (0,017) (adultes) 0,005 (0,025) (enfants)		Bemrah et al., 2012
			0,001 (0,01) (18-79 ans) 0,002 (0,01) (3-17 ans)		Vin et al., 2013
			0,01 (0,01) (1-3 ans)		Mancini et al., 2015
Italie	0,001 (0,005) (65-97 ans) 0,002 (0,007) (18-64 ans) 0,002 (0,006) (10-17 ans) 0,004 (0,012) (3-9 ans) 0,004 (0,016) (0-2 ans)				Roila et al., 2018

<sup>44</sup> Scénario où les consommateurs consomment des produits avec et sans nitrites ajoutés

<sup>45</sup> Scénario où les consommateurs consomment uniquement des produits avec nitrites ajoutés

Pays	Produits carnés	Produits carnés et eau de boisson Moy(P95)	Aliments (hors eau de boisson) Moy(P95)	Aliments et boissons Moy(P95)	Référence
			0,001 (0,007) (18-97 ans) 0,001 (0,013) (1-17 ans)		Vin et al., 2013
Irlande			0,003 (0,015) (18-64 ans) 0,003 (0,021) (5-12 ans) 0,002 (0,012) (13-17 ans)		Vin et al., 2013
Pays-Bas			<b>0,095-0,114 (0,182-0,209)</b> (1-79 ans) <sup>46</sup>		van den Brand et al., 2020
Pologne			0,03 (adultes) *		Anyzewska and Wawrzyniak, 2014
Royaume Uni			0,003 (0,020) (19-64 ans) 0,005 (0,041) (1-4 ans) 0,003 (0,019) (4-8 ans)		Vin et al., 2013
Suède	0,013 (4 ans) 0,010 (8 à 9 ans) 0,007 (11 à 12 ans)				Larsson et al., 2011

\* recalculé d'après les données de l'auteur en tenant compte d'un poids corporel de 70 kg.

<sup>46</sup> Sur base de différents scénarios de contamination de l'eau et d'un taux de conversion des nitrates ingérés en nitrites au niveau salivaire de 23%

**Tableau 18. Exposition aux nitrates (exprimée en mg ion NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>1</sup>) : moyenne (P95). Les valeurs qui dépassent la DJA de 3,7 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>1</sup> sont indiquées en gras et soulignées.**

Pays	Produits carnés	Produits carnés, eau de boisson, légumes	Légumes	Aliments et eau de boisson	Référence
Autriche				3,24 ( <b>6,18</b> ) (☐ 18–64 ans)	Vurma et al., 2006
				2,66 ( <b>4,88</b> ) (☐ 18-64 ans)	
				<b>3,96 (7,06)</b> (végétariens, 18-64 ans)	
Belgique	0,013 (0,043) (> 15 ans)			1,38 (2,76) (> 15 ans)	Temme et al., 2011
Danemark	1,01 mgjour <sup>-1</sup> (☐ 4–5 ans)				Leth et al., 2008
	0,95 mgjour <sup>-1</sup> (☐ 6–14 ans)				
	0,99 mgjour <sup>-1</sup> (☐ 15–75 ans)				
Espagne	0,09	(adultes) *	1,46	(adultes) *	Espejo-Herrera et al., 2016
			1 (2,8)	(adultes)	Pardo-Marin et al., 2010
			0,5	(0-1 an)	
			0,7	(1-2 ans)	
			0,38 (1,53)	(6-15 ans) 0,28 (1,17) (16-95 ans)	Quijano et al., 2017
		0,26-1,83 (1,32- <b>9,25</b> ) (adultes)	0,49-2,31 (2,47- <b>6,15</b> ) (enfants)	Martin Leon and Luzardo, 2020	
Estonie			0,8	(adultes) *	Tamme et al., 2006
			1,7	(1-3 ans)	
			1,5	(4-6 ans)	
Italie	0,014 (0,055)	(65-97 ans)	2,10 ( <b>8,05</b> )	(65-97 ans)	Roila et al., 2018
	0,019 (0,084)	(18-64 ans)	1,94 ( <b>9,99</b> )	(18-64 ans)	
	0,025 (0,066)	(10-17 ans)	1,22 ( <b>7,39</b> )	(10-17 ans)	
	0,044 (0,133)	(3-9 ans)	2,56 ( <b>12,83</b> )	(3-9 ans)	
	0,048 (0,175)	(0-2 ans)	<b>3,84 (19,13)</b>	(0-2 ans)	

Pays	Produits carnés	Produits carnés, eau de boisson, légumes	Légumes	Aliments et eau de boisson	Référence
Pays-Bas		1,5	(adultes) *		Zeegers et al., 2006
Pologne		1,53	(adultes) *		Anyzewska & Wawrzyniak, 2014
			1,91 (adultes, légumes BIO)		Gruszecka-Kosowska and Baran, 2017
			1,45 (adultes, légumes conventionnels)		
Suède		0,8	(4 ans)		Larsson et al., 2011
		0,7	(8 à 9 ans)		
		0,4	(11 à 12 ans)		

\* recalculé d'après les données de l'auteur en tenant compte d'un poids corporel de 70 kg.

### 9.3. Exploitation des bases de données relatives aux concentrations en nitrates et nitrites dans les eaux et les aliments consommés en France métropolitaine

Les bases données SISE-EAUX et Contamine, présentées au chapitre 6, ont été exploitées. Afin d'assurer une certaine cohérence entre les deux bases de données, seules les données relatives aux échantillons d'eau et d'aliments prélevés et analysés pendant la période 2010-2019, période commune aux deux bases de données, ont été gardées.

#### 9.3.1. Traitement des données censurées

Les données censurées correspondent à tous les résultats inférieurs aux limites de sensibilité analytique (limite de détection (LOD) ou de quantification (LOQ) selon le cas).

Afin d'être en mesure d'exploiter l'ensemble des résultats, une substitution des données censurées par des valeurs numériques doit être appliquée.

Selon les recommandations de l'OMS (GEMS/Food-EURO, 1995), deux cas peuvent se présenter (Figure 26):

1. le taux de censure total est inférieur à 60%, les données censurées sont remplacées par une hypothèse moyenne dite « middle bound (MB) » :
  - Toutes les valeurs non détectées (<LOD) sont fixées à ½ LOD.
  - Toutes les valeurs non quantifiées (<LOQ) sont fixées à ½ LOQ.
  
2. le taux de censure total est supérieur à 60%, les données censurées sont remplacées par deux hypothèses :
  - Hypothèse basse dite « lower bound (LB) » où toutes les valeurs non détectées (<LOD) sont fixées à zéro et toutes les valeurs non quantifiées (<LOQ) sont fixées à la LOD ou à 0 si la LOD n'est pas renseignée.
  - Hypothèse haute dite « upper bound (UB) » où toutes les valeurs non détectées (<LOD) sont fixées à la LOD et toutes les valeurs non quantifiées (<LOQ) sont fixées à la LOQ.

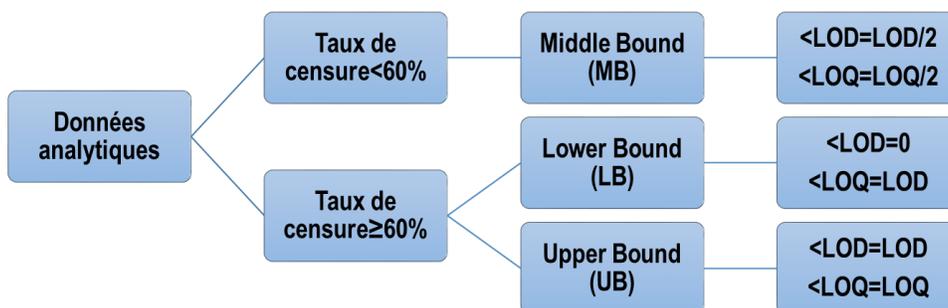


Figure 26. Règles de substitution des données censurées en fonction des recommandations de l'OMS (GEMS/Food-EURO, 1995)

Compte tenu de la grande hétérogénéité du taux de censure entre les matrices eau et aliments et au sein même des catégories alimentaires, le GT a choisi d'appliquer les hypothèses LB et UB dans le cadre de ce travail.

### 9.3.2. Concentrations en nitrates et nitrites dans les eaux de boisson consommées en France

#### 9.3.2.1. Concentrations en nitrates et nitrites dans les eaux destinées à la consommation humaine distribuées en réseau en France métropolitaine hors Corse entre 2010 et 2019

Les nitrates sont quantifiés dans 94 % des échantillons d'eau distribuée (n total =1 147 654), avec des concentrations moyennes de 16,7 mg L<sup>-1</sup> en LB et 16,8 mg L<sup>-1</sup> en UB (Tableau 19). Pour 5 % des échantillons analysés, la concentration en nitrates est supérieure à 42,2 mg L<sup>-1</sup> quelle que soit l'hypothèse de traitement des données censurées.

1,2 % des résultats d'analyse des nitrates dans les EDCH sont supérieurs à la limite de qualité de 50 mg L<sup>-1</sup>, ce qui représente 13 883 résultats.

Les nitrites sont peu quantifiés dans les eaux distribuées (2,7 % des échantillons), avec une concentration moyenne comprise entre 0,002 et 0,021 mg L<sup>-1</sup> (Tableau 19). 0,07 % des échantillons présentent des concentrations supérieures à la limite de qualité de 0,50 mg L<sup>-1</sup>.

Tableau 19. Concentrations en ions nitrate et nitrite dans l'eau distribuée en France métropolitaine hors Corse entre 2010 et 2019.

		N	Taux de censure (%)	Concentration en mg L <sup>-1</sup>					Dépassement de la limite de qualité	
				Moy	ET	Med	P95	Max	Nombre	Pourcentage
Ion nitrate	LB	1 147 654	6,0	16,7	14,3	14,0	42,2	170,0	13 883	1,2
	UB			16,8	14,2	14,0	42,2	170,0		
Ion nitrite	LB	99 999	97,3	0,002	0,036	0	0	5,030	66	0,07
	UB			0,021	0,037	0,020	0,050	5,030		

Source : Ministère en charge de la santé, ARS - Traitement : Anses

La répartition régionale des concentrations en nitrites et en nitrates dans les EDCH est présentée en annexe 12.

- **Description des concentrations en ions nitrate en fonction de différentes variables**

- *Variabilité temporelle des concentrations en nitrates*

Le Tableau 20 présente les concentrations en nitrates dans les EDCH distribuées en fonction de l'année de prélèvement. Les concentrations médianes en nitrates sont significativement différentes entre certaines années<sup>47</sup> pour les deux hypothèses LB et UB. Le niveau de concentration en 2019 est significativement plus faible qu'en 2010<sup>48</sup>. Néanmoins, la variance expliquée par la variable année est faible par rapport à la variance globale.

<sup>47</sup> Test Kruskal-Wallis, p<0,05

<sup>48</sup> Méthode de régression linéaire généralisée, p<0,05

Tableau 20. Concentrations en nitrates dans les EDCH distribuées en réseau en fonction de l'année de prélèvement.

		Nombre de résultats	Taux de censure (%)	Concentration en mg L <sup>-1</sup>					Dépassement de la limite de qualité	
				Moy	ET	Med	P95	Max	Nombre	Pourcentage
2010	LB	109 499	7,13	17,3	14,4	14,7	42,8	170,0	1 455	1,3
	UB			17,3	14,3	14,7				
2011	LB	110 974	7,28	17,0	14,6	14,1	43	150,0	1 515	1,4
	UB			17,1	14,5	14,1				
2012	LB	111 518	6,61	16,9	14,3	14,4	42,2	150,0	1 384	1,2
	UB			17,0	14,2	14,4				
2013	LB	113 682	5,51	17,6	14,8	15,2	43,7	143,0	1 691	1,5
	UB			17,7	14,7	15,2				
2014	LB	114 050	6,14	16,9	14,6	14,0	43	150,0	1 576	1,4
	UB			17,0	14,5	14,0				
2015	LB	115 564	5,66	16,6	14,4	13,4	42,5	129,0	1 428	1,2
	UB			16,6	14,3	13,4				
2016	LB	115 882	5,22	16,4	14,2	13,3	42,1	118,0	1 354	1,2
	UB			16,5	14,2	13,3				
2017	LB	119 076	5,82	15,7	13,8	12,6	41	106,4	1 056	0,9
	UB			15,8	13,7	12,6				
2018	LB	118 397	5,57	16,3	14,0	13,3	41,5	130,0	1 251	1,1
	UB			16,4	14,0	13,3				
2019	LB	119 012	5,32	16,4	14,0	13,8	41,5	107,7	1 173	1,0
	UB			16,5	13,9	13,8				

Source : Ministère en charge de la santé, ARS - Traitement : Anses

De plus, les concentrations en nitrates varient de manière significative<sup>49</sup> en fonction de certaines saisons. Ainsi, elles sont significativement<sup>50</sup> plus faibles en automne qu'en été et en été qu'en l'hiver. Néanmoins, la variance expliquée par la variable saison est faible par rapport à la variance globale.

○ *Influence de la nature de l'eau utilisée pour produire les EDCH*

Le tableau 21 présente les concentrations en nitrates dans les EDCH distribuées en réseau en fonction du type d'eau brute utilisé pour produire les EDCH. On distingue ainsi les eaux produites à partir d'eaux de mer, d'eaux souterraines, d'eaux superficielles, ainsi que les eaux « mixtes » issues du mélange de ressources de nature différente (souterraines et superficielles).

La concentration en nitrates est particulièrement faible lorsque les EDCH sont produites à partir d'eau de mer ( $\leq 0,5$  mg L<sup>-1</sup>). Ce constat est lié à l'emploi de techniques de désalinisation, qui garantissent l'élimination de la charge en ions des eaux, dont celle des nitrates.

Les concentrations médianes sont de 13,1 mg L<sup>-1</sup> dans les eaux produites à partir d'eaux souterraines et de 12,0 mg L<sup>-1</sup> dans les eaux produites à partir d'eaux superficielles.

<sup>49</sup> Test Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$

<sup>50</sup> Méthode de régression linéaire généralisée,  $p < 0,05$

Les concentrations en nitrates sont significativement<sup>51</sup> différentes en fonction de la nature de l'eau : elles sont plus élevées dans les eaux produites à partir d'eau mixte que dans les EDCH produites à partir d'autres types d'eau. Néanmoins, la variance expliquée par la variable nature de l'eau est petite par rapport à la variance globale.

Toutefois, les EDCH produites à partir d'eau souterraine présentent la fréquence de dépassement de la limite de qualité la plus importante avec 1,5 % de dépassement, contre 0,1 % pour les EDCH produites à partir d'eau mixte et 0,02 % pour les EDCH produites à partir d'eaux superficielles.

**Tableau 21. Concentrations en nitrates dans les EDCH distribuées en réseau en fonction de la nature de l'eau alimentant l'unité de distribution.**

		N	Taux de censure (%)	Concentration en mg L <sup>-1</sup>					Dépassement de la limite de qualité	
				Moy	ET	Med	P95	Max	Nombre	Pourcentage
EMI	LB	131 856	2,14	18,3	12,1	18,8	39,2	80,2	181	0,1
	UB			18,4	12,1	18,8	39,2	80,2		
ESO	LB	885 970	7,06	16,9	15,0	13,1	43,6	170,0	13 674	1,5
	UB			17,0	14,9	13,1	43,6	170,0		
ESU	LB	129 792	2,74	13,5	10,6	12,0	32,0	94,0	28	0,02
	UB			13,6	10,5	12,0	32,0	94,0		
MER	LB	36	97,22	0,02	0,1	0	0	0,6	0	0
	UB			0,6	0,2	0,5	1,0	1,0		

EMI = eaux mixtes (mélange d'eaux souterraines et superficielles) ; ESO = eaux souterraines ; ESU = eaux superficielles ; MER = eaux de mer. Source : Ministère en charge de la santé, ARS - Traitement : Anses

○ *Influence de la nature des UDI*

Il est habituel de distinguer les UDI en fonction de la population desservie : les UDI « publiques » (AEP) sont destinées à alimenter une population par un réseau public d'adduction d'eau. Il s'agit de la majorité des UDI. Certaines UDI, qualifiées ici de « privées » (PRV), sont dédiées à l'alimentation d'un site privé, par exemple une emprise industrielle ou une base militaire. Dans ce cas, l'UDI est soumise aux mêmes dispositions réglementaires qu'une UDI publique.

Le Tableau 22 présente les concentrations en nitrates dans les EDCH distribuées selon que l'unité de distribution d'eau soit publique ou privée. La concentration en nitrates est significativement différente selon la nature des UDI<sup>52</sup> et est plus élevée dans les eaux distribuées en UDI publiques (concentration médiane de 14,0 mg L<sup>-1</sup>) que dans les eaux distribuées en UDI privées (concentration médiane comprise entre 4,6 mg L<sup>-1</sup> et 4,7 mg L<sup>-1</sup>)<sup>53</sup>. Néanmoins, la variance expliquée par la variable nature des UDI est faible par rapport à la variance globale. En revanche, la fréquence de dépassement de la limite de qualité est plus importante dans les eaux distribuées en UDI privées (2,5 %) que dans les eaux distribuées en UDI publiques (1,2 %).

<sup>51</sup> Test Kruskal-Wallis, p<0,05

<sup>52</sup> Test Kruskal-Wallis, p<0,05

<sup>53</sup> Régression linéaire généralisée, p<0,05

**Tableau 22. Niveau de concentration en nitrates (mgL<sup>-1</sup>) en fonction de la nature des UDI sous les hypothèses LB et UB.**

		Nombre de résultats	Taux de censure (%)	Concentration en mg L <sup>-1</sup>					Dépassement de la limite de qualité	
				Moy	ET	Med	P95	Max	Nombre	Pourcentage
AEP	LB	1 118 171	5,82	16,9	14,3	14,0	42,2	130,0	13 138	1,2
	UB			16,9	14,2	14,0	42,2	130,0		
PRV	LB	29 483	13,26	10,9	14,6	4,6	42,1	170,0	745	2,5
	UB			11,1	14,6	4,7	42,1	170,0		

AEP = alimentation en eau potable (unités de distributions publiques) ; PRV = adduction collectives privées (unités de distributions privées). *Source : Ministère en charge de la santé, ARS - Traitement : Anses*

○ *En fonction de la taille de l'UDI*

Le Tableau 23 présente les concentrations en nitrates dans les EDCH en fonction de la taille de l'UDI, définie par la population desservie. La taille de l'UDI a un effet significatif dans les concentrations en nitrates<sup>54</sup>, qui sont significativement plus élevées dans les UDI desservant plus de 5 000 habitants (concentration médiane de 17,4 mg L<sup>-1</sup>) que dans les UDI desservant jusqu'à 5 000 habitants (concentration médiane de 11,5 mg L<sup>-1</sup>)<sup>55</sup>. Néanmoins, la variance expliquée par la variable taille de l'UDI est faible par rapport à la variance globale. En revanche, la fréquence de dépassement de la limite de qualité est plus importante dans les EDCH produites par les UDI alimentant jusqu'à 5 000 habitants (1,8 %) que dans les EDCH produites par des UDI desservant plus de 5 000 habitants (0,2 %).

**Tableau 23. Concentration en ions nitrate dans les EDCH distribuée en réseau en fonction de la taille de l'UDI (seuil : 5000 pers)**

		N	Taux de censure	Concentration en mg L <sup>-1</sup>					Dépassement de la limite de qualité	
				Moy	ET	Med	P95	Max	Nombre	Pourcentage
UDI alimentant jusqu'à 5 000 habitants	LB	739 485	7,19	15,9	14,9	11,5	43,6	170,0	13 199	1,8
	UB			16,0	14,8	11,5	43,6	170,0		
UDI alimentant plus de 5 000 habitants	LB	406 144	3,82	18,1	13,0	17,4	40,4	81,0	647	0,2
	UB			18,2	12,9	17,4	40,4	81,0		

*Source : Ministère en charge de la santé, ARS - Traitement : Anses*

● **Concentration en nitrites dans les EDCH distribuées**

Comme les nitrites sont très peu fréquemment quantifiés dans les EDCH (Tableau 19), seule une caractérisation succincte des concentrations quantifiées a été effectuée. Sur les 2 688 résultats quantifiés :

- 83 % concernent des eaux produites à partir d'eau souterraine, 10 % à partir d'eau superficielle et 7 % à partir d'eau mixte,
- 93 % concernent des eaux distribuées par des UDI publiques et 7 % par des UDI privées ;
- 70 % concernent des eaux distribuées par des UDI alimentant jusqu'à 5 000 habitants et 30 % alimentant plus de 5 000 habitants.

<sup>54</sup> Test Kruskal-Wallis, p<0.05

<sup>55</sup> Régression linéaire généralisée, p<0.05

Sur les 66 résultats dépassant la limite de qualité de 0,50 mg L<sup>-1</sup> :

- 63 concernent des eaux produites à partir d'eau souterraine, 2 à partir d'eau superficielle ESU et 1 à partir d'eau mixte ;
- 59 concernent des eaux distribuées par des UDI publiques et 7 par des UDI privées ;
- 54 concernent des eaux distribuées par des UDI alimentant jusqu'à 5 000 habitants et 12 alimentant plus de 5 000 habitants.

#### • Bilan des données par UDI

Au total, l'extraction SISE-EAUX a fourni les concentrations en nitrates pour 26 304 UDI, dont 24 288 installations de distribution d'EDCH publiques (AEP) et 2 722 installations de distribution d'EDCH collectives privées (PRV).

Le Tableau 24 présente la répartition des unités de distribution (UDI) en fonction de leur concentration moyenne en nitrates dans les eaux distribuées sur la période 2010-2019 sous l'hypothèse haute ou basse. Quelle que soit l'hypothèse de traitement des données censurées, plus de 77 % des UDI, alimentant plus de 66 % de la population, présentent des concentrations moyennes en nitrates inférieures à 20 mg L<sup>-1</sup>.

Cent-cinquante-cinq (155) UDI (0,5% des UDI), alimentant environ 88 500 personnes (0,1% de la population), présentent des concentrations moyennes en nitrates supérieures à la limite de qualité de 50 mg L<sup>-1</sup>.

**Tableau 24. Répartition des unités de distribution (UDI) en fonction de leur concentration moyenne en nitrates dans les eaux distribuées sur la période 2010-2019 (en LB) et populations associées.**

Classe de contamination moyenne en mg L <sup>-1</sup>	Nombre d'UDI	Pourcentage d'UDI	Population totale desservie <sup>a</sup>	Pourcentage de population desservie <sup>a</sup>
< 10	16 086	61,2	27 890 440	42,5
[10-20[	4 416	16,8	16 032 420	24,4
[20-30[	3 001	11,4	14 778 750	22,5
[30-40[	1 927	7,3	5 881 334	9,0
[40-50[	719	2,7	1 004 038	1,5
[50-60[	117	0,4	78 590	0,1
[60-70[	26	0,1	8 684	0,01
[70-80[	8	0,03	850	0,001
[80-90[	2	0,01	296	0,000
[90-100[	0	-	0	-
[100-110[	1	0,000	49	0,000
> 110	1	0,000	20	0,000

<sup>a</sup> Les population rapportées sont celles renseignées dans la base de données SISE-EAUX.

Seules les UDI dont la population desservie est renseignée et supérieure à zéro sont prises en compte dans ce tableau.

Source : Ministère en charge de la santé, ARS - Traitement : Anses

**Tableau 25. Répartition des unités de distribution (UDI) en fonction de leur concentration moyenne en nitrates dans les eaux distribuées sur la période 2010-2019 (en UB) et populations associées**

Classe de contamination moyenne en mg L <sup>-1</sup>	Nombre d'UDI	Pourcentage d'UDI	Population totale desservie <sup>a</sup>	Pourcentage de population desservie <sup>a</sup>
< 10	16 077	61,12	27 870 594	42,437
[10-20[	4 421	16,81	16 042 558	24,427
[20-30[	3 005	11,42	14 788 460	22,517
[30-40[	1 927	7,33	5 881 334	8,955
[40-50[	719	2,73	1 004 038	1,529
[50-60[	117	0,44	78 590	0,120
[60-70[	26	0,10	8 684	0,013
[70-80[	8	0,03	850	0,001
[80-90[	2	0,01	296	0,000
[90-100[	0	0,00	0	0,000
[100-110[	1	0,00	49	0,000
> 110	1	0,00	20	0,000

<sup>a</sup> Les population rapportées sont celles renseignées dans la base de données SISE-EAUX.

Seules les UDI dont la population desservie est renseignée et supérieure à zéro sont prises en compte dans ce tableau.

Source : Ministère en charge de la santé, ARS - Traitement : Anses

Au total, l'extraction SISE-EAUX a fourni des concentrations en nitrites pour 26 862 UDI, dont 24 131 installations de distribution d'EDCH publiques (AEP) et 2 731 installations de distribution d'EDCH collectives privées (PRV).

Les tableaux 26 et 27 présentent la répartition des unités de distribution (UDI) en fonction de leur concentration moyenne en nitrites dans les eaux distribuées sur la période 2010-2019. 98 % des UDI, alimentant plus de 99 % de la population, présentent des concentrations moyennes en nitrites inférieures à 0,01 mg L<sup>-1</sup> en LB et à 0,05 mg L<sup>-1</sup> en UB.

Seules deux UDI présentent des concentrations moyennes en nitrites sur la période 2010-2019 supérieures à la limite de qualité de 0,50 mg L<sup>-1</sup>.

**Tableau 26. Répartition des unités de distribution (UDI) en fonction de leur concentration moyenne en nitrites dans les eaux distribuées sur la période 2010-2019 (en LB) et populations associées**

Classe de contamination moyenne en mg L <sup>-1</sup>	Nombre d'UDI	Pourcentage d'UDI	Population totale desservie <sup>a</sup>	Pourcentage de population desservie
≤ 0,01	26 346	98,1	67 097 044	99,2
[0,01-0,02[	265	1,0	260 528	0,4
[0,02-0,03[	89	0,3	91 665	0,1
[0,03-0,04[	51	0,2	29 831	0,0
[0,04-0,05[	27	0,1	43 572	0,1
[0,05-0,10[	51	0,2	118 332	0,2
[0,10-0,20[	22	0,08	17 266	0,03
[0,20-0,50[	9	0,03	6 344	0,01
> 0,50	2	0,01	106	0,000

<sup>a</sup> Les populations rapportées sont celles renseignées dans la base de données SISE-EAUX.

Seules les UDI dont la population desservie est renseignée et supérieure à zéro sont prises en compte dans ce tableau.

Source : Ministère en charge de la santé, ARS - Traitement : Anses

**Tableau 27. Répartition des unités de distribution (UDI) en fonction de leur concentration moyenne en nitrites dans les eaux distribuées sur la période 2010-2019 (en UB) et populations associées**

Classe de contamination moyenne en mg L <sup>-1</sup>	Nombre d'UDI	Pourcentage d'UDI	Population totale desservie <sup>a</sup>	Pourcentage de population desservie
≤ 0,01	694	2,584	269 516	0,40
[0,01-0,02[	10 898	40,570	34 242 828	50,61
[0,02-0,03[	12 344	45,953	26 681 569	39,43
[0,03-0,04[	1 697	6,317	3 813 141	5,64
[0,04-0,05[	564	2,100	2 259 876	3,34
[0,05-0,10[	628	2,338	373 691	0,55
[0,10-0,20[	26	0,097	17 617	0,03
[0,20-0,50[	9	0,034	6 344	0,01
> 0,50	2	0,007	106	0,00

<sup>a</sup> Les populations rapportées sont celles renseignées dans la base de données SISE-EAUX.

Seules les UDI dont la population desservie est renseignée et supérieure à zéro sont prises en compte dans ce tableau.

Source : Ministère en charge de la santé, ARS - Traitement : Anses

### 9.3.2.2. Concentrations en nitrates et nitrites dans les eaux embouteillées consommées en France métropolitaine hors Corse, produites entre 2010 et 2019

Les nitrates sont quantifiés dans 58,1 % des échantillons d'eau conditionnée et les nitrites dans 6,2 % de ces échantillons. Les concentrations moyennes en nitrates varient de 1,89 mg L<sup>-1</sup> en LB à 2,2 mg L<sup>-1</sup> en UB, le P95 des concentrations en nitrates est de 6,9 mg L<sup>-1</sup> quelle que soit l'hypothèse. Les concentrations médianes sont plus faibles (de 0,8 mg L<sup>-1</sup> LB à 1 mg L<sup>-1</sup> en UB). Les nitrites varient, en LB et UB, de 0 à 0,01 mg L<sup>-1</sup> en moyenne et de 0,01 à 0,03 mg L<sup>-1</sup> au P95. Aucun dépassement des limites de qualité n'a été observé à partir des analyses d'eau conditionnée (Figure 28).

**Tableau 28. Niveaux de concentration en nitrates et nitrites dans les eaux embouteillées consommées en France Métropolitaine (mg L<sup>-1</sup>)**

	N	Censure (%)	LB					UB				
			Moy*	ET*	Med*	P95*	Max*	Moy	ET	Med	P95	Max
Ion nitrate	18 495	41,9	1,89	3,44	0,80	6,90	47,00	2,19	3,30	1,00	6,90	47,00
Ion nitrite	192	93,8	0,00	0,01	0,00	0,01	0,60	0,01	0,01	0,01	0,03	0,06

\*Moy : moyenne, ET : Ecart-type, Med : Médiane, P95 : 95<sup>e</sup> percentile, Max : Valeur maximum

Source : Ministère en charge de la santé, ARS - Traitement : Anses

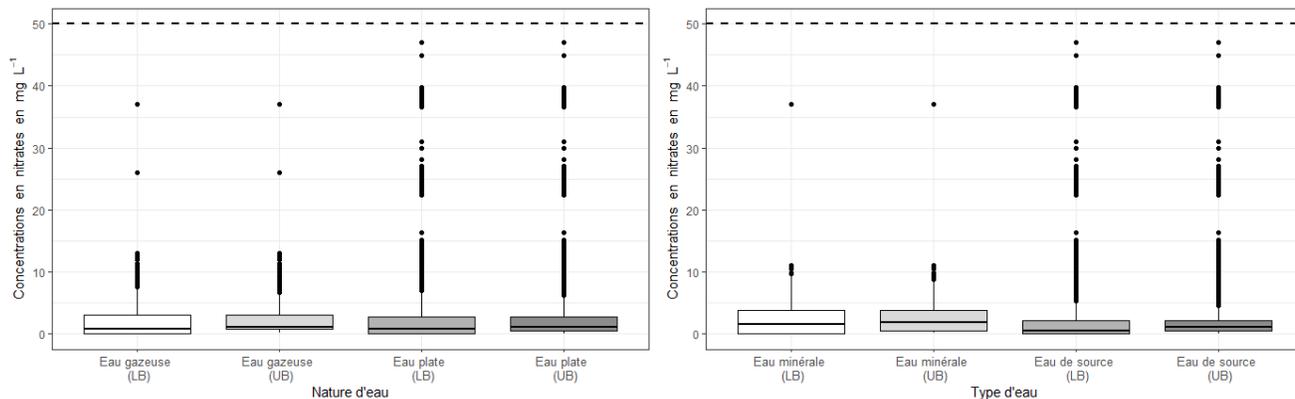


Figure 27. Distribution des concentrations en nitrates (en  $\text{mg L}^{-1}$ ) dans l'eau embouteillée en fonction de la nature et du type d'eau. Source : Ministère en charge de la santé, ARS - Traitement : Anses

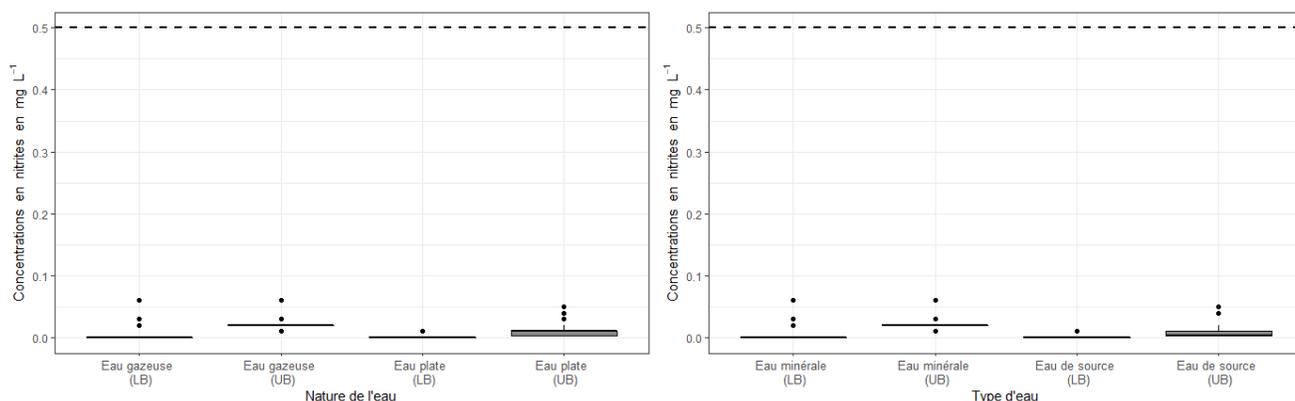


Figure 28. Distribution des concentrations en nitrites (en  $\text{mg L}^{-1}$ ) dans l'eau embouteillée en fonction de la nature et du type d'eau. Source : Ministère en charge de la santé, ARS - Traitement : Anses

### 9.3.3. Concentrations en nitrates et nitrites dans les denrées alimentaires

La base de données contaminate comptait initialement 11 036 observations. Les traitements présentés en annexe 14 et l'ajustement des données sur la même période (2010-2019) ont été réalisés pour la rendre exploitable. La base de données finale et exploitée dans le cadre de ce travail compte 9788 observations.

#### 9.3.3.1. Méthodes analytiques et limites analytiques

Le tableau ci-dessous reprend, pour chaque substance, les méthodes analytiques et les limites de détection et de quantification rapportées par les laboratoires chargés des analyses.

Les lignes du tableau ne comportant ni LOD ni LOQ correspondent à des valeurs quantifiées pour lesquelles les limites analytiques n'ont pas été indiquées.

Tableau 29. Limites analytiques (mg kg<sup>-1</sup>) en fonction de la méthode et de la substance.

Substance	Méthode analytique	LOD	LOQ	N
Ion nitrate	High Performance Liquid Chromatography (HPLC)/Liquid Chromatography (LC)	3	10	113
		3		1
		10		2
			10	12
				821
	HPLC with standard detection methods	10		1
		30		1
				453
	Méthode non précisée		14,6	1212
	UV/VIS spectroscopie (spectrophotometrie)		14,6	2972
Ion nitrite	Inconnu		1,3	1229
	UV/VIS spectroscopie (spectrophotometrie)		1,3	582
			2,0	2389

### 9.3.3.2. Concentrations en nitrates et nitrites dans les aliments

Les tableaux 30 et 31 ci-dessous présentent la distribution des concentrations en nitrates et nitrites dans les aliments (selon les données issues des plans de surveillance et de contrôle). Le taux de censure correspond au pourcentage d'analyses pour lesquelles la concentration en contaminant n'a pas été détectée ou n'a pas été quantifiée.

Concernant les nitrates, les groupes d'aliments ayant le plus faible pourcentage de censure (et donc le taux de quantification le plus élevé) comprennent les denrées d'origine végétale ainsi que les denrées végétales transformées, avec respectivement 1,3% et 0% de données censurées (et donc 98,7% et 100% de quantification). Les nitrates n'ont pas été quantifiés dans 59,5% des denrées animales transformées, dans 84 % de la viande fraîche et dans la totalité des poissons (100%). C'est dans les produits végétaux que les niveaux moyens de nitrates sont les plus élevés (1515 mg kg<sup>-1</sup> pour toute la catégorie) et notamment dans les légumes feuilles et les graines germées et pousses avec, respectivement, une moyenne de 1651 et 1405 mg kg<sup>-1</sup> et ce, quelle que soit l'hypothèse. Certaines épices et fines herbes présentent également des niveaux élevés (1988 mg kg<sup>-1</sup> en moyenne).

Les nitrites sont surtout quantifiés dans les produits de charcuterie (50%) mais très faiblement dans les autres catégories alimentaires (entre 82% et 96% de données censurées). C'est également dans la catégorie des produits de la charcuterie que sont observés les niveaux de concentrations les plus élevés avec des moyennes variant de 4 à 5 mg kg<sup>-1</sup> selon l'hypothèse, et des niveaux pouvant aller au-delà de 18.8 mg kg<sup>-1</sup> dans 5% des cas.

Il est à noter que l'ajout de nitrites n'est pas autorisé dans les viandes fraîches bien que l'on retrouve quelques analyses positives aux nitrites dans cette catégorie. Ce constat a également été rapporté dans l'opinion de l'Efsa relative à l'évaluation des risques liés aux nitrites (EFSA, 2017b). Cela peut être dû soit à une conversion des nitrates en nitrites dans les viandes fraîches (Iacumin et al., 2019; Iammarino and Di Taranto, 2012), soit à des intitulés imprécis conduisant à classer certaines viandes transformées parmi les viandes fraîches.

Tableau 30. Concentrations en nitrates dans les aliments (mg kg<sup>-1</sup>) selon les hypothèses basse (LB) et haute (UB)

Base de données Contamine, Anses

Catégorie alimentaire	Sous-catégorie alimentaire	N	Censure %	LB				UB			
				Moy**	ET**	Med**	P95**	Moy	ET	Med	P95
Catégories de produits alimentaires composés (basés sur une recette) (y compris les PPB strictement liés ou les dérivés de PPB)		275	60,7	45,9	235,1	0,0	132,1	54,8	233,5	14,6	132,1
	<i>Assaisonnement, sauces et condiments</i>	5	0,0	1367,2	1168,4	1749,8	2848,5	1367,2	1168,4	1749,8	2848,5
	<i>Plats composés</i>	269	61,7	21,5	54,5	0,0	102,0	30,5	51,3	14,6	102,0
	<i>Produits de boulangerie</i>	1	100,0	0,0		0,0	0,0	14,6		14,6	14,6
Lait et produits laitiers	Fromage	1	100,0	0,0		0,0	0,0	14,6		14,6	14,6
Poissons transformés ou conservés (y compris les abats transformés)		55	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	14,6	0,0	14,6	14,6
	<i>Poisson en boîte/en bocaux</i>	1	100,0	0,0		0,0	0,0	14,6		14,6	14,6
	<i>Poisson fumé</i>	20	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	14,6	0,0	14,6	14,6
	<i>Poisson mariné/au vinaigre</i>	33	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	14,6	0,0	14,6	14,6
	<i>Produits à base de chair de poisson structurée/texturée ou pâtes de poisson</i>	1	100,0	0,0		0,0	0,0	14,6		14,6	14,6
Produits primaires dérivés de produits végétaux		37	0,0	927,5	1246,8	549,0	5316,0	927,5	1246,8	549,0	5316,0
	<i>Fines herbes et épices transformées ou conservées et similaires</i>	7	0,0	1988,1	2624,6	252,0	6090,0	1988,1	2624,6	252,0	6090,0
	<i>Légumes transformés ou conservés et similaires</i>	30	0,0	680,0	411,9	601,5	1584,0	680,0	411,9	601,5	1584,0
Produits végétaux (PPB)		1355	1,3	1514,8	1347,2	1165,0	4180,0	1515,0	1347,1	1165,0	4180,0
	<i>Choux</i>	7	0,0	237,7	339,9	92,0	982,0	237,7	339,9	92,0	982,0
	<i>Feuilles</i>	1202	0,4	1650,7	1356,8	1282,0	4292,0	1650,8	1356,8	1282,0	4292,0
	<i>Graines germées, pousses et similaires</i>	13	0,0	1405,2	986,9	1290,0	3579,0	1405,2	986,9	1290,0	3579,0
	<i>Légumes-bulbes</i>	2	50,0	212,0	299,8	212,0	424,0	217,0	292,7	217,0	424,0
	<i>Légumineuses non écossées</i>	9	0,0	518,7	143,9	523,0	739,0	518,7	143,9	523,0	739,0
	<i>PPB à base de fruit</i>	99	11,1	274,8	271,8	205,0	858,0	275,9	270,7	205,0	858,0
	<i>Racines et autres parties souterraines</i>	4	0,0	196,3	285,8	76,0	618,0	196,3	285,8	76,0	618,0
	<i>Tiges/pédoncules</i>	19	0,0	813,4	808,0	523,0	3088,0	813,4	808,0	523,0	3088,0
Produits à base de viande animale (PPB tissulaires)		353	83,9	5,6	17,1	0,0	34,3	17,9	13,5	14,6	34,3
	<i>Abats d'animaux et autres produits issus de l'abattage</i>	10	70,0	5,0	8,2	0,0	19,7	15,3	1,6	14,6	19,7
	<i>Viande animale fraîche</i>	343	84,3	5,6	17,3	0,0	34,3	17,9	13,7	14,6	34,3
Viande transformée ou conservée	Produits de charcuterie	3512	59,5	23,5	70,4	0,0	104,4	32,2	67,8	14,6	104,4

\*Produits primaires bruts

\*\*Moy : moyenne, ET : écart-type, Med : Médiane, P95 : 95è percentile

Tableau 31. Concentration en nitrites dans les aliments (mg kg<sup>-1</sup>) selon les hypothèses LB et UB

Base de données Contamine, Anses

Catégorie alimentaire	Sous-catégorie alimentaire	N	Censure %	LB				UB			
				Moy	ET	Med	P95	Moy	ET	Med	P95
Catégories de produits alimentaires composés (basés sur une recette) (y compris les PPB strictement liés ou les dérivés de PPB)		265	85,7	0,8	3,1	0,0	4,7	2,4	2,7	2,0	4,7
	<i>Assaisonnement, sauces et condiments</i>	4	75,0	5,2	10,4	0,0	20,8	6,2	9,7	1,3	20,8
	<i>Plats composés</i>	260	85,8	0,7	2,9	0,0	4,7	2,3	2,5	2,0	4,7
	<i>Produits de boulangerie</i>	1	100,0	0,0		0,0	0,0	2,0		2,0	2,0
Lait et produits laitiers	Fromage	1	100,0	0,0		0,0	0,0	2,0		2,0	2,0
Poissons transformés ou conservés (y compris les abats transformés)		55	96,4	0,1	0,5	0,0	0,0	1,9	0,4	2,0	2,0
	<i>Poisson en boîte/en bocaux</i>	1	100,0	0,0		0,0	0,0	2,0		2,0	2,0
	<i>Poisson fumé</i>	20	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,8	0,3	2,0	2,0
	<i>Poisson mariné/au vinaigre</i>	33	93,9	0,2	0,7	0,0	2,0	1,9	0,4	2,0	2,0
	<i>Produits à base de chair de poisson structurée/texturée ou pâtes de poisson</i>	1	100,0	0,0		0,0	0,0	1,3		1,3	1,3
Produits à base de viande animale (PPB tissulaires)		356	86,0	1,4	4,9	0,0	10,7	3,0	4,5	2,0	10,7
	<i>Abats d'animaux et autres produits issus de l'abattage</i>	10	70,0	4,7	13,2	0,0	42,2	6,0	12,7	2,0	42,2
	<i>Viande animale fraîche</i>	346	86,4	1,3	4,5	0,0	10,1	2,9	4,1	2,0	10,1
Viande transformée ou conservée	Produits de charcuterie	3523	50,1	4,0	7,3	0,0	18,8	4,9	6,8	2,0	18,8

\*Produits primaires bruts

\*\*Moy : moyenne, ET : écart-type, Med : Médiane, P95 : 95<sup>e</sup> percentile

Compte tenu de ces éléments et des données issues de la littérature décrites plus haut, il apparaît dès-lors bien fondé de valoriser les valeurs de la base de données française CONTAMINE qui s'articule sur des dosages réalisés sur des produits commercialisés en France, quelle que soit leur origine.

La base de données CONTAMINE contient donc les valeurs de contamination jugées les plus pertinentes pour ce qui concerne l'évaluation de l'exposition aux nitrates et aux nitrites en France.

**Tableau 32. Teneurs en nitrates et en nitrites dans diverses denrées alimentaires sélectionnées. Comparaison des valeurs de la base de données CONTAMINE avec celles d'autres bases de données internationales récentes. Les valeurs notées en gras correspondent aux moyennes auxquelles sont associés les écart-types ou, entre parenthèses, les valeurs minimales et valeurs maximales.**

Résultats exprimés en mg kg<sup>-1</sup>

Source Bibliographique	Roila et al. *	Van den Brand et al.	Zhong et al.	CONTAMINE LB	CONTAMINE UB
Année	2018	2020	2022	2010-2019	2010-2019
Champ	Italie	Pays-Bas	Worldwide	France	France
Provenance des données	Mesures**	Mesures	Tabulation***	Mesures	Mesures
<b>Produits végétaux Nitrates</b>					
Laitues	<b>1079 ± 974</b>	<b>2538</b> (20-4315)	-	<b>1409 ± 982</b>	<b>1461 ± 1031</b>
Roquette	<b>4415 ± 1362</b>	NS	-	<b>3609 ± 2015</b>	<b>4174 ± 1985</b>
Epinards (frais)	<b>2036 ± 1042</b>	<b>1907</b> (0-5145)	-	<b>1506 ± 1002</b>	<b>1534 ± 1015</b>
Mâche	NS	<b>3010</b> (1090-7385)	-	<b>2461 ± 1133</b>	<b>2461 ± 1133</b>
<b>Produits carnés Nitrites</b>					
Jambon	NS	<b>7,4</b>	<b>21,1 ± 45,78</b>	<b>5,4 ± 4,7</b>	<b>5,68 ± 4,49</b>
Salami	<b>69 ± 97</b>		<b>17,84 ± 24,87</b>	<b>15,2 ± 11,1</b>	<b>15,4 ± 10,9</b>

\* Voir tableau 18, NS : Non Spécifié, \*\* Campagne de mesures, LB = Lower Bound value,

\*\*\* Méta-analyse, UB = Upper Bound value

## 9.4. Evaluation de l'exposition aux nitrates et aux nitrites dans la population française

### 9.4.1. Démarche de calcul de l'exposition

L'exposition de la population par voie alimentaire à chaque substance a été calculée de façon individuelle, pour l'ensemble des individus de l'étude INCA3, selon la formule suivante :

$$E_i = \sum_{k=1}^N \frac{C_{i,k} \times T_k}{PC_i}$$

Où E<sub>i</sub> est l'exposition de l'individu i, N est le nombre d'aliments dans le régime, C<sub>i,k</sub> est la consommation de l'aliment k par l'individu i, T<sub>k</sub> est la teneur en contaminant de l'aliment k, PC<sub>i</sub> est le poids corporel de l'individu i.

Les calculs ont pris en compte le design de l'enquête, avec les facteurs de stratification, de pondération et de correction (cf. chapitre 7.1).

Par ailleurs, le calcul d'exposition a été adapté à chaque matrice comme suit.

### 9.4.1.1. Démarche du calcul de l'exposition pour les aliments

L'exposition alimentaire (hors eau) a été calculée selon l'approche probabiliste en réalisant, pour chaque aliment  $k$ , 1000 tirages aléatoires dans les données de concentration de cet aliment. A chaque itération, l'exposition de l'individu  $i$  ( $\text{mg j}^{-1}$ ) a été calculée en combinant la consommation journalière de l'aliment  $k$  par l'individu  $i$  ( $\text{g j}^{-1}$ ) et la concentration en nitrates ou nitrites tirée aléatoirement par aliment  $k$  ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) et ce, pour les  $N$  aliments consommés par l'individu  $i$  (Figure 29). L'exposition totale individuelle a ainsi été calculée en sommant les expositions associées à chaque aliment. Chaque exposition a été divisée par le poids corporel de l'individu  $i$  ( $\text{kg}$ ) afin de pouvoir être comparée à la VTR correspondante ( $\text{mg (kg pc)}^{-1} \text{j}^{-1}$ ). Cette démarche a été suivie pour tous les individus aboutissant à 1000 distributions d'exposition dans la population.

La description statistique des données d'exposition (moyenne et 95ème percentile) a été réalisée à partir des 1000 distributions de l'exposition totale de la population. Les résultats des calculs d'exposition sont présentés en termes de distributions de ces moyennes et 95ème percentiles avec leur intervalle de probabilité.

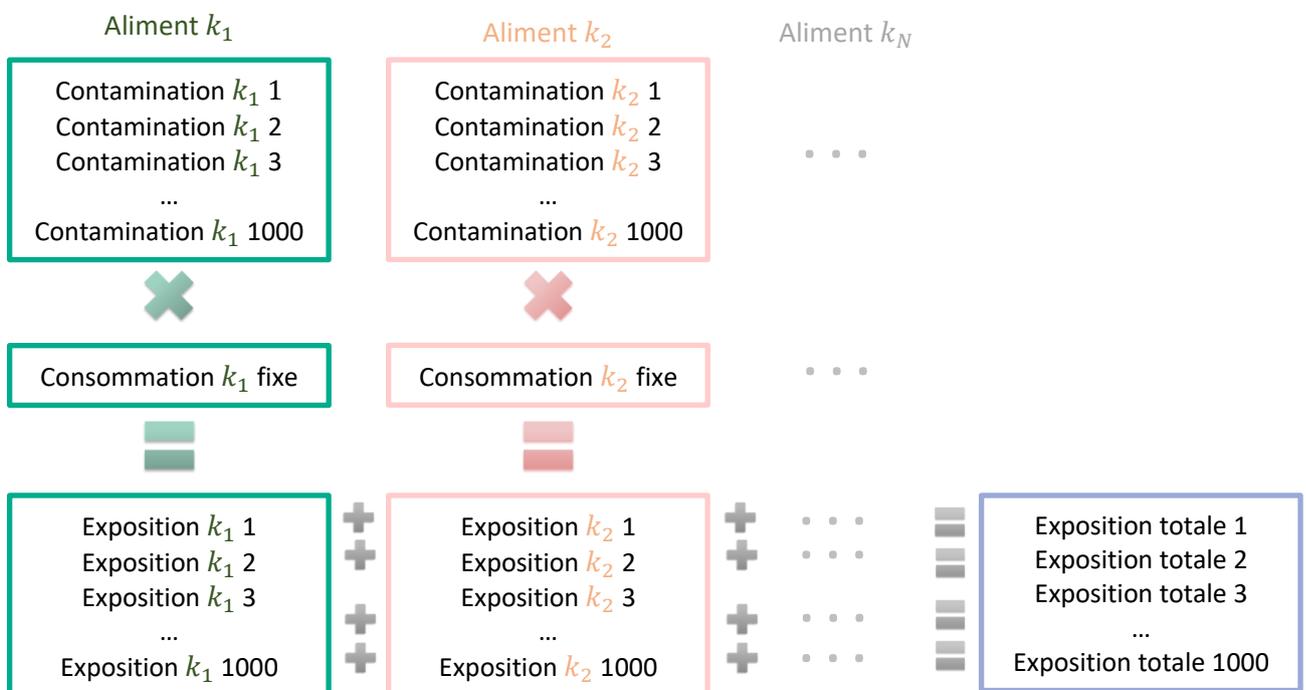


Figure 29 : Schéma descriptif de la démarche de calcul de l'exposition individuelle aux nitrates et aux nitrites associés aux aliments par la méthode probabiliste

### 9.4.1.2. Démarche du calcul de l'exposition pour l'eau de distribution

La quantité d'eau de distribution consommée ( $\text{mL j}^{-1}$ ) a été calculée par individu  $i$  à partir de ses déclarations de consommation. La consommation était directe à partir de la source de distribution ou indirecte, par la consommation d'eau dans les soupes, bouillons, boissons chaudes et boissons rafraîchissantes sans alcool (type sirop). Lorsque la recette était indiquée dans la base de données INCA3, la quantité d'eau renseignée était prise en compte. Lorsque la quantité d'eau n'était pas spécifiée, la recette, ainsi que la quantité d'eau correspondante, étaient établies à partir de trois sources de recettes différentes.

Pour chaque consommation d'eau de distribution, nous sommes partis de l'hypothèse que chaque individu consomme toujours l'eau de distribution de l'UDI dont dépend sa résidence.

Ainsi, une UDI a été tirée au sort dans la commune de résidence de l'individu *i* lorsque l'information était disponible ou à défaut dans son département de résidence, puis la concentration en nitrates/nitrites dans l'eau distribuée au niveau de cette UDI a été affectée à la consommation (ou la moyenne des analyses effectuées sur les échantillons de cette UDI si plusieurs résultats étaient disponibles).

Toutes les UDI n'ont pas été analysées pour les nitrates et les nitrites conjointement par conséquent, il a été nécessaire de tirer au sort deux UDI séparément pour le calcul d'exposition à chaque substance.

#### 9.4.1.3. Démarche du calcul de l'exposition pour l'eau conditionnée

Pour chaque consommation d'eau conditionnée, la moyenne des concentrations par marque d'eau et type d'eau (minéral/source) a été attribuée à la consommation. Si l'information relative à la marque n'était pas disponible, la moyenne des concentrations par type d'eau a été utilisée. Seule la consommation directe a été considérée.

#### 9.4.2. Exposition globale de la population française aux nitrates et aux nitrites toutes sources confondues

Les résultats des calculs des expositions sont présentés dans les sections ci-dessous (Tableaux 33 et 34 pour les nitrates, tableaux 35 et 36 pour les nitrites).

L'approche probabiliste n'ayant été appliquée qu'à l'exposition via les aliments, la distribution de l'exposition moyenne et au 95<sup>e</sup> percentile ainsi que leurs intervalles de probabilité à 95% sont présentés séparément, d'une part, pour l'exposition due aux aliments et, d'autre part, pour l'exposition totale calculée en additionnant l'exposition liée à l'eau (déterministe) à l'exposition due aux aliments (probabiliste).

##### 9.4.2.1. Exposition aux nitrates

L'exposition totale aux nitrates chez les adultes, toutes sources confondues, se situe entre 0,90 et 0,93 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> en moyenne avec un P95 entre 2,40 et 2,43 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>. Les aliments contribuent à hauteur de 0,67 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> en LB (P95 : 2,08 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>) et 0,70 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> en UB (P95 : 2,11 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>) soit les trois quarts de l'exposition aux nitrates.

L'eau de boisson représente le quart des apports en nitrates, principalement sous forme distribuée (eau du robinet).

Tableau 33. Exposition alimentaire aux nitrates (intervalle de probabilité à 95% entre crochets) chez les adultes de 18 ans et plus (N=2121) en mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>

	LB		UB	
	Moyenne	P95	Moyenne	P95
<b>Eau totale</b>	<b>0,231</b>	<b>0,789</b>	<b>0,233</b>	<b>0,789</b>
<i>Eau conditionnée</i>	0,014	0,059	0,015	0,064
<i>Eau distribuée</i>	0,217	0,770	0,217	0,770
<b>Aliments</b>	<b>0,67 [0,44;1,02]</b>	<b>2,08 [1,34;3,30]</b>	<b>0,70 [0,47;1,04]</b>	<b>2,11 [1,38;3,34]</b>
<b>Exposition totale</b>	<b>0,90 [0,67;1,25]</b>	<b>2,40 [1,73;3,55]</b>	<b>0,93 [0,70;1,27]</b>	<b>2,43 [1,75;3,57]</b>

Chez les enfants, l'exposition totale aux nitrates, toutes sources confondues, se situe entre 0,97 et 1,02 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> en moyenne avec un P95 de 2,80 à 2,85 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>.

Les aliments contribuent à hauteur de 0,76 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> en LB (P95 : 2,50 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>) et 0,80 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> en UB (P95 : 2,55 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>) soit, près de 80% de l'exposition aux nitrates. L'eau représente entre 21% et 22% des apports en nitrates, principalement sous forme distribuée (eau du robinet).

Que ce soit pour les adultes ou les enfants, l'incertitude est assez grande puisque les bornes supérieures des intervalles de probabilité sont environ 40 à 50% plus élevées que les valeurs estimées.

**Tableau 34. Exposition alimentaire (intervalle de probabilité à 95% entre crochets) aux nitrates chez les enfants de 3 à 17 ans (N=1839) en mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>**

	LB		UB	
	Moyenne	P95	Moyenne	P95
<b>Eau totale</b>	<b>0,214</b>	<b>0,723</b>	<b>0,217</b>	<b>0,723</b>
<i>Eau conditionnée</i>	0,014	0,068	0,017	0,074
<i>Eau distribuée</i>	0,199	0,711	0,200	0,711
<b>Aliments</b>	<b>0,76 [0,54;1,01]</b>	<b>2,50 [1,70;3,40]</b>	<b>0,80 [0,58;1,05]</b>	<b>2,55 [1,75;3,44]</b>
<b>Exposition totale</b>	<b>0,97 [0,75;1,22]</b>	<b>2,80 [2,04;3,70]</b>	<b>1,02 [0,80;1,27]</b>	<b>2,85 [2,08;3,73]</b>

#### 9.4.2.2. Exposition aux nitrites

L'exposition totale aux nitrites chez les adultes, toutes sources confondues, se situe entre 0,0046 et 0,0076 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> en moyenne avec un P95 de 0,0167 et 0,0203 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> en LB et en UB.

**Tableau 35. Exposition alimentaire (intervalle de probabilité à 95% entre crochets) aux nitrites chez les adultes de 18 ans et plus (N=2121) en mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>**

	LB		UB	
	Moyenne	P95	Moyenne	P95
<b>Eau totale</b>	<b>0,00003</b>	<b>0,00007</b>	<b>0,00044</b>	<b>0,00097</b>
<i>Eau conditionnée</i>	0,000005	0,000025	0,000143	0,000505
<i>Eau distribuée</i>	0,000023	0,000054	0,000293	0,000805
<b>Aliments</b>	<b>0,0046 [0,0017;0,0137]</b>	<b>0,0167 [0,0069;0,0434]</b>	<b>0,0071 [0,0046;0,0157]</b>	<b>0,0198 [0,0112;0,0458]</b>
<b>Exposition totale</b>	<b>0,0046 [0,0017;0,0137]</b>	<b>0,0167 [0,0071;0,0435]</b>	<b>0,0076 [0,0050;0,0161]</b>	<b>0,0203 [0,0117;0,0462]</b>

Chez les enfants, l'exposition totale aux nitrites, toutes sources confondues, se situe entre 0,0090 et 0,0145 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> en moyenne avec un P95 de 0,0339 et 0,0404 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> en LB et en UB, respectivement.

**Tableau 36. Exposition alimentaire (intervalle de probabilité à 95% entre crochets) aux nitrites chez les enfants de 3 à 17 ans (N=1839) en mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>**

	LB		UB	
	Moyenne	P95	Moyenne	P95
<b>Eau totale</b>	<b>0,00002</b>	<b>0,00007</b>	<b>0,00047</b>	<b>0,00115</b>
<i>Eau conditionnée</i>	0,000004	0,000016	0,000166	0,000741
<i>Eau distribuée</i>	0,000019	0,000050	0,000299	0,000956
<b>Aliments</b>	<b>0,0090 [0,0028;0,0263]</b>	<b>0,0339 [0,0117;0,0827]</b>	<b>0,0140 [0,0085;0,0306]</b>	<b>0,0398 [0,0201;0,0853]</b>
<b>Exposition totale</b>	<b>0,0090 [0,0028;0,0263]</b>	<b>0,0339 [0,0117;0,0827]</b>	<b>0,0145 [0,0090;0,0310]</b>	<b>0,0404 [0,0208;0,0862]</b>

Les aliments apportent la quasi-totalité (plus de 99%) des nitrites en LB dans les deux populations et autour de 94 et 97% en UB, chez les adultes et les enfants respectivement. Que ce soit pour les adultes ou les enfants, l'incertitude est très grande puisque les bornes supérieures des intervalles de probabilité représentent généralement au moins le double des valeurs estimées.

### 9.4.3. Identification des contributeurs majoritaires à l'exposition aux nitrates et aux nitrites

#### 9.4.3.1. Contributeurs majoritaires par catégorie alimentaire

Chez les adultes, les légumes sont les contributeurs majoritaires à l'exposition totale aux nitrates (67% en UB et 69% en LB) (Tableau 37). Dans cette catégorie, ce sont les légumes feuilles qui représentent la plus grosse contribution (30%) puis les graines germées et pousses (14%).

Chez les enfants, ce sont également les légumes qui contribuent le plus à l'exposition totale aux nitrates (62% en UB et 64% en LB). Dans cette catégorie, la répartition est plus homogène que chez les adultes avec des apports des légumineuses, des légumes feuilles, des fruits et des graines germées et pousses assez proches (entre 13 et 17%).

Comme indiqué précédemment, l'eau est le 2<sup>ème</sup> contributeur à l'exposition aux nitrates après la catégorie des légumes, dans les deux populations (25% chez les adultes, et de l'ordre de 21% à 22% chez les enfants).

Tableau 37. Exposition moyenne et contribution à l'exposition totale aux nitrates chez les adultes de 18 ans et plus et les enfants de 3 à 17 ans calculées par catégorie alimentaire

Catégorie alimentaire		Exposition moyenne (mg (kg pc) <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> )		Contribution (%)	
		LB	UB	LB	UB
Adultes (N=2121)	Produits végétaux (PPB)*	0,626	0,630	68,6	67,1
	Eaux et produits à base d'eau	0,231	0,233	25,3	24,8
	Catégories de produits alimentaires composés (basés sur une recette) (y compris les PPB strictement liés ou les dérivés de PPB)	0,038	0,044	4,2	4,7
	Viande transformée ou conservée	0,011	0,016	1,2	1,7
	Produits à base de viande animale (PPB tissulaires)	0,005	0,014	0,6	1,5
	Produits primaires dérivés de produits végétaux	0,001	0,001	0,1	0,1
	Lait et produits laitiers	0,000	0,000	0,0	0,0
	Poissons transformés ou conservés (y compris les abats transformés)	0,000	0,001	0,0	0,1
Enfants (N=1839)	Produits végétaux (PPB)	0,630	0,634	64,4	61,8
	Eaux et produits à base d'eau	0,214	0,217	21,9	21,1
	Catégories de produits alimentaires composés (basés sur une recette) (y compris les PPB strictement liés ou les dérivés de PPB)	0,107	0,120	10,9	11,6
	Viande transformée ou conservée	0,018	0,026	1,8	2,5
	Produits à base de viande animale (PPB tissulaires)	0,010	0,028	1,0	2,7
	Produits primaires dérivés de produits végétaux	0,001	0,001	0,1	0,1
	Lait et produits laitiers	0,000	0,000	0,0	0,0
	Poissons transformés ou conservés (y compris les abats transformés)	0,000	0,001	0,0	0,1

\*PPB : Produits primaires bruts

Concernant l'exposition aux nitrites (Tableau 38), les contributions à l'exposition sont très impactées par les hypothèses de censure et on constate une différence plus marquée entre les calculs en LB et en UB.

Chez les adultes, les nitrites sont principalement apportés par les viandes transformées ou conservées, représentées par les produits de la charcuterie (61% en LB et 42% en UB), les produits à base de viande (abats et viande fraîche, à hauteur de 29% en LB et 33% en UB) puis les plats composés (9% en LB et 18% en UB). Dans la catégorie des produits de la charcuterie, c'est le jambon cuit qui représente l'apport le plus élevé en nitrites (18% en LB et 11% en UB).

Chez les enfants, ce sont également les viandes transformées ou conservées qui représentent la plus grande contribution à l'exposition aux nitrites (63% en LB et 43% en UB), suivies des produits à base de viande (entre 25 et 32%) et des plats composés (11% en LB et 21% en UB). Parmi les viandes transformées, ce sont les saucisses cuites qui contribuent le plus à l'exposition aux nitrites (23% en LB et 14% en UB) ainsi que le jambon cuit (17% en LB et 11% en UB).

Comme signalé précédemment, les viandes fraîches apparaissent parmi les forts contributeurs à l'exposition totale aux nitrites alors qu'elles n'en contiennent pas naturellement ou à des quantités très faibles et que l'ajout de cet additif n'y est pas autorisé. Il est probable que le manque de précision de certains libellés des échantillons analysés n'ait pas permis leur classement dans la catégorie alimentaire adéquate. Il s'agit, par exemple de libellés tels que « rôti de dinde » ou « rôti de porc » sans autre détail qui sont classés dans la catégorie des viandes fraîches alors qu'il peut s'agir de viande en tranches traitée en salaison, vendue en barquettes.

**Tableau 38. Exposition moyenne et contribution à l'exposition totale aux nitrites chez les adultes de 18 ans et plus et les enfants de 3 à 17 ans calculées par catégorie alimentaire**

	Catégorie alimentaire	Exposition moyenne (mg (kg pc) <sup>-1</sup> j <sup>-1</sup> )		Contribution (%)	
		LB	UB	LB	UB
Adultes (N=2121)	Catégories de produits alimentaires composés (basés sur une recette) (y compris les PPB strictement liés ou les dérivés de PPB*)	0,00041	0,00132	9,2	17,7
	Eaux et produits à base d'eau	0,00003	0,00044	0,6	5,9
	Lait et produits laitiers	0,00000	0,00001	0,0	0,1
	Poissons transformés ou conservés (y compris les abats transformés)	0,00001	0,00014	0,2	1,9
	Produits à base de viande animale (PPB tissulaires)	0,00129	0,00243	28,7	32,8
	Viande transformée ou conservée	0,00274	0,00309	61,3	41,5
Enfants (N=1839)	Catégories de produits alimentaires composés (basés sur une recette) (y compris les PPB strictement liés ou les dérivés de PPB)	0,00098	0,00296	11,2	20,8
	Eaux et produits à base d'eau	0,00002	0,00047	0,3	3,3
	Lait et produits laitiers	0,00000	0,00000	0,0	0,0
	Poissons transformés ou conservés (y compris les abats transformés)	0,00001	0,00014	0,1	1,0
	Produits à base de viande animale (PPB tissulaires)	0,00222	0,00450	25,3	31,6
	Viande transformée ou conservée	0,00555	0,00615	63,2	43,3

\*PPB : Produits primaires bruts

#### 9.4.3.2. Contributeurs majoritaires en fonction de la source

La contribution aux nitrates et aux nitrites utilisés en tant qu'additifs alimentaires a été calculée selon les données fournies par la base des occurrences de l'OQALI.

Les nitrates utilisés en tant qu'additifs contribuent très peu à l'exposition totale toutes sources confondues, soit moins de 2% chez les adultes et moins de 4% chez les enfants (Tableau 39).

**Tableau 39. Contribution à l'exposition totale aux nitrates chez les adultes et les enfants de 3 à 17 ans calculées selon la source d'apport**

		Contribution à l'exposition totale	
		LB (%)	UB (%)
Adultes	Additif	1,1	1,6
	Autres	98,9	98,4
Enfants	Additif	2,8	3,7
	Autres	97,2	96,3

Concernant les nitrites, en raison d'une couverture non exhaustive des secteurs de la charcuterie par cette base de données (64%<sup>56</sup>) et du fait de l'apport majoritaire de cette catégorie dans l'exposition totale, nous avons considéré, pour ce calcul, que tous les produits de la charcuterie contenaient des nitrites en tant qu'additifs.

<sup>56</sup> Tableau 48 en annexe 4 relative aux données de l'oqali sur l'usage des nitrates et nitrites en tant qu'additifs alimentaires

Les nitrites utilisés en tant qu'additifs alimentaires sont majoritaires en LB (63% chez les adultes et 65% chez les enfants) et représentent presque la moitié des apports en nitrites en UB (45% chez les adultes et 48% chez les enfants)<sup>57</sup> (Tableau 40).

**Tableau 40. Contribution à l'exposition totale aux nitrites chez les adultes et les enfants de 3 à 17 ans calculée selon la source d'apport**

		Contribution à l'exposition totale	
		LB (%)	UB (%)
Adultes	Additif	62,7	45,3
	Autres	37,3	54,7
Enfants	Additif	64,6	48,3
	Autres	35,4	51,7

### 9.5. Incertitudes

Les sources d'incertitudes identifiées dans le cadre du présent rapport sont listées dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 41. Sources d'incertitudes et leur estimation sur l'estimation de l'exposition aux nitrates et aux nitrites**

Sources d'incertitudes	Impact sur l'estimation de l'exposition/Contribution à l'exposition	Nature de l'impact
Précision des libellés des aliments analysés	+/-	Impact sur la contribution des viandes fraîches versus les viandes transformées à l'exposition totale en particulier dans le cas des nitrites
Couverture incomplète des secteurs dans lesquels les nitrates et les nitrites sont autorisés en tant qu'additifs (ex : charcuterie)	--	Impact sur la contribution des nitrates et nitrites utilisés en tant qu'additifs alimentaires
Précision de l'appariement entre les libellés de l'enquête de consommation et les libellés de la base de données contaminée	+/-	Possibilité de sous-estimation ou de surestimation de l'exposition
Absence de données concernant la relation entre quantités ajoutées et quantités résiduelles	+/-	Impact sur la faisabilité des scénarios de réduction en nitrites au regard des scénarios étudiés dans le volet microbiologie
Non prise en compte d'un facteur de réduction des nitrates dans les légumes, lié au rinçage ou à la cuisson.	+	Surestimation des concentrations et par conséquent, des expositions aux nitrates
Estimation peu robuste des centiles faibles ou élevés en raison de la méthode	+/-	Possibilité de sous-estimation ou de surestimation des percentiles faibles ou élevés de

<sup>57</sup> En considérant les secteurs de la charcuterie réellement couverts par l'OQALI, la contribution des nitrites utilisés en tant qu'additifs est, en LB, de 47 et 57% chez les adultes et les enfants et, en UB, de 35 et 43% chez les adultes et les enfants.

de recueil de l'étude de consommation (3 jours)		consommation et d'exposition (vigilance à avoir concernant les effectifs)
Tirage au sort d'une UDI dans la commune ou le département	+/-	Possibilité de sous-estimation ou de surestimation par rapport à l'UDI dont dépend réellement l'individu
Toujours la même UDI considérée pour la consommation d'eau distribuée pour un individu	+/-	Possibilité de sous-estimation ou de surestimation par rapport à la consommation d'eau provenant de plusieurs UDI
Précision des recettes utilisant l'eau de distribution	+/-	Possibilité de sous-estimation ou de surestimation par rapport à la quantité d'eau utilisée lorsque la quantité d'eau était inconnue dans la recette
Non prise en compte d'aliments nécessitant de l'eau pour leur préparation	-	Sous-estimation possible due à la non prise en compte de la quantité d'eau consommée et des transferts possibles entre l'eau et l'aliment final
Toute eau consommée indirectement considérée comme eau distribuée	+	Possibilité de surestimation si certaines recettes contenaient de l'eau conditionnée
Méconnaissance de la provenance de l'eau conditionnée malgré la présence de l'information sur la source et la marque de l'eau	+/-	Possibilité de sous-estimation ou de surestimation par rapport à l'origine de l'eau pour une même marque, ce qui peut avoir des impacts significatifs sur la concentration d'ions nitrite et ions nitrate
Tirage au sort des UDI parfois différent, pour un même individu, pour nitrates et nitrites.	+/-	

+ : incertitude pouvant entraîner une surestimation de l'exposition

- : incertitude pouvant entraîner une sous-estimation de l'exposition

### En conclusion :

**Sur la base des données disponibles sur les concentrations en nitrates et en nitrites dans l'eau<sup>58</sup> et les aliments<sup>59</sup> entre 2010 et 2019, des données de consommation alimentaire dans la population française (adultes et enfants de plus de 3 ans en France métropolitaine hors Corse)<sup>60</sup> et des données relatives à la présence des additifs nitrés dans les produits alimentaires vendus sur le marché français<sup>61</sup>, les travaux d'expertise ont conduit aux considérations suivantes :**

#### Concernant les nitrates :

<sup>58</sup> Données SISE-EAUX (source : Direction générale de la santé)

<sup>59</sup> Données CONTAMINE (source : plans de surveillance et de contrôle / Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes)

<sup>60</sup> ANSES. 2017. Avis et rapport de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatifs à l'Étude individuelle nationale des consommations alimentaires 3 (INCA 3)

<sup>61</sup> INRA et ANSES. 2019. Bilan et utilisation des additifs dans les produits transformés.

- ils sont en grande partie apportés par les aliments (75-80 %) tandis que l'eau, essentiellement l'eau destinée à la consommation humaine distribuée en réseau, contribue pour 20 à 25 % à l'exposition des consommateurs ;
- leur utilisation en tant qu'additifs représente moins de 4 % de l'exposition totale, toutes sources confondues ;
- ils sont toujours présents dans les végétaux, cependant, certains les accumulent à des concentrations parfois très élevées. Ainsi, les légumes sont les contributeurs majoritaires (entre 62 et 69 %) à l'exposition totale aux nitrates. Chez les adultes, les légumes feuilles sont les principaux contributeurs alors que chez les enfants, les légumineuses, les légumes feuilles, les fruits ainsi que les graines germées et les pousses contribuent de manière similaire à l'exposition aux nitrates.

Concernant les nitrites :

- ils sont majoritairement apportés par les aliments (99 %) et en particulier par les produits carnés traités avec des sels nitrés tels que le jambon cuit, les saucisses et les saucissons cuits qui représentent de 41 à 63 % des apports selon les consommateurs et/ou les hypothèses de censure ;
- leur utilisation en tant qu'additifs représente entre 45 et 65 % de l'exposition totale, toutes sources confondues.

Ces estimations restent cependant tributaires des incertitudes citées ci-dessus.

## 10. CARACTÉRISATION DES DANGERS LIÉS AUX NITRATES, NITRITES ET COMPOSÉS NITROSÉS

### 10.1. Toxicocinétique des nitrates et des nitrites dans l'organisme

Les études sur la toxicocinétique des nitrates et nitrites chez l'animal et chez l'Homme ont été examinées dans les évaluations précédemment conduites par les instances sanitaires (EFSA, 2017a; EFSA, 2017b; IARC, 2010; JECFA, 2003a; JECFA, 2003b; SCF, 1997). Les processus d'ADME (absorption, distribution, métabolisme et élimination) des nitrates et nitrites chez l'Homme sont décrits ci-après.

- Absorption

Les nitrates et les nitrites dans le corps proviennent soit de l'exposition orale (alimentation totale) soit de leur formation endogène par la voie de la L-arginine-NO synthase (Lundberg et al., 2008). Lorsqu'ils proviennent de l'alimentation, ceux-ci sont rapidement et presque totalement absorbés (~ 100%) comme cela a été montré lors d'études de cinétique chez des volontaires sains (EFSA, 2017a; EFSA, 2017b).

Distribution

Les nitrates sont distribués dans l'ensemble de l'organisme et se retrouvent également dans le lait maternel. Un volume de distribution équivalent à  $0,32 \text{ L (kg pc)}^{-1}$  avait été estimé par l'EFSA. Les nitrites sont également distribués dans l'ensemble de l'organisme et peuvent se retrouver dans certains tissus à des concentrations supérieures à celle du sang (volume de distribution estimé à 94 L).

- Métabolisme

Après absorption des nitrates, une partie est réabsorbée par les glandes salivaires (cycle entéro-salivaire), 20 à 25% de la dose d'exposition orale est ainsi excrété dans la salive puis converti en nitrites par le microbiote buccal (5-36%). Un taux de conversion global des nitrates

en nitrites a été estimé entre 1 et 9% de la dose orale en nitrates (EFSA, 2017a; EFSA, 2017b). Les nitrites sont très largement convertis en nitrates dans le sang après réaction avec l'hémoglobine formant également de la méthémoglobine (EFSA, 2017a; Zeilmaier et al., 2010). La formation endogène de composés nitrosés est abordée au chapitre 9.2 de ce rapport.

- Excrétion

Les nitrates sont majoritairement excrétés dans les urines (50-100%) et présentent une demi-vie d'élimination de 5 à 13h et semblent être réabsorbés au niveau du tubule rénal (clairance rénale des nitrates inférieure à la clairance glomérulaire, 25-54 mL min<sup>-1</sup> contre 120 mL min<sup>-1</sup>) (EFSA, 2017b). En revanche, les nitrites sont très faiblement excrétés dans les urines (~0,02%). La demi-vie d'élimination des nitrites est de seulement 30 minutes (EFSA, 2017a; EFSA, 2017b).

### **Modèle cinétique humain**

Un modèle multi-compartiments a été développé par le RIVM (Rijksinstituut Voor Volksgezondheid en Milieu- Pays Bas (Zeilmaier et al., 2010; Zeilmaier et al., 1996) décrivant la formation de méthémoglobine après ingestion de nitrates chez l'Homme. Ce modèle se compose de trois compartiments par substance (nitrates et nitrites), le tractus gastro-intestinal (absorption), le compartiment central (plasma sanguin) et la salive. Le modèle intègre l'absorption de nitrates à partir de l'alimentation et/ou de l'eau de boisson, la sécrétion de nitrates dans la salive, la conversion des nitrates en nitrites dans la salive, l'absorption de nitrites et la réaction des nitrites absorbés avec l'hémoglobine, produisant de la méthémoglobine. Le modèle a été calibré sur la base de données de la littérature et d'études *in vivo* dans lesquelles des volontaires humains ont été exposés par voie orale ou intraveineuse à du nitrate ou du nitrite.

Le groupe de travail a modifié le modèle existant en y ajoutant l'ingestion d'une dose externe de nitrites de sorte que l'exposition combinée aux nitrates et nitrites puisse être étudiée. Ainsi, il est possible de calculer la quantité totale de nitrites transitant dans le tractus gastro-intestinal lors des expositions quotidiennes par l'alimentation totale en tenant compte également de la formation endogène de ces substances. L'ensemble des équations mathématiques et les valeurs (distributions) des paramètres, calibrés à partir d'études sur volontaires sains ou issus de la littérature, sont rapportés par les auteurs (Zeilmaier et al., 2010).

## **10.2. Mécanismes de formation endogène de composés nitrosés dans le tractus gastro-intestinal après ingestion de nitrates et de nitrites**

### **10.2.1. Généralités concernant la formation endogène de composés nitrosés après ingestion de nitrates et de nitrites**

Après ingestion, les nitrites peuvent générer des composés nitrosés dans le tractus gastro-intestinal. La formation de ces composés dépend de nombreux facteurs tels que l'acidité stomacale, le microbiote colique et le régime alimentaire (Figure 30) (Kobayashi, 2018).

#### **Formation de composés nitrosés dans l'estomac**

Dans les fluides gastriques acides à pH=2, les nitrites sont majoritairement présents sous forme protonée HNO<sub>2</sub>, qui libère des ions nitrosoniums (NO<sup>+</sup>) via N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Le NO<sup>+</sup>, un agent fortement nitrosant, va :

- S-nitroser les groupements thiols des protéines en S-nitrosothiols;

- O-nitroser les phénols et alcools en composés O-nitrosés. En présence d'éthanol, il y a formation d'éthyle nitrite ;
- N-nitroser les amines en N-nitrosamines et les amides en N- nitrosamides.

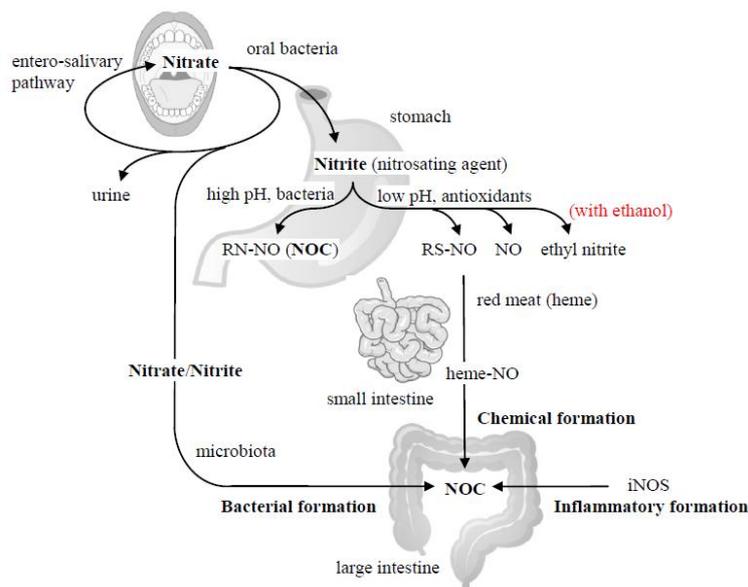


Figure 30. Schéma du métabolisme des nitrates/nitrites alimentaires et de la formation des composés nitrosés dans le tractus gastro-intestinal (d'après Kobayashi, 2018). NO<sub>2</sub> : monoxyde d'azote ou oxyde nitrique, RN-NO (NOC) : N-nitroso-composés, RS-NO : S-nitroso-composés, iNOS : inductible oxyde nitrique synthase

### Formation des composés nitrosés dans le côlon

Pour les forts consommateurs de viande rouge, le transport des agents nitrosants est assuré jusqu'au côlon par l'intermédiaire de l'hème. Dans l'estomac, la S-nitrosation (cystéine-NO) des protéines digérées et des protéines héminiques peut avoir lieu. Ces nitrosothiols sont instables et relarguent du NO° qui facilite la nitrosylation de l'hème (Fe-NO) dans la partie réductrice et anaérobie de l'intestin et du côlon (Figure 30). Le fer nitrosylé agit comme agent nitrosant avec les amines biogènes et conduit à la formation de nitrosamines qui peuvent former des adduits d'alkylation de l'ADN dont le O<sup>6</sup>-carboxyméthylguanine (O<sup>6</sup>-C-MeG) (Figure 31).

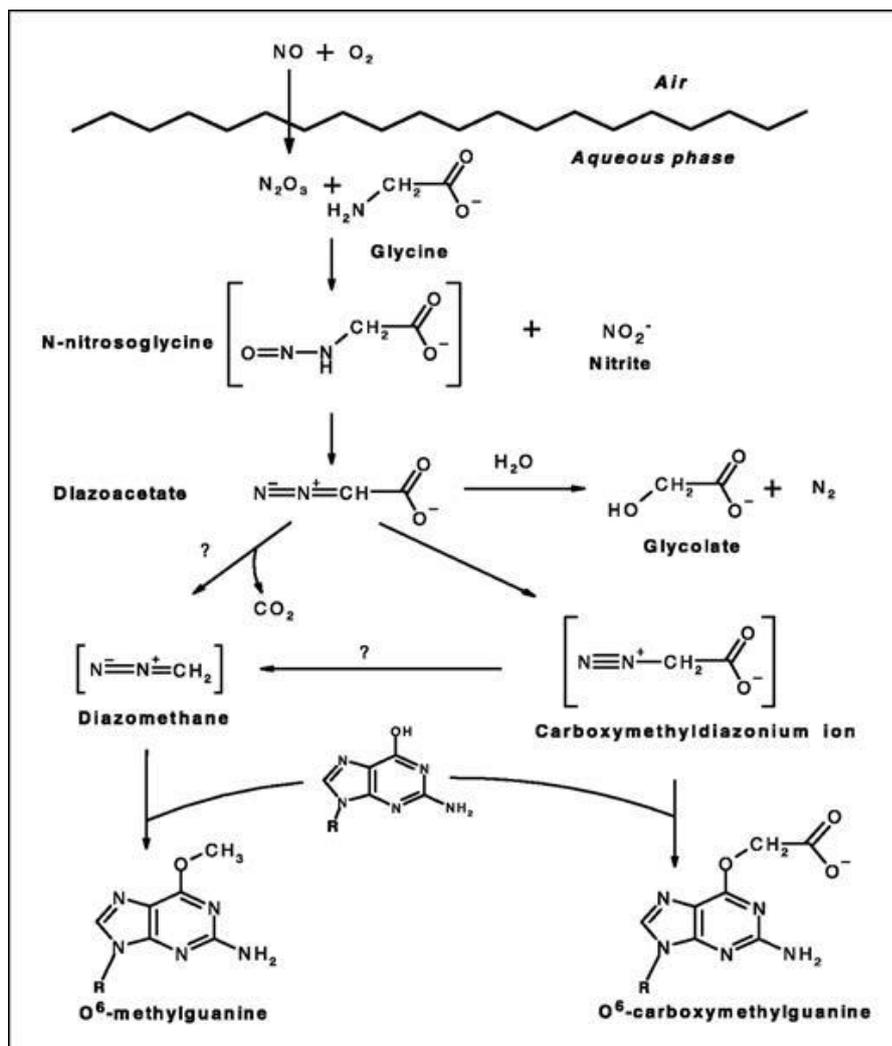


Figure 31 : Formation d'adduits O<sup>6</sup>-carboxyméthyle et O<sup>6</sup>-méthylguanine à partir de la N-nitrosation de la glycine (Lewin et al., 2006)

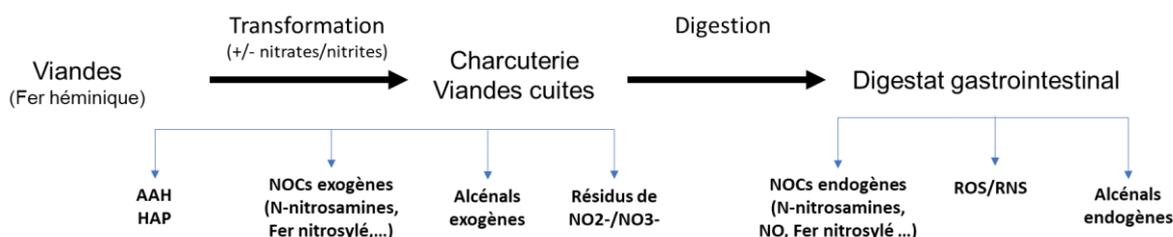
Le microbiote colique contient un très grand nombre de bactéries ( $10^{12}$  UFC g<sup>-1</sup> de matières fécales) et est très diversifié en termes d'espèces bactériennes dont de nombreuses ne sont pas encore identifiées. Il contribue à la formation des composés N-nitrosés, comme démontré par des expériences sur des rats à microbiote conventionnel comparés à des rats dépourvus de microbiote (Kobayashi, 2018). Des expériences *in vitro* ont révélé que la formation de ces composés N-nitrosés par le microbiote est propre à chaque individu. La plupart des espèces microbiennes impliquées sont anaérobies facultatives et utilisent les nitrates ou nitrites pour leur respiration anaérobie en réduisant les nitrates en nitrites, NO, N<sub>2</sub>O et N<sub>2</sub> (Kobayashi, 2018). Ces bactéries, comme les entérobactéries (*Escherichia coli*, *Proteus morgani*) et *Pseudomonas aeruginosa*, possèdent des nitrates et des nitrites réductases. Elles sont minoritaires dans le microbiote colique essentiellement composé de bactéries anaérobies strictes dépourvues de ces réductases mais elles peuvent créer une dysbiose en cas de consommation de régimes riches en nitrates ou nitrites. Le développement de ces bactéries anaérobies facultatives peut être aussi favorisé chez les patients souffrant de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) en raison d'une activité importante de l'enzyme oxyde nitrique synthase submucosale (iNOS) qui conduit à une augmentation de la libération de nitrites néo-formés à partir de NO<sup>o</sup>.

De plus, des souches du microbiote colique appartenant à divers genres bactériens tels que *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*,

*Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella* et *Proteus* sont capables de produire des amines biogènes qui peuvent servir de substrats à la réaction de *N*-nitrosation dans le côlon (Pugin et al., 2017).

### 10.2.2. Formation endogène de composés nitrosés lors de la consommation de produits carnés

La Figure 32 synthétise schématiquement les transformations des nitrates et des nitrites exogènes (d'origine alimentaire) ou endogènes (néo-formés au sein de l'organisme). Elle permet de situer de manière synoptique les divers points abordés dans ce qui suit.



**Figure 32 : Mécanismes de transformation des nitrates, nitrites et composés nitrosés dans les aliments carnés et dans l'organisme**

(AAH : Amines Aromatiques Hétérocycliques, HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques : ces composés ne sont pas considérés dans ce rapport car leur formation est essentiellement liée à la cuisson et à la fumaison des viandes)

La formation endogène des composés nitrosés au cours de la digestion a été étudiée dans des digesteurs artificiels, dans des modèles animaux et chez des volontaires sains.

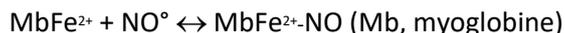
#### 10.2.2.1. Etudes *in vitro* en digesteurs artificiels de la formation endogène de composés nitrosés et du rôle des nitrites dans les réactions d'oxydation des lipides

Deux modèles de digestion ont été utilisés : l'un, statique, consiste à placer l'aliment dans une série de bioréacteurs où l'environnement physico-chimique et enzymatique de chaque compartiment digestif est recréé, ainsi que l'environnement bactérien par l'ajout de microbiote intestinal humain au niveau du compartiment qui mime le côlon (Van Hecke et al., 2014). La principale limite de ce modèle est l'absence de flux. L'autre, dynamique, permet de suivre les cinétiques d'hydrolyse des aliments au cours de la digestion gastro-intestinale. Il mime les parties supérieures du tube digestif, c'est-à-dire l'estomac, le duodénum/jéjunum et l'iléon grâce à trois réacteurs aux conditions physico-chimiques différentes (de La Pomélie et al., 2018a).

- Etudes *in vitro* en digesteur artificiels de la formation endogène de composés nitrosés
  - **Formation du nitrosylhème**

La nitrosylation du fer héminique a été étudiée dans le système digestif dynamique (dispositif DIDGI®) composé de l'estomac, du duodénum/jéjunum et de l'iléon (de La Pomélie et al., 2018a; de La Pomélie et al., 2019). Elle a été étudiée sur des échantillons de viandes de bœuf crues, cuites à 60°C ou 90°C, additionnées ou non de nitrite de sodium 1 mM et d'ascorbate de sodium 1 mM directement dans le système digestif. Ces concentrations miment la prise d'un repas contenant de la viande et des légumes. Une nitrosylation du fer héminique a été

observée lors de la digestion de ces échantillons, elle résulte de la réaction avec le NO° produit à partir des nitrites en milieu acide et favorisée par l'ascorbate.

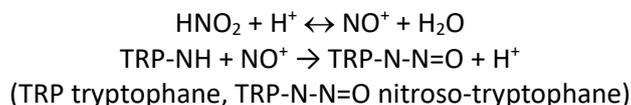


Ces expériences *in vitro* montrent que la nitrosylation commence dans le compartiment gastrique, augmente dans le duodénum/jéjunum et atteint un taux maximal de 76% dans le digestat iléal, après 150 minutes d'incubation de la viande de bœuf crue additionnée de nitrite de sodium. Une nitrosylation d'environ 30% est notée dans le digestat iléal de la viande de bœuf crue ne contenant pas de nitrite de sodium, due à la présence de carbonate d'ammonium présent dans le fluide digestif. Une diminution de la nitrosylation est notée après 210 min d'incubation dans le compartiment iléal et ce, pour tous les échantillons. Cette diminution pourrait être due à la dégradation du nitrosylhème.

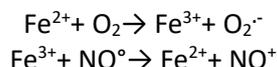
La nitrosylation du fer héminique de la viande cuite, additionnée de nitrite de sodium, suit la même cinétique au cours de la digestion, mais elle est significativement inhibée (moins 26% à 60°C et moins 38% à 90°C) par rapport à la digestion de la viande crue (de La Pomélie et al., 2019).

#### ○ **Formation de nitrosamines**

La formation de nitrosamines a été étudiée dans un modèle gastro-intestinal en incubant du tryptophane (2 mM) à différents pH allant de 2 à 6,5 et diverses concentrations de nitrite de sodium (0,1 à 20 mM) (de La Pomélie et al. 2017). La nitrosation du tryptophane augmente avec la concentration de nitrite ( $p < 0,001$ ) et l'acidité du milieu ( $p < 0,001$ ). Ainsi, la concentration maximale de *N*-nitroso-tryptophane (1,3 mM) est mesurée à pH 2, en présence de 20 mM de nitrites et après 10 min d'incubation. Cette nitrosation en milieu acide résulte d'un mécanisme appelé « proton assisté » :



Le rôle du fer, ajouté sous forme de FeSO<sub>4</sub> à différentes concentrations (0; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2 mM), couplé à celui du pH (2; 3,5; 5; 6,5) pour une concentration de 0,5 mM de nitrite de sodium sur la formation du nitroso-tryptophane a été étudié. La nitrosation augmente significativement avec la concentration de fer ( $p < 0,001$ ) et l'augmentation du pH. Le fer intervient dans plusieurs réactions conduisant à la formation de l'ion NO<sup>+</sup> selon un mécanisme appelé « métal assisté » :



Ces résultats révèlent que la nitrosation se déroule dans l'estomac à pH = 2 selon le mécanisme « proton assisté » et dans l'intestin selon le mécanisme « métal assisté » dans le cas d'un régime riche en fer. L'effet de l'acide ascorbique et du β-carotène sur la nitrosation est dépendant de la concentration en fer.

Cette même équipe a étudié la formation de composés *N*-nitrosés lors de la digestion d'échantillons de viande de bœuf crus, cuits à 60°C ou 90°C, additionnés ou non de nitrite de sodium 1 mM et d'ascorbate de sodium 1 mM directement dans le système digestif dynamique (de La Pomélie et al., 2018b). Ces composés *N*-nitrosés correspondent à la *N*-nitrosation de petites protéines, de peptides et d'acides aminés libres. Ils sont mesurés dans tous les échantillons, en présence ou non de nitrites, cela étant dû à la production de nitrite à partir du carbonate d'ammonium ajouté dans le compartiment gastrique lors de l'expérimentation. Les

quantités de ces composés augmentent au cours de la digestion, de l'estomac jusqu'à l'iléon. L'ajout de nitrites augmente la *N*-nitrosation ( $p=0,005$ ) d'environ 30% par rapport à la viande sans nitrites. La formation de ces composés *N*-nitrosés est maximale (0,3 mM) en fin de digestion de la viande crue additionnée de nitrites (dans l'iléon). La formation de ces composés est plus faible (diminution de 25%) lors de la digestion de viandes cuites à 60°C ou 90°C.

- **Formation de nitrosothiols**

Les nitrosothiols sont rapidement formés à partir de nitrites et de groupes thiol libres à pH acide dans l'estomac (Bechaux et al., 2018). La réaction de *S*-nitrosation est favorisée lors de la digestion car la protéolyse permet la libération de groupes thiols. Il y a alors compétition entre l'oxydation et la réaction de *S*-nitrosation :



La formation de nitrosothiols a été étudiée *in vitro* dans des conditions simulant la digestion gastrique (pH = 2,2) d'aliments contenant 200 mg kg<sup>-1</sup> de nitrites mimant un régime riche en viande rouge, ou d'aliments correspondant à un régime végétarien, ou uniquement en présence d'hémoglobine (Kuhnle, et al. 2007, Kuhnle and Bingham, 2007). Les nitrosothiols étaient les principaux composés nitrosés formés en concentration significativement supérieure ( $p<0,001$ ) dans le cas d'un régime carné ( $91,1 \pm 4,7$  nmoles g<sup>-1</sup> aliment) par rapport à un régime végétarien ( $16,9 \pm 1,3$  nmoles g<sup>-1</sup> aliment). Une proportion de  $0,67 \pm 0,01$  mole de nitrosothiols par mole d'hémoglobine était formée au cours de la digestion gastrique de l'hémoglobine. Les nitrosothiols sont connus pour être instables quand le pH augmente (comme dans l'intestin) et peuvent se décomposer en disulfures et NO qui pourra agir comme agent nitrosant pendant la digestion (Kuhnle and Bingham, 2007).

- **Formation de O<sup>6</sup>-carboxyméthylguanine**

Le NO°, comme mentionné ci-dessus, peut conduire à la formation de composés nitrosés susceptibles de former des adduits d'alkylation de l'ADN dont le O<sup>6</sup>-carboxyméthylguanine (O<sup>6</sup>-C-MeG). La formation de cet adduit intervient après incubation du digestat colique de divers échantillons de viande traitée ou non aux nitrites avec de l'ADN de cellules CaCo2 (Van Hecke et al. 2014a, J Agric food, *Vanden Bussche et al. 2014*, *Van Hecke et al. 2014b*, *plos one*, Van Hecke et al. 2015). Il ressort de ces études que la formation du O<sup>6</sup>-C-MeG est dépendante du microbiote fécal des donneurs individuels. Cette formation est plus importante lors de la consommation de viande rouge (bœuf) que de viande blanche (poulet) indépendamment du traitement ou non aux nitrites.

#### **10.2.2.1.1. Etudes *in vitro* en digesteurs artificiels du rôle des nitrites dans les réactions d'oxydation des lipides**

Au cours de la digestion des viandes, l'hydrolyse enzymatique des lipides et des protéines du bol alimentaire permet la libération d'acides gras et d'acides aminés. Cette meilleure accessibilité des substrats favorise les phénomènes oxydatifs endogènes. De plus, l'hydrolyse de la myoglobine favorise le relargage du fer sous forme de fer Fe<sup>2+</sup> et Fe<sup>3+</sup> qui auront un rôle oxydant ou réducteur en fonction des conditions digestives (Bechaux et al., 2018). La production de radicaux libres est favorisée dans les conditions acides et aérobies de l'estomac, contrairement à l'environnement neutre et anaérobie de l'intestin (Bechaux et al., 2018). Les radicaux libres vont attaquer les acides gras insaturés et, par l'oxydation qu'ils favorisent, vont

mener à la formation de produits secondaires comme des aldéhydes dont le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxy-2-nonéanal (4-HNE, Figure 33), qui sont des composés réactifs et mutagènes. Les acides aminés sont aussi la cible des radicaux libres. Par exemple, les cystéines peuvent se transformer en radicaux thiyl ( $RS^\bullet$ ) qui peuvent propager la réaction d'oxydation des acides gras ou d'autres acides aminés. Les acides aminés basiques, quant à eux, sont dégradés en composés carbonylés (de la Pomélie et al. 2018). Les composés carbonylés peuvent réagir avec des groupes  $NH_2$  libres d'acides aminés et conduire à la formation d'agrégats protéiques difficilement digestibles (de la Pomélie et al. 2018).

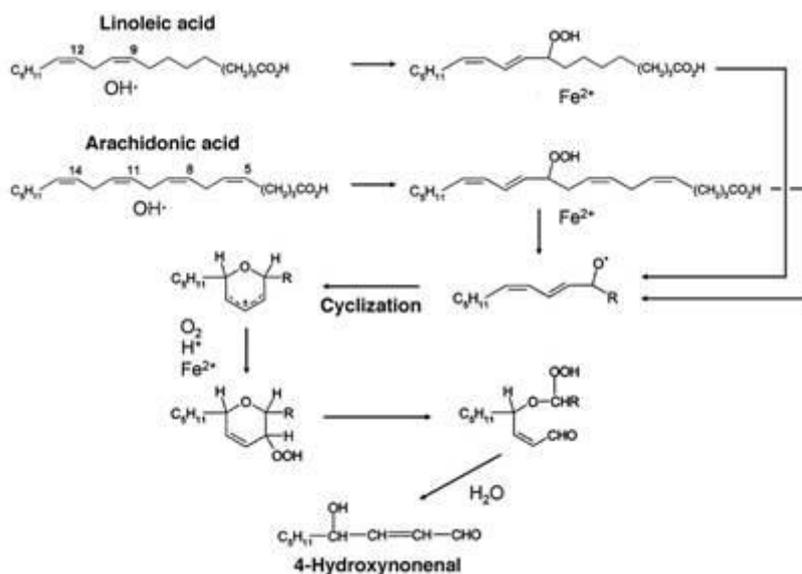


Figure 33 : Mécanisme de formation de l'HNE par la peroxydation de l'acide arachidonique (Gentile et al., 2017)

Les nitrites dans les conditions acides de l'estomac sont transformés en acide nitreux ( $HNO_2$ ) puis en oxyde nitrique ( $NO^\bullet$ ). Le  $NO^\bullet$  peut réagir avec les radicaux lipidiques ( $LOO^\bullet$ ) pour former un composé stable  $L(O)NO$  qui arrête la réaction radicalaire. Il peut aussi interagir avec le radical superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) pour former du peroxydinitrite ( $ONOO^-$ ) qui est un oxydant puissant. Ces deux réactions expliquent la complexité d'action des nitrites selon les conditions (Bechaux et al., 2018).

Trois études se sont focalisées sur les produits d'oxydation des lipides (MDA, 4-HNE, et autres aldéhydes) et des protéines (composés carbonylés totaux) formés au cours de la digestion de divers échantillons de viande traités ou non aux nitrites dans un système digestif statique composé de 4 compartiments (bouche, estomac, duodénum, côlon) (Van Hecke et al., 2014; Van Hecke et al., 2015; Vanden Bussche et al., 2012). Les échantillons ont été analysés aux étapes de digestion duodénal et colique.

De ces études il ressort que lors de la digestion des échantillons de viande non traités aux nitrites :

- L'oxydation des lipides et des protéines augmente et elle est plus importante pour les échantillons riches en fer. Les concentrations en MDA et HNE sont positivement corrélées à la quantité de fer héminique.
- La cuisson et la surcuisson conduit à une augmentation significative des produits issus de l'oxydation des lipides et des protéines.

- Les nitrites inhibent l'oxydation des protéines et des lipides et donc la formation de malondialdéhyde (MDA) et de 4-hydroxy-2-nonéanal (4-HNE) au cours de la digestion de viandes traitées aux nitrites. Cette inhibition est limitée en cas de surcuisson des viandes.

#### 10.2.2.2. Etudes *in vivo* en modèle animal de la formation endogène de composés nitrosés

Différents modèles animaux ont été utilisés pour étudier la formation endogène de composés nitrosés notamment chez des rongeurs (rat et souris) conventionnels ou dans des modèles de cancérogenèse colorectale (rat chimio-induit et souris mutée pour le gène Apc).

##### 10.2.2.2.1. Etudes en modèle animal de la formation endogène de composés nitrosés suite à la consommation d'un régime alimentaire standard

L'étude de Mirvish et al. (2003) décrit la formation de composés nitrosés le long du tractus digestif chez le rat (Sprague–Dawley) lors de la consommation d'un régime standard pour animaux de laboratoire, sans ajout de nitrates ou de nitrites supplémentaires. Les niveaux de composés *N*-nitrosés (NOC, nitrosamines et nitrosamides) et des précurseurs des NOCs (NOCP, amines secondaires et *N*-alkylamides) ont été mesurés. Ainsi, les concentrations en NOCs sont plus faibles dans l'estomac que dans l'alimentation puis augmentent régulièrement au cours du tractus digestif, avec une augmentation importante au niveau colique et fécal. Les auteurs suggèrent qu'au moins une partie des NOCs fécaux proviennent des NOCs alimentaires qui ne sont pas absorbés ou dégradés dans le tractus digestif. Les NOCPs, quant à eux, sont similaires dans l'aliment et l'estomac puis augmentent d'un facteur 16 de l'estomac à l'intestin grêle proximal ( $6,2 \mu\text{mol g}^{-1}$  en moyenne) et d'un facteur 1,7 entre le colon distal et les fèces ( $11,6 \mu\text{mol g}^{-1}$  en moyenne). L'augmentation importante des niveaux de NOCPs dans la partie proximale de l'intestin grêle (duodénum) suggère que les NOCPs sont sécrétés ou produits dans cette partie du tractus digestif et sont absorbés ou dégradés dans sa partie distale.

##### 10.2.2.2.2. Etudes en modèle animal de la formation endogène de composés nitrosés suite à la consommation de viande blanche ou rouge non additionnée de nitrites

La consommation de **bœuf**, **poulet** et **porc** par des rats (Fischer 344) induit une formation plus faible de composés nitrosés que le régime contrôle sans viande ( $0,3$ ,  $0,9$  et  $0,5 \text{ nmol g}^{-1}$  de fèces respectivement vs  $1,4 \text{ nmol g}^{-1}$  de fèces pour le contrôle) (Parnaud et al., 2000). L'ajout de lipides apportés par de la graisse de porc (14%, 28%) ne modifie pas le taux de composés nitrosés fécaux (Parnaud et al., 2000). Cependant, dans une autre étude, la consommation de **bœuf** a induit une augmentation d'un facteur moyen de 2,5 la formation de composés nitrosés comparé à un régime contrôle sans viande (Mirvish et al., 2003).

### 10.2.2.2.3. Etudes en modèle animal de la formation endogène de composés nitrosés suite à la consommation de produits carnés nitrés

La consommation de **bacon** a pour effet d'augmenter d'un facteur 10 la formation de composés nitrosés fécaux (14 vs 1,4 nmol g<sup>-1</sup> de fèces pour le régime sans viande). L'ajout de lipides (gras de porc) augmente la concentration de ces composés de facteurs 20 et 12 respectivement comparés aux contrôles (9,2 vs 0,5 nmol g<sup>-1</sup> de fèces pour le régime à 14% de lipides et 13,7 vs 1,1 nmol g<sup>-1</sup> de fèces pour le régime à 28% de lipides) (Parnaud et al., 2000).

La consommation de **saucisse type hot dog** contenant entre 0,4 et 0,8 nmol g<sup>-1</sup> de composés nitrosés conduit à la formation de 4,5 fois plus de composés nitrosés, comparée à un régime contrôle. Ainsi, l'excrétion fécale de composés nitrosés représente entre 33 et 41% des quantités de composés nitrosés présents dans les régimes carnés consommés. Les concentrations de précurseurs des composés nitrosés (NOCPs) formés sont environ 1000 fois supérieures (1100-2000 nmol par jour) aux composés nitrosés (NOCs) sans différence entre les régimes carnés ou le régime contrôle (Mirvish et al., 2003).

Dans une autre étude, la consommation de **saucisse type hot dog** (180 g kg<sup>-1</sup> de régime) et d'eau de boisson contenant 1 g L<sup>-1</sup> de NaNO<sub>2</sub> par des souris (Swiss) augmente d'un facteur 3 les composés nitrosés comparé à un régime sans nitrites dans l'eau (59 vs 21 nmol g<sup>-1</sup> fèces respectivement). En revanche, la consommation de hot dog et d'ascorbate de sodium (23 g kg<sup>-1</sup> de régime) diminue les composés nitrosés à un taux de 12 nmol g<sup>-1</sup> fèces. Cette étude a également permis de mettre en évidence que 13 à 18% des composés nitrosés présents au niveau fécal et dans les saucisses de hot-dog sont des nitrosothiols (Mirvish et al., 2008).

La consommation de **saucisse type hot dog** et de **saucissons** par des rats (Fischer 344) augmente d'un facteur 3 les composés nitrosés fécaux comparés à un régime contrôle (10, 34 et 33 nmol de NNO g<sup>-1</sup> pour le régime contrôle, les hot-dogs et les saucissons, respectivement) (Santarelli et al., 2013).

La consommation d'un **jambon modèle** (riche en hème, cuit, nitrité et oxydé) par des rats (Fischer 344) augmente significativement les teneurs en composés nitrosés fécaux d'un facteur 9 par rapport à un régime contrôle (424 vs 47 µmol L<sup>-1</sup> de NNO). La consommation de jambons similaires mais non oxydés ou fabriqués sans nitrite n'augmente pas les composés nitrosés par rapport au régime contrôle (Santarelli et al., 2010).

La consommation de **saucisses de porc nitritées** par des rats (Sprague-Dawley) augmente les niveaux fécaux des composés nitrosés (2,1 µmol L<sup>-1</sup>), de FeNO (1,3 µmol L<sup>-1</sup>, 62% des composés nitrosés) et de RSNO (0,6 µmol L<sup>-1</sup>, 29% des composés nitrosés). L'ajout d'inuline aux saucisses, afin d'enrichir le produit en fibres, permet de diminuer significativement les concentrations fécales des composés nitrosés et de FeNO (Thøgersen et al., 2020).

### 10.2.2.2.4. Etudes en modèle animal de l'excrétion fécale de composés nitrosés suite à l'ingestion de composés nitrosés partiellement purifiés

La consommation de **composés nitrosés** extraits à partir de hot-dogs (85 nmol g<sup>-1</sup> régime, deux extraits contenant 6 et 14% de nitrosothiols et 1 et 3% de fer héminique nitrosylé) par des souris (A/J) augmente d'un facteur 45 les teneurs en composés nitrosés fécaux comparativement aux contrôles (32 vs 0,7 nmol composés nitrosés g<sup>-1</sup> respectivement) (Davis et al., 2012).

La consommation d'**hémine** à différentes concentrations (64, 125, 250, 500, 1000 mg kg<sup>-1</sup> de régime) et d'eau de boisson contenant 2 g L<sup>-1</sup> de NaNO<sub>2</sub> par des souris (Swiss) augmente de 2,3, 2,2 et 4,6 fois, respectivement pour 64, 125 et 250 mg d'hémine les composés nitrosés comparés à un régime sans nitrites dans l'eau de boisson (Mirvish et al., 2008).

La consommation d'un régime de base, ou avec **hème** (1% dans le régime) ou avec **amines hétérocycliques** (AHC, 75 µg kg<sup>-1</sup> dans le régime) avec de l'eau de boisson additionnée de nitrate + nitrite (0,4 g L<sup>-1</sup>) par des souris (Min) augmente la teneur fécale des composés nitrosés, à savoir : ≈250 µmol L<sup>-1</sup> (vs non détectable avec l'eau) pour le régime de base ; ≈110 µmol L<sup>-1</sup> pour le régime hème (vs 35 µmol L<sup>-1</sup>), ≈150 µmol L<sup>-1</sup> pour le régime amines (vs 25 µmol L<sup>-1</sup>). Les composés nitrosés contenaient 30% de RSNO et pas de FeNO dans les régimes de base et AHC et 80% de FeNO et pas de RSNO dans le régime avec hème. La consommation, indépendamment de l'eau de boisson, des régimes de base et d'AHC engendre un taux d'oxydation des lipides de l'ordre de ≈ 60 µmol L<sup>-1</sup> (MDA) alors que le régime avec hème engendrait un taux d'oxydation bien supérieur ≈110 µmol L<sup>-1</sup> (MDA) avec la présence de 4-HNE (Bastide et al., 2015).

#### 10.2.2.2.5. Etudes en modèle animal de l'impact de l'ingestion de produits carnés sur l'oxydation des lipides.

Les études sur les modèles animaux ont permis de mettre en évidence que l'oxydation des lipides du bol alimentaire semble être la voie principale expliquant la toxicité des viandes rouges fraîches tandis que la formation de composés nitrosés semble être la plus importante pour les produits carnés nitrités (Pierre et al., 2013; Santarelli et al., 2013; Santarelli et al., 2010). Dans ce qui suit, compte tenu de l'abondance pléthorique d'articles relatifs à l'oxydation des lipides après consommation de viande ou de charcuterie et par souci de clarté, seules les études traitant plus spécifiquement des produits nitrosés ont été considérées.

Une étude de 14 jours a montré que les eaux fécales de rats ayant consommé des produits carnés transformés contiennent 2 à 5 fois plus de produits d'oxydation des lipides que celles des rats ayant consommé un régime contrôle sans viande. L'ajout de nitrites permet de diminuer les taux de TBARs fécaux (*Thiobarbituric Acid Reactive Species*), indicateurs d'oxydation lipidique. L'excrétion urinaire de DHN-MA (Acide mercapturique 1,4-dihydroxynonane, principal métabolite du 4-Hydroxy-nonanal) est 12 à 37 fois plus importante chez les rats ayant consommé des produits carnés transformés qu'un régime contrôle sans viande. Dans une étude de 100 jours sur rats chimio-induits, les régimes à base de viande transformée ont augmenté les marqueurs de lipoperoxydation (TBARs et DHN-MA) avec un effet plus important pour la viande ne contenant pas de nitrites (Santarelli et al., 2010).

Une autre étude de 14 jours a confirmé que les eaux fécales de rats nourris avec des produits carnés transformés contiennent 2 à 5 fois plus de produits d'oxydation des lipides comparés à un régime contrôle sans viande, le niveau le plus important de TBARs étant retrouvé dans les fèces des rats ayant consommé du jambon sec et du saucisson. Dans une étude de 100 jours, sur rats chimio-induits, la consommation de saucisson augmente significativement les valeurs de DHN-MA urinaire et de TBARs fécaux mais la consommation de saucisses de hot dog augmente seulement les valeurs de DHN-MA urinaire. L'addition de carbonate de calcium au régime à base de saucisse de hot dog diminue fortement la formation de TBARs fécaux (Santarelli et al., 2013).

Enfin, une étude a également permis de mettre en évidence que la présence d'hémoglobine dans le régime alimentaire de rats augmente les TBARs fécaux et le DHN-MA urinaire. L'augmentation de ces deux biomarqueurs de lipoperoxydation dépend uniquement des niveaux d'hème présents dans l'aliment et retrouvés au niveau fécal mais n'est pas associée à la présence de nitrates/nitrites ou d'amines hétérocycliques en absence d'hémoglobine (Bastide et al., 2015).

### 10.2.2.3. Etudes sur volontaires sains de la formation endogène de composés nitrosés suite à l'ingestion de nitrates et de nitrites

La formation des composés nitrosés endogènes formés au cours de la digestion, notamment dans le cadre de la consommation de viande et de produits carnés traités avec des sels nitrés, a été également étudiée chez des volontaires sains. La plupart des études ont été réalisées en cross-over, c'est-à-dire que chaque volontaire est son propre témoin et va, tour à tour, consommer les différents régimes alimentaires.

#### 10.2.2.3.1. Etudes sur volontaires sains de la formation endogène de composés nitrosés suite à la consommation de viande rouge

Plusieurs études (Bingham et al., 2002; Bingham et al., 1996; Cross et al., 2006; Hughes et al., 2001) ont été réalisées afin d'évaluer l'effet de la consommation de viande rouge fraîche sur la teneur en composés nitrosés fécaux chez des volontaires sains. En combinant les résultats de ces différentes études, les auteurs ont mis en évidence, sur plus de 50 individus, que les **composés nitrosés totaux apparents (ATNC)** fécaux sont corrélés aux doses de viande rouge ingérées ( $r=0,963$ ). Les auteurs suggèrent que les composés nitrosés retrouvés sont majoritairement formés de manière endogène. Ils notent également une forte variabilité entre les individus quant aux taux d'ATNC excrétés et suggèrent que ces variations pourraient être expliquées soit par une variation de la nature du microbiote intestinal chez des volontaires possédant des niveaux importants de bactéries produisant du NO, soit par des variations d'absorption du fer et/ou des protéines qui pourraient modifier les quantités de précurseurs disponibles pour former les composés nitrosés. Par ailleurs, les résultats indiquent que la consommation d'un régime à base de viande rouge augmente également les nitrites retrouvés au niveau fécal par comparaison à un régime à base de viande blanche. Cependant, la consommation de viande blanche ou de poisson n'augmentait pas les niveaux fécaux en composés nitrosés, en nitrates, en nitrites et en fer.

Kuhnle et al. (2007) ont caractérisé les ATNC produits après consommation d'un régime à base de viande rouge, notamment les teneurs iléales et fécales en fer nitrosylé, nitrosothiols et hème. La consommation d'un régime riche en viande rouge augmente significativement les teneurs en hème (667 vs 28 pmol mg<sup>-1</sup> au niveau iléal et 1028 vs 63 pmol mg<sup>-1</sup> au niveau fécal), en fer nitrosylé (65 vs 1,6 pmol mg<sup>-1</sup> au niveau iléal et 92 vs 0,2 pmol mg<sup>-1</sup> au niveau fécal) et en nitrosothiols (11 vs 0,33 pmol mg<sup>-1</sup> au niveau iléal et 55 vs 0,2 pmol mg<sup>-1</sup> au niveau fécal) par rapport au régime sans viande. Ainsi, significativement plus de fer nitrosylé que de nitrosothiols est retrouvé aux niveaux iléal et fécal. La corrélation entre les niveaux fécaux de fer nitrosylé et d'hème (Spearman's  $\rho$  0,647;  $p < 0,05$ ) suggère que l'hème est la source principale de fer. Il a également été mis en évidence une forte corrélation positive entre les concentrations fécales en nitrites et les concentrations totales de composés nitrosés (Pearson's correlation coefficient 0,809;  $p < 0,01$ ). Les auteurs suggèrent que la composition

en composés nitrosés ne change pas durant le passage de l'intestin grêle au côlon car les ratios entre RSNO et FeNO sont similaires au niveau iléal (0,22) et fécal (0,4).

Joosen et al. (2009) ont étudié l'effet de la consommation d'un régime à base de viande rouge (6 hommes et 6 femmes) comparé à un régime végétarien. Les régimes étaient composés de 420 g j<sup>-1</sup> de viande pour les hommes et 366 g j<sup>-1</sup> pour les femmes. Comparé à un régime végétarien, la consommation d'un régime à base de viande rouge augmente significativement les quantités excrétées quotidiennement au niveau fécal d'hème (0,13 vs 0,02 mmol j<sup>-1</sup>), de composés nitrosés totaux (22 vs 1 mmol j<sup>-1</sup>), de RSNO (2,3 vs 0,1 mmol j<sup>-1</sup>), de FeNO (17,1 vs 0,5 mmol j<sup>-1</sup>) et des autres composés nitrosés (2,2 vs 0,3 mmol j<sup>-1</sup>).

Joosen et al. (2010) ont comparé les effets d'un régime à base de viande rouge, d'un régime à base de viande rouge et de poisson et d'un régime à base de poisson uniquement, pendant 8 jours sur 14 volontaires. Les taux fécaux retrouvés étaient de 66 µmol j<sup>-1</sup> d'hème, 9 µmol j<sup>-1</sup> de composés nitrosés totaux, 0,6 µmol j<sup>-1</sup> de RSNO, 7,6 µmol j<sup>-1</sup> de FeNO et 0,5 µmol j<sup>-1</sup> d'autres composés nitrosés pour le régime à base de viande rouge. Les taux d'hème et de composés nitrosés étaient significativement inférieurs dans le régime poisson par rapport au régime viande rouge et le FeNO était le principal contributeur des composés nitrosés totaux.

#### **10.2.3.2. Etudes sur volontaires sains de la formation endogène de composés nitrosés suite à la consommation de produits carnés nitrés**

Lunn et al. (2007) ont investigué l'effet d'un régime sans viande, à base de viande rouge (240 g j<sup>-1</sup>) ou de charcuterie (240 g j<sup>-1</sup>), sur 27 sujets pendant 2 jours, sur la formation d'ATNC au niveau iléal. Les concentrations en ATNC dans les régimes étaient de 9 µg kg<sup>-1</sup> pour le régime sans viande, 22 µg kg<sup>-1</sup> pour le régime viande rouge et 37 µg kg<sup>-1</sup> pour le régime charcuterie. La consommation d'un régime à base de viande rouge ou à base de charcuterie augmente de manière significative les ATNC au niveau iléal comparé à un régime sans viande (1175 et 1832 vs 283 µg kg<sup>-1</sup> respectivement). La supplémentation en acide ascorbique (1g) ou en α-tocophérol (400 IU) n'a pas d'effet sur les teneurs en ATNC. Les auteurs précisent que les valeurs d'ATNC au niveau iléal sont similaires à celles publiées précédemment au niveau fécal et concluent que l'hème peut favoriser la formation de composés nitrosés en l'absence du microbiote présent au niveau du colon.

Joosen et al. (2009) ont étudié l'effet de la consommation d'un régime à base de charcuterie (5 hommes et 11 femmes) comparé à un régime végétarien. Les régimes étaient composés de 420 g j<sup>-1</sup> de charcuterie pour les hommes et 366 g j<sup>-1</sup> pour les femmes. Comparé à un régime végétarien, la consommation d'un régime à base de charcuterie augmente significativement les quantités excrétées quotidiennement au niveau fécal d'hème (0,05 vs 0,01 mmol j<sup>-1</sup>), de composés nitrosés totaux (29 vs 0,6 mmol j<sup>-1</sup>), de RSNO (5 vs 0,05 mmol j<sup>-1</sup>), de FeNO (15 vs 0,4 mmol j<sup>-1</sup>) et les autres composés nitrosés (8 vs 0,1 mmol j<sup>-1</sup>). Les auteurs concluent que les charcuteries ont le même effet que les viandes rouges sur la nitrosation endogène.

Pierre et al. (2013) ont également montré que la consommation d'une charcuterie modèle entraîne une augmentation significative des ATNC dans les eaux fécales comparativement à un régime sans viande. L'ajout de CaCO<sub>3</sub> dans la charcuterie inhibe l'augmentation des ATNC fécaux ; cependant l'ajout d'α-tocophérol n'a pas cet effet.

van Breda et al. (2019) ont analysé les effets des nitrates dans l'eau de boisson et leurs interactions avec la consommation de viande sur la formation de composés nitrosés chez 20 volontaires. Les volontaires ont été répartis en deux groupes (charcuterie ou viande blanche)

et ont consommé 3,75 g kg<sup>-1</sup> poids corporel de viande par jour (maximum 300 g par jour) pendant 2 semaines. Durant la première semaine, le taux de nitrates dans l'eau de boisson a été maintenu à une valeur faible (< 1,5 mg L<sup>-1</sup>) puis a été augmenté à 3,7 mg kg<sup>-1</sup> de poids corporel (équivalent à la DJA) pendant la deuxième semaine. L'excrétion urinaire des nitrates a augmenté significativement pendant la deuxième semaine comparée à la première semaine pour le régime viande blanche (1071 vs 375 μmol j<sup>-1</sup>) et le régime à base de charcuteries (1542 vs 634 μmol j<sup>-1</sup>). Les niveaux d'ATNC fécaux ont augmenté significativement durant la deuxième semaine et étaient plus importants pour le groupe ayant consommé le régime à base de charcuterie (44 vs 18 μmol j<sup>-1</sup>) comparé au groupe ayant consommé la viande blanche (30 vs 15 μmol j<sup>-1</sup>). Les auteurs concluent que la consommation de nitrates via l'eau de boisson contribue à la formation endogène de composés nitrosés, indépendamment du type de viandes consommées. Ils suggèrent que les niveaux de nitrates dans les eaux de boisson devraient être pris en compte lors de l'évaluation de l'effet de la consommation de viande sur la formation endogène de composés nitrosés.

Dans un projet nommé PHYTOME, van Breda et al. (2021) ont étudié l'impact du remplacement des nitrites présents dans la charcuterie par l'ajout de composés bioactifs de plantes (composés antioxydants). Pour cela, 63 volontaires ont reçu, pendant 2 semaines, 300 g de charcuterie nitritée classique, ou de viande blanche, ou de charcuterie + composés bioactifs, ou de charcuterie à taux réduit de nitrites + composés bioactifs. Ainsi les auteurs ont étudié l'ajout d'extrait de polygonum, de rutine/sophora, de thé vert, d'origanox, de raisin blanc, de romarin et d'acélora dans du jambon cuit, du jambon cru, des saucisses cuites, des saucisses sèches, du jambon sec et des saucisses sèches de type « Southern ». Lorsque le taux de nitrates dans l'eau de boisson était bas, les taux d'ATNC au niveau fécal étaient de 11,5 μmol L<sup>-1</sup> au niveau basal, 12,3 μmol L<sup>-1</sup> après consommation de viande blanche, 16,1 μmol L<sup>-1</sup> après consommation de charcuterie, 10,8 μmol L<sup>-1</sup> après consommation de charcuterie + composés bioactifs et 7,4 μmol L<sup>-1</sup> après consommation de charcuterie diminuée en nitrites + composés bioactifs. Lorsque le taux de nitrates dans l'eau de boisson était élevé, les taux d'ATNC au niveau fécal étaient non détectés au niveau basal, 17,6 μmol L<sup>-1</sup> après consommation de viande blanche, 21,0 μmol L<sup>-1</sup> après consommation de charcuterie, 17,8 μmol L<sup>-1</sup> après consommation de charcuterie + composés bioactifs et 10,3 μmol L<sup>-1</sup> après consommation de charcuterie diminuée en nitrites + composés bioactifs. Ainsi, la consommation de charcuterie diminuée en nitrites et additionnée de composés biologiques actifs entraîne une diminution significative de l'excrétion fécale des composés nitrosés comparée à la charcuterie nitritée classique.

Les auteurs ont également démontré qu'un taux élevé de nitrates dans l'eau de boisson en combinaison avec la consommation de charcuterie stimule la formation de composés nitrosés et que cet effet peut être atténué par le remplacement du E250 (nitrite de sodium) par des composés antioxydants.

Holtrop et al. (2012) ont investigué les éléments du régime alimentaire sur la formation de composés nitrosés chez des hommes obèses. La consommation totale de viande, de viande rouge, de viande blanche, de charcuterie, de fer de la viande et la présence de nitrates sont significativement et positivement corrélés à la présence de composés nitrosés dans les eaux fécales des patients. Les auteurs présentent dans cet article un modèle de régression permettant de prédire la formation de composés nitrosés selon les habitudes alimentaires. Ce modèle pourrait être utilisé afin d'estimer la formation endogène des composés nitrosés notamment dans les études épidémiologiques sur le lien entre nutrition et cancer.

**Conclusion concernant la formation endogène de composés nitrosés suite à l'ingestion de nitrates et de nitrites**

Les nitrites sont instables et, en excès, ils peuvent générer la formation de composés nitrosés dans le tractus gastro-intestinal tels que :

- Les S-nitrosothiols (RSNO) formés principalement dans l'estomac où ils agissent comme donneurs de NO ;
- Les composés N-nitrosés, notamment les nitrosamines, qui peuvent être formées tout au long du tractus digestif soit à pH acide dans l'estomac, soit à pH neutre et en présence de fer dans l'intestin. Les composés N-nitrosés peuvent conduire à la formation d'adduits de l'ADN ;
- Le fer héminique nitrosylé ou nitrosylhème (FeNO) formé dans l'intestin et principalement dans le côlon.

La consommation de viande rouge, très riche en fer héminique, est directement et de manière dose-dépendante associée à la formation de composés nitrosés coliques et à la formation d'adduits à l'ADN spécifiques à ces composés.

La consommation de charcuterie augmente la formation de composés nitrosés, excrété au niveau fécal, par rapport à la consommation de viande rouge.

La consommation de charcuterie diminuée en nitrites et additionnée de composés antioxydants permet une diminution significative de l'excrétion fécale des composés nitrosés comparé à la charcuterie classique.

La consommation de nitrates via l'eau de boisson contribue à la formation endogène de composés nitrosés et pourrait être plus importante lors de la consommation de produits carnés nitrités. Cet effet pourrait être atténué par la diminution des teneurs en nitrites dans les produits ou le remplacement du E250 (nitrite de sodium) par des composés antioxydants.

Les nitrites inhibent l'oxydation des lipides et donc la formation de malondialdéhyde (MDA) et de 4-hydroxy-2-nonénal (4-HNE) au cours de la digestion de produits carnés nitrités. Cette inhibition est limitée en cas de surcuisson des viandes.

La formation de O<sup>6</sup>-carboxyméthylguanine (O<sup>6</sup>-C-MeG) dans le côlon n'est pas liée à la présence de nitrites mais au microbiote fécal.

**10.3. Toxicité aiguë des nitrates, des nitrites et des nitrosamines**

Les effets de toxicité aiguë des nitrates et des nitrites comprennent la relaxation des muscles lisses, la vasodilatation et l'abaissement de la pression sanguine ainsi que l'augmentation de la méthémoglobinémie. L'EFSA (EFSA, 2017a; EFSA, 2017b) indique des valeurs de référence aiguës par voie orale se situant entre 2 480 et 6 250 mg de nitrate de sodium par kg de poids corporel chez les souris et entre 4 860 et 9 000 mg de nitrate de sodium par kg de poids corporel chez les rats. Une DL50 de 1 600 mg par kg de poids corporel a été signalée pour les lapins.

La DL50 orale chez les animaux de laboratoire était comprise entre 100 et 220 mg de nitrite par kg de poids corporel. Chez l'humain, en raison de la grande variabilité de la sensibilité individuelle (Santé Canada, 2013), les doses létales orales estimées en nitrites varient de 1,6 à 9,5 g et de 33 à 250 mg (kg pc)<sup>-1</sup>, les doses les plus faibles s'appliquant aux enfants, aux personnes âgées et aux personnes présentant une déficience des enzymes nicotinamide

adénine dinucléotide (NADH) méthémoglobine réductase et cytochrome b5 réductase (EFSA, 2017a).

Aucune nouvelle donnée sur la toxicité aiguë des nitrates et des nitrites n'a été publiée entre la publication des opinions de l'EFSA (EFSA, 2017a; EFSA, 2017b) et la fin des travaux d'expertise réalisés dans le cadre de ce rapport (juin 2022).

L'ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, USA) a publié le profil toxicologique du NDMA (ATSDR, 2022). Des études de toxicité aiguë pour la nitrosamine NDMA chez l'animal de laboratoire ont démontré une dose mortelle à partir de 15 mg par kg de poids corporel. Des doses uniques de 15 et 20 mg (kg pc)<sup>-1</sup> n'ont pas été létales chez les rates non gestantes, mais des mortalités ont été observées chez des rates gestantes exposées une fois au dix-huitième jour de la gestation à ces doses (concernant 3 rates gestantes sur 32 exposées à 15 mg (kg pc)<sup>-1</sup> et 6 rates gestantes sur 17 exposées à 20 mg (kg pc)<sup>-1</sup>). Une DL50 d'environ 23 mg (kg pc)<sup>-1</sup> a été estimée pour les rates gravides. L'ATSDR (2022) rapporte qu'une autre étude chez le rat indique une mortalité de 100 % à la suite d'administration par voie orale d'une dose unique de 25 mg (kg pc)<sup>-1</sup> de NDMA, sans que le nombre de rats et la présence d'un groupé témoin soient précisés dans cette étude.

#### **10.4. Toxicité court-terme et sub-chronique des nitrates, des nitrites et des nitrosamines**

L'EFSA (EFSA, 2017a; EFSA, 2017b) rapporte des études de toxicité à court terme et subchronique chez le rat montrant que l'apport de nitrates jusqu'à une proportion de 5 % dans l'alimentation (équivalent à 4 500 mg de nitrate de sodium par kg de poids corporel par jour) n'a pas entraîné d'effets indésirables chez le rat. A des niveaux de dose plus élevés, le taux de mortalité était plus élevé (10/10 des femelles et 7/10 des mâles à 18000 mg de nitrate de sodium par kg de poids corporel par jour) avec une augmentation de la méthémoglobinémie observée à l'autopsie des animaux.

Les études de toxicité du nitrite de sodium et de potassium à court terme et subchronique chez les rats et les souris ont confirmé que le principal effet observé est la formation de méthémoglobine.

Aucune nouvelle donnée sur la toxicité court-terme et subchronique des nitrates et nitrites n'a été publiée entre la publication des opinions de l'EFSA (EFSA, 2017a; EFSA, 2017b) et la fin des travaux d'expertise réalisés dans le cadre ce rapport (juin 2022).

Le profil toxicologique du NDMA de l'ATSDR (2022) indique la réalisation d'études du taux de survie chez la souris exposée au NDMA par l'eau de boisson sur des périodes allant de 45 jours à 38 semaines. Une diminution de la survie a été observée à une dose de 1,8 mg par kg de poids corporel par jour chez la souris exposée pendant 49 jours, à une dose de 1,2 mg par kg de poids corporel par jour chez la souris exposée pendant 13 semaines et à une dose de 1 mg par kg de poids corporel par jour chez la souris exposée pendant 38 semaines. De même, des études du taux de survie ont été réalisées par gavage chez des chats, chiens, cobayes, singes, hamsters et visons (ATSDR, 2022). L'exposition par gavage à 1 mg par kg pendant 30 jours a entraîné une diminution de la survie chez les chats, mais pas chez les cobayes ou les singes. Chez les chiens exposés deux fois par semaine pendant 4 semaines à des capsules contenant 2,51 mg par kg de NDMA, il est relevé la mort d'un chien par insuffisance hépatique aiguë 2 semaines après la fin de l'exposition. Cependant, les autres études du taux de survie menées chez les chiens n'ont révélé aucune mortalité après 4 ou 24 semaines d'exposition.

Chez les hamsters, l'administration de 4 mg par kg de poids corporel et par jour dans l'eau potable pendant 8, 12 ou 16 semaines a entraîné une mortalité chez 3 animaux sur 13 avant 8 semaines, alors que l'administration de la même dose pendant 28 jours n'a entraîné aucune létalité chez les animaux restant. Un traitement par gavage une fois par semaine avec une dose de 10,7 mg par kg pendant 4 semaines ou 5,4 mg par kg pendant 20 semaines a été létal pour les hamsters. Les visons qui ont reçu des doses de 0,32 ou 0,63 mg par kg de poids corporel par jour dans leur régime alimentaire sont morts après 23 à 34 jours de traitement.

## 10.5. Génotoxicité des nitrates, des nitrites, des nitrosamines et du fer nitrosylé et des nitrosothiols

### • Génotoxicité des nitrates

L'EFSA (EFSA, 2017b) rapporte qu'une étude *in vitro* réalisée sur des bactéries *Salmonella* Typhimurium (TA92, TA94, TA100, TA1535 et TA1537), avec et sans activation métabolique, n'a pas mis en évidence d'effet mutagène du nitrate de sodium ou de potassium. Un test d'aberrations chromosomiques effectué sur cellules de hamster chinois CHL, avec et sans système d'activation métabolique, n'a pas apporté de preuves d'un potentiel génotoxique du nitrate de sodium ou de potassium. De même, aucune induction de cassures simple brin de l'ADN, mesurée par un test d'éluion alcaline, n'a été observée dans des cellules de hamster chinois V79 traitées avec du nitrate de sodium.

Parmi les études *in vivo* réalisées avec le nitrate de sodium ou de potassium, peu d'entre elles sont considérées comme pertinentes pour une évaluation du risque par le panel d'experts de l'EFSA (2017a). Néanmoins les résultats ne montrent aucune indication fiable de génotoxicité chez les souris et les rats exposés au nitrate de sodium par voie orale, tant dans les cellules somatiques que dans les cellules germinales. L'EFSA a conclu que les données expérimentales disponibles montrent que les sels de nitrate ne suscitent pas de préoccupation quant à leur génotoxicité.

Aucune nouvelle donnée sur le potentiel génotoxique intrinsèque des nitrates n'a été publiée entre la publication des opinions de l'EFSA (2017b) et la fin des travaux d'expertise réalisés dans le cadre ce rapport (juin 2022).

### • Génotoxicité des nitrites

La mutagenèse et la génotoxicité du nitrite de sodium et de potassium ont été évaluées à travers une multitude d'études réalisées *in vitro* (dans des systèmes eucaryotes et des cellules de mammifères) et *in vivo* (chez le rongeur et dans une moindre mesure chez l'Homme). Les différents systèmes d'essai utilisés ont permis de couvrir l'ensemble des endpoints génotoxiques (altérations primaires de l'ADN, mutations géniques, aberrations chromosomiques).

*In vitro*, les études disponibles montrent que le nitrite de sodium présente des propriétés génotoxiques et mutagènes puisque des résultats positifs ont été obtenus dans des tests de mutations génétiques sur bactéries, et dans les tests d'aberrations chromosomiques (clastogénèse et aneuploïdie), de mutations génétiques et de transformation cellulaire sur cellules de mammifères.

La majorité des études réalisées *in vivo* n'ont pas été considérées pertinentes par l'EFSA dans un contexte d'évaluation du risque (EFSA, 2017a). Néanmoins, des résultats négatifs ont été obtenus dans des tests du micronoyau *in vivo* sur le plan expérimental, chez la souris et le rat, avec une preuve d'exposition systémique après administration aiguë et sub-chronique par voie orale de nitrite de sodium. Une absence de génotoxicité a également été noté au site de

contact (estomac), notamment dans un test des comètes *in vivo* par gavage (bien que la dose maximale testée était inférieure aux recommandations habituelles). Aucune lésion oxydative de l'ADN dans l'épithélium du pré-estomac après une exposition par voie orale (via l'alimentation) au nitrite n'a été notée ni aucune activité initiatrice de tumeurs dans un modèle de cancer de l'estomac en deux étapes.

Dans l'ensemble, le groupe d'experts de l'EFSA a conclu que les données disponibles n'indiquent pas de potentiel génotoxique *in vivo* pour le nitrite de sodium et de potassium, et que donc il est possible d'établir une valeur toxicologique de référence (DJA).

Aucune nouvelle donnée sur le potentiel génotoxique intrinsèque des nitrites n'a été publiée entre la publication des opinions de l'EFSA (2017a) et la fin des travaux d'expertise réalisés dans le cadre ce rapport (juin 2022). Le GT note qu'une étude a été menée afin d'étudier le potentiel génotoxique de deux composés pouvant être retrouvés dans les produits de viande transformée : le décabromodiphényl ether (BDE-209) et le sodium de nitrite. Alors que ces deux composés seuls ne sont pas génotoxiques, leur mélange augmente le nombre de foyers positifs pour  $\gamma$ -H2AX et le nombre de micronoyaux détectés sur des cellules HepG2 (Che et al., 2021).

- **Génotoxicité des nitrosamines**

Les *N*-nitrosamines ont besoin d'être bioactivées (oxydation par le cytochrome P450 2E1) pour former divers ions diazonium. Les ions alkyldiazonium sont des précurseurs d'ions carbonium réactifs et électrophiles qui réagissent directement avec l'ADN en formant des adduits stables, principalement avec l'azote et l'oxygène de la guanine et de la thymidine. Les adduits à l'ADN formés dépendent de la nature des ions diazonium et leur structure et nombre sont eux-mêmes dépendants de la structure chimique de chaque *N*-nitrosamine (EMA, 2020).

L'ATSDR (2022) a publié le profil toxicologique de la NDMA dont une revue des études de génotoxicité *in vitro* et *in vivo* de celle-ci. Les données sur la génotoxicité *in vitro* et *in vivo* démontrent clairement qu'un ou plusieurs métabolites de la NDMA sont génotoxiques au niveau hépatique chez de nombreuses espèces et que ce mécanisme d'action joue un rôle majeur dans l'hépatocarcinogénèse de la NDMA.

De plus, des études récentes (Dong et al., 2022; Wang et al., 2017a) ont mis en évidence que des mélanges de faibles doses de nitrosamines retrouvées dans l'eau de boisson ont des potentiels génotoxiques plus importants que les composés individuels.

- **Génotoxicité du fer héminique nitrosylé**

Une étude a comparé les effets toxiques de l'hématine et du nitrosylhème synthétisé en laboratoire dans différents tests *in vitro* (Kostka et al., 2020). Les auteurs ont observé une augmentation statistiquement significative et dose dépendante des cassures à l'ADN, évaluées par test des comètes, dans les lignées cellulaires Caco-2 (issues d'un adénome colorectal humain) et BALB/c 3T3 (issues de fibroblastes embryonnaires de souris) après traitement à l'hématine, et significative uniquement dans la lignée Caco-2 après traitement au nitrosylhème. Dans la lignée CHO-K1 (cellules ovariennes de hamster chinois), l'hématine et le nitrosylhème ont induit une augmentation statistiquement significative de la fréquence des mutations géniques au locus hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT). Un test d'Ames a également été réalisé sur les souches de *Salmonella* Typhimurium TA100 et TA1535. Les résultats étaient positifs après traitement par l'hématine et négatif après traitement par le nitrosylhème sur la souche TA100, et négatif pour les deux composés sur la

souche TA1535. Enfin, un test de transformation cellulaire (CTA) <sup>62</sup> a été effectué et une augmentation statistiquement significative du nombre de foci transformés (foci de type III) a été observé après traitement à l'hématine et au nitrosylhème, mais sans relation dose-effet. En conclusion, les auteurs indiquent que leurs résultats suggèrent que l'hème seul plutôt que la forme nitrosylée pourrait expliquer le risque de cancer colorectal associé à la consommation de produits carnés.

A l'examen de l'article de Kostka et al. (2020) par le GT, des incertitudes sont identifiées sur la stabilité des substances testées, la pertinence d'utiliser l'hématine comme contrôle et des lignées cancéreuses pour des tests de toxicité aiguë. Par ailleurs, des réserves sont formulées quant à la vérification exacte de la nature du produit de synthèse (l'hème nitrosylé). En effet, seules des analyses spectrophotométriques ont été réalisées. Leurs performances en matière de caractérisation sont limitées et n'apportent pas, en l'état, une réelle preuve de la structure du composé synthétisé.

- **Génotoxicité des nitrosothiols**

La consommation de produits carnés, qu'ils soient nitrés ou non, induit la formation de composés nitrosés et notamment de nitrosothiols (RSNO) (Chapitre 10.2). Cependant, la nature des RSNO formés n'est actuellement pas connue et nécessite une caractérisation approfondie. Peu d'études se sont intéressées au potentiel effet toxique de ces composés sur des modèles cellulaires ou animaux cohérents avec l'objet de la présente saisine à savoir une exposition par voie orale (alimentation) et une formation de RSNO au niveau digestif, se retrouvant ensuite au niveau fécal.

Le S-nitrosoglutathion (GSNO) est un S-nitrosothiol endogène qui joue un rôle important dans la signalisation de l'oxyde nitrique (NO°) et qui est une source de NO°. Il peut mimer les effets du NO° endogène puisque le NO est relargué lors de la décomposition du GSNO. Le GSNO est principalement utilisé pour étudier les différents mécanismes impliquant le NO°.

Aucune donnée de génotoxicité n'a été identifiée. Toutefois, des données de cytotoxicité ont été recensées et sont présentées en annexe 15.

## 10.6. Génotoxicité en lien avec l'ingestion de nitrates et de nitrites

### 10.6.1. Génotoxicité des eaux fécales et formation d'adduits à l'ADN suite à la consommation de viande rouge

Cross et al. (2006) ont comparé les niveaux des composés nitrosés apparents totaux (ATNC) dans les homogénats fécaux de volontaires ayant consommé 60 g j<sup>-1</sup> de **viande rouge** (n=9) ou 120 g j<sup>-1</sup> de viande rouge (n=9), supplémentés en fer héminique (n=9) ou supplémentés en fer (n=6). Les auteurs n'ont pas observé de corrélation entre les concentrations en ATNC dans les homogénats fécaux et la génotoxicité des eaux fécales associées sur des cellules HT-29, une lignée cellulaire issue d'un adénocarcinome intestinal, évaluée par le test des comètes. Les auteurs suggèrent que ce résultat pourrait être biaisé en raison de la forte variabilité individuelle ou par le fait que les niveaux moyens d'ATNC dans les eaux fécales étaient inférieurs à ceux des homogénats fécaux (272 vs 895 µg kg<sup>-1</sup> d'échantillon).

Lewin et al. (2006) ont comparé l'effet de la consommation d'un régime végétarien, d'un régime riche en **viande rouge** (420 g j<sup>-1</sup>) ou riche en viande rouge + riche en fibres, pendant 15 jours, sur 21 volontaires. La consommation d'un régime riche en viande rouge a induit une

<sup>62</sup> OECD 2012, Balb/c 3T3 cell transformation assay Prevalidation Study Report, Series of Testing and Assessment No. 149. ENV-JM-MONO(2011)30.

augmentation significative du pourcentage de cellules positives pour l'O6-carboxyméthyl guanine (O6CMG), un adduit spécifique des composés nitrosés, dans des cellules exfoliées coliques. L'ajout de fibre dans le régime riche en viande rouge ne modifiait pas les niveaux d'O6CMG par rapport à un régime riche en viande rouge sans fibre. Les auteurs ont observé une corrélation positive entre les teneurs fécales en ATNC et le pourcentage de cellules positives pour O6CMG.

Joosen et al. (2010) ont comparé les effets d'un régime à base de viande rouge, d'un régime à base de viande rouge et de poisson et d'un régime à base de poisson uniquement, pendant 8 jours sur 14 volontaires. Les auteurs n'ont pas observé de différence significative entre les régimes concernant la génotoxicité des eaux fécales sur des cellules Caco-2 (lignée cellulaire immortalisée de cellules d'adénocarcinome colorectal humain).

Hebels et al. (2012) ont étudié l'effet d'un régime à base de viande rouge (300 g j<sup>-1</sup> de viande rouge), pendant 7 jours, sur la génotoxicité des eaux fécales en lien avec des changements d'expression génique dans des tissus coliques de 12 patients atteints de maladie inflammatoire intestinale, en période ou non de crise inflammatoire. Cette étude met en évidence une augmentation de la génotoxicité des eaux fécales après consommation d'un régime à base de viande rouge indépendamment de la présence ou non d'une inflammation intestinale. L'analyse transcriptomique a révélé que les gènes significativement corrélés avec l'augmentation de la génotoxicité des eaux fécales étaient impliqués dans des processus liés au développement du cancer colorectal tels que la réparation des dommages à l'ADN, le cycle cellulaire, l'apoptose, la voie de signalisation Wnt et le remodelage du nucléosome.

Le Leu et al. (2015) ont mis en évidence, chez 23 volontaires sains, que la consommation pendant 4 semaines d'un régime riche en viande rouge (300 g j<sup>-1</sup>) augmentait de 21% les adduits O<sup>6</sup>MeG observés par immunohistochimie à partir de biopsies rectales comparés aux valeurs obtenues avant l'intervention alimentaire.

#### 10.6.2. Génotoxicité des eaux fécales et formation d'adduits à l'ADN suite à la consommation de produits carnés nitrés

Joosen et al. (2009) n'ont pas observé de différence significative dans la génotoxicité des eaux fécales de volontaires ayant consommé un régime à base de viande rouge ou un régime à base de charcuterie. Cependant, ils ont observé que les eaux fécales des volontaires ayant consommé un régime végétarien étaient plus génotoxiques que les eaux fécales des volontaires ayant consommé les régimes à base de viande. De façon similaire à l'étude de Cross et al. (2006), les concentrations en composés nitrosés dans les eaux fécales étaient inférieures à celles des homogénats fécaux.

Une étude clinique croisée (cross over) a été effectuée afin de tester les effets à court-terme (3 jours pour chaque régime) d'un régime sans viande, d'un régime riche en **viande rouge** fraîche ou d'un régime riche en **charcuterie nitrifiée** (420 g de viande par jour pour les hommes et 366 g pour les femmes). Cette étude n'a pas mis en évidence de différence dans la génotoxicité des eaux fécales issus des régimes viande rouge ou charcuterie analysés par un test des comètes (Joosen et al., 2009).

Van Breda et al. (2019) ont analysé les effets des nitrates dans l'eau de boisson et leurs interactions avec la consommation de charcuteries. Durant la première semaine, le taux de nitrates dans l'eau de boisson a été maintenu à une valeur faible (< 1,5 mg L<sup>-1</sup>) puis a été augmenté à 3,7 mg kg<sup>-1</sup> de poids corporel (équivalent à la DJA) pendant la deuxième semaine. La génotoxicité des eaux fécales, évaluée sur des cellules Caco-2, était statistiquement

significative uniquement pour les sujets ayant consommé le régime à base de charcuteries pendant la première semaine (van Breda et al., 2019).

Dans le projet PHYTOME, les chercheurs ont analysé la génotoxicité des eaux fécales sur des cellules Caco-2 par test des comètes et les niveaux d'adduits à l'ADN de type O<sup>6</sup>MeG à partir de biopsies coliques. Les régimes testés sur 63 volontaires étaient composés de viande blanche, de charcuteries nitritées ou de charcuteries enrichies en composés biologiques actifs et nitritées à un taux classique ou à un taux diminué. Après deux semaines de consommation de charcuteries, la génotoxicité des eaux fécales était statistiquement supérieure à celle observée pendant la période contrôle où seule de la viande blanche avait été consommé. Pas de différence statistiquement significative n'a été observée entre la génotoxicité des eaux fécales après consommation de charcuteries enrichies en composés biologiques actifs (niveau de nitrites standards ou diminués) ou après consommation de viande blanche. Les niveaux de nitrates dans l'eau de boisson n'ont pas influé sur la génotoxicité des eaux fécales. La consommation de charcuteries pendant deux semaines a augmenté significativement les niveaux d'O<sup>6</sup>MeG comparé aux valeurs de base avant consommation ou aux valeurs obtenus lors de la consommation de viande blanche. Il n'y avait pas de différence significative avec les charcuteries enrichies en composés biologiques actifs (niveau de nitrites standards ou diminués) (van Breda et al., 2021).

### 10.6.3. Génotoxicité en lien avec l'ingestion de nitrates via l'eau de boisson

Dans leur étude de 2019 sur 20 volontaires sains, van Breda et al. (2019) n'ont pas observé de différence statistiquement significative concernant la génotoxicité des eaux fécales (test de comètes sur des cellules Caco-2) après une période de consommation d'eau où la teneur en nitrates dans l'eau de boisson était basse (<1,5 mg L<sup>-1</sup>) ou équivalente à la DJA (3,7 mg kg pc<sup>-1</sup>).

Une étude récente, sur 420 femmes âgées de 18 à 45 ans, a mis en évidence qu'une exposition chronique aux nitrates via l'eau de boisson causait des altérations métaboliques et hormonales ainsi que des dommages génotoxiques des lymphocytes du sang périphérique. Les concentrations en nitrates dans l'eau de boisson étaient de 4,7, 32,1 et 56,9 mg L<sup>-1</sup> pour les groupes exposés à de faibles, moyennes ou fortes doses respectivement (Gandarilla-Esparza et al., 2021).

## 10.7. Toxicité chronique et cancérogénèse des nitrates, des nitrites et des composés nitrosés

### • Toxicité chronique et cancérogénèse des nitrates

L'EFSA (2017b) rapporte que le nitrate de sodium n'a pas montré de différence dans l'incidence des tumeurs par rapport aux témoins dans des études de cancérogénèse conduites chez les souris. Quatre études non standard menées sur des rats et des porcs ont évalué les paramètres hématologiques ou les effets sur la thyroïde et les hormones liées à la thyroïde (Azeez OH et al., 2011; Boink and Speijers, 2001; JECFA, 1996; MUKHOPADHYAY et al., 2005; Zaki et al., 2004). Dans l'ensemble, l'EFSA a considéré que le nitrate de sodium n'affectait pas la fonction des glandes surrénales et thyroïdiennes chez les animaux et qu'il n'était pas cancérogène dans les études animales.

Aucune nouvelle donnée n'a été publiée entre la publication des opinions de l'EFSA (EFSA, 2017a; EFSA, 2017b) et la fin des travaux d'expertise liées à ce rapport (juin 2022).

- **Toxicité chronique et cancérogénèse des nitrites**

Les études sur la cancérogénicité chez les souris et les rats évaluées par l'EFSA (2017a) n'ont pas mis en évidence le potentiel cancérogène du nitrite de sodium. Une étude à long terme chez la souris a montré une tendance positive dans l'incidence du papillome et du carcinome épidermoïde (combinés) du préestomac et de l'adénome ou du carcinome alvéolaire/bronchiolaire (combinés) chez les souris femelles. Toutefois, aucune différence statistiquement significative par rapport aux témoins n'a été signalée dans l'incidence de ces tumeurs et l'examen histopathologique des lésions a montré une invasion focale de l'épithélium pavimenteux dans la lamina propria sans infiltration de cellules néoplasiques à travers la séreuse du pré-estomac ni aucun signe de métastase (NTP, 2001). Dans une étude de 2 ans chez le rat exposé à du nitrite de sodium ajouté à l'eau de boisson, aucune augmentation de tumeurs (toutes localisation) n'a pu être liée au traitement, jusqu'à la dose maximale de l'étude de  $125 \text{ mg (kg pc)}^{-1} \text{ j}^{-1}$  (Maekawa et al., 1982).

Aucune nouvelle donnée n'a été publiée entre la publication des opinions de l'EFSA (EFSA, 2017a; EFSA, 2017b) et la fin des travaux d'expertise liées à ce rapport (juin 2022).

- **Toxicité chronique et cancérogénèse des nitrosamines**

Le SCCS (2011) (Scientific Commity for Consumer Safety) a estimé le potentiel cancérogène de plusieurs nitrosamines à partir de trois indicateurs de cancérogénicité qui sont : l'approche T25, la benchmark dose (BMD) et la  $TD_{50}^{63}$  (Tableau 42). Il est choisi de retenir la valeur de  $BMDL_{10}$  pour estimer les marges d'exposition au NDMA pour la population française en fonction des différents scénarios d'expositions estimés (chapitre 13). Une revue des études de cancérogénicité chez l'animal de laboratoire a été menée (ATSDR, 2022) et conclue que « *des études de cancérogénicité chronique de la NDMA par voie orale ont été menées sur des rats, des souris et des visons ; ces études ont montré une augmentation liée à la dose de l'incidence des tumeurs du foie et des testicules chez les rats, des tumeurs du foie et des poumons chez les souris et des tumeurs du foie chez les visons* ».

La  $BMDL_{10}$  pour le NDMA est calculée par le SCCS à partir des études de Peto et al. (Peto et al., 1984; Peto et al., 1991a; Peto et al., 1991b), où des groupes de 60 rats par sexe et par dose (15 doses de  $0.001$  à  $0.697 \text{ mg (kg pc)}^{-1}$  par jour) sont exposés au NDMA dans l'eau de boisson. Le détail des calculs de  $BMDL_{10}$  pour les différentes nitrosamines dont le NDMA sont présentées dans le rapport du SCCS (2011, Annexe II).

---

<sup>63</sup> T25 : la dose journalière qui va générer des tumeurs à un site spécifique chez 25% des animaux après correction pour l'incidence spontanée et de la durée de vie de l'espèce (Dybing et al., 1997) ; BMD : niveau de dose dérivé de la courbe dose-réponse, associé à la modification spécifique de la réponse définie par cette benchmark response (BMR), la BMR est généralement fixée à 10% de risque supplémentaire par rapport au contrôle (EFSA, 2009) ;  $TD_{50}$  : la dose journalière provoquant des tumeurs chez 50 % des animaux au cours d'une vie.

**Tableau 42. Classement des nitrosamines selon leur potentiel cancérigène sur la base d'études chez le rat (SCCS, 2011).**

Name	T25 (mg/kg bw/d) (SD)	BMDL-10 (mg/kg bw/d)	TD50 (mg/kg bw/d)
N-nitrosodiméthylamine NDMA	0.058 (±0.028)	0.027	0.0959 <sup>m,v</sup>
N-nitrosodiéthylamine NDEA	0.085 (±0.065)	0.018 #	0.0265 <sup>m,v</sup>
N-nitrosomorpholine MMOR	0.094 (±0.036)	NA	0.109 <sup>m</sup>
N-nitroso-N-méthyl-N- dodécylamine	0.46 (±0.08)	NA	0.537 <sup>m,P</sup>
N-nitrosobis(2- hydroxypropyl)amine NBHPA	0.54	NA	0.846 <sup>m</sup>
N-nitrosopyrrolidine NPYR	0.57 (±0.46)	0.16	0.799 <sup>m,P</sup>
N-nitrosodiéthanolamine NDELA	2.18 (±0.72)	1.74	3.17 <sup>m,v</sup>
N-nitroso-Para amino benzoic acid esters NPABA	No data	No data	No data

- **Lien entre consommation de produits carnés, fer héminique nitrosylé et cancérogénèse**

Dans une étude de promotion de la cancérogénèse de 100 jours chez des rats chimio-induits à l'azoxyméthane, la présence de fer héminique nitrosylé dans les fèces a uniquement été retrouvée chez les animaux ayant consommé un régime enrichi en fer héminique (1% d'hémoglobine ajouté au régime de base AIN76, dose représentative de la consommation humaine de viande rouge), et non chez les animaux ayant un régime enrichi en citrate de fer. Cette présence était associée à une augmentation significative du nombre de lésions précancéreuses de type MDF (*Mucin Depleted Foci*) au niveau du colon-rectum, de l'activité cytotoxique des eaux fécales et des TBARs fécaux (Thiobarbituric Acid Reactive Species) (aldéhydes marqueurs de la lipoperoxydation). De plus, cette étude a mis en évidence que l'ajout de nitrites dans un régime riche en hème augmente la concentration en fer héminique nitrosylé retrouvé au niveau fécal mais n'augmente pas le nombre de lésions précancéreuses ou les biomarqueurs associés (Bastide et al., 2015).

Lors de la consommation de charcuterie par des rats chimio-induits, seule la présence de fer héminique nitrosylé fécal - mais pas d'autres composés nitrosés fécaux ou la teneur en fer héminique nitrosylé dans les produits - est associée à l'augmentation significative du nombre de lésions précancéreuses de type MDF, mais sans effet dose-réponse. Les auteurs suggèrent un rôle central du fer héminique nitrosylé dans la promotion du cancer colorectal lié à la consommation de charcuteries riches en hème et en nitrites, associé à un rôle mineur des aldéhydes issus de la lipoperoxydation (Bastide et al., 2017).

Une charcuterie additionnée de nitrites contient plus de 13 fois plus de fer héminique nitrosylé que la même charcuterie modèle sans nitrites (40 vs 3 mg kg<sup>-1</sup>). La consommation de cette charcuterie nitrifiée par des rats chimio-induits pendant 80 jours a induit l'augmentation d'un facteur 9 de l'excrétion fécale de composés nitrosés totaux comparé à la consommation de la même charcuterie sans nitrite (424 ± 92 vs 64 ± 25 µmol L<sup>-1</sup> d'eau fécale). Dans cette étude, la consommation de la charcuterie nitrifiée a induit une augmentation statistiquement significative du nombre de foyers MDF contrairement à la charcuterie non nitrifiée (Santarelli et al., 2010).

**La formation de fer héminique nitrosylé est favorisée par l'ajout de nitrites dans des régimes riches en hème. Le fer héminique nitrosylé fécal est un marqueur du cancer colorectal associé à la consommation de produits carnés traités avec des sels nitrés.**

## 10.8. Reprotoxicité et toxicité du développement

L'EFSA (2017b) rapporte qu'aucun effet sur la reproduction et le développement n'a été observé lorsque des rats sont exposés à du nitrate de potassium par gavage à des doses allant jusqu'à  $1\ 500\text{ mg (kg pc)}^{-1}\text{ j}^{-1}$ . De plus, aucune toxicité pour le développement n'a été observée chez les souris exposées par gavage jusqu'à 400 mg de nitrate de potassium par kg de poids corporel par jour (400 mg de nitrate de sodium par kg de poids corporel par jour), les rats jusqu'à 1 980 mg de nitrate de potassium par kg de poids corporel par jour (250 mg de nitrate de sodium par kg de poids corporel par jour), les hamsters jusqu'à 280 mg de nitrate de potassium par kg de poids corporel par jour (400 mg de nitrate de sodium par kg de poids corporel par jour) ou les lapins jusqu'à 206 mg de nitrate de potassium par kg de poids corporel par jour (250 mg de nitrate de sodium par kg de poids corporel par jour). Dans une étude de reprotoxicité conduite chez des souris ayant reçu du nitrate de potassium dans l'eau potable, des effets ont été observés sur le nombre de spermatozoïdes et les enzymes testiculaires à la plus forte dose testée de  $156\text{ mg (kg pc)}^{-1}\text{ j}^{-1}$ . Des modifications histopathologiques des testicules, de l'épididyme et d'autres organes sexuels ont également été signalées dans cette étude. Selon l'EFSA (2017b), la dose sans effet nocif observé (NOAEL) dans cette étude était de 122 mg de nitrate de potassium par kg de poids corporel par jour. Toutefois, le nombre d'animaux testés était faible. Bien que certains effets sur le nombre de spermatozoïdes, les enzymes testiculaires et les organes reproducteurs ont été observés, l'EFSA (2017b) conclut qu'aucune indication de toxicité pour la reproduction n'a été observée à des doses plus élevées.

L'EFSA (2017a) indique qu'aucune toxicité pour la reproduction n'a été observée lorsque les souris sont exposées jusqu'à 437 mg de nitrite de sodium par kg de poids corporel par jour pour les mâles et 412 mg de nitrite de sodium par par kg de poids corporel par jour pour les femelles. Toutefois, dans une étude de 14 semaines, des anomalies du sperme ont été observées chez les souris exposés à 345 mg de nitrite de sodium par kg de poids corporel par jour (NTP, 2001). Selon l'EFSA (2017a), la toxicité pour le développement a également été étudiée chez des souris, des rats et des hamsters exposés à des doses allant respectivement par espèce jusqu'à 23, 10 et 23 mg de nitrite de sodium par kg de poids corporel par jour et jusqu'à 32, 10 et 32 mg de nitrite de potassium par kg de poids corporel par jour. Un retard de développement squelettique a été observé à la dose la plus élevée chez les rats traités au nitrite de sodium et de potassium.

Aucune nouvelle donnée n'a été publiée entre la publication des opinions de l'EFSA (EFSA, 2017a; EFSA, 2017b) et la fin des travaux d'expertise réalisés dans le cadre de ce rapport (juin 2022).

## 10.9. Effet perturbateur endocrinien des nitrates

De plus en plus d'études apportent des preuves expérimentales d'une activité endocrinienne des nitrates ou de ses dérivés à la fois chez les vertébrés et invertébrés (Edwards and Hamlin, 2018; Poulsen et al., 2018). Ces études rapportent des dérégulations d'hormones

stéroïdiennes ou thyroïdiennes ainsi que des altérations du développement, des troubles de la reproduction ou du développement (Edwards and Hamlin, 2018; Poulsen et al., 2018).

- *Effets sur les hormones stéroïdiennes*

Les preuves que les nitrates peuvent modifier les concentrations circulantes de stéroïdes sexuels et les paramètres de reproduction en aval ont augmenté régulièrement au cours de la dernière décennie. Cependant, toutes les études ne vont pas dans le même sens. Les nitrates ont causé ou étaient positivement associés à une élévation des hormones stéroïdes de type testostérone, 17 $\beta$ -estradiol et 11-cétotestostérone dans plusieurs espèces aquatiques comme les esturgeons, les aligators et autres espèces de poissons, les doses testées allant de 0,7 à 100 mg L<sup>-1</sup> (Hamlin et al., 2016; Hamlin et al., 2008; Kellock et al., 2018). Une étude réalisée chez des femmes ayant recours à des fécondations *in vitro* a montré une corrélation positive entre les concentrations folliculaires de NO<sub>3</sub>/NO<sub>2</sub> et d'estradiol ainsi qu'avec le volume folliculaire (Anteby et al., 1996). Dans d'autres études *in vitro* ou chez l'animal, l'exposition aux nitrates ou à l'oxyde nitrique entraîne une diminution de la testostérone, de la corticostérone ou de l'estradiol (Barbeau and Guillette, 2007; Panesar and Chan, 2000). Ces résultats ont été observés aussi bien *in vitro* sur cellules de Leydig qu'*in vivo* chez le rat<sup>9</sup> et le xenope (Barbeau and Guillette, 2007).

L'effet des nitrates sur les taux d'hormones stéroïdes circulantes est compliqué par le fait que les différentes études portent sur des espèces animales très variées (espèces marines, rongeurs) ou sur des cultures cellulaires animales, qu'elles concernent des durées et concentrations d'exposition variables et du fait de l'utilisation de différentes méthodes de quantification des hormones (Poulsen et al., 2018). La sensibilité à l'exposition aux nitrates (800 à 2500 mg L<sup>-1</sup>) et nitrites (132 à 500 mg L<sup>-1</sup>) entre différents stades de développement a par exemple été observée pour les rainettes (Bellezi et al., 2015). Enfin, des effets sous forme de dose-réponse non monotone sur les niveaux d'hormones circulantes ont été rapportés dans de nombreuses études aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Dubey, 1998; Faes et al., 2009; Freitag et al., 2015). Ainsi chez le saumon exposé à 10 mg L<sup>-1</sup> de NO<sub>3</sub>-N, on a observé une augmentation des taux plasmatiques de testostérone qui n'a pas été retrouvée à une dose plus élevée de 101,8 mg L<sup>-1</sup> (Freitag et al., 2015).

Au-delà des niveaux d'hormones circulantes, certaines études rapportent des effets d'exposition aux nitrites sur le taux de reproduction. Ainsi, certaines espèces de crustacés exposées aux nitrites présentent une diminution dose-dépendante du nombre de descendants par couvée, diminution du nombre total de la progéniture par mère et nombre total de pontes par mère. De plus, le nombre de mues a considérablement diminué chez les animaux exposés à la concentration de nitrites dans l'eau la plus élevée (Lyu et al., 2013; Yang et al., 2011).

- *Effets sur les hormones thyroïdiennes*

Les hormones thyroïdiennes des vertébrés sont contrôlées par l'axe hypothalamo-hypophysio-thyroïdien et sont vitales pour la croissance, le métabolisme et le développement neurologique. Des études menées chez plusieurs espèces différentes montrent que l'exposition aux nitrates provoque une diminution des niveaux d'hormones thyroïdiennes circulantes et peut se traduire par une augmentation du volume de la thyroïde sous forme de goitre (Bahadoran et al., 2015).

Des études animales menées chez le rat, les poissons et les amphibiens ont montré que les nitrates et/ou nitrites peuvent affecter les principales hormones thyroïdiennes circulantes (Ciji et al., 2013; Edwards et al., 2006; Freitag et al., 2015; Zaki et al., 2004). Par exemple, des doses élevées de nitrates ont causé un goitre et une diminution de la thyroxine sérique (T4) et de la 3,5,3'-triiodothyronine (T3) chez les rats (Zaki et al., 2004) et les nitrites ont diminué la T4 sérique alors que les taux de T3 étaient inchangés chez la daurade (Deane, 2007). Les têtards de crapaud et de grenouille exposés aux nitrates présentent un développement métamorphique altéré (Edwards et al., 2006; Ortiz-Santaliestra and Sparling, 2007; Wyngaarden et al., 1953; Xu and Oldham, 1997).

Il existe cependant des études rapportant des résultats contraires (Poulsen et al., 2018). Ainsi une exposition de 27 jours du saumon atlantique à de l'eau (température de l'eau ?) contenant 5,2, 10,3 ou 101,8 mg L<sup>-1</sup> de nitrates n'a pas eu d'effet significatif sur les taux sériques totaux de T3 et T4 (Freitag et al., 2015). Il est à noter que, dans la plupart des cas, les doses de nitrates qui ont induit des effets antithyroïdiens chez les animaux sont extrêmement élevées (environ 10 à 600 fois la DJA).

Les études épidémiologiques sur le lien entre exposition aux nitrates et troubles thyroïdiens sont assez controversés. Certaines font état d'effets antithyroïdiens dus à l'exposition aux nitrates via l'eau potable plutôt que dans l'alimentation (Bruce et al., 2013; Gatseva et al., 1998; van Maanen et al., 1994), d'autres études ne montrent aucune association entre la concentration de nitrates dans l'eau et la prévalence de l'hypo- ou de l'hyperthyroïdie (Hunault et al., 2007; Ward et al., 2010). Une méta-analyse réalisée par Behadoran et al. en 2015 n'a permis de dégager aucune association significative entre l'exposition aux nitrates et l'hyper- ou d'hypothyroïdie (Bahadoran et al., 2015).

- Hypothèses émises quant au mode d'action PE des nitrates<sup>3</sup> :

Hypothèse 1 : les nitrates affectent le transport de l'iode ce qui entraîne la réduction de production d'hormones thyroïdiennes (Figure 34, hypothèse 1A). L'augmentation de la concentration intracellulaire de Cl<sup>-</sup> due à une excrétion altérée peut entraîner une diminution de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), ce qui affecte la synthèse des protéines. Cette diminution peut aussi affecter directement la synthèse des hormones stéroïdiennes (Figure 34, hypothèse 1B).

Hypothèse 2 : l'effet passe par l'oxyde nitrique (NO). Le NO peut interagir avec les protéines, soit par nitrosylation des résidus cystéine et des groupes protéiques métalliques, après oxydation, par nitration des résidus de tyrosine. Cette modification des protéines peut entraîner une modification de la régulation transcriptionnelle ou une modification chimique directe des protéines. Cela peut entraîner : 1) des changements dans les niveaux d'hormones lorsque les enzymes impliquées dans la biosynthèse et la dégradation des hormones sont affectées 2) des changements dans la signalisation hormonale si les récepteurs et les protéines de transduction du signal sont affectés, par exemple, la modification du récepteur des œstrogènes (ER) par nitrosylation 3) des changements dans la distribution hormonale lorsque les protéines et les canaux de transport sont affectés, comme décrit pour le transport de l'iode (Figure 34, hypothèse 2A). Un dernier effet décrit est que le NO inhibe l'action d'enzymes de détoxification, empêchant ainsi la métabolisation de molécules comme par exemple le bisphénol A pouvant avoir un effet perturbateur endocrinien (Figure 34, hypothèse 2B).

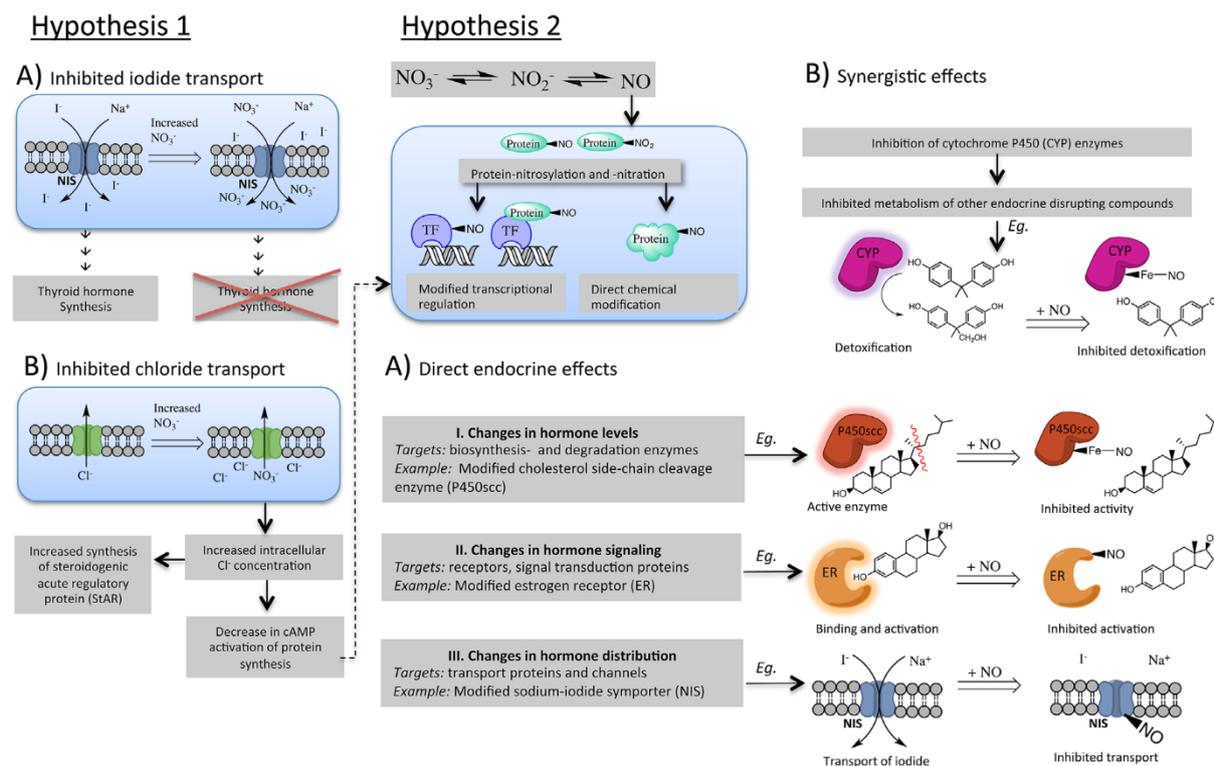


Figure 34. Hypothèses concernant l'activité de perturbation endocrinienne du nitrate (d'après Poulsen et al. (2017))

**In fine**, une littérature très abondante traite des effets perturbateurs endocriniens des nitrates/nitrites et du NO particulièrement sur les hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes. Les données restent cependant controversées pour un grand nombre de raisons liées à l'espèce, à l'âge, au sexe, aux stades de développement, à la dose ou encore à la durée d'exposition. Des effets doses-réponse non monotones caractéristiques des perturbateurs endocriniens sont également rapportés pour les nitrates ce qui rend toute démarche d'évaluation de risque classique difficilement applicable.

## 11. DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES - LIEN ENTRE EXPOSITION ALIMENTAIRE AUX NITRATES ET AUX NITRITES ET INCIDENCE DE CANCER CHEZ L'HOMME

Dans le cadre du traitement de la saisine, le groupe de travail a trouvé opportun d'élargir son analyse aux études traitant de l'exposition aux nitrates et aux nitrites par toutes les sources alimentaires (hydriques, végétales, animales dont les viandes transformées).

### 11.1. Méthodologie - Revue systématique de la littérature

La méthodologie du GT a consisté à recenser de manière systématique dans la littérature tous les articles parus ultérieurement aux recherches présentées dans le rapport de l'EFSA (fin décembre 2014). L'extraction en date du 01/06/2022, a permis d'identifier 187 articles sur la période de janvier 2015 à mars 2022 avec les mots clés présentés en tableau 43 (recherche effectuée à partir de PubMed et Scopus).

Tableau 43. Liste des mots clés utilisés lors de la revue systématique de la littérature.

Type	Mots clés
<i>Substances</i>	Nitrates, nitrites, NOCs, nitrosylated heme
<i>Réponse</i>	Neoplasm, cancer
<i>Population</i>	Cohort, case-control
<i>Période</i>	2015-2022
<i>Langue</i>	Anglais

Les articles pris en compte sont basés sur les résultats d'études de cohortes ou d'études cas-témoins. Concernant l'exposition, l'indicateur est varié, nitrates, nitrites, par source (alimentaire, eaux, aliments d'origine animale ou végétale) et composés nitrosés (par exemple : NDMA, NDEA, FeNO).

Certains articles n'ont pas été pris en compte pour les raisons suivantes :

- ils ne présentent pas de résultats issus d'une étude de cohorte et/ou cas-témoins ou ne présentent pas de résultats originaux (méta-analyse) ;
- le schéma de l'étude ne permet pas d'attribuer de risque relatif ou d'odd ratios (OR) aux substances d'intérêts ;
- les risques de biais n'ont pas ou insuffisamment été pris en compte dans le calcul des OR.

Lorsqu'une seule étude décrit une association entre une exposition et le risque de cancer ou lorsque plusieurs articles fournissent des résultats non convergents, il est considéré que le niveau de preuve est insuffisant pour conclure sur l'existence ou l'absence d'association.

Ces articles sont basés sur les résultats d'études de cohortes ou d'études cas témoins. Concernant l'exposition, l'indicateur est varié, nitrates, nitrites, par source (alimentaire, eaux, aliments d'origine animale ou végétale) et composés nitrosés (par exemple : NDEA, NDMA, FeNO).

Les résultats seront présentés par localisation de cancer. Lorsqu'une seule étude décrit une association entre d'une part, une exposition et d'autre part, le risque de cancer, il est considéré que le niveau de preuve est insuffisant pour conclure.

**Abréviations** : CRC, cancer colorectal ; FFQ, questionnaire de fréquence alimentaire ; HR, hazard ratio ; IC95%, intervalle de confiance à 95% ; OR, odd-ratio ; THM, traitements hormonaux de la ménopause, IMC, Indice de Masse Corporelle ; RR, risque relatif, NSAID : anti-inflammatoire non-stéroïdien.

## 11.2. Résultats

Les résultats de cette revue systématique de la littérature sont présentés sous forme de diagramme Prisma dans la figure ci-après (Figure 35).

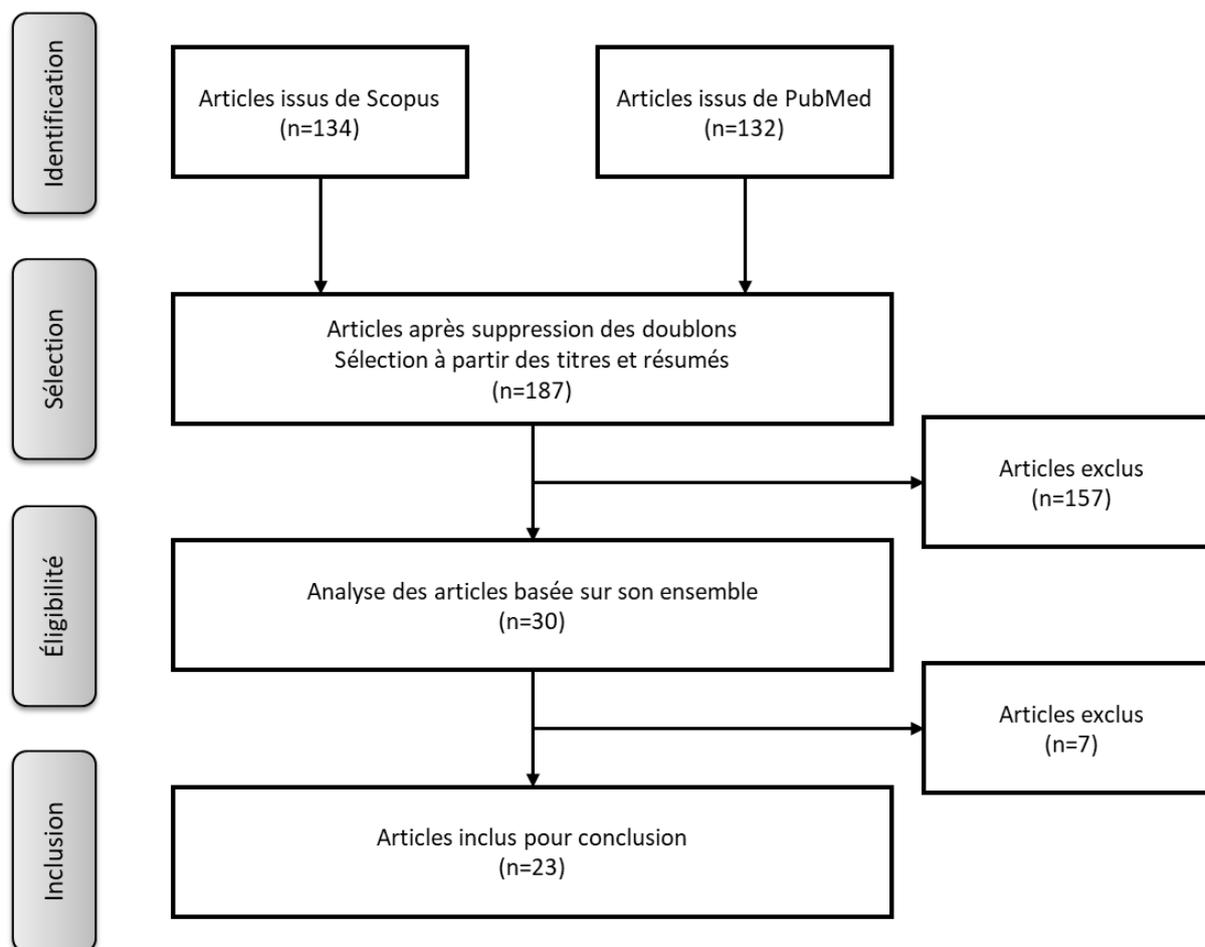


Figure 35. Diagramme Prisma relatif à la recherche bibliographique sur les données épidémiologiques

### 11.2.1. Toutes localisations

Une étude de cohorte a exploré l'association entre exposition aux nitrates et nitrites et le risque de cancer toute localisation (Chazelas et al., 2022).

Cette étude a été conduite en France chez 101 056 participants de la cohorte française NutriNet-Santé (Chazelas et al., 2022). Les participants ont été suivis depuis 2009 (suivi médian de 6,7 ans) et l'exposition aux nitrites/nitrates a été estimée par jumelage de données de consommation alimentaire (issues d'enregistrements alimentaires répétés sur 24 heures), à des bases de données de concentrations des aliments (et eau) en nitrites et nitrates. Les sources naturelles et ajouts en tant qu'additifs (nitrite de potassium (E249), nitrite de sodium (E250), nitrate de sodium (E251) et nitrate de potassium (E252)) ont été explorés. L'exposition par la consommation d'eau a été estimée par des données de contrôle sanitaire régional de l'eau du robinet. Au total, 3311 cas incidents de cancer (dont 142 décès) ont été diagnostiqués au cours du suivi. Les modèles étaient ajustés sur l'âge (échelle de temps), le sexe, l'apport énergétique total, le nombre d'enquêtes alimentaires, les consommations d'alcool, de sucre, d'acides gras saturés, de fibres ( $\text{g j}^{-1}$ , continu), de sodium et de fer héminique, l'indice de masse corporelle, la taille, sur les antécédents familiaux de cancer chez les parents au premier degré (oui ou non), le niveau d'éducation, le statut tabagique, et l'activité physique. Tous les modèles étaient mutuellement ajustés pour les apports en nitrates/nitrites autres que celui spécifiquement étudié.

**Rappel EFSA :**

Dans l'ensemble, l'EFSA (2017a,b) a considéré qu'il n'y avait qu'une seule étude qui examinait le lien entre composés *N*-nitroso alimentaires (*N*-nitrosodiméthylamine), l'indice ENOC (qui reflète le lien entre l'apport alimentaire de fer via la viande et les NOCs totaux formés au niveau fécal) et les nitrites alimentaires et l'incidence totale de cancer et n'a trouvé aucune association.

**Méta-analyse :** Xie et al. (2016)

Xie et al. (2016) ont publié une méta-analyse des études épidémiologiques qui résume les preuves disponibles sur l'association entre l'apport en nitrates et nitrites alimentaires et le risque de cancer à partir d'études prospectives et cas-témoins publiées. La méta-analyse inclut les données publiées jusqu'au 30 avril 2016. Les données de 62 études d'observation, 49 études pour les nitrates et 51 études pour les nitrites, incluant un total de 60 627 cas de cancer ont été analysées. En comparant les niveaux les plus élevés aux niveaux les plus bas, l'ingestion de nitrates alimentaires était inversement associée au risque de cancer gastrique (RR<sub>haut vs. bas</sub> = 0,78, IC95 : 0,67 - 0,91) avec une hétérogénéité modérée (I<sup>2</sup> = 42,3%). En revanche, l'ingestion de nitrites alimentaires était positivement associée au risque de gliome et de cancer de la thyroïde chez l'adulte, avec des RR<sub>haut vs. bas</sub> poolé de 1,21 (IC95% : 1,03 - 1,42) et 1,52 (IC95 % = 1,12 - 2,05), respectivement. Aucune association significative n'a été trouvée entre les nitrates/nitrites alimentaires et les cancers du sein, de la vessie, du côlon, de l'œsophage, des cellules rénales, des lymphomes non hodgkiniens, des ovaires et du pancréas.

Aucune association n'a été observée entre d'une part, l'exposition aux nitrates ou aux nitrites, provenant ou non de l'utilisation d'additifs, présents dans l'alimentation (hors eau de boisson), et d'autre part, le risque de cancer toutes localisations.

**11.2.2. Tube digestif toutes localisations**

Deux études, l'une (Buller et al., 2021) conduite dans une cohorte (Cohorte Iowa) et une étude cas-témoins (Taneja et al., 2017) ont documenté le risque de cancer gastro-intestinaux toutes localisations confondues.

L'étude de Buller et al. (2021) porte sur un échantillon de 33964 femmes ménopausées de la cohorte de l'Iowa. L'exposition aux nitrates et nitrites a été estimée par jumelage de données de consommations et de contamination et une étude portant sur la qualité de l'eau (échantillon de 20507 femmes). Au cours de ce suivi (moyenne 21.6 ans), 308 cas de cancers sont survenus (171 cas dans l'étude sur la qualité de l'eau).

Deux analyses ont été conduites sur

- La qualité de l'eau au moyen des données publiques de teneur en nitrates sur la période 1955-1988 jumelées aux données de consommation de cette eau, qui ont permis d'estimer des expositions moyennes aux nitrates. L'exposition à long terme et le nombre d'années d'exposition à des teneurs élevées ont été considérées.
- L'exposition via l'alimentation a également été estimée au moyen d'un FFQ jumelé à des données de concentration issues de la littérature.

L'étude est de qualité avec une prise en compte des facteurs d'ajustement (âge, activité physique, tabagisme, IMC, consommation d'alcool, prise d'œstrogènes, diabète, âge à la ménopause, profession, lieu de résidence (rural ou ville), prise de NSAID et d'aspirine). Dans

cette étude, aucune association entre les nitrates alimentaires et le risque de cancer du système digestif au global n'a été identifiée. De même l'étude sur la qualité de l'eau ne révélait aucune association avec l'exposition aux nitrates.

Dans l'étude cas témoins de Taneja et al. (2017), incluant 234 hommes et femmes, 78 cas de cancers gastro-intestinaux ont été appariés à 156 témoins, sans cancer, selon le lieu de résidence, et la consommation d'eau ou de légumes de même origine. La qualité de l'eau était évaluée au travers de questions décrivant la qualité de l'eau à laquelle les individus étaient exposés (source de l'eau consommée, potabilité, odeur, couleur, purification) et les fréquences de consommation de légumes potentiellement riches en nitrates étaient collectées. Par ailleurs, des échantillons d'eau potable et de légumes ont été prélevés parmi les sources des patients et des témoins. Chaque échantillon a été collecté en trois exemplaires afin de vérifier la concentration de nitrates. Une exposition aux nitrates des eaux de boisson était associée à une augmentation du risque de cancer gastro-intestinal (OR  $>45 \text{ mg L}^{-1}$  versus  $\leq 45 \text{ mg L}^{-1}$  = 1.2, IC95% : 1.04 -1.34) après ajustement sur l'âge, le sexe et la consommation de tabac.

Une association est observée entre d'une part, l'exposition aux nitrates présents dans l'eau de boisson, et d'autre part, le risque de cancer du tube digestif quelle qu'en soit la localisation dans une seule des deux études disponibles, ce qui ne permet pas de conclure.

Aucune association n'a été observée entre d'une part, l'exposition aux nitrates, provenant ou non de l'utilisation d'additifs, présents dans l'alimentation (hors eau de boisson), et d'autre part, le risque de cancer du tube digestif quelle qu'en soit la localisation.

### 11.2.3. Intestin, colon et rectum

Six articles ont été identifiés portant sur le risque de cancer colorectal (CRC) dont 4 sont issus de données de cohorte (Chazelas et al., 2022; Etemadi et al., 2018; Jones et al., 2019; Schullehner et al., 2018) et 2 d'enquêtes cas-témoins (Espejo-Herrera et al., 2016a; Fathmawati et al., 2017).

L'étude de Schullehner et al. (2018) conduite au Danemark à partir des registres de santé, a rapporté une augmentation du risque de CRC chez les personnes exposées à des niveaux élevés de nitrates dans l'eau potable (HR = 1,16, IC 95 % : 1,08-1,25). Cette augmentation de risque était observée à partir de teneurs supérieures à  $3,87 \text{ mg L}^{-1}$ , bien en dessous de la norme actuelle de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  pour l'eau potable. L'étude inclut peu de facteurs d'ajustement et on peut noter l'absence de prise en compte de la consommation d'eau avec une exposition estimée uniquement sur la qualité de l'eau au niveau géographique.

L'étude de Etemadi et al. (2018) était basée sur les données de 3 cohortes américaines. Les données de consommations, collectées par un questionnaire d'histoire alimentaire, ont été jumelées à une table de concentration. Les ajustements des modèles étaient multiples (sexe, âge, antécédents familiaux de cancer colorectal chez des parents au premier degré, utilisation régulière d'aspirine et/ou d'autres AINS au cours des 12 mois précédant l'inscription, origine ethnique, niveau d'éducation, tabagisme, indice de masse corporelle, la consommation d'alcool et les apports quotidiens en fibres, calcium et énergie totale). Au cours des 13,8 années de suivi (médiane), 6640 cas de cancer colorectal ont été enregistrés. Dans cette étude incluant plus de 400000 participants, les nitrates issus des charcuteries étaient associés au risque de CRC (HR = 1.18, IC95% : 1.08 -1.28), sans variation entre les différents sites

anatomiques. Les nitrites issus des charcuteries étaient également associés au risque de CRC avec une ampleur d'effet plus faible (HR = 1,11, IC95% : 1,02 -1,20).

L'étude de Jones et al. (2019), a porté sur les femmes ménopausées de la cohorte Iowa (description des données dans l'étude de Buller et al. (2021) du chapitre tube digestif). Cette étude incluait 15910 femmes, et 624 et 158 cas de cancer du côlon et rectum ont été enregistrés respectivement. La relation entre l'exposition à long terme aux nitrates ou le nombre d'années d'exposition à des teneurs dans l'eau > 5 mg L<sup>-1</sup> et le risque de cancer du côlon ou du rectum était non linéaire avec une significativité rapportée seulement pour le 3<sup>ème</sup> quintile (concentration en nitrates, de 0,81 à 1,35 mg L<sup>-1</sup> comparé au Q1 (≤ 0,36 mg L<sup>-1</sup>) : HR Q3 vs. Q1=1,32, IC95% : 1,03–1,69). Aucune association n'était rapportée entre le risque de cancer du côlon ou du rectum et l'apport total en nitrates alimentaires (toutes sources) ou en nitrites alimentaires (toutes sources), et nitrites d'origine végétale, animale ou issus de la viande transformée.

L'étude italienne de cas témoins (Espejo-Herrera et al., 2016a) incluait 2371 cas et 3530 témoins, l'exposition aux nitrates a été évaluée à partir de deux sources de données :

- La qualité de l'eau de boisson avec construction d'un historique en fonction des niveaux locaux ;
- La consommation alimentaire (jumelage avec des données de concentration).

Le niveau d'ajustement était important avec la prise en compte des facteurs suivants : sexe, âge, zone d'étude et niveau d'éducation, tabagisme, activité physique, indice de masse corporelle (IMC), antécédents 1<sup>er</sup> degré de CCR, utilisation d'AINS, apport énergétique, fibres, alcool et modulateurs endogènes de la nitrosation (apport en vitamine C, vitamine E, viande rouge, viande transformée et antécédents d'ulcère gastrique). Le risque de CRC selon une exposition alimentaire aux nitrates élevée (> 10 versus 5 mg/jour) était associée à une augmentation de risque de CRC, estimé par un OR de 1,49 (IC95 : 1,24 - 1,78) dans l'ensemble de la population, 1,50 (IC95% : 1,21 - 1,87) chez les hommes et 1,41 (IC95% : 1,04 -1,91) chez les femmes.

Dans les analyses stratifiées, des ORs (IC95 %) plus élevés ont été trouvés dans les groupes ayant ingéré à la fois le plus de nitrates par l'eau et consommé le plus de viande rouge, et ce surtout chez les hommes : 1,71 (IC95% : 1,30 - 2,26). Par ailleurs, les participants présentant un régime alimentaire faiblement vecteur de nitrates et riche en vitamine E présentaient un risque plus faible de CRC (0,73, IC95% : 0,59 - 0,89). Un apport en nitrates d'origine animale était associé au risque de cancer rectal (1,55, IC95 : 1,17 - 2,05) mais aucune association n'était détectée pour le côlon. L'ingestion issue de l'alimentation totale (y compris l'eau) ou des légumes a conduit à des associations nulles ou inverses pour les deux sites de cancer<sup>64</sup>.

Dans l'étude française NutriNet-Santé portant sur 101 056 participants (Chazelas et al., 2022) et suivis pendant 6,7 ans, l'exposition aux nitrites/nitrates a été estimée par jumelage de données de consommation alimentaire (issues d'enregistrements alimentaires répétés sur 24 heures), à des bases de données de concentrations des aliments (et eau) en nitrites et nitrates. Les sources naturelles et ajouts en tant qu'additifs (nitrite de potassium (E249), nitrite de sodium (E250), nitrate de sodium (E251) et nitrate de potassium (E252)) ont été explorées. L'exposition par la consommation d'eau a été estimée par des données de contrôle sanitaire régionale de l'eau du robinet. Au total, 268 cas de cancer colorectal ont été diagnostiqués au cours du suivi. Les modèles étaient ajustés pour les antécédent familiaux de cancer colorectal chez les parents au premier degré (oui ou non), le niveau d'éducation, le statut tabagique, le

<sup>64</sup> Mentionner tel que par les auteurs, sans données chiffrées.

statut ménopausique, l'activité physique, l'indice de masse corporelle, l'apport énergétique total, la consommation d'alcool, l'apport en fibres alimentaires, les apports en sodium et fer héminique. Des ajustements supplémentaires sur les apports en antioxydants, l'hormonothérapie au cours de la ménopause ne modifiaient pas les associations. Aucune association n'a été observée entre l'exposition aux nitrates, aux nitrites (naturels ou provenant de l'utilisation d'additifs) et le risque de cancer colorectal.

Une étude indonésienne de cas-témoins (Fathmawati et al., 2017) incluait 75 cas et 75 contrôles non appariés. Il est donc à noter que les contrôles étaient plus éduqués et que les cas étaient plus âgés, avaient plus souvent un antécédent familial de cancer, plus souvent diabétique et plus souvent fumeurs. Les nitrates de l'eau de boisson ont été considérés. L'exposition a été estimée à partir de l'analyse d'échantillons d'eau consommée par les individus (1 seul dosage pratiqué). Un questionnaire alimentaire court (18 items) a également été proposé aux participants. Une association était observée entre l'exposition aux nitrates par l'eau de boisson et le risque de cancer colorectal ( $OR_{>50 \text{ mg L}^{-1} \text{ vs. } \leq 50 \text{ mg L}^{-1}} = 2,82$ , IC95% : 1,08 – 7,40) même après ajustement pour les apports en protéines, au tabagisme, à l'âge et aux antécédents familiaux de cancer. La qualité de l'eau n'était pas jumelée à la consommation.

Dans l'étude de Buller et al. (2021), portant sur la cohorte de femmes ménopausées Iowa, les apports moyens et élevés en nitrites alimentaires étaient associés à un moindre risque de cancer de l'intestin grêle ( $HR_{T2 \text{ vs. } T1} = 0,36$ , IC : 0,14-0,94) mais la relation n'était pas linéaire.

#### **Rappel EFSA :**

Dans l'ensemble, l'EFSA (2017a,b) a conclu qu'il n'y avait pas suffisamment de preuves pour établir un lien entre les nitrites alimentaires et le cancer du côlon, qu'il y avait quelques preuves pour établir un lien entre les nitrates et les nitrites provenant de la viande transformée et le cancer du côlon, et qu'il y avait des preuves que l'apport estimé de *N*-nitrosodiméthylamine préformée était associé à un risque accru de cancer colorectal ou de ses sous-types.

#### **Méta-analyse :** Hosseini et al. (2021)

Quinze articles de cohorte prospective et de cas-témoins ont été inclus dans cette revue systématique et cette méta-analyse. Au total, 2 573 524 participants dont l'âge variait entre 20 et 85 ans ont été inclus. Le nombre total de cas de cancer colorectal était de 38 848. La consommation de **nitrates** alimentaires était associée à un risque de cancer colorectal ( $HR_{\text{cat. Elevée vs. basse}} = 1,13$  ; IC95% : 1,04-1,23,  $I^2$ <sup>65</sup> 38% ;  $P = 0,08$ ). Les **nitrites** alimentaires n'étaient pas significativement associés au risque de cancer colorectal ( $HR_{\text{cat. Elevée vs. basse}} = 1,07$  ; IC à 95% : 0,95-1,21,  $I^2 = 61,6\%$  ;  $P = 0,005$ ). L'exposition aux nitrates présents dans l'eau n'était pas associée à un risque accru de cancer colorectal ( $HR_{\text{cat. Elevée vs. basse}} = 1,04$  ; IC95 % : 0,92-1,19,  $I^2 = 64,7\%$  ;  $P=0,002$ ).

Une association positive a été observée entre d'une part, l'exposition aux nitrates présents dans l'eau de boisson, et d'autre part, le risque de cancer de l'intestin et de cancer colorectal. Une association positive a été observée dans la méta-analyse ainsi que dans l'un des deux articles analysés entre d'une part, l'exposition aux nitrates provenant ou non de l'utilisation d'additifs, présents dans l'alimentation (hors eau de boisson), et d'autre part, le risque de cancer de l'intestin et colorectal.

<sup>65</sup>  $I^2$  : indicateur d'hétérogénéité entre les résultats calculé dans les méta-analyses

Aucune association n'a été observée dans la méta-analyse, par l'EFSA ainsi que dans les articles analysés, entre d'une part, l'exposition aux nitrites provenant ou non de l'utilisation d'additifs, présents dans l'alimentation (hors eau de boisson), et d'autre part, le risque de cancer de l'intestin et colorectal.

Les conclusions de l'EFSA concernant l'association positive entre d'une part, l'exposition au NDMA par l'alimentation et d'autre part, le risque de cancer de l'intestin et colorectal ne sont pas révisées en l'absence de nouvelles données.

Aucune association n'a été observée entre d'une part l'exposition aux nitrates, nitrites présents dans l'alimentation d'origine végétale et d'autre part, le risque de cancer de l'intestin et colorectal.

Une association positive est observée entre d'une part l'exposition aux nitrates, nitrites dans la viande transformée et d'autre part, le risque de cancer de l'intestin et de cancer colorectal.

#### 11.2.4. Pancréas

Deux études, l'une cas-témoins (Zheng et al., 2019) et l'une de cohorte (Quist et al., 2018), ont porté sur le risque de cancer du pancréas.

L'étude de Zheng et al. (2019) est une étude de cas-témoins qui incluait 957 cas et témoins. Il est à noter que les témoins sont des personnes atteintes de cancer autre que le pancréas, associés le plus souvent au tabagisme. L'exposition aux composés nitrosés a été estimée par appariement de données de consommation et de concentrations. Les expositions incluaient : composés N-nitrosés totaux, nitrosamines (NDEA, NDMA, NDBA, NPYR), nitrates, et nitrites. Une association positive entre l'exposition à la NDEA et le risque de cancer du pancréas a été rapportée (OR<sub>Q4 vs. Q1</sub> = 2,28, IC95% : 1,71 - 3,04). Les ajustements considéraient l'apport énergétique, l'âge, le sexe, la « race » (ethnicité), le niveau d'éducation, l'IMC, la consommation d'alcool et les antécédents de diabète, et le tabagisme. Ce résultat était observé pour les sources végétales (OR<sub>Q4 vs. Q1</sub> = 1,93, IC95% : 1,44 - 2,60) et animales (OR<sub>Q4 vs. Q1</sub> = 1,35, IC95% : 1,03 - 1,78). Par ailleurs une association avec l'exposition au NDMA de source végétale était observée (OR<sub>Q4 vs. Q1</sub> = 1,93, IC95% : 1,42 - 2,61, Ptrend < 0,0001) mais aucune association pour la NDMA d'origine animale. Aucune association entre l'exposition aux nitrates et le risque de cancer du pancréas n'était observé. En revanche, une réduction du risque de cancer du pancréas était observée chez les participants présentant des apports en nitrites par des aliments d'origine animale, plus élevés (OR<sub>Q4 vs. Q1</sub> = 0,68, IC95% : 0,51 – 0,91).

La seconde étude de Quist et al. (2018) portait sur les données de la cohorte Iowa incluant des femmes ménopausées et considérait de nombreux facteurs d'ajustement (âge, activité physique, tabagisme, IMC, consommation d'alcool, prise d'œstrogènes, diabète, âge à la ménopause, profession, lieu de résidence (rural ou ville), prise de NSAID et d'aspirine).

De même que dans l'étude de Jones et al. (2019) sur le risque de cancer colorectal, deux analyses ont été conduites sur

- La qualité de l'eau au moyen des données publiques sur la période 1955-1988, jumelées aux données de consommation de cette eau, qui ont permis d'estimer des expositions moyennes aux nitrates. L'exposition à long terme et le nombre d'années d'exposition à des teneurs élevées ont été considérées.
- L'exposition via l'alimentation a également été estimée au moyen d'un FFQ jumelé à des données de concentration issues de la littérature.

Aucune association n'a été détectée entre les concentrations moyennes en nitrates dans l'eau et le cancer du pancréas (HR<sub>P95vsQ1</sub>=1,18, IC95% : 0,52 - 2,67). Toutefois une association entre le risque de cancer du pancréas et la consommation pendant 1 à 4 ans d'eau présentant une concentration en nitrates > 5 mg L<sup>-1</sup> était observée (HR<sub>4 ans vs 0 an</sub> = 1,66, IC95% : 1,22 - 2,44), mais cette association disparaissait pour des durées de consommation > 4 ans.

Aucune association n'a été détectée entre le risque de cancer du pancréas et l'apport total en nitrates via les aliments, ou l'apport total en nitrites via les aliments, ou de nitrites via les aliments d'origine végétale. On peut noter une association "suggestive" avec les apports en nitrites via les aliments d'origine animale après ajustement complémentaire pour les graisses saturées (HR<sub>P95vsQ1</sub>=1,65, IC95% : 0,84 - 3,22, p=0,13). Enfin une association positive entre des niveaux élevés de nitrites (> 0,18 mg par jour de nitrites) via la viande transformée et le risque de cancer du pancréas était observée (HR<sub>P95vsQ1</sub>=1,73, IC95% : 1,05 - 2,85, p trend = 0,05). Cette association était atténuée après ajustement pour les graisses saturées (HR<sub>P95vsQ1</sub>=1,66, IC95% : 1,00 - 2,75, p trend = 0,05).

### **Rappel EFSA**

Dans l'ensemble, l'EFSA (2017a,b) a conclu qu'il n'y avait pas suffisamment de preuves pour établir un lien entre la consommation de nitrites alimentaires et/ou de nitrosamines et le cancer du pancréas.

Aucune association n'a été observée entre d'une part l'exposition aux nitrates présents dans l'eau de boisson et d'autre part, le risque de cancer du pancréas.

Aucune association n'a été observée entre d'une part, l'exposition aux nitrates provenant ou non de l'utilisation d'additifs, présents dans l'alimentation (hors eau de boisson), et d'autre part, le risque de cancer du pancréas.

Aucune association n'a été observée entre d'une part, l'exposition aux nitrites provenant ou non de l'utilisation d'additifs, présents dans l'alimentation (hors eau de boisson), et d'autre part, le risque de cancer du pancréas.

Une association positive est observée entre d'une part, l'exposition aux nitrites présents dans la viande transformée et d'autre part, le risque de cancer du pancréas dans une seule étude ce qui ne permet pas de conclure.

Une association positive est observée entre d'une part, l'exposition aux NDEA et NDMA provenant ou non de l'utilisation d'additifs, présents dans l'alimentation (hors eau de boisson), et d'autre part, le risque de cancer du pancréas dans une seule étude, ce qui ne permet pas de conclure.

### **11.2.5. Foie et voies biliaires**

Une étude cas témoins (Zheng et al., 2021) et une étude cohorte (Buller et al., 2021) ont été conduites.

L'étude de Buller et al. (2021)<sup>66</sup> conduite dans la cohorte de l'Iowa a documenté le risque de cancer du foie. Cette étude porte sur un échantillon de 33964 femmes ménopausées et 31 et 58 cas de cancer du foie et des voies biliaires sont respectivement survenus au cours du suivi (21.6 ans en moyenne). L'exposition aux nitrates et nitrites a été estimée par jumelage de données de consommation et de concentration issue de la littérature. L'association entre les nitrites alimentaires et le cancer du foie était non significative (HR<sub>haut vs. bas</sub> = 3,37, IC95% :

<sup>66</sup> L'étude de Buller est décrite dans le chapitre tube digestif

0,93 - 12,21). Aucune association n'était observée avec la consommation d'eau provenant de puits, ou avec les nitrates. Toutefois, le niveau de consommation d'eau n'était pas considéré. L'étude est de qualité avec une prise en compte des facteurs d'ajustement.

Dans cette même étude, des associations inverses significatives entre les nitrites alimentaires et les cancers des voies biliaires (vésicule biliaire et canaux biliaires ; HR<sub>Q4 vs. Q1</sub> = 0,37, IC95% : 0,16 - 0,85) et de la vésicule biliaire (HR<sub>Q4 vs. Q1</sub> = 0,30, IC95% : 0,09-0,96) ont été documentées. Une association inverse avec le risque de cancer des voies biliaires était retrouvée pour les nitrites d'origine végétale (HR<sub>Q4 vs. Q1</sub> = 0,32, IC95% : 0,12 - 0,86 ; HR<sub>continu</sub> = 0,49, IC : 0,24 - 0,98).

Une étude cas-témoins américaine a porté sur les cas de carcinome hépatocellulaire (Zheng et al., 2021). Les cas étaient identifiés dans le service d'oncologie médicale gastro-intestinale Cancer Center de l'Université du Texas.

Les témoins étaient des participants sans cancers, conjoints de patients ayant un cancer autre que cancer du foie, gastro-intestinaux, pulmonaires ou de la tête et du cou. Ainsi 827 cas et 1013 témoins ont été recrutés entre 2004 et 2018. Dans cette étude cas-témoins, l'apport en composés N-nitrosés a été calculé en jumelant des données de consommations alimentaires collectées par questionnaires de fréquence à une base de données de concentrations en composés N-nitrosés des aliments. Les facteurs de confusion considérés incluaient : l'apport calorique total, l'âge, le sexe, l'ethnie, le niveau d'éducation, l'IMC à l'âge de 30 ans, la consommation d'alcool, les antécédents de diabète, le tabagisme et les antécédents familiaux de cancer du foie. Dans les modèles portant sur les sources alimentaires, l'apport alimentaire total en aliments d'origine végétale ou animale, la consommation de viande rouge, de viande transformée, et de fruits et légumes ont été considérés.

Après ajustement pour les facteurs de confusion, une consommation plus élevée de NDEA d'origine végétale (OR<sub>Q4 vs. Q1</sub> = 1,58, IC95% : = 1,03-2,41), NDMA provenant de sources végétales (OR<sub>Q4 vs. Q1</sub> = 1,54, IC95% : = 1,01 - 2,34), et NPIP (OR<sub>Q4 vs. Q1</sub> = 2,52, IC95% : = 1,62 - 3,94) était associée à un risque accru de carcinome hépatocellulaire. Aucune association n'a été observée avec l'apport en nitrates ou en composés N-nitrosés total. Une interaction forte était détectée entre l'apport en composés N-nitrosés et le statut positif au virus de l'hépatite.

#### **Rappel EFSA**

Dans l'ensemble, l'EFSA (2017a,b) a conclu que les études de cas-témoins et de cohortes n'ont pas prouvé l'existence d'une association entre un risque accru de cancer du foie et l'exposition aux nitrates ou aux nitrites.

Aucune association n'a été observée entre d'une part, l'exposition aux nitrates présents dans l'eau de boisson et d'autre part, le risque de cancer du foie et des voies biliaires.

Aucune association n'a été observée entre d'une part, l'exposition aux nitrates provenant ou non de l'utilisation d'additifs, présents dans l'alimentation (hors eau de boisson), et d'autre part, le risque de cancer du foie et des voies biliaires.

Une association inverse est observée entre d'une part, l'exposition aux nitrites provenant ou non de l'utilisation d'additifs, présents dans l'alimentation (hors eau de boisson), et d'autre part, le risque de cancer hépatiques dans une étude et des voies biliaires dans une autre, ce qui ne permet pas de conclure.

Une association inverse est observée entre d'une part, l'exposition aux nitrites présents dans l'alimentation d'origine végétale et d'autre part, le risque de cancer du foie et des voies biliaires dans une étude, ce qui ne permet pas de conclure.

Une association positive est observée entre d'une part, l'exposition aux NDEA et NDMA présents dans l'alimentation d'origine végétale et d'autre part, le risque de cancer du foie dans une seule étude ce qui ne permet pas de conclure.

### 11.2.6. Estomac

L'association entre l'exposition aux nitrites/nitrates et le risque de cancer de l'estomac a été étudiée dans une étude de cohorte (Buller et al., 2021) et une étude cas-témoins (Xu et al., 2015).

Dans l'étude de cohorte de Buller et al. (2021), incluant 33964 femmes ménopausées et 84 cas de cancer de l'estomac (21.6 ans en moyenne), l'association entre les nitrites alimentaires et le risque de cancer de l'estomac est non significative. En revanche, l'apport en nitrites provenant de viandes transformées était positivement associé au risque de cancer de l'estomac (HRQ4vQ1 = 2,24, IC95% : 1,18 - 4,3 ; HR continu = 1,1, IC95% : 1,01 - 1,20). Aucune association n'était observée avec l'exposition aux nitrates par la consommation d'eau. Une seconde étude a été conduite en Chine et était basée sur la cohorte de Shangaï (Xu et al., 2015) incluant plus de 18000 hommes âgés de 45 à 64 ans. Il s'agit d'une étude cas témoins nichée (191 cas et 569 témoins). Les témoins et les cas ont été appariés sur les facteurs suivants : âge, année de prélèvement et lieu de résidence.

Les hommes ont répondu à un questionnaire alimentaire et des analyses d'urine ont été effectuées. Les niveaux urinaires élevés de NOCs individuels (acide *N*-nitroso-2-méthylthiazolidine-4-carboxylique (NMTCA), *N*-nitrosoproline (NPRO), *N*-nitrososarcosine (NSAR), acide *N*-nitrosothiazolidine-4-carboxylique (NTCA)), nitrites ou nitrates n'étaient pas associés au risque de cancer gastrique, après ajustement sur le tabagisme, la consommation d'alcool, le statut sérologique *Helicobacter pylori*, et les concentrations urinaires ou sériques en antioxydants. Au global, les concentrations urinaires de composés nitrosés n'étaient pas associées au risque de cancer de l'estomac. Une stratification des analyses sur le statut vis-à-vis de l'infection à *H. pylori* a été conduite. Aucune association n'était observée chez les participants infectés, alors que chez les non infectés, une augmentation du risque de cancer de l'estomac était observée chez les participants présentant des nitrates urinaires supérieurs à 285 mg/g créatinine (OR : 4.82 : IC95% 1.05 - 22.17).

#### **Rappel EFSA**

Dans l'ensemble, l'EFSA (2017a) a conclu que :

- il existe des preuves d'une association entre l'exposition aux nitrites alimentaires et un risque accru de cancer de l'estomac (pas d'association significative dans les études de cohorte et association significative dans les études cas-témoins).
- il n'y avait pas suffisamment de preuves que la *N*-nitrosodiméthylamine préformée soit associée à un risque accru d'adénocarcinome gastrique (hors cardia).

#### **Méta-analyse** : Zhang et al. (2019a)

Dix-huit études cas-témoins et six études de cohorte prospectives portant sur 800 321 participants ont été incluses dans cette étude. Les résultats sommaires indiquent que la consommation de nitrites la plus élevée (odds ratio = 1,27, IC95% : 1,03 - 1,55 ; P=0,022) ou modérée (OR = 1,12, IC95% : 1,01 - 1,26 ; P=0,037) était associée à un risque plus élevé de cancer gastrique. Cependant, les auteurs ont noté que des apports élevés (OR = 0,81 ; IC95% : 0,68 - 0,97 ; P=0,021) ou modérés (OR = 0,86, IC95% : 0,75 - 0,99 ; P=0,036) en nitrates étaient associés à un risque réduit de cancer gastrique. Ces associations différaient

lorsqu'elles étaient stratifiées selon l'année de publication, la conception de l'étude, le pays, le pourcentage de participants masculins, l'évaluation de l'exposition, le modèle ajusté et la qualité de l'étude. Ces résultats suggèrent qu'une consommation élevée ou modérée de nitrites est associée à un risque plus élevé de cancer gastrique, tandis qu'une consommation élevée ou modérée de nitrates est corrélée à un risque plus faible de cancer gastrique.

Aucune association n'a été observée entre d'une part, l'exposition aux nitrates présents dans l'eau de boisson et d'autre part, le risque de cancer de l'estomac.

Aucune association n'a été observée entre d'une part, l'exposition aux nitrates provenant ou non de l'utilisation d'additifs, présents dans l'alimentation (hors eau de boisson), et d'autre part, le risque de cancer de l'estomac.

Les conclusions de l'EFSA concernant l'association positive entre d'une part, l'exposition aux nitrites par l'alimentation et d'autre part, le risque de cancer de l'estomac ne sont pas révisées au vu des nouvelles données.

Aucune association n'a été observée entre d'une part, l'exposition au NDMA présent dans l'alimentation (hors eau de boisson) et d'autre part, le risque de cancer de l'estomac (depuis EFSA (2017a)), les conclusions de l'EFSA ne sont pas révisées au vu des nouvelles données.

Une association positive est observée entre d'une part, l'exposition aux nitrites présents dans la viande transformée et d'autre part, le risque de cancer de l'estomac dans une seule étude, ce qui ne permet pas de conclure.

### 11.2.7. Œsophage

Le risque de cancer de l'œsophage a été estimé dans deux études, l'une de cohorte (Buller et al., 2021) et l'autre de cas témoins (Zhang et al., 2018).

Dans l'étude de cohorte de Buller et al. (2021), portant sur 33964 femmes ménopausées dont 36 ont développé un cancer de l'œsophage au cours des 21.6 ans de suivi, l'association entre les nitrites alimentaires et le risque de cancer de l'œsophage est non significative. En revanche, l'apport en nitrites provenant de viandes transformées était inversement associé au cancer de l'œsophage ( $HR_{T2 \text{ vs. } T1} = 0,17$ , IC95% : 0,06-0,51 ;  $HR_{\text{continu}} = 0,90$  IC95% : 0,83-0,97). Aucune association n'était observée avec l'exposition aux nitrates par la consommation d'eau.

Dans l'étude de Zhang et al. (2018), 100 cas présentant des lésions précancéreuses de l'œsophage (par screening et validation biologique) ont été appariés sur l'âge à 100 témoins non malades (d'autres cancers, de maladies cardiovasculaires et cérébrovasculaires, la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie, des problèmes de mobilité et d'autres maladies susceptibles d'affecter l'alimentation). Des données de consommation ont été collectées sur 3 jours consécutifs dont 1 jour de week-end par repas dupliqué (pour la prise alimentaire) ; puis un mélange contenant tous les aliments identifiés a été constitué afin d'y analyser la teneur en nitrites et évaluer l'exposition globale. Le groupe témoin considérait des résidents qui avaient subi un examen endoscopique de l'œsophage sans hyperplasie anormale. Une association positive entre le risque de lésions et la consommation de nitrites via l'alimentation a été observé ( $OR_{Q4 \text{ vs. } Q1} = 2,26$ , IC95% : 1,02, 5,03). Chez les cas, 76% dépassaient la DJA des nitrites de  $0,07 \text{ mg (kg pc)}^{-1} \text{ j}^{-1}$  avec une différence significative ( $p < 0,05$ ) en comparaison avec les témoins (59%).

**Rappel EFSA :**

Dans l'ensemble, l'EFSA (2017a,b) a considéré que les informations étaient encore rares pour le cancer de l'œsophage, mais ses conclusions provisoires basées sur les conceptions d'études les plus solides étaient les suivantes :

- il n'y a pas suffisamment de preuves que les nitrites alimentaires soient liés au risque accru de carcinome épidermoïde de l'œsophage (ESCC), ni aux adénocarcinomes de l'œsophage (EAC), car une association était observée uniquement chez les hommes et ce dans une seule étude ;
- les preuves de l'association de la *N*-nitrosodiméthylamine préformée dans l'alimentation à un risque accru de carcinome épidermique de l'œsophage, mais pas de l'adénocarcinome de l'œsophage, sont insuffisantes car elles ne reposent que sur une seule grande étude de cohorte.

Aucune association n'a été observée entre d'une part, l'exposition aux nitrates présents dans l'eau de boisson et d'autre part, le risque de cancer de l'œsophage.

Une association positive entre d'une part, l'exposition aux nitrites provenant ou non de l'utilisation d'additifs, présents dans l'alimentation (hors eau de boisson), et d'autre part, le risque de cancer de l'œsophage est observé dans une seule étude parmi les deux disponibles, ce qui ne permet pas de conclure, ni de remettre en cause les conclusions de l'EFSA.

Une association inverse est observée entre d'une part, l'exposition aux nitrites présents dans la viande transformée et d'autre part, le risque de cancer de l'œsophage dans une seule étude, ce qui ne permet pas de conclure.

**11.2.8. Sein**

Trois études, deux de cohorte (Chazelas et al., 2022; Inoue-Choi et al., 2016) et une étude cas-témoin (Espejo-Herrera et al., 2016b) ont exploré le risque de cancer du sein.

Dans l'étude de Inoue-Choi, 196 742 femmes ménopausées ont été suivies dans 8 états des USA et 9305 cas de cancer du sein ont été enregistrés sur une période de 9 ans. Les différents stades de cancer du sein et les récepteurs aux œstrogènes/progestérone (ER+/PR+) ont été considérés. Les apports alimentaires, évalués à l'aide d'un questionnaire de fréquence alimentaire, étaient jumelés à une table de concentrations. Les modèles étaient ajustés sur les consommations de viande, les apports en nitrites et en fer héminique et sur l'apport énergétique. L'exposition aux nitrites via les aliments d'origine animale (toutes sources) et des charcuteries n'était pas associée au risque de cancer du sein chez les femmes en pré-ménopause, quel que soit le type de cancer : au global, *in situ*, localisé, régional, ER+/PR+ ou ER-/PR-. Un apport élevé en nitrites provenant de la viande transformée était positivement associé à un risque plus élevé de cancer « localisé » (HR<sub>Q5 vs. Q1</sub> = 1,23, IC à 95 % : 1,09–1,39).

Une étude a été conduite en France chez 101 056 participants de la cohorte française NutriNet-Santé (Chazelas et al., 2022) (Chazelas et al., 2022). Ils ont été suivis depuis 2009 (suivi médian de 6,7 ans) et l'exposition aux nitrites/nitrates a été estimée par jumelage de données de consommations alimentaires (issues d'enregistrements alimentaires répétés sur 24 heures), à des bases de données de concentrations des aliments (et eau) en nitrites et nitrates. Les sources naturelles et ajouts en tant qu'additifs (nitrite de potassium (E249), nitrite de sodium (E250), nitrate de sodium (E251) et nitrate de potassium (E252)) ont été explorés. L'exposition par la consommation d'eau a été estimée par des données de contrôle sanitaire

régionale de l'eau du robinet. Au total, parmi les 79 284 femmes, 3311 cas incidents de cancer (dont 966 cancers du sein, 381 en préménopause et 585 en postménopause) ont été diagnostiqués au cours du suivi. Les modèles étaient ajustés pour les antécédent familiaux de cancer du sein chez les parents au premier degré (oui ou non), le niveau d'éducation, le statut tabagique, le statut ménopausique, l'activité physique, l'indice de masse corporelle, l'apport énergétique total, la consommation d'alcool, l'apport en fibres alimentaires, les apports en sodium et en fer héminique alimentaire. Des ajustements supplémentaires sur les apports en antioxydants, l'hormonothérapie au cours de la ménopause ne modifiaient pas les associations.

Les participants ayant des apports alimentaires en nitrates sous forme d'additifs élevés présentaient un risque plus élevé de cancer du sein (HR = 1,24, IC 95% = 1,03-1,48, p=0,02), plus spécifiquement pour le nitrate de potassium.

Dans l'étude de Espejo-Herrera et al. (2016b), 1245 cas ont été appariés à 1520 témoins issus de la population générale recrutés dans 8 régions espagnoles. Un historique de la région de résidence et de la consommation d'eau depuis l'âge de 18 ans a été construit pour évaluer l'exposition. Les apports en nitrates alimentaires, ont été estimés par des questionnaires de fréquence alimentaires, appariés à des données de concentration. De nombreux facteurs d'ajustement potentiels ont été explorés et seules les variables effectivement associées dans l'étude ont été considérées (âge, zone d'étude, éducation, IMC, antécédents familiaux de cancer du sein, âge au premier accouchement, utilisation de contraceptifs oraux, apport énergétique et âge à la ménopause pour les femmes ménopausées). Aucune association n'a été observée entre le risque de cancer du sein (indépendamment du statut ménopausique) et l'exposition aux nitrates par l'eau ou l'alimentation et ce quelle que soit la source, animale ou végétale. En revanche, chez les femmes ménopausées, le risque de cancer du sein était plus élevé chez les participantes qui avaient une exposition élevée aux nitrates de l'eau (> 6 vs. < 2,6 mg par jour) et une consommation élevée de viande rouge ( $\geq 20$  vs. < 20 g/ par jour) comparé aux femmes présentant une faible consommation de nitrates et de viande rouge (OR = 1,64, IC95% : 1,08 - 2,49). Aucune association n'a été observée avec l'exposition aux nitrates d'origine alimentaire. Conclusions : les nitrates ingérés dans l'eau sont associés au cancer du sein uniquement chez les femmes ménopausées qui consomment beaucoup de viande rouge.

#### **Rappel EFSA**

Dans l'ensemble, l'EFSA (2017a,b) a conclu que les preuves d'une association entre l'exposition aux nitrites alimentaires et le risque accru de cancer du sein étaient insuffisantes.

Aucune association n'a été observé entre d'une part, l'exposition aux nitrates présents dans l'eau de boisson et d'autre part, le risque de cancer du sein.

Aucune association n'a été observée entre d'une part, l'exposition aux nitrates provenant ou non de l'utilisation d'additifs, présents dans l'alimentation (hors eau de boisson), et d'autre part, le risque de cancer du sein.

Une association positive est observée entre d'une part, l'exposition aux nitrates présents dans la viande transformée et d'autre part, le risque de cancer du sein dans une seule étude, ce qui ne permet pas de conclure.

Aucune association n'a été observée entre d'une part, l'exposition aux nitrites présents dans l'alimentation d'origine animale et d'autre part, le risque de cancer du sein.

Une association positive est observée entre d'une part, l'exposition aux nitrites présents dans la viande transformée et d'autre part, le risque de cancer du sein dans une seule étude, ce qui ne permet pas de conclure.

### 11.2.9. Ovaires

Seule une étude de cohorte (Inoue-Choi et al., 2015), sur une durée de suivi de 12 ans, a considéré le risque de cancer de l'ovaire (n=315) dans la cohorte de l'Iowa incluant 28,555<sup>67</sup>. Une association a été montrée pour des teneurs en nitrates dans l'eau de 1,09 à 2,97 mg L<sup>-1</sup> (HR = 1,66, CI95% : 1 - 2.76) et 2,98-25,34 mg L<sup>-1</sup> (HR= 2.34, CI95% : 1,42 - 3,84).

#### **Rappel EFSA**

Dans l'ensemble, l'EFSA (2017a,b) a conclu qu'il n'y avait pas suffisamment de preuves pour établir un lien entre l'exposition aux nitrites alimentaires et le risque accru de cancer de l'ovaire.

#### **Méta-analyse** : Khodavandi et al. (2021)

Dans cette méta-analyse, les cas de cancer de l'ovaire à faible et haut risque ont été considérés à partir des données de 97 études de cohorte. L'exposition aux nitrates étaient significativement associés à un risque accru de cancer de l'ovaire.

### 11.2.10. Vessie

Trois études, une de cohorte (Jones et al., 2016) et deux études cas-témoin (Barry et al., 2020; Espejo-Herrera et al., 2015) ont exploré le risque de cancer de la vessie.

L'étude de Jones et al. (2016) a été conduite sur la cohorte Iowa incluant 34708 femmes ménopausées<sup>68</sup>, et portait sur l'exposition aux nitrates de l'eau et le risque de cancer de la vessie (N=258). Les auteurs ont rapporté une augmentation du risque de cancer de la vessie dès lors que l'exposition à des concentrations en nitrates était supérieure à 5 mg NO<sub>3</sub>-N L<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub>-N était supérieure à 4 ans comparé aux femmes non exposées (HR = 1,62, IC95% = 1,06 - 2,47 p trend = 0,03). Cette association était renforcée dans le sous échantillon de femmes ayant eu une exposition à l'eau de boisson publique supérieure à 20 ans (HR Q4 vs. Q1 = 2,38, IC95 % = 1,08 - 5,22 ; p trend = 0,02). Il n'y avait pas d'association entre nitrates ou nitrites.

L'étude cas-témoin de Espejo-Herrera et al. (2015) incluant 531 cas et 556 témoins a considéré l'exposition aux nitrates par les eaux publiques de boisson. Un historique de la région de résidence et de la consommation d'eau depuis l'âge de 18 ans a été construit pour évaluer l'exposition. Les apports en nitrates d'origine alimentaire ont été estimés par des questionnaires de fréquence alimentaires jumelés à des données de concentration. Les ajustements comprenaient âge, sexe, région de l'étude, statut tabagique, utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens, fréquence de miction nocturne, nombre d'années d'activités agricoles, consommation de vitamine C (4,5 ou 5 fois par jour) et diagnostic d'infection urinaire. Des ajustements additionnels ont été testés selon les apports en vitamine E, la consommation de viande et le diagnostic d'ulcère gastrique. Aucune association n'était significative quelle que soit l'exposition considérée. Des stratifications selon la consommation de vitamine C, de vitamine E, de viande et du diagnostic d'ulcère gastrique ne modifiaient pas les associations.

<sup>67</sup> Décrite dans le chapitre tube digestif dans l'article de Buller et al. 2021

<sup>68</sup> Décrite dans le chapitre tube digestif dans l'article de Buller et al. 2021

Une étude de cas-témoins a été conduite en aux Etats-Unis (Barry et al., 2020) afin d'estimer les expositions en nitrate par la consommation d'eau en jumelant des données de concentrations (moyenne des teneurs entre 1970 et le moment du diagnostic) à des données de consommation d'eau collectées par questionnaire de fréquence, et les expositions alimentaires en nitrites par jumelage à des données quantifiées et le risque de cancer de la vessie.

Les cas étaient (30 à 79 ans) des patients présentant un carcinome de la vessie confirmé histologiquement entre 2001 et 2004 pour les résidents du Maine et du Vermont, et entre 2002 et 2004 pour les résidents du New Hampshire et identifiés par les services de pathologie des hôpitaux et les registres du cancer des hôpitaux et de l'État.

Ainsi 1 213 cas ont été appariés à des témoins, sélectionnés de manière aléatoire du même état sur le sexe et l'âge au moment du diagnostic (groupes de 5 ans). Les modèles étaient ajustés sur l'âge, le sexe, l'ethnie, l'état, le statut tabagique, les professions à risques. Enfin, les modèles portant sur l'eau de boisson étaient ajustés sur la concentration en trihalométhane. Des ajustements complémentaires ont été effectués sur les apports en vitamine B12, et vitamine C et sur l'apport énergétique. Un risque de cancer plus élevé était observé chez les participants consommant une eau contenant plus de 2,07 mg L<sup>-1</sup> de nitrates (exprimés en NO<sub>3</sub>-N) comparé à ceux consommant une eau contenant ≤ 0,21 mg L<sup>-1</sup> (OR = 1,5, 95% CI = 0,97–2,3; p-trend = 0,01).

Les apports alimentaires en nitrates et en nitrites provenant de la viande transformée étaient également associés au risque de cancer de la vessie (OR<sub>Q5 vs. Q1</sub> nitrates = 1,4, IC95% = 1,0-2,0 ; p-tendance = 0,04 ; OR<sub>Q5 vs. Q1</sub> pour les nitrites = 1,5, IC à 95% = 1,0-2,1 ; p-tendance = 0,04, respectivement), mais pas pour les autres sources alimentaires ou les totaux. Des interactions ont été observées entre les nitrates de l'eau de boisson et la viande rouge (p-interaction 0,05) et la viande rouge transformée (0,07).

### **Rappel EFSA**

Dans l'ensemble, l'EFSA (2017a,b) a conclu que les preuves d'une association entre l'exposition aux nitrates alimentaires et aux nitrates présents dans l'eau potable et le risque accru de cancer de la vessie étaient insuffisantes.

Dans l'ensemble, l'EFSA a conclu que les preuves d'un lien entre l'exposition aux nitrites et les nitrosamines alimentaires et le risque accru de cancer de la vessie étaient insuffisantes.

### **Méta-analyses : SeyyedSalehi et al. (2021)**

Dix études ont été incluses. La majorité des études de cette méta-analyse ont été réalisées chez des femmes. Aucune association significative entre les apports alimentaires de NOCs, nitrites ou nitrates et le risque de cancer de la vessie n'a été identifiée.

Une association positive est observée entre d'une part, l'exposition aux nitrates présents dans l'eau de boisson et d'autre part, le risque de cancer de la vessie dans deux études sur trois (depuis EFSA 2017). Cependant, de précédentes études épidémiologiques n'ayant pas observé d'association, il n'y a pas de révision de la conclusion de l'EFSA.

Aucune association n'a été observée entre d'une part, l'exposition aux nitrates, nitrites provenant ou non de l'utilisation d'additifs, présents dans l'alimentation (hors eau de boisson), et d'autre part, le risque de cancer de la vessie.

Une association positive a été observée entre d'une part, l'exposition aux nitrates, nitrites présents dans la viande transformée et d'autre part, le risque de cancer de la vessie.

### 11.2.11. Rein

Seule une étude de cohorte (Jones et al., 2017) a considéré le risque de cancer du rein dans la cohorte de l'Iowa<sup>69</sup> incluant 15577 femmes ménopausées et a recensé 315 cas de cancer du rein au cours de 21 ans de suivi. Dans cette étude, une augmentation du risque de cancer du rein était associée au nombre d'années d'exposition aux nitrates de l'eau à des teneurs supérieures à 5 mg NO<sub>3</sub>-N L<sup>-1</sup> (HR = 2,3, IC95% : 1,2 - 4,3, ptrend = 0,33). Aucune association avec l'exposition aux nitrates ou nitrites alimentaires n'a été détectée.

**Rappel EFSA :**

Dans l'ensemble, l'EFSA (2017a) a conclu qu'il n'y avait aucune preuve d'une association entre l'exposition aux nitrates alimentaires et les nitrates présents dans l'eau potable et le risque accru de cancer du rein.

Dans l'ensemble, l'EFSA (2017b) a conclu qu'il n'y avait pas suffisamment de preuves pour établir un lien entre l'exposition aux nitrites et le risque accru de cancer du rein.

Une association positive est observée entre d'une part, l'exposition aux nitrates présents dans l'eau de boisson et d'autre part, le risque de cancer des reins dans une seule étude, ce qui ne permet pas de conclure.

Aucune association n'a été observée entre d'une part, l'exposition aux nitrates, aux nitrites provenant ou non de l'utilisation d'additifs, présents dans l'alimentation (hors eau de boisson), et d'autre part, le risque de cancer des reins.

### 11.2.12. Cancers pédiatriques (SNC, lymphomes, leucémies)

Une étude cas-témoins a été conduite (Stayner et al., 2021) chez des enfants de moins de 15 ans incluant environ 100 témoins pour chaque cas (596 leucémies, 180 lymphomes et 310 cancers du système nerveux central (SNC)) à partir des registres danois de cancer. Les cas et témoins ont été appariés sur le sexe et la date de naissance.

L'exposition est basée sur les teneurs en nitrates des eaux publiques ainsi qu'une estimation de l'exposition aux nitrates de l'eau (sans tenir compte de la consommation) de la mère au cours des périodes de préconception, pré et postnatales. Les modèles sont ajustés sur rang de naissance, poids de naissance, urbain/rural, niveau éducation maternelle, emploi, salaire, tabac, et âge parental. Aucune association entre nitrates et risque de leucémies et de lymphomes n'a été détectée. En revanche, une association a été observée pour le niveau d'exposition le plus élevé (>25 mg/L nitrates) et risque de cancer du système nerveux central pour les périodes de préconception (OR = 1,82, IC95% : 1,09 - 3,04), prénatale (OR = 1,65, IC95% : 0,97 - 2,81) et postnatale (OR = 1,48, IC95% : 0,82 - 2,68), et au cours du 3<sup>ème</sup> trimestre de grossesse (OR = 1,80, IC95% : 1,07 - 3,03).

Une association positive est observée entre d'une part, l'exposition aux nitrates présents dans l'eau de boisson et d'autre part, le risque de cancer pédiatriques dans une seule étude, ce qui ne permet pas de conclure. Il s'agit de la première et seule étude à évaluer l'impact d'une exposition péri-natale aux nitrates sur le risque de cancer chez l'enfant.

<sup>69</sup> La méthode est décrite dans l'article de Buller et al. 2021 décrite dans le Chapitre cancer du tube digestif.

### 11.2.13. Cancer de la prostate

Dans la cohorte NutriNet-Santé (Chazelas et al., 2022), le risque de cancer de la prostate a été estimé chez 21172 hommes suivis pendant 5,5 ans et au cours desquels 400 cas de cancer de la prostate ont été enregistrés. Les mêmes modèles que ceux du cancer du sein ont été conduits et ajustés sur les antécédents familiaux de cancer de la prostate. Les participants ayant des apports alimentaires en nitrites sous forme d'additifs élevés présentaient un risque plus élevé de cancer de la prostate (HR = 1.58, IC95% : 1,14-2,18, p = 0,008), spécifiquement pour le nitrite de sodium.

Aucune association n'a été observée entre d'une part, l'exposition aux nitrates, aux nitrites provenant ou non de l'utilisation d'additifs, présents dans l'alimentation (hors eau de boisson), et d'autre part, le risque de cancer de la prostate.

Aucune association n'a été observée entre d'une part, l'exposition aux nitrates présents dans la viande transformée et d'autre part, le risque de cancer de la prostate.

Une association positive est observée entre d'une part, l'exposition aux nitrites présents dans la viande transformée et d'autre part, le risque de cancer de la prostate dans une seule étude, ce qui ne permet pas de conclure.

### 11.2.14. Autres localisations sans article depuis 2017

- Tête et cou (ORL) :
  - Pas de données disponibles pour les nitrates.
  - Pour les nitrites, une étude de cohorte avait examiné l'association entre l'apport de nitrite et de NDMA et le risque de cancer tête et cou. Dans l'ensemble, le groupe a considéré qu'aucune association significative n'a été observée pour les nitrites ou les NDMA.
- Thyroïde (méta-analyse Said Abasse et al. (2022))
  - Pour les nitrates, dans l'ensemble, le groupe a conclu qu'il n'y avait pas suffisamment de preuves pour établir un lien entre les nitrates alimentaires et le risque de cancer de la thyroïde à partir de trois études de cohortes dont deux rapportaient une association.
  - Pour les nitrites, dans l'ensemble, le groupe a conclu qu'il n'y avait pas suffisamment de preuves pour établir un lien entre les nitrites et le risque de cancer de la thyroïde. D'autres études de cohorte avec des échantillons de grande taille et un bon contrôle des facteurs de confusion, y compris l'exposition aux rayonnements, sont nécessaires.
- Poumon
  - Pour les nitrates, le groupe a conclu qu'il n'y avait pas suffisamment de preuves pour établir un lien entre les nitrates alimentaires et le risque de cancer du poumon (une seule étude).
  - Pour les nitrites, dans l'ensemble, le groupe a pu conclure qu'il n'y avait pas suffisamment de preuves concernant l'association entre l'apport en nitrites et/ou la NDMA et un risque accru de cancer du poumon, car les associations ne sont observées que dans des études cas-témoins.

### 11.2.15. Mortalité par cancer

Deux études de cohorte (Etemadi et al., 2017; van den Brandt, 2019) ont porté sur le risque de mortalité par cancer.

Une étude hollandaise (van den Brandt, 2019) a estimé la mortalité associée à l'exposition aux nitrites issus des aliments. Dans cette étude portant sur plus de 120000 sujets âgés de 55 à 69 ans, les consommations journalières ont été estimées par un questionnaire de fréquence et de nombreux facteurs de confusion ont été considérés (âge, tabagisme, nombre de cigarettes fumées par jour et nombre d'années de tabagisme, antécédents d'hypertension et de diabète diagnostiqués par un médecin, taille, IMC, activité physique non professionnelle, niveau d'éducation, consommation d'alcool, de légumes et de fruits, énergie, utilisation de compléments alimentaires et de THM chez les femmes ménopausées). Le nombre de décès était de 8823 dont 3917 par cancer sur une période de 10 ans. L'exposition aux nitrites a été évaluée par jumelage des données consommations à des données de concentration dans les aliments. Dans cette étude la mortalité globale était associée à l'exposition alimentaire aux nitrites (HR pour des régressions par intervalle, *spline*), mais pas la mortalité par cancer.

Dans une autre étude de cohorte (Etemadi et al., 2017), la mortalité globale et par cause a été estimée dans la NIH-AARP Diet and Health study qui porte sur 536969 participants américains âgés de 50 à 71 ans suivis pendant 16 ans au cours desquels 128524 décès ont été recensés. Les consommations alimentaires ont été recueillies par un questionnaire d'histoire alimentaire afin d'estimer les consommations usuelles individuelles. Les données de consommation alimentaires ont été appariées à des données de concentrations en nitrites et nitrates pour calculer l'exposition. Les causes de décès au cours du suivi ont été validées par jumelage au registre des décès et codés selon la classification internationale des maladies- 10ème édition. Les modèles de Cox ont été ajustés sur le sexe, l'âge, le statut marital, l'origine ethnique, le niveau d'éducation, un indice composite de déprivation, la santé perçue, les antécédents de maladie cardiaque, d'accident vasculaire cérébral, de diabète et de cancer au départ, le tabagisme, l'IMC, l'activité physique intense, les activités habituelles journalières, la consommation d'alcool, les consommations de fruits et légumes et l'apport énergétique total. L'ingestion de nitrates provenant de la viande transformée était associée à un risque accru de mortalité toutes causes confondues (HR<sub>Q4 vs. Q1</sub> = 1,15, IC95% : 1,13 - 1,17) et de mortalité par cancer (HR<sub>Q4 vs. Q1</sub> = 1,11, IC95% : 1,08 - 1,14). De même, l'apport de nitrites via la viande transformée a montré des associations très similaires avec la mortalité globale (HR<sub>Q4 vs. Q1</sub> = 1,16, IC95% : 1,14 - 1,18) et la mortalité par cancer (HR<sub>Q4 vs. Q1</sub> = 1,11, IC95% : 1,08 - 1,15). Dans cet article un modèle de médiation a été testé. Ainsi dans la relation entre consommation de viande rouge et risque de décès par cancer, 37% de la relation était médié par l'apport en nitrates. De nombreuses analyses de sensibilité ont été conduites.

Aucune association n'a été observée entre d'une part, l'exposition aux nitrites provenant ou non de l'utilisation d'additifs, présents dans l'alimentation (hors eau de boisson), et d'autre part, le risque de mortalité par cancer.

Une association positive est observée entre d'une part, l'exposition aux nitrates, aux nitrites présents dans la viande transformée et d'autre part, la mortalité par cancers dans une seule étude ce qui ne permet pas de conclure.

## 11.2.16. Analyse des biais et incertitudes

- **Risque de biais<sup>70</sup> :**

Les études portant sur la qualité de l'eau ont souvent été conduites dans des sous-échantillons, probablement en raison de données manquantes.

La randomisation et sélection des sujets contrôles dans les enquêtes cas-témoins ne sont pas toujours très robustes et l'absence d'appariement parfois peut conduire à l'existence de biais dans les caractéristiques des cas et des témoins.

Les enquêtes cas-témoins présentent un niveau de preuve inférieur à celui des études de cohortes prospectives. En effet la mesure de l'exposition peut être en partie biaisée par la présence de la pathologie et générer ainsi des biais de causalité inverse.

La prise en compte des facteurs de confusion est très variable selon les études. L'exposition concernant la qualité de l'eau au niveau local considère rarement la consommation réelle, ce qui peut avoir entraîné des biais de classification quant à l'exposition.

La cohorte Iowa ne porte que sur des femmes ménopausées, ce qui entraîne une sélection des participants, donc le caractère transposable des résultats à d'autres groupes de populations est sujet à caution. Globalement les mesures liées à l'événement de santé (incidence de cancer) sont de bonne qualité, par des registres ou des données d'hospitalisation permettant une classification des pathologies selon la CIM.

Certains résultats peuvent ne pas avoir été rapportés.

- **Cohérence :**

Considérées globalement, les études permettent difficilement d'établir la cohérence en raison de plusieurs facteurs :

- Multitudes d'expositions considérées : nitrates, nitrites, NOCS, totaux, par sources alimentaires (diversité des groupes alimentaires), eaux de boissons, qualité de l'eau du lieu de résidence, ancienneté de l'exposition etc. ;
- Seuils de comparaison très variables : seuils fixes, quartiles basés sur la distribution dans une étude spécifique ;
- Variété des indicateurs de santé considérés dans la thématique cancer : hommes et ou femmes, localisations, sous-type de cancer, regroupement de localisations etc.

- **Caractère direct :**

D'une manière générale, dans toutes les analyses considérées ici, les études présentent un caractère direct, c'est-à-dire qu'elles ont été mises en place pour répondre à la question posée : étude de cohorte (visant à estimer les associations entre exposition et événements de santé) ou études cas-témoins.

- **Précision<sup>71</sup> :**

D'une manière générale, les études de cohorte sont de grande taille avec des nombres de cas importants, permettant une puissance statistique satisfaisante. Dans les enquêtes cas témoins, la précision est difficile à évaluer et aucun calcul de puissance n'a été fourni pour évaluer la capacité de ces études à mettre en évidence des associations.

---

<sup>70</sup> Probabilité qu'une erreur systématique ait modifié les résultats analysés

<sup>71</sup> Niveau de précision des résultats obtenus incluant la taille de l'échantillon, le nombre d'études, la variabilité entre les études

- **Généralisabilité :**

Les études nord-américaines et européennes sont potentiellement généralisables à la population française. En revanche, les résultats issus de populations asiatiques sont peu transposables à la population française en raison de modes de vie différents, notamment de régimes alimentaires. Enfin, les réglementations concernant l'ajout de nitrites sous forme d'additifs diffèrent selon les pays ; les teneurs retrouvées dans les aliments sont probablement variables.

**En conclusion :**

**Le groupe de travail conclut à :**

- ✓ l'existence d'une association positive entre l'exposition aux nitrates via l'eau de boisson et le risque de cancer colorectal ;
- ✓ l'existence d'une association positive entre l'exposition aux nitrates et/ou aux nitrites via la viande transformée et le risque de cancer colorectal.

Pour la première fois, une étude récente rapporte l'impact d'une exposition périnatale aux nitrates sur le risque de cancers pédiatriques. S'agissant de la seule étude disponible, le GT n'est pas en mesure de conclure sur ce point.

Dans la mesure où un seul article était disponible, le GT considère qu'il n'a pas été possible, en l'état actuel des connaissances, de conclure à l'existence d'une association entre exposition aux nitrates et aux nitrites et le risque d'autres cancers que le cancer colorectal mais note :

- ✓ une association positive suspectée entre :
  - l'exposition aux nitrates présents dans l'eau de boisson et le risque de cancers des ovaires et des reins ;
  - l'exposition aux nitrates provenant ou non de l'utilisation d'additifs, présents dans l'alimentation (hors eau de boisson), et le risque de cancer des ovaires ;
  - l'exposition aux NDEA (N-Nitrosodiéthylamine) et NDMA (N-Nitrosodiméthylamine) provenant ou non de l'utilisation d'additifs, présents dans l'alimentation (hors eau de boisson), et le risque de cancer du pancréas ;
  - l'exposition aux NDEA et NDMA présents dans l'alimentation d'origine végétale et le risque de cancers du foie et des voies biliaires ;
  - l'exposition aux nitrates présents dans la viande transformée et le risque de cancers du sein, de la vessie et de mortalité par cancer ;
  - l'exposition aux nitrites présents dans la viande transformée et le risque de cancers du pancréas, de l'estomac, de l'œsophage, du sein, de la vessie, de la prostate et de mortalité par cancer.
- ✓ une association inverse suspectée entre l'exposition aux nitrites présents dans l'alimentation d'origine végétale et le risque de cancers du foie et des voies biliaires.

Dans la mesure où plusieurs articles fournissent des résultats non convergents, dans la population des femmes ménopausées, le groupe de travail ne peut conclure quant à l'association positive observée dans certaines études, entre les expositions aux

**nitrates dans l'eau de boisson et le risque de cancer de la vessie et du sein.**

## **12. CONCLUSIONS RELATIVES À L'EXAMEN DES VTR DE L'EFSA D'APRÈS LES DONNÉES TOXICOLOGIQUES ET ÉPIDÉMIOLOGIQUES RÉVISÉES**

### **12.1. Valeurs toxicologiques de références recommandées par l'EFSA**

L'EFSA (EFSA, 2017a; EFSA, 2017b) a réévalué en 2017 les valeurs toxicologiques de référence (VTR) par ingestion liées aux nitrates et nitrites.

Les Doses Journalières Admissibles (DJA) liées aux nitrates et nitrites utilisés comme additifs alimentaires réévaluées par l'Efsa s'appuient sur un effet lié à la formation de méthémoglobine. La méthémoglobine empêche l'acheminement normal de l'oxygène vers les tissus, pouvant provoquer une hypoxie tissulaire (Mensinga et al., 2003). La proportion normale de méthémoglobine est de 1 à 3 % de la concentration totale d'hémoglobine dans le sang (Goldsmith et al, 1976). Les signes cliniques de la méthémoglobinémie (méthémoglobine > 20%) sont les conséquences de l'hypoxie tissulaire : cyanose, léthargie, dyspnée, céphalées, et tachycardie. Des taux de méthémoglobine > 50 % peuvent provoquer une hypoxie tissulaire importante et être fatals (Mensinga et al., 2003).

Ci-après sont présentés les repères toxicologiques retenus par l'EFSA pour les VTR qu'elle a recommandées dans son opinion.

#### **12.1.1. Les nitrites**

En 1997, le SCF (Scientific Committee for Food) a établi une Dose Journalière Acceptable (DJA) de 0-0,06 mg d'ion nitrite (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> applicable à toutes les sources alimentaires. Cette DJA est basée sur une NOEL de 5,4 mg d'ion nitrite (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> pour des effets sur l'hypertrophie de la zone glomérulaire surrénalienne dans des études subchroniques sur la lignée de rats la plus sensible avec un facteur d'incertitude de 100. Une seconde NOEL avait été observée (6,7 mg d'ion nitrite (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>) associée à des changements histologiques dans les poumons et le cœur lors d'une étude 2 ans chez le rat. Considérant les limites et incertitudes liées aux études, le SCF a estimé que ces NOEL étaient du même ordre de grandeur.

L'évaluation la plus récente des nitrites par le JECFA date de 2002 (JECFA, 2002), au cours de laquelle une DJA de 0-0,07 mg d'ion nitrite (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> basé ici sur la NOEL de 6,7 mg d'ion nitrite (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> (la même que précédemment identifiée par le SCF) associée à des changements histologiques dans les poumons et le cœur lors d'une étude 2 ans chez le rat avec un facteur d'incertitude de 100.

En 2017, l'EFSA a noté que la méthémoglobinémie était l'effet le plus fréquemment observé dans les études expérimentales chez l'animal, ainsi que chez l'Homme en cas d'exposition accidentelle, notamment chez les nourrissons (une des populations les plus sensibles). Les études chez l'Homme examinées dans cet avis corroborent le fait que l'exposition aux nitrites pouvait entraîner la formation de méthémoglobine. L'EFSA a alors considéré une méthémoglobinémie élevée, indiquant la formation de méthémoglobine non compensée par l'activité de la cytochrome b5 réductase (qui reconvertit la méthémoglobine en hémoglobine), comme un effet pertinent pour la dérivation d'une valeur d'orientation par l'approche

*benchmark dose* (BMD)<sup>72</sup>. Une BMDL (*lower benchmark dose*) a été déterminée à partir d'une étude du NTP (2001) (National Toxicology Program) chez le rat. Une BMR de 5% (valeur par défaut pour des données continues) serait ici comprise dans des valeurs biologiques normales et n'aurait donc pas été biologiquement pertinente. Une BMR (*Benchmark Response*) basée sur les données expérimentales et impliquant un doublement de la méthémoglobinémie (BMR =100%) chez les rats a été utilisée. Ce doublement de la méthémoglobinémie a été considéré comme marqueur précoce d'exposition pertinent mais ne résulte pas en un effet néfaste.

L'étude du NTP (2001) était basée sur une étude sub-chronique de 14 semaines chez le rat F344/N, avec l'exposition de 10 animaux par sexe au nitrite de sodium ajouté à l'eau de boisson et 5 groupes de doses (0, 375, 750, 1500, 3000, 5000 mg L<sup>-1</sup>). La méthémoglobinémie a été mesurée à j5, j19 et à 14 semaines.

Seules les données expérimentales à 14 semaines ont permis d'obtenir un modèle dose-réponse acceptable avec une BMDL de 9,63 et 14,62 mg de nitrates (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> pour les mâles et les femelles, respectivement.

En utilisant la plus faible BMDL et en y appliquant un facteur d'incertitude de 100, l'EFSA (2017a) a calculé une DJA de 0,1 mg sodium nitrite équivalent à 0,7 mg ion nitrite (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>. Aucun facteur d'incertitude supplémentaire n'a été ajouté pour tenir compte de l'extrapolation sub-chronique à chronique du fait que l'augmentation de la méthémoglobinémie à des taux similaires était le seul effet observé dans l'étude chronique de 2 ans sur des rats.

### 12.1.2. Les nitrates

L'EFSA (2017b) a examiné la détermination DJA pour les nitrates basée sur la formation de méthémoglobine provoquée par les nitrites issus de la conversion des nitrates en nitrites au niveau salivaire (pour rappel, les nitrates ingérés, subissent un cycle entéro-salivaire, sont excrétés dans la salive et transformés en nitrites par l'action des bactéries buccales).

Une première DJA a été estimée par le SCF en 1990 et mise à jour en 1997 (SCF, 1992; SCF, 1997). Elle s'appuie sur une étude chronique rats (F344) de 2 ans (50 animaux par sexe et par groupe) où les animaux ont reçu du nitrate de sodium dans leur alimentation à hauteur de 0, 1250 et 2500 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> (Maekawa et al., 1982). Le traitement au nitrate de sodium n'a pas eu d'effet significatif sur les taux de survie, en revanche, les rats mâles du groupe exposé à 2500 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> ont présenté une mortalité cumulative supérieure de 10% à celle du groupe de dose inférieure. Le SCF a alors considéré la plus forte dose de 2500 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> comme une NOAEL (*No Observable Adverse Effect Level* - Dose sans effet nocif observable). Un facteur d'incertitude de 500 a été appliqué, en tenant compte d'un facteur de 10 pour la variabilité inter-espèce et d'un facteur de 10 pour la variabilité intra-individuelle, et en ajoutant un facteur de sécurité supplémentaire (5), car le rat n'a pas été considéré comme un bon modèle pour l'Homme en ce qui concerne la sécrétion salivaire des nitrates et leur conversion en nitrites par l'action des bactéries buccales. Une DJA de 5 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> équivalent à 3,7 mg d'ion nitrate (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> est ainsi calculée

<sup>72</sup> BMD (Benchmark Dose) : La benchmark dose est une dose produisant un effet mesurable correspondant à un niveau de réponse donné par rapport à un groupe témoin Anses, 2017c. Valeurs toxicologiques de référence - Guide d'élaboration de l'Anses  
<https://www.anses.fr/fr/system/files/SUBSTANCES2017SA0016Ra.pdf>.

Le JECFA a également dérivé une DJA en 1996 et l'a mise à jour en 2003 (JECFA, 1996; JECFA, 2003a). Dans son évaluation, le JECFA a rapporté trois études long-terme (d'une durée de 2 ans) où l'exposition aux nitrates n'avait produit aucun effet néfaste chez des rats. Dans l'une d'elles, la plus forte dose testée était de 370 mg ion nitrate (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> (NOEL - *no observed effect level*). Après application d'un facteur de sécurité de 100, une DJA était calculée correspondant à 5 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> équivalent à 3,7 mg d'ion nitrate (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>. Le JECFA a également recalculé cette DJA à partir de la NOAEL dérivée pour les nitrites (6 mg d'ion nitrate (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>). En considérant un taux de conversion de 5% (nitrite/nitrate) pour les personnes saines et de 20% pour celles ayant un taux de conversion élevé, les NOAEL transposées pour les nitrates seraient de 160 et 40mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>. Cette méthode prenant en compte des données cinétiques humaines et un facteur de sécurité de 50 mène à une DJA de 3,2 mg ion nitrate (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>. Ces deux DJA étant similaires, le JECFA a retenu la première DJA de 3,7 mg d'ions nitrate (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>

En absence de la disponibilité des données liées à l'étude pivot utilisée par le JECFA, l'EFSA (2017b) a décidé que l'approche la plus pertinente pour évaluer la toxicité des nitrites était de se baser sur l'augmentation de la méthémoglobinémie causée par les nitrites ingérés (NTP, 2001). Sur la base des taux de sécrétion de nitrates (20-25%) dans la salive et des taux de conversion des nitrates en nitrites (5-36%) dans la bouche, le pourcentage de conversion global des nitrates en nitrites global a été estimé entre 1% et 9%. En utilisant cette fourchette de taux de conversion et en tenant compte de la DJA des nitrites (0,07 mg d'ion nitrite par kg pc par jour), les valeurs de la DJA estimées se situeraient entre 1,05 et 9,4 mg d'ion nitrate par kg pc par jour. La DJA établie par le SCF (1997) (3,7 mg d'ion nitrate par kg pc par jour) se situait dans la fourchette de ces estimations. L'EFSA a estimé qu'il n'y avait pas suffisamment de preuves pour modifier cette DJA et a confirmé une DJA pour les nitrates de 3,7 mg d'ion nitrate par kg de poids corporel par jour (EFSA, 2017b).

## **12.2. Evaluation de nouvelles connaissances justifiant le besoin de réexaminer les valeurs toxicologiques de référence recommandées par l'EFSA**

### **12.2.1. Conclusions relatives au réexamen des VTR de l'Efsa**

Actuellement, l'EFSA recommande des doses journalières admissibles (DJA) pour les nitrates de 3,7 mg d'ions nitrate (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>, et pour les nitrites de 0,07 mg d'ions nitrite (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>. Comme pour les nitrates, la DJA des nitrites se fonde sur l'augmentation du taux de méthémoglobine dans le sang suite à la l'exposition aux nitrites dans l'eau chez les rongeurs (NTP, 2001).

Les études de génotoxicité n'indiquent pas de potentiel génotoxique des nitrates et des nitrites. Les études de cancérogénèse du NTP sur les nitrites dans l'eau de boisson (2001) concluent à l'absence de preuve d'activité cancérogène chez les rats F344/N mâles et femelles et les souris B6C3F1 mâles. Les résultats sont équivoques chez les souris B6C3F1 femelles sur la base de la tendance positive des incidences de papillome spinocellulaire ou carcinome (combiné) du pré-estomac. Toutefois, le NTP souligne que les études ont été conduites dans des conditions ne favorisant pas la formation endogène de nitrosamines.

En l'absence d'autres données, le groupe de travail conclut que le doublement du niveau basal de la méthémoglobinémie peut être identifié comme un marqueur précoce d'exposition aux nitrates et aux nitrites (indicateur d'oxydation). A ce stade, la prise en compte de la

méthémoglobinémie comme marqueur précoce d'exposition reste justifiée par le fait qu'il s'agit de l'effet observable à la plus faible dose.

### 12.2.2. Conclusions relatives aux mécanismes de transformation des nitrates/nitrites dans les denrées alimentaires et dans l'organisme

Le Centre International de recherche sur le Cancer (IARC, 2010) a classé "probablement cancérigène pour l'Homme" (2A) les nitrates et les nitrites ingérés dans des conditions pouvant conduire à la formation de composés endogènes nitrosés.

L'état des connaissances a permis d'identifier la formation de composés nitrosés, en particulier lors de la consommation de produits carnés traités aux additifs nitrés. Après exposition orale, 75 % des nitrates alimentaires absorbés sont excrétés dans les urines, les 25 % restants sont sécrétés par les glandes salivaires dans la cavité buccale où une partie sera réduite en nitrites par les bactéries. Les nitrites sont instables et, en excès, ils peuvent générer la formation de composés nitrosés dans le tractus gastro-intestinal tels que :

- o les S-nitrosothiols (RSNO) formés principalement dans l'estomac où ils agissent comme donneurs de monoxyde d'azote (NO) ;
- o les composés N-nitrosés, notamment les nitrosamines, qui peuvent être formées tout au long du tractus digestif soit à pH acide dans l'estomac, soit à pH neutre et en présence de fer dans l'intestin. Les composés N-nitrosés peuvent conduire à la formation d'adduits à l'ADN ;
- o le fer nitrosylé (FeNO) ou nitrosylhème formé dans l'intestin et principalement dans le côlon.

La consommation de **viande rouge**, très riche en fer héminique, est directement et de manière dose-dépendante associée à la formation de composés nitrosés coliques et à la formation d'adduits à l'ADN spécifiques de ces composés. La consommation de **charcuterie (produits carnés traités)** augmente la formation de composés nitrosés par rapport à la consommation de viande rouge. La consommation de **charcuterie diminuée en nitrites et additionnée de composés aux propriétés antioxydantes** permet une diminution significative de la formation des composés nitrosés comparé à la charcuterie classique.

Parmi les composés nitrosés, les nitrosamines sont les mieux caractérisées. Les données toxicologiques soulignent la génotoxicité et cancérogénicité de ces composés dans les études expérimentales. La N-nitrosodiméthylamine (NDMA) est identifiée comme ayant le plus fort potentiel cancérigène. La benchmark dose (BMDL<sub>10</sub>), estimée à partir de données expérimentales chez le rat (SCCS, 2011), a été utilisée dans la suite des travaux pour estimer le niveau de préoccupation sanitaire par la marge d'exposition (MOE) après estimation de la quantité de nitrosamines endogènes formée après ingestion de nitrates et de nitrites cumulés. Les données relatives à l'identification et la quantification des composés nitrosés exogènes<sup>73</sup> et endogènes<sup>74</sup> sont lacunaires. De plus, les données sur le potentiel toxicologique de ces composés, et en particulier du fer héminique nitrosylé et des nitrosothiols, font défaut.

---

<sup>73</sup> Dans la matrice alimentaire

<sup>74</sup> Dans l'organisme du consommateur

**En conclusion :**

**Les nouvelles connaissances disponibles ne sont pas suffisantes pour modifier la DJA proposée par l'EFSA et celle-ci est donc reprise pour l'évaluation des risques dans la présente expertise.**

**13. CARACTÉRISATION DU RISQUE****13.1. Caractérisation du risque lié à l'ingestion de nitrates/nitrites en termes de dépassement des VTR**

Dans la population des adultes, la DJA en **nitrates** est dépassée dans 1,06% des cas quelle que soit l'hypothèse de censure. Chez les enfants de 3 à 17 ans, 1,38% à 1,47% des individus présentent un dépassement de cette DJA (Tableau 44).

**Tableau 44. Taux de dépassement de la DJA (intervalle de probabilité à 95% entre crochets) en nitrates de 3,7 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>**

	LB	UB
Adultes de 18 ans et plus (N=2121)	1,06% [0,52%-1,59%]	1,06% [0,52%-1,59%]
Enfants de 3 à 17 ans (N=1839)	1,38% [0,75%-2,02%]	1,47% [0,76%-2,18%]

Concernant les **nitrites**, aucun des individus de la population de plus de 18 ans ne dépasse la DJA. Chez les enfants, entre 0,33% et 0,38% dépassent la DJA sans que ce dépassement ne soit significatif (Tableau 45).

**Tableau 45. Taux de dépassement de la DJA (intervalle de probabilité à 95% entre crochets) en nitrites de 0,07 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>**

	LB	UB
Adultes de 18 ans et plus (N=2121)	0,00%	0,00%
Enfants de 3 à 17 ans (N=1839)	0,33% [0-0,80%]	0,38% [0-0,86%]

**13.2. Caractérisation du risque lié à l'ingestion de nitrates/nitrites en termes de marge d'exposition**

L'exposition aux nitrates et aux nitrites génère la formation d'un grand nombre de composés après ingestion (voir 10.2). Parmi ces composés, les nitrosamines sont les mieux caractérisés (de façon quantitative) en termes d'exposition interne (formation endogène) et de dangers. En effet, le SCCS (2011) a classé huit nitrosamines sur la base d'indices de potentiel cancérigène chez le rat (T25 et TD50) ainsi que benchmark doses (BMDL<sub>10</sub>) lorsque les données expérimentales permettaient leur estimation. Ainsi, la nitrosamine ayant le plus fort potentiel cancérigène est la *N*-nitrosodiméthylamine, NDMA, dont la BMDL-10 est estimée à 0,027 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>.

La marge d'exposition (MOE) permet d'indiquer un niveau de préoccupation vis-à-vis du risque cancérigène pour la population aux niveaux d'exposition de celle-ci à la substance. Elle se

calculé par le ratio entre le point de départ (PoD) et l'exposition estimée de la population générale à la substance d'intérêt. Les évaluateurs de risques considèrent généralement qu'une MoE de 10 000 ou plus, si elle est basée sur le BMDL<sub>10</sub> d'une étude animale, serait peu préoccupante du point de vue de la santé publique. La quantité de nitrosamines endogènes formée après ingestion de nitrates/nitrites peut être modélisée à l'aide d'un modèle mathématique développé par Santé Canada (2013) dans lequel on considère, de façon protectrice, que tous les nitrites présents dans l'estomac vont réagir avec le précurseur de nitrosamines.

La concentration en nitrites dans l'estomac est estimée à l'aide de l'équation suivante :

$$[NO_2^-] = A_{NO_2^-} / V_S$$

où  $A_{NO_2^-}$  est la quantité en mmol de nitrites dans l'estomac et  $V_S$  le volume de l'estomac estimé à 0,5 L pour la région pertinente à la nitrosation.

L'exposition journalière en nitrosamine (ici *N*-nitrosodiméthylamine, NDMA) est calculée à partir de l'exposition à l'amine précurseur (diméthylamine, DMA) :

$$DD_{NDMA} = ([NO_2^-]^2 \times DI_{DMA} \times K_{am} \times 3600 \times MW_{NDMA}) / \text{masse corporelle}$$

où  $DD_{NDMA}$  est la dose journalière en NDMA (mg (kg pc)<sup>-1</sup> par jour),  $DI_{DMA}$  la dose journalière en DMA (mg (kg pc)<sup>-1</sup> par jour),  $K_{am}$  est la constante de taux de nitrosation (0,002 ((mol L<sup>-1</sup>)<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>), 3600 est une estimation du temps pendant lequel les concentrations des précurseurs d'amine et des précurseurs des nitrites resteraient constantes dans la région œsophagienne, mesurée en secondes,  $MW$  est la masse moléculaire du NDMA. En l'absence de nouvelles données, l'exposition quotidienne en DMA présentée dans Santé Canada (2013) est utilisée, soit 40 mg (kg pc)<sup>-1</sup> par jour.

Pour la population générale adulte, la quantité de nitrites dans l'estomac est estimée de façon probabiliste pour chacun des individus de la population INCA à l'aide du modèle cinétique des nitrates et nitrites chez l'Homme (Zeilmaker et al., 2010; Zeilmaker et al., 1996) (Chapitre 10.1). Une distribution de chaque paramètre cinétique est utilisée (variabilité inter-individuelle, méthode de Monte-Carlo : 1000 tirages par individus, n = 2121) pour le calcul de la quantité de nitrites ayant transité dans le compartiment "Absorption" après exposition aux nitrates et nitrites au cours d'une journée et tenant compte de la formation endogène de nitrates.

Pour la population générale "enfants" (2 ans à 17 ans inclus), l'approche décrite pour les adultes n'est pas employée car le modèle cinétique a été calibré exclusivement sur des volontaires sains adultes et ne permet pas de refléter la cinétique de ces substances chez un enfant. Le groupe de travail considère que le niveau d'incertitude serait ici trop élevé. En revanche, l'approche plus conservatrice présentée par l'EFSA (EFSA, 2017a; EFSA, 2017b) est employée. La quantité totale de nitrites à laquelle les enfants sont exposés est calculée en sommant la dose externe de nitrites et la dose externe de nitrates convertie en nitrites en utilisant le facteur de conversion global de 9% :

$$Dose_{Total\_NO_2^-} = Dose_{NO_2^-} + Dose_{NO_3^-} \times 9\% \times MW_{NO_2^-} / MW_{NO_3^-}$$

Le volume de l'estomac des enfants est corrigé par extrapolation allométrique en considérant un poids corporel adulte de 70kg. La dose de NDMA n'est pas modifiée.

Les MoE sont calculées pour les scénarios LB et UB, la médiane ainsi que la MoE pour le 95<sup>ème</sup> et 97,5<sup>ème</sup> centile (IC95%) d'exposition au NDMA sont présentés dans le tableau 46 pour les adultes et dans le tableau 47 pour les enfants.

**Tableau 46. Marges d'exposition pour la population adulte après exposition aux nitrates et aux nitrites (médiane et intervalle de confiance à 95% entre crochets)**

Adultes (N=2121)	LB	UB
Médiane	98 529 [91 762-105 695]	97 314 [90 862-104 823]
P95	23 076 [20 589-25 640]	22 825 [20 447-25 388]
P97,5	17 807 [15 474-20 079]	17 656 [15 258-20 153]

**Tableau 47. Marges d'expositions pour la population enfants après exposition aux nitrates et aux nitrites (médiane et intervalle de confiance à 95% entre crochets)**

Enfants (N=1839)	LB	UB
Médiane	396 024 [331 716-483 668]	298 522 [243 560-348 797]
P95	18 988 [13 489-23 666]	16 945 [13 146-24 571]
P97,5	9 444 [5 172-14 794]	8 636 [5 170-13 870]

Chez les adultes, la marge d'exposition médiane est environ 10 fois supérieure au seuil de 10 000, la MoE au quantile 97,5 était toujours supérieure à 10 000. L'EFSA a calculé des MoE non pas à partir des valeurs réelles d'exposition mais en tenant compte d'un scénario où l'exposition était équivalente à la DJAL. Les MoE étaient de 32 000 et 420 000 pour les nitrates et nitrites respectivement.

Chez les enfants, les MoE calculées étaient plus faibles et pouvaient être inférieures à 10 000 pour le quantile 97,5. Les enfants dont l'exposition aux nitrites était supérieure à la DJA avaient tous une MoE estimée supérieure à 10 000. Cela s'explique par la très forte contribution de la dose de nitrates au calcul de la dose totale en nitrites à travers le taux de conversion fixé à la borne supérieure de 9%. Pour les enfants dont la MoE était inférieure à 10 000, les nitrates contribuaient au moins pour 90% à la dose de NDMA calculée. On observe que la MoE est dans ce cas inversement corrélée à l'exposition aux nitrates (test de Spearman,  $\rho = -0,96$ ) et peu corrélée à l'exposition aux nitrites (test de Spearman,  $\rho = -0,46$ ). L'exposition totale aux nitrites semble être fortement surestimée par ce calcul lors d'une exposition combinée aux nitrates et aux nitrites.

Cette approche a pour principal avantage de permettre une caractérisation du risque liée à une exposition combinée aux nitrates et nitrites. De plus, elle est protectrice du fait que :

- la formation endogène de nitrates est prise en compte chez l'adulte ;
- la totalité du nitrite est considéré disponible pour la réaction de nitrosation ;
- la prise en compte de la formation de la nitrosamine ayant le plus fort potentiel cancérigène chez l'animal de laboratoire (caractérisé par la BMDL<sub>10</sub>) est modélisée ;

- le taux de conversion maximum estimé (9%) est appliqué au calcul de l'exposition totale des enfants aux nitrites.

**En conclusion :**

- Pour moins de 1,5 % des adultes et des enfants, l'exposition totale dépasse la DJA des nitrates.
- L'exposition totale aux nitrites dépasse la DJA chez moins de 0,4 % des enfants. Aucun dépassement de la DJA n'est observé chez les adultes.

Le groupe de travail a évalué l'exposition cumulée aux nitrates et aux nitrites par l'approche de la marge d'exposition (MOE). La MOE pour le NDMA endogène (basée sur la BMDL<sub>10</sub>) chez les adultes est supérieure à 10 000 au 97,5<sup>ème</sup> percentile (17 656 [15 258-20 153]). Chez les enfants de plus de 3 ans, la médiane de la distribution des 97,5<sup>ème</sup> percentile est inférieure à 10 000 (8 636 [5 170-13 870]), sans que cela soit significatif. Par ailleurs, l'approche utilisée chez les enfants, qui est basée sur un taux de conversion des nitrates en nitrites de 9 %, est jugée plus protectrice que le modèle cinétique utilisé chez les adultes.

**14. EVALUATION DES LEVIERS DE RÉDUCTION DE L'EXPOSITION DES CONSOMMATEURS FRANÇAIS AUX NITRATES ET NITRITES (ET AUX NITROSAMINES) QUELLE QUE SOIT L'ORIGINE****14.1. Levier « eau »**

L'eau de boisson contribue entre 20 et 25 % à l'exposition alimentaire totale aux **nitrates**. L'impact d'un respect systématique de la limite de qualité pour les nitrates dans les EDCH distribuées a été testé en considérant qu'aucun individu ne consommait une eau contenant plus de 50 mg L<sup>-1</sup> de nitrates (toutes les concentrations en nitrates dans les EDCH dépassant cette limite ont été fixées à 50 mg L<sup>-1</sup>).

Cette simulation a un impact minime sur l'exposition alimentaire totale de la population française. Ceci s'explique par le faible nombre d'UDI<sup>75</sup> pour lesquelles la concentration moyenne en nitrates est supérieure à 50 mg L<sup>-1</sup>.

Cependant, pour les populations desservies par des UDI distribuant une eau dont la concentration en nitrates est supérieure à cette limite de qualité, le niveau d'exposition via les EDCH distribuées est plus de trois fois supérieur à celui du reste de la population. Pour ces populations, l'EDCH distribuée contribue à plus de 47 % à l'exposition alimentaire totale<sup>76</sup>.

L'eau ne contribuant que très peu à l'exposition aux **nitrites** (0,6 % en *lower bound*), elle ne constitue pas un levier d'action pour réduire l'exposition totale aux nitrites.

<sup>75</sup> Unité de distribution d'eau destinée à la consommation humaine

<sup>76</sup> Ce scénario fait l'objet d'un avis spécifique (Anses 2022).

## 14.2. Levier « additif »

Les produits de charcuterie contribuent entre 42 et 63 % à l'exposition totale en nitrites. Sans préjuger des conséquences sur le risque microbiologique, un scénario théorique « sans nitrites ajoutés » dans les deux produits carnés qui contribuent le plus à l'exposition, c'est-à-dire le « jambon cuit » et les « saucisses et saucissons cuits » a été évalué.

Ce scénario réduit de 18 à 29 % l'exposition totale aux nitrites des adultes et de 25 à 40 % celle des enfants. Dans ce scénario, quelle que soit la population, aucun dépassement de la DJA pour les nitrites n'est alors observé.

Une réduction de l'utilisation de ces additifs constitue un levier dont les modalités de mise en œuvre doivent être précisées dans le but de déterminer les teneurs résiduelles dans les produits finis en fonction des quantités ajoutées. Faute de données sur les relations entre quantité ajoutée et quantité résiduelle, il n'a pas été possible de réévaluer les doses d'emploi de ces additifs qui permettent de limiter à la fois le risque microbiologique et le risque chimique associés à la consommation du produit, en priorité pour les contributeurs majeurs.

## 14.3. Levier « recommandation de consommation »

Dans ce scénario, la recommandation de limiter la consommation de charcuterie à 150 g par semaine a été appliquée aux deux contributeurs majeurs que sont le « jambon cuit » et les « saucisses et saucissons cuits » (Anses, 2016).

On observe alors une réduction de l'exposition totale aux nitrites de 4 à 7 % chez les adultes et les enfants. Cette réduction permet de ne plus observer de dépassement de la DJA chez les enfants.

## 15. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS GÉNÉRALES DU GT ET DES CES ERCA ET BIORISK

### 15.1. Conclusions et recommandations relatives à la question 1 :

**« établir si possible, en prenant en compte les travaux de l'EFSA sur la préservation des produits carnés vis-à-vis du risque de contamination par *Clostridium botulinum*, les situations – y compris en cas d'usage de procédés présentés par l'industrie comme un moyen de remplacement des sels nitrés - dans lesquelles une diminution des taux de nitrites/nitrates présents dans les denrées est susceptible d'accroître de manière significative les risques liés à la prolifération de bactéries pathogènes dans certains aliments »**

#### 15.1.1. Conclusions

En raison de leurs propriétés antimicrobiennes et technologiques, les nitrites et les nitrates (comme précurseurs des nitrites) sont très utilisés en tant qu'additifs alimentaires dans une grande diversité de denrées alimentaires, principalement carnées (charcuteries et salaisons). L'activité inhibitrice et microbicide des nitrites s'exerce sur un nombre élevée de microorganismes, notamment des bactéries pathogènes. L'impact de la réduction de l'emploi

des nitrates/nitrites dans les denrées alimentaires sur les microorganismes d'altération n'a pas été évalué dans le cadre du présent avis.

La présente expertise a été conduite en identifiant, au sein des catégories de produits de charcuterie et de salaison et des dangers microbiologiques qui y sont liés, certains couples danger/aliment<sup>77</sup> considérés comme des exemples pertinents pour estimer le risque microbiologique, pour le consommateur, lié à une réduction ou une suppression des quantités de nitrites utilisés. Cette évaluation s'appuie sur des modèles de microbiologie prévisionnelle pour trois couples danger/aliment et fournit des estimations de l'augmentation potentielle du risque en fonction des scénarios de réduction en nitrites testés. Cette expertise est par nature non-exhaustive : des évaluations quantitatives des risques supplémentaires incluant d'autres couples danger/aliment et la disponibilité de nouvelles connaissances pourraient permettre d'approfondir ces premiers résultats et d'apporter des recommandations, notamment pour les catégories de denrées alimentaires encore non explorées.

Sur la base de ces travaux, les experts du GT et des CES ERCA et BIORISK considèrent que la réduction ou la suppression de l'emploi des nitrites :

- dans les produits de charcuterie cuits prêts à être consommés, n'augmenterait pas le risque de listériose, sous réserve de la maîtrise effective de la température de conservation et d'une réduction de la durée de vie des produits concernés ;
- dans les saucissons secs, devrait nécessairement et prioritairement s'accompagner de mesures de réduction de la charge en salmonelles des porcs à l'élevage et de mesures d'hygiène à l'abattoir telles que recommandées dans l'avis de l'Anses de 2018 (Anses, 2018b), sans préjuger de la mise en œuvre d'autres dispositions ;
- dans les jambons secs, est compatible avec la prévention du risque lié au botulisme, sous réserve d'assurer une maîtrise stricte du taux de sel et de la température au cours des étapes de salage, de repos et d'affinage du produit.

Les experts du GT et des CES ERCA et BIORISK soulignent que plus la réduction de l'emploi des nitrites est importante, plus le risque microbiologique pour les consommateurs augmente. Par conséquent, les mesures de maîtrise complémentaires à mettre en place par les opérateurs devraient alors être drastiques et/ou plus nombreuses. La faisabilité de leur application et leur efficacité devront donc être évaluées.

L'efficacité des alternatives à l'emploi des nitrates/nitrites dans les produits carnés actuellement à l'étude ou appliquées n'a pas été évaluée dans le présent avis. Cependant, les experts du GT et des CES ERCA et BIORISK soulignent pour certaines d'entre-elles le manque de données portant sur leur efficacité antimicrobienne et leur évaluation toxicologique.

### 15.1.2. Recommandations

Les experts du GT et des CES ERCA et BIORISK rappellent que l'application des bonnes pratiques d'hygiène et la mise en place d'un système HACCP sont des mesures efficaces et demeurent une obligation légale dans les unités de production.

Ils recommandent :

- que la suppression ou la réduction éventuelle de l'usage des nitrates/nitrites soit systématiquement associée à des mesures de maîtrise compensatrices autorisées, validées, surveillées, vérifiées et partagées par les professionnels et par les autorités ;

---

<sup>77</sup> *Listeria monocytogenes*/jambon cuit - *Salmonella*/saucisson sec - *Clostridium botulinum*/jambon sec

- que la validation de ces mesures compensatrices s'appuie sur des données prédites (par des outils de microbiologie prévisionnelle) et/ou sur des données expérimentales sur les matrices concernées ;
- que tout changement dans l'emploi des nitrates/nitrites soit accompagné d'une révision des guides de bonnes pratiques d'hygiène des filières concernées ;

Les experts du GT et des CES ERCA et BIORISK recommandent par ailleurs :

- de mener des travaux permettant d'améliorer les connaissances sur la contamination par les salmonelles des matières premières et son évolution au cours du processus de fabrication des saucissons secs ;
- d'acquérir des données sur la prévalence de *Clostridium botulinum* dans les viandes fraîches et les concentrations associées ;
- d'établir un cadre d'évaluation des mesures alternatives à l'emploi des nitrates/nitrites comme antimicrobiens ;
- d'acquérir des données sur les mesures alternatives à l'emploi des nitrates/nitrites concernant leur efficacité antimicrobienne, leur toxicité éventuelle et leur impact sur les propriétés organoleptiques des denrées alimentaires concernées.

Les experts du GT et des CES ERCA et BIORISK notent que certains procédés qui se substituent à l'ajout direct de nitrites consistent à apporter des nitrates d'origine naturelle (extraits végétaux, bouillons de légumes, etc.) qui, sous l'effet d'enzymes bactériennes, sont convertis en nitrites. Ce type d'alternatives ne conduit donc pas à diminuer l'exposition des consommateurs aux nitrites.

## 15.2. Conclusions et recommandations relatives à la question 2

*« recenser les leviers d'actions permettant de diminuer l'exposition globale des consommateurs, en fonction de l'exposition propre à la France, aux nitrites et nitrates par ingestion quelle que soit leur origine, et donc in fine aux nitrosamines ».*

### 15.2.1. Conclusions

Sur la base des données disponibles sur les concentrations en nitrates et en nitrites dans l'eau<sup>78</sup> et les aliments<sup>79</sup> entre 2010 et 2019, des données de consommation alimentaire dans la population française (adultes et enfants de plus de 3 ans en France métropolitaine hors corse)<sup>80</sup> et des données relatives à la présence des additifs nitrés dans les produits alimentaires vendus sur le marché français<sup>81</sup>, les travaux d'expertise ont conduit aux considérations suivantes :

Concernant les nitrates :

---

<sup>78</sup> Données SISE-EAUX (source : Direction générale de la santé)

<sup>79</sup> Données CONTAMINE (source : plans de surveillance et de contrôle / Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes)

<sup>80</sup> ANSES. 2017. Avis et rapport de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatifs à l'Étude individuelle nationale des consommations alimentaires 3 (INCA 3)

<sup>81</sup> INRA et ANSES. 2019. Bilan et utilisation des additifs dans les produits transformés.

- ils sont en grande partie apportés par les aliments (75-80 %) tandis que l'eau, essentiellement l'eau destinée à la consommation humaine distribuée en réseau qui contribue pour 20 à 25 % à l'exposition des consommateurs ;
- leur utilisation en tant qu'additifs représente moins de 4 % de l'exposition totale, toutes sources confondues ;
- ils sont toujours présents dans les végétaux, cependant, certains les accumulent à des concentrations parfois très élevées. Ainsi, les légumes sont les contributeurs majoritaires (entre 62 et 69 %) à l'exposition totale aux nitrates. Chez les adultes, les légumes feuilles sont les principaux contributeurs alors que chez les enfants, les légumineuses, légumes feuilles, fruits ainsi que les graines germées et pousses contribuent de manière similaire à l'exposition aux nitrates.
- pour moins de 1,5 % des adultes et des enfants, l'exposition totale dépasse la DJA des nitrates.

Concernant les nitrites :

- ils sont majoritairement apportés par les aliments (99 %) et en particulier par les produits carnés traités tels que le jambon cuit, les saucisses et les saucissons cuits qui représentent de 41 à 63 % des apports selon les consommateurs et/ou les hypothèses de censure ;
- leur utilisation en tant qu'additifs représentent entre 45 et 65 % de l'exposition totale, toutes sources confondues ;
- l'exposition totale aux nitrites dépasse la DJA chez moins de 0,4 % des enfants. Aucun dépassement de la DJA n'est observé chez les adultes.

Le groupe de travail a évalué l'exposition cumulée aux nitrates et aux nitrites par l'approche de la marge d'exposition (MoE). La MoE pour le NDMA endogène (basée sur la BMDL<sub>10</sub>) chez les adultes est supérieure à 10 000 au 97,5<sup>ème</sup> percentile (17 656 [15 258-20 153]). Chez les enfants de plus de 3 ans, la médiane de la distribution des 97,5<sup>ème</sup> percentile est inférieur à 10 000 (8 636 [5 170-13 870]), sans que cela soit significatif. Par ailleurs, l'approche utilisée chez les enfants, qui est basée sur un taux de conversion des nitrates en nitrites de 9 %, est jugée plus protectrice que le modèle cinétique utilisé chez les adultes.

### 15.2.2. Recommandations

Au regard des résultats observés et des simulations effectuées, le GT et le CES ERCA recommandent de **réduire les apports en nitrates et en nitrites via l'eau et les aliments notamment en limitant les quantités d'additifs nitrés ajoutés dans les produits carnés traités.**

De plus, le GT et le CES ERCA recommandent :

- de suivre les recommandations de l'Anses en termes de consommation de charcuterie qui la limitent à 150 g par semaine<sup>32</sup>. Effectivement, cette recommandation permet de ne pas dépasser la dose journalière admissible pour les nitrites à savoir 0,07 mg (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup> ;

- de poursuivre les études permettant de mieux caractériser les relations entre quantités ajoutées<sup>82</sup> et concentrations résiduelles<sup>83</sup> de nitrates et de nitrites dans les produits carnés traités afin d'évaluer plus précisément l'impact de leur réduction sur l'exposition des consommateurs ;
- de réévaluer la pertinence de la valeur dérogatoire maximale utilisée en gestion (100 mg L<sup>-1</sup>) pour les nitrates dans les eaux destinées à la consommation humaine ;
- de diversifier la consommation de légumes dans le régime alimentaire total. En effet, diverses denrées d'origine végétale, comme les légumes feuilles, peuvent présenter des concentrations élevées en nitrates. Cependant, du fait de leur richesse en fibres, vitamines et minéraux, les légumes assurent une protection à l'encontre de diverses maladies (cancer, diabète, maladies cardiovasculaires, etc.). L'Anses recommande de consommer 5 portions de fruits et légumes par jour à raison de 80 à 100 g par portion (Anses, 2016).

### 15.3. Conclusions et recommandations relatives à la question 3

« évaluer si de nouvelles connaissances scientifiques, notamment en réponse aux recommandations de l'EFSA, sont susceptibles de lever les incertitudes sur les mécanismes de transformation des nitrates et nitrites dans l'organisme et dans les denrées alimentaires, ainsi que de justifier le réexamen des DJA/VTR déterminées par l'EFSA ».

#### 15.3.1. Conclusions

##### 15.3.1.1. Conclusions relatives au réexamen des VTR de l'Efsa

Actuellement, l'EFSA (EFSA, 2017a; EFSA, 2017b) recommande des doses journalières admissibles (DJA) pour les nitrates de 3,7 mg d'ions nitrate (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>, et pour les nitrites de 0,07 mg d'ions nitrite (kg pc)<sup>-1</sup> j<sup>-1</sup>. Comme pour les nitrates, la DJA des nitrites se fonde sur l'augmentation du taux de méthémoglobine dans le sang suite à la l'exposition aux nitrites dans l'eau chez les rongeurs (NTP, 2001).

Les études de génotoxicité n'indiquent pas de potentiel génotoxique des nitrates et des nitrites. Les études de cancérogénèse du NTP sur les nitrites dans l'eau de boisson (2001) concluent à l'absence de preuve d'activité cancérogène chez les rats F344/N mâles et femelles et les souris B6C3F1 mâles. Les résultats sont équivoques chez les souris B6C3F1 femelles sur la base de la tendance positive des incidences de papillome spinocellulaire ou carcinome (combiné) du pré-estomac. Toutefois, le NTP souligne que les études ont été conduites dans des conditions ne favorisant pas la formation endogène de nitrosamines.

En l'absence d'autres données, le groupe de travail conclut que le doublement du niveau basal de la méthémoglobinémie peut être identifié comme un marqueur précoce d'exposition aux nitrates et aux nitrites (indicateur d'oxydation). A ce stade, la prise en compte de la méthémoglobinémie comme marqueur précoce d'exposition reste justifiée par le fait qu'il s'agit de l'effet observable à la plus faible dose.

<sup>82</sup> Quantités maximum autorisées d'additif dans un produit alimentaire (règlement (CE) n° 1333/2008).

<sup>83</sup> Teneur en résidus à la fin du processus de production, exprimée en NaNO<sub>2</sub> ou en NaNO<sub>3</sub> d'après le règlement (CE) n° 1333/2008 (et ses amendements), annexe II partie E.

### 15.3.1.2. Conclusions relatives aux mécanismes de transformation des nitrates/nitrites dans les denrées alimentaires et dans l'organisme

Le Centre International de recherche sur le Cancer (IARC, 2010) a classé “probablement cancérigène pour l'Homme” (2A) les nitrates et les nitrites ingérés dans des conditions pouvant conduire à la formation de composés endogènes nitrosés.

L'état des connaissances a permis d'identifier la formation de composés nitrosés, en particulier lors de la consommation de produits carnés traités aux additifs nitrés. Après exposition orale, 75 % des nitrates alimentaires absorbés sont excrétés dans les urines, les 25 % restants sont sécrétés par les glandes salivaires dans la cavité buccale où une partie sera réduite en nitrites par les bactéries. Les nitrites sont instables et, en excès, peuvent générer la formation de composés nitrosés dans le tractus gastro-intestinal tels que :

- o les S-nitrosothiols (RSNO) formés principalement dans l'estomac où ils agissent comme donneurs de monoxyde d'azote (NO) ;
- o les composés N-nitrosés, notamment les nitrosamines, qui peuvent être formées tout au long du tractus digestif soit à pH acide dans l'estomac, soit à pH neutre et en présence de fer dans l'intestin. Les composés N-nitrosés peuvent conduire à la formation d'adduits à l'ADN ;
- o le fer nitrosylé (FeNO) ou nitrosylhème formé dans l'intestin et principalement dans le côlon.

La consommation de **viande rouge**, très riche en fer héminique, est directement et de manière dose-dépendante associée à la formation de composés nitrosés coliques et à la formation d'adduits à l'ADN spécifiques de ces composés. La consommation de **charcuterie (produits carnés traités)** augmente la formation de composés nitrosés par rapport à la consommation de viande rouge. La consommation de **charcuterie (produits carnés traités) diminuée en nitrites et additionnée de composés aux propriétés antioxydantes** permet une diminution significative de la formation des composés nitrosés comparé à la charcuterie classique.

Parmi les composés nitrosés, les nitrosamines sont les mieux caractérisées. Les données toxicologiques soulignent la génotoxicité et cancérogénicité de ces composés dans les études expérimentales. La N-nitrosodiméthylamine (NDMA) est identifiée comme ayant le plus fort potentiel cancérigène. La benchmark dose (BMDL<sub>10</sub>), estimée à partir de données expérimentales chez le rat (SCCS, 2011), a été utilisée dans la suite des travaux pour estimer le niveau de préoccupation sanitaire par le calcul de la marge d'exposition (MoE) après estimation de la quantité de nitrosamines endogènes formée après ingestion de nitrates et de nitrites cumulés.

Les données relatives à l'identification et la quantification des composés nitrosés exogènes<sup>84</sup> et endogènes<sup>85</sup> sont lacunaires. De plus, les données sur le potentiel toxicologique de ces composés, et en particulier du fer héminique nitrosylé et des nitrosothiols, font défaut.

En conclusion, les nouvelles connaissances disponibles ne sont pas suffisantes pour modifier la DJA proposée par l'EFSA et celle-ci est donc reprise pour l'évaluation des risques dans la présente expertise.

---

<sup>84</sup> Dans la matrice alimentaire

<sup>85</sup> Dans l'organisme du consommateur

### 15.3.2. Recommandations

Le groupe de travail recommande :

- de mener une réflexion sur l'établissement de valeurs toxicologiques de référence tenant compte de la co-exposition aux nitrates, aux nitrites et aux composés nitrosés endogènes et exogènes, et considérant les matrices alimentaires ;
- de mener des études expérimentales permettant d'identifier les effets critiques des nitrates et des nitrites dans des conditions reflétant la formation de composés nitrosés endogènes ;
- que soient conduites d'autres études expérimentales de toxicité chronique et de cancérogénèse sur modèle animal permettant d'évaluer le lien potentiel avec la consommation de produits carnés traités ou non à différentes doses de nitrates/nitrites ajoutés ;
- d'identifier les composés nitrosés exogènes et endogènes autres que les nitrosamines, de les quantifier et d'évaluer leur toxicité potentielle ;
- d'étudier les facteurs influençant la toxicité liée à la consommation de produits carnés traités (régime alimentaire, vieillissement, microbiote, pathologies, etc.).

### 15.4. Conclusions et recommandations relatives à la question 4

*“évaluer si, depuis la publication du CIRC/INCa de 2018, de nouvelles connaissances scientifiques sont susceptibles de mieux caractériser le lien entre cancérogénèse chez l'Homme et apport de fer-héminique associé aux nitrites via la consommation de produits carnés. Pour ce faire, l'Anses prendra l'attache de l'INCa, en tant que de besoin. »*

#### 15.4.1. Conclusions

Le groupe de travail conclut à :

- ✓ l'existence d'une association positive entre l'exposition aux **nitrates** via l'**eau de boisson** et le risque de cancer colorectal ;
- ✓ l'existence d'une association positive entre l'exposition aux **nitrates et/ou aux nitrites** via la **viande transformée** et le risque de cancer colorectal.

Pour la première fois, une étude récente rapporte l'impact d'une exposition périnatale aux nitrates sur le risque de cancers pédiatriques. S'agissant de la seule étude disponible, le GT n'est pas en mesure de conclure sur ce point.

Dans la mesure où seul un article était disponible, le GT considère qu'il n'a pas été possible, en l'état actuel des connaissances, de conclure à l'existence d'une association entre exposition aux nitrates et aux nitrites et le risque d'autres cancers que le cancer colorectal mais note :

- ✓ une association positive suspectée entre :
  - l'exposition aux **nitrates** présents dans l'**eau de boisson** et le risque de cancers des ovaires et des reins ;
  - l'exposition aux **nitrates** présents dans l'**alimentation** (eau de boisson exclue, naturels ou provenant de l'utilisation d'additifs) et le risque de cancer des ovaires ;

- l'exposition aux **NDEA (N-Nitrosodiéthylamine)** et **NDMA (N-Nitrosodiméthylamine)** présents dans l'**alimentation** (eau de boisson exclue, naturels ou provenant de l'utilisation d'additifs) et le risque de cancer du pancréas ;
  - l'exposition aux **NDEA** et **NDMA** présents dans l'**alimentation d'origine végétale** et le risque de cancers du foie et des voies biliaires ;
  - l'exposition aux **nitrates** présents dans la **viande transformée** et le risque de cancers du sein, de la vessie et de mortalité par cancer ;
  - l'exposition aux **nitrites** présents dans la **viande transformée** et le risque de cancers du pancréas, de l'estomac, de l'œsophage, du sein, de la vessie, de la prostate et de mortalité par cancer.
- ✓ une association inverse suspectée entre l'exposition aux **nitrites** présents dans l'**alimentation d'origine végétale** et le risque de cancers du foie et des voies biliaires.

Dans la mesure où plusieurs articles fournissent des résultats non convergents, dans la population des femmes ménopausées, le groupe de travail ne peut conclure quant à l'association positive observée dans certaines études, entre les expositions aux nitrates dans l'eau de boisson et le risque de cancer de la vessie et du sein.

#### 15.4.2. Recommandations

Les associations positives constatées ci-dessus, par l'examen approfondi des études épidémiologiques, soulignent la nécessité de limiter l'exposition alimentaire :

- aux nitrates et aux nitrites via les viandes transformées ;
- aux nitrates via l'eau de boisson.

Concernant les cancers pédiatriques et les cancers chez la femme ménopausée, une attention particulière doit être portée à l'impact de l'exposition aux nitrates dans l'eau de boisson. Des recherches complémentaires doivent être menées.

Pour le cas particulier des cancers chez la femme ménopausée, des études complémentaires seraient nécessaires au regard du rôle potentiel des nitrates en tant que perturbateur endocrinien.

#### 15.5. Conclusions et recommandations générales relatives aux risques liés à la consommation de nitrates et de nitrites

Au regard de l'expertise réalisée dans la présente saisine, le GT et les CES ERCA et BioRisk recommandent de **réduire les apports en nitrates et en nitrites via l'eau et les aliments**.

Concernant les produits carnés traités, le groupe de travail conclut que :

- les nitrites sont majoritairement apportés par les produits carnés traités et que leur utilisation en tant qu'additifs représente entre 45 et 65% de l'exposition totale toutes sources confondues ;
- la consommation de produits carnés traités participe à la formation de composés nitrosés endogènes préoccupants (nitrosamines, nitrosothiols, nitrosylhème);

- l'exposition aux nitrates et/ou aux nitrites *via* la consommation de produits carnés traités est associée positivement avec un risque de cancer colorectal, après analyse des données épidémiologiques issues d'une revue approfondie de la littérature ;
- le nombre d'études est insuffisant pour confirmer ou infirmer l'association entre l'exposition aux nitrates et/ou aux nitrites *via* la consommation de produits carnés traités et le risque de cancer du pancréas, de l'estomac, de l'œsophage, du sein, de la vessie, de la prostate et de mortalité par cancer.

Par ailleurs, l'analyse des risques microbiologiques découlant de la réduction ou de la suppression des nitrates et des nitrites dans la charcuterie permet aux experts du GT et des CES ERCA et BIORISK de souligner que plus la réduction de l'emploi des nitrites est importante, plus le risque microbiologique pour les consommateurs augmente. Par conséquent, les mesures de maîtrise complémentaires à mettre en place par les opérateurs devraient alors être drastiques et/ou plus nombreuses. Ils notent également que certains procédés qui se substituent à l'ajout direct de nitrites consistent à apporter des nitrates d'origine naturelle (extraits végétaux, bouillons de légumes, etc.) qui, sous l'effet d'enzymes bactériennes, sont convertis en nitrites. Ce type d'alternatives ne conduit donc pas à diminuer l'exposition des consommateurs aux nitrites.

Au vu de ces conclusions, le groupe de travail et les CES recommandent :

- de **limiter l'exposition alimentaire aux nitrates et aux nitrites apportés par les produits carnés traités** en limitant l'utilisation des additifs nitrés ajoutés et en respectant les recommandations de consommation ;
- que la **suppression ou la réduction éventuelle de l'usage des nitrates/nitrites** soit systématiquement associée à des **mesures de maîtrise compensatrices** autorisées, validées, surveillées, vérifiées, partagées par les professionnels et par les autorités ;
- que la poursuite des études permettant d'établir la relation entre la dose résiduelle de nitrates/nitrites et la dose d'additifs nitrés ajoutés dans les produits carnés ;
- que les mesures alternatives à l'emploi des nitrates/nitrites soient étudiées pour leur efficacité antimicrobienne, leur toxicité éventuelle et leur impact sur les propriétés organoleptiques des denrées alimentaires concernées ;
- d'améliorer l'information des consommateurs concernant l'utilisation d'alternatives à l'emploi des nitrates, nitrites telles que les bouillons de légumes, qui peuvent également être source d'exposition à ces composés ;
- que de nouvelles études épidémiologiques soient conduites pour améliorer les connaissances sur l'association entre l'exposition aux nitrates et aux nitrites *via* la consommation des produits carnés traités et les risques de cancer.

Concernant l'eau, le groupe de travail et le CES ERCA concluent :

- que les nitrates apportés par l'eau de boisson contribuent pour 20 à 25 % de l'apport total en nitrates ;
- à la mise en évidence, par les études épidémiologiques, d'une association, entre l'exposition aux nitrates *via* la consommation d'eau de boisson et le risque de cancer colorectal ;
- que le nombre d'études est insuffisant pour confirmer ou infirmer l'association entre l'exposition aux nitrates *via* la consommation d'eau de boisson et le risque de cancer des reins, de la vessie, du sein et des ovaires ainsi que les cancers pédiatriques.

Le groupe de travail et le CES ERCA recommandent :

- de réévaluer la pertinence de la valeur dérogatoire maximale utilisée en gestion (100 mg L<sup>-1</sup>) pour les nitrates dans les eaux destinées à la consommation humaine ;
- afin de limiter les expositions aux nitrates *via* les EDCH distribuées en réseau :
  - *de renforcer les actions visant à préserver la qualité des ressources en eau d'une contamination par les nitrates ;*
  - *de poursuivre et renforcer les actions visant à restaurer la qualité de l'eau pour les ressources contaminées ;*
  - *si les actions précédentes ne sont pas suffisantes, d'adapter les filières de production d'EDCH (mélange d'eau, mise en place de traitements adaptés, voire abandon de captages durablement contaminés) afin de garantir en permanence le respect de la limite de qualité dans les eaux distribuées ;*
- de mener des études complémentaires, afin d'étudier l'association entre les nitrates dans l'eau de boisson et le risque de cancer (autre que colorectal) révélé par les études épidémiologiques. Il s'agit des cancers pédiatriques suite à une exposition périnatale et des cancers des reins, des ovaires, du sein et de la vessie chez les femmes ménopausées ;
- d'évaluer, à la lumière des nouvelles données épidémiologiques et toxicologiques, la pertinence de la limite de qualité de 50 mg L<sup>-1</sup> de nitrates dans les eaux destinées à la consommation humaine.

Concernant les végétaux, le groupe de travail et le CES ERCA concluent que :

- les légumes sont les contributeurs majoritaires (entre 62 et 69 %) à l'exposition totale aux nitrates ;
- certains végétaux, en particulier les légumes feuilles, peuvent accumuler des quantités importantes de nitrates.

Le GT et le CES ERCA recommandent de diversifier la consommation de légumes dans le régime alimentaire total.

Le GT et le CES ERCA ont noté un manque de données dans plusieurs domaines, concernant notamment :

- les composés nitrosés exogènes (dans la matrice alimentaire) ou endogènes (dans l'organisme du consommateur) formés suite à l'ingestion de nitrates et de nitrites *via* la consommation de l'eau et de l'alimentation :
  - les mécanismes de formation et la toxicité associée à ces substances sont encore mal connus et doivent être étudiés ;
  - des méthodes d'analyses permettant d'identifier et de quantifier ces composés dans des matrices alimentaires et biologiques doivent être développées.
- l'établissement de valeurs toxicologiques de référence tenant compte de la co-exposition aux nitrates, aux nitrites et aux composés nitrosés endogènes et exogènes, et considérant les matrices alimentaires. A cette fin, des études expérimentales permettant d'identifier les effets critiques des nitrates, des nitrites dans des conditions reflétant la formation de composés nitrosés.

**16. BIBLIOGRAPHIE**

- Adler-Nissen, J., Ekgreen, M., Risum, J., 2014. Practical use of nitrite and basis for dosage in the manufacture of meat products. National Food Institute, Technical University of Denmark.
- Afssa, 2007a. Avis relatif à des utilisations de produits phytopharmaceutiques contenant du tolylfluamide susceptibles de conduire à une contamination des eaux de boisson et pour réaliser une évaluation quantitative du risque pour le consommateur Agence française de sécurité sanitaire des aliments.
- Afssa, 2007b. Revue des données récentes relatives à l'ionisation des denrées destinées à l'alimentation humaine. <https://www.anses.fr/fr/system/files/AAAT-Ra-Ionisation.pdf> Agence française de sécurité sanitaire des aliments.
- Afssa, 2008. Avis de l'Afssa relatif à l'évaluation des risques sanitaires liés aux situations de dépassement de la limite de qualité des nitrates et des nitrites dans les eaux destinées à la consommation humaine (saisine 2004-SA-0067), Agence française de sécurité sanitaire des aliments.
- Afssa, 2009. Avis sur l'augmentation des cas de listériose et le lien éventuel avec l'évolution des modes de production, de préparation et de consommation des aliments. <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC-Ra-ListerioseAliments.pdf>, Agence française de sécurité sanitaire des aliments.
- Afssa, 2010. Avis relatif à la demande d'appui scientifique et technique sur le plan d'échantillonnage du plan de surveillance de la contamination par *Listeria monocytogenes* de certaines denrées alimentaires prêtes à être consommées. <https://www.anses.fr/fr/system/files/AUT2009sa0323.pdf>, Agence française de sécurité sanitaire des aliments.
- Alahakoon, A.U., Jayasena, D.D., Ramachandra, S., Jo, C., 2015. Alternatives to nitrite in processed meat: Up to date. Trends in Food Science & Technology, 45(1): 37-49.
- Alarcon-Rojo, A.D., Carrillo-Lopez, L.M., Reyes-Villagrana, R., Huerta-Jiménez, M., Garcia-Galicia, I.A., 2019. Ultrasound and meat quality: A review. Ultrasonics sonochemistry, 55: 369-382.
- Albina, P. et al., 2019. Influence of Hydrogen Electron Donor, Alkaline pH, and High Nitrate Concentrations on Microbial Denitrification: A Review. Int J Mol Sci, 20(20).
- Alirezalu, K. et al., 2021a. Combined effects of  $\epsilon$ -polylysine and  $\epsilon$ -polylysine nanoparticles with plant extracts on the shelf life and quality characteristics of nitrite-free frankfurter-type sausages. Meat Sci, 172: 108318.
- Alirezalu, K. et al., 2021b. Antimicrobial Polyamide-Alginate Casing Incorporated with Nisin and  $\epsilon$ -Polylysine Nanoparticles Combined with Plant Extract for Inactivation of Selected Bacteria in Nitrite-Free Frankfurter-Type Sausage. Foods, 10: 1003.
- Aliyari, P., Kazaj, F.B., Barzegar, M., Ahmadi Gavlighi, H., 2020. Production of functional sausage using pomegranate peel and pistachio green hull extracts as natural preservatives. Journal of Agricultural Science and Technology, 22(1): 159-172.
- Alvarez, B., Radi, R., 2003. Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. Amino acids, 25(3): 295-311.
- Anses, 2010. Avis concernant les traitements par hautes pressions hydrostatiques sur des aliments emballés. <https://www.anses.fr/fr/system/files/AAAT2010sa0193.pdf>.
- Anses, 2011. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : *Toxoplasma gondii*. <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2010sa0274Fi.pdf>.

- Anses, 2012. Avis relatif à l'évaluation des risques sanitaires liés à la présence de N-nitrosomorpholine dans l'eau destinée à la consommation humaine <https://www.anses.fr/fr/system/files/EAUX2012sa0172.pdf>.
- Anses, 2013a. Avis relatif à la « Demande d'évaluation du risque lié à la contamination des produits de charcuterie à base de foie cru par le virus de l'hépatite E (VHE) ». <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2012sa0012.pdf>.
- Anses, 2013b. Note d'appui scientifique et technique dans le cadre de la mise en œuvre de l'objectif de la feuille de route pour la transition écologique portant sur des polluants émergents dans l'eau <https://www.anses.fr/fr/system/files/EAUX2013sa0133.pdf>.
- Anses, 2014. Avis et rapport d'expertise collective. Information des consommateurs en matière de prévention des risques biologiques liés aux aliments. Tome 1 - Tome 1 – Hiérarchisation des couples danger/aliment et état des lieux des mesures d'information. <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2012sa0118Ra-01.pdf>.
- Anses, 2015. Avis et rapport d'expertise collective. Information des consommateurs en matière de prévention des risques biologiques liés aux aliments. Tome 2 - Évaluation de l'efficacité des stratégies de communication. <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2012sa0118Ra-02.pdf>.
- Anses, 2016. Avis relatif à l'actualisation des repères du PNNS: révision des repères de consommations alimentaires. <http://www.caloris.fr/projets/17-01-ed-rapport-pnns-revision-reperes-1.pdf>.
- Anses, 2017a. Attribution des sources des maladies infectieuses d'origine alimentaire. Partie 1 : Revue des méthodes et inventaire des données. <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2015SA0162Ra.pdf>.
- Anses, 2017b. Étude individuelle nationale des consommations alimentaires 3 (INCA 3) <https://www.anses.fr/fr/system/files/NUT2014SA0234Ra.pdf>.
- Anses, 2017c. Valeurs toxicologiques de référence - Guide d'élaboration de l'Anses <https://www.anses.fr/fr/system/files/SUBSTANCES2017SA0016Ra.pdf>.
- Anses, 2018a. Attribution des sources des maladies infectieuses d'origine alimentaire. Partie 2 : Analyse des données épidémiologiques. <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2015SA0162Ra-2.pdf>.
- Anses, 2018b. Avis et rapport relatif aux mesures de maîtrise des salmonelles en filière porcine : état des connaissances et appréciation quantitative des risques. <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2016SA0037Ra.pdf>.
- Anses, 2018c. Avis relatif à la détermination d'une valeur sanitaire maximale (VMAX) pour le N,N - diméthylsulfamide dans l'eau destinée à la consommation humaine <https://www.anses.fr/fr/system/files/EAUX2017SA0063.pdf>.
- Anses, 2019. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : "*Clostridium botulinum*, *Clostridium* neurotoxigènes" - Août 2019. <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2016SA0074Fi.pdf>.
- Anses, 2020a. Avis et rapport d'expertise. Hiérarchisation des dangers biologiques et chimiques dans le but d'optimiser la sécurité sanitaire des aliments : Méthodologie et preuve de concept. <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2016SA0153Ra.pdf>.
- Anses, 2020b. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : *Trichinella* spp. <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2016SA0265Fi.pdf>.
- Anses, 2021. Rapport intermédiaire relatif à *Clostridium botulinum* : mise à jour des connaissances sur les différentes formes des types C, D, mosaïque C/D et D/C et E. <https://www.anses.fr/fr/system/files/SABA2019SA0114Ra.pdf>.
- Anteby, E.Y. et al., 1996. Human follicular nitric oxide pathway: relationship to follicular size, oestradiol concentrations and ovarian blood flow. Hum Reprod, 11(9): 1947-51.

- Anyzewska A. , A., W., 2014. Evaluating adult dietary intakes of nitrate and nitrite in Polish households during 2006-2012. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 65(2): 107-111.
- Aschebrook-Kilfoy, B. et al., 2012. Epithelial ovarian cancer and exposure to dietary nitrate and nitrite in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Eur J Cancer Prev*, 21(1): 65-72.
- ATSDR, 2022. Toxicological Profile for N-Nitrosodimethylamine (NDMA), Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Augustin, J.-C. et al., 2011. Design of challenge testing experiments to assess the variability of *Listeria monocytogenes* growth in foods. *Food Microbiology*, 28(4): 746-754.
- Augustin, J.C., Zuliani, V., Cornu, M., Guillier, L., 2005. Growth rate and growth probability of *Listeria monocytogenes* in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 99(5): 1019-1042.
- Aurore A. Coudray et al., 2019. Bilan et utilisation des additifs dans les produits transformés. 2018-SA0064: 105 p. anses-02860704.
- Ávila, M., Gómez-Torres, N., Hernández, M., Garde, S., 2014. Inhibitory activity of reuterin, nisin, lysozyme and nitrite against vegetative cells and spores of dairy-related Clostridium species. *International journal of food microbiology*, 172: 70-75.
- Aymerich, T., Jofré, A., Garriga, M., Hugas, M., 2005. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by Natural Antimicrobials and High Hydrostatic Pressure in Sliced Cooked Ham. *Journal of Food Protection*, 68(1): 173-177.
- Azeez OH, Mahmood MB, JS, H., 2011. Effect of nitrate poisoning on some biochemical parameters in rats. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 25(2): 47-50.
- Babateen, A.M., Fornelli, G., Donini, L.M., Mathers, J.C., Siervo, M., 2018. Assessment of dietary nitrate intake in humans: a systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 108(4): 878-888.
- Baer, A.A., Miller, M.J., Dilger, A.C., 2013. Pathogens of interest to the pork industry: a review of research on interventions to assure food safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(2): 183-217.
- Bahadoran, Z. et al., 2015. Is dietary nitrate/nitrite exposure a risk factor for development of thyroid abnormality? A systematic review and meta-analysis. *Nitric Oxide*, 47: 65-76.
- Bang, I.-S. et al., 2006. Maintenance of nitric oxide and redox homeostasis by the Salmonella flavohemoglobin hmp. *Journal of Biological Chemistry*, 281(38): 28039-28047.
- Baranyi, J., Tamplin, M.L., 2004. ComBase: a common database on microbial responses to food environments. *Journal of food protection*, 67(9): 1967-1971.
- Barba, F.J., Koubaa, M., do Prado-Silva, L., Orlien, V., de Souza Sant'Ana, A., 2017. Mild processing applied to the inactivation of the main foodborne bacterial pathogens: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 66: 20-35.
- Barbeau, T.R., Guillette, L.J., 2007. Altered Ovarian Steroids in *Xenopus laevis* Exposed to Environmentally Relevant Concentrations of Nitrate. *Journal of Herpetology*, 41(4): 590-596.
- Barruet, R. et al., 2020. A common source for a trichinellosis outbreak reported in France and Serbia in 2017. *Eurosurveillance*, 25(24): 1900527.
- Barry, K.H. et al., 2020. Ingested Nitrate and Nitrite and Bladder Cancer in Northern New England. *Epidemiology*, 31(1): 136-144.
- Bastide, N.M. et al., 2015. A central role for heme iron in colon carcinogenesis associated with red meat intake. *Cancer Res*, 75(5): 870-9.
- Bastide, N.M. et al., 2017. Red Wine and Pomegranate Extracts Suppress Cured Meat Promotion of Colonic Mucin-Depleted Foci in Carcinogen-Induced Rats. *Nutr Cancer*, 69(2): 289-298.

- Bechaux, J., de La Pomélie, D., Théron, L., Santé-Lhoutellier, V., Gatellier, P., 2018. Iron-catalysed chemistry in the gastrointestinal tract: Mechanisms, kinetics and consequences. A review. *Food Chem*, 268: 27-39.
- Bellezi, L., Ilha, P., Schiesari, L., 2015. Ontogenetic Variation in the Sensitivity of the Gladiator Frog, *Hypsiboas faber*, to Inorganic Nitrogen. *Copeia*, 2015(1): 14-21, 8.
- Bemrah, N., Leblanc, J.-C., Volatier, J.-L., 2008. Assessment of dietary exposure in the French population to 13 selected food colours, preservatives, antioxidants, stabilizers, emulsifiers and sweeteners. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 1(1): 2-14.
- Bemrah, N. et al., 2012. Assessment of dietary exposure to annatto (E160b), nitrites (E249-250), sulphites (E220-228) and tartaric acid (E334) in the French population: the second French total diet study. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 29(6): 875-885.
- Bergis, H. et al., 2019. Development of standards for conducting microbiological challenge tests for food and feed products (ISO 20976), IAFP 2019 Annual Meeting, Louisville Kentucky. International Association for Food Protection, pp. 261-261.
- Bhaduri, S., Buchanan, R., Phillips, J., 1995. Expanded response surface model for predicting the effects of temperatures, pH, sodium chloride contents and sodium nitrite concentrations on the growth rate of *Yersinia enterocolitica*. *Journal of applied bacteriology*, 79(2): 163-170.
- Bingham, S.A., Hughes, R., Cross, A.J., 2002. Effect of white versus red meat on endogenous N-nitrosation in the human colon and further evidence of a dose response. *J Nutr*, 132(11 Suppl): 3522s-3525s.
- Bingham, S.A. et al., 1996. Does increased endogenous formation of N-nitroso compounds in the human colon explain the association between red meat and colon cancer? *Carcinogenesis*, 17(3): 515-23.
- Björkroth, J., 2005. Microbiological ecology of marinated meat products. *Meat Science*. Elsevier Ltd, in, 477–480 pp.
- Boink, A., Speijers, G., 2001. HEALTH EFFECTS OF NITRATES AND NITRITES, A REVIEW. International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium, pp. 29-36.
- Bolumar, T. et al., 2021. High-pressure processing of meat: Molecular impacts and industrial applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(1): 332-368.
- Bombrun, L., 2013. Analyse des transferts de masse et de l'adhésion entre muscles lors de la fabrication de charcuteries cuites à faible teneur en sel. Effet du traitement thermique et modélisation des pertes de poids, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II.
- Bombrun, L., Gatellier, P., Carlier, M., Kondjoyan, A., 2014. The effects of low salt concentrations on the mechanism of adhesion between two pieces of pork semimembranosus muscle following tumbling and cooking. *Meat Science*, 96(1): 5-13.
- Bone, A. et al., 2010. Nationwide outbreak of *Salmonella enterica* serotype 4, 12: i:-infections in France, linked to dried pork sausage, March-May 2010. *Eurosurveillance*, 15(24): 19592.
- Bonifacie, A. et al., 2021a. New Insights into the Chemical Reactivity of Dry-Cured Fermented Sausages: Focus on Nitrosation, Nitrosylation and Oxidation. *Foods*, 10(4): 852.
- Bonifacie, A. et al., 2021b. Chemical reactivity of nitrite and ascorbate in a cured and cooked meat model implication in nitrosation, nitrosylation and oxidation. *Food Chemistry*, 348: 129073.
- Botsaris, G., Taki, A., 2015. Effect of high-pressure processing on the microbial quality throughout the shelf life of vacuum-packed sliced ham and frankfurters. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6): 840-845.
- Bruce, G.M., Corey, L.M., Mandel, J.H., Pleus, R.C., 2013. Urinary nitrate, thiocyanate, and perchlorate and serum thyroid endpoints based on NHANES 2001 to 2002. *J Occup Environ Med*, 55(1): 52-8.

- Bruchet A., Hochereau C., M., E., 2012. Recherche de N-nitrosamines sur une vingtaine de sites représentant différents scénarios de traitement, Journées Internationales Eau Poitiers.
- Brul, S., Van Gerwen, S., Zwietering, M.H., 2007. Modelling microorganisms in food. Elsevier.
- Buller, I.D. et al., 2021. Ingestion of Nitrate and Nitrite and Risk of Stomach and Other Digestive System Cancers in the Iowa Women's Health Study. *Int J Environ Res Public Health*, 18(13).
- Burney, S., Caulfield, J.L., Niles, J.C., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., 1999. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxyxynitrite. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424(1-2): 37-49.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol*, 94: 223-253.
- Carpentier, B., Cerf, O., 2011. Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International journal of food microbiology*, 145(1): 1-8.
- Cartwright, E.J. et al., 2013. Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998–2008. *Emerging infectious diseases*, 19(1): 1.
- Chaitiemwong, N., Hazeleger, W., Beumer, R., Zwietering, M., 2014. Quantification of transfer of *Listeria monocytogenes* between cooked ham and slicing machine surfaces. *Food Control*, 44: 177-184.
- Charrois, J.W.A., Arend, M.W., Froese, K.L., Hrudey, S.E., 2004. Detecting N-Nitrosamines in Drinking Water at Nanogram per Liter Levels Using Ammonia Positive Chemical Ionization. *Environmental Science & Technology*, 38(18): 4835-4841.
- Chazelas, E. et al., 2021. Exposure to food additive mixtures in 106,000 French adults from the NutriNet-Santé cohort. *Scientific Reports*, 11(1): 19680.
- Chazelas, E. et al., 2022. Nitrites and nitrates from food additives and natural sources and cancer risk: results from the NutriNet-Santé cohort. *International Journal of Epidemiology*.
- Che, S. et al., 2021. Hesperidin prevents the combined toxicity of decabromodiphenyl ether and sodium nitrite in vitro. *Food Chem Toxicol*, 156: 112410.
- Christieans, S., Picgirard, L., Parafita, E., Lebert, A., Gregori, T., 2018. Impact of reducing nitrate/nitrite levels on the behavior of *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in French dry fermented sausages. *Meat science*, 137: 160-167.
- Cichoski, A.J. et al., 2015. Ultrasound-assisted post-packaging pasteurization of sausages. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 30: 132-137.
- Ciji, A., Sahu, N.P., Pal, A.K., Akhtar, M.S., 2013. Physiological changes in *Labeo rohita* during nitrite exposure: detoxification through dietary vitamin E. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 158(2): 122-9.
- Cleide, O.d.A. et al., 2015. Risk assessment of *Salmonella* in Danish meatballs produced in the catering sector. *International journal of food microbiology*, 196: 109-125.
- Clemente, I., Condón-Abanto, S., Pedrós-Garrido, S., Whyte, P., Lyng, J., 2020. Efficacy of pulsed electric fields and antimicrobial compounds used alone and in combination for the inactivation of *Campylobacter jejuni* in liquids and raw chicken. *Food Control*, 107: 106491.
- Cooper, C.E., 1999. Nitric oxide and iron proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1411(2-3): 290-309.
- Cooper, C.E., 2002. Nitric oxide and cytochrome oxidase: substrate, inhibitor or effector? *Trends in biochemical sciences*, 27(1): 33-39.
- Coroller, L., Jeuge, S., Couvert, O., Christieans, S., Ellouze, M., 2015. Extending the gamma concept to non-thermal inactivation: A dynamic model to predict the fate of *Salmonella* during the dried sausages process. *Food microbiology*, 45: 266-275.

- Cressey, P., Cridge, B., 2022. Exposure to nitrate from food and drinking-water in New Zealand. Can these be considered separately? *Food Additives & Contaminants: Part A*, 39(5): 838-852.
- Cross, A.J., Greetham, H.L., Pollock, J.R., Rowland, I.R., Bingham, S.A., 2006. Variability in fecal water genotoxicity, determined using the Comet assay, is independent of endogenous N-nitroso compound formation attributed to red meat consumption. *Environ Mol Mutagen*, 47(3): 179-84.
- CSHPF, 1998. Position sanitaire sur les nitrates dans les eaux destinées à la consommation humaine., Conseil supérieur d'hygiène publique de France.
- Cui, H., Gabriel, A.A., Nakano, H., 2010. Antimicrobial efficacies of plant extracts and sodium nitrite against *Clostridium botulinum*. *Food Control*, 21: 1030-1036.
- Currie, A. et al., 2015. Multi-province listeriosis outbreak linked to contaminated deli meat consumed primarily in institutional settings, Canada, 2008. *Foodborne pathogens and disease*, 12(8): 645-652.
- David, J.M. et al., 2013. Attribution of the French human Salmonellosis cases to the main food-sources according to the type of surveillance data. *Preventive Veterinary Medicine*, 110(1): 12-27.
- Davis, M.E. et al., 2012. Induction of colonic aberrant crypts in mice by feeding apparent N-nitroso compounds derived from hot dogs. *Nutr Cancer*, 64(2): 342-9.
- de La Pomélie, D., Santé-Lhoutellier, V., Gatellier, P., 2018a. Mechanisms and kinetics of heme iron nitrosylation in an in vitro gastro-intestinal model. *Food Chem*, 239: 86-93.
- de La Pomélie, D., Santé-Lhoutellier, V., Sayd, T., Gatellier, P., 2018b. Oxidation and nitrosation of meat proteins under gastro-intestinal conditions: Consequences in terms of nutritional and health values of meat. *Food Chem*, 243: 295-304.
- de La Pomélie, D., Santé-Lhoutellier, V., Sayd, T., Théron, L., Gatellier, P., 2019. Using a dynamic artificial digestive system to investigate heme iron nitrosylation during gastro-intestinal transit. *Food Chem*, 281: 231-235.
- De Oliveira, T.L.C. et al., 2011. Antimicrobial activity of *Satureja montana* L. essential oil against *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. *International journal of food microbiology*, 144(3): 546-555.
- Deane, E.E., 2007. Impact of nitrite exposure on endocrine, osmoregulatory and cytoprotective functions in the marine teleost *Sparus sarba*. *Aquatic toxicology*, v. 82(no. 2): pp. 85-93-2007 v.82 no.2.
- Delhalle, L., Daube, G., Adolphe, Y., Crevecoeur, S., Clinquart, A., 2012. Les modèles de microbiologie prévisionnelle pour la maîtrise de la sécurité des aliments (synthèse bibliographique). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 16(3): 369-381.
- Denis, M. et al., 2011. Prevalence and characterization of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in french raw pork meat at the distribution level.
- Derens, E., Guilpart, J., Palagos, B., Prosen, E., Geslain, T., 2004. La chaîne du froid, du fabricant au consommateur. *Revue générale du froid*(1042): 29-36.
- Desriac, N., Vergos, M., Achberger, V., Coroller, L., Couvert, O., 2019. Predicting heat process efficiency in thermal processes when bacterial inactivation is not log-linear. *International journal of food microbiology*, 290: 36-41.
- Dias, N.A.A., Rodrigues, L.T.d.S., Palhares, P.C., Ramos, E.M., Piccoli, R.H., 2015. Antimicrobial Activity of Essential Oils on *Clostridium perfringens* Type A Inoculated in Mortadella. *Journal of Food Safety*, 35: 466-472.
- Dong, L. et al., 2022. The genotoxic potential of mixed nitrosamines in drinking water involves oxidative stress and Nrf2 activation. *J Hazard Mater*, 426: 128010.

- Dubey, J., 1998. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. International journal for parasitology, 28(7): 1019-1024.
- Dubrovsky, N.M. et al., 2010. The quality of our Nation's waters—Nutrients in the Nation's streams and groundwater, 1992-2004. U.S. Geological Survey Circular 1350: 174 p.
- Durantou, F., Guillou, S., Simonin, H., Chéret, R., de Lamballerie, M., 2012. Combined use of high pressure and salt or sodium nitrite to control the growth of endogenous microflora in raw pork meat. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 16: 373-380.
- Duret, S., Guillier, L., Hoang, H.-M., Flick, D., Laguerre, O., 2014. Identification of the significant factors in food safety using global sensitivity analysis and the accept-and-reject algorithm: application to the cold chain of ham. International journal of food microbiology, 180: 39-48.
- Duret, S. et al., 2019. Combining quantitative risk assessment of human health, food waste, and energy consumption: The next step in the development of the food cold chain? Risk Analysis, 39(4): 906-925.
- Edwards, T.M., Hamlin, H.J., 2018. Reproductive endocrinology of environmental nitrate. Gen Comp Endocrinol, 265: 31-40.
- Edwards, T.M. et al., 2006. Environmental context determines nitrate toxicity in Southern toad (*Bufo terrestris*) tadpoles. Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands), 78(1): 50-58.
- EFSA, 2003. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on a request from the Commission related to the effects of Nitrites/Nitrates on the Microbiological Safety of Meat Products. The EFSA Journal, 14: 1-34.
- EFSA, 2008. Nitrate in vegetables - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. EFSA Journal, 6.
- EFSA, 2017a. Re-evaluation of potassium nitrite (E 249) and sodium nitrite (E 250) as food additives. EFSA Journal, 15(6): e04786.
- EFSA, 2017b. Re-evaluation of sodium nitrate (E 251) and potassium nitrate (E 252) as food additives. EFSA Journal, 15(6): e04787.
- EFSA, 2018. *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. EFSA Journal, 16(1): e05134.
- EFSA, ECDC, 2021. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. EFSA Journal, 19(2).
- Einsle, O., Messerschmidt, A., Huber, R., Kroneck, P.M., Neese, F., 2002. Mechanism of the six-electron reduction of nitrite to ammonia by cytochrome c nitrite reductase. Journal of the American Chemical Society, 124(39): 11737-11745.
- Eisinaité, V., Tamkutė, L., Vinauskienė, R., Leskauskaitė, D., 2020. Freeze-dried celery as an indirect source of nitrate in cold-smoked sausages: Effect on safety and color formation. LWT, 129: 109586.
- Ekart, K., Hmelak Gorenjal, A., Madorran, E., Lapajne, S., Langerholc, T., 2013. Study on the influence of food processing on nitrate levels in vegetables. EFSA Supporting Publications, 10(12): 514E.
- Elias, A. et al., 2020. Nitrite and nitrate content in meat products and estimated nitrite intake by the Estonian children. Food Additives & Contaminants: Part A, 37(8): 1229-1237.
- EMA, 2020. Assessment report Nitrosamine impurities in human medicinal products.
- Escobar-Gutiérrez, A.J., Burns, I.G., Lee, A., Edmondson, R.N., 2002. Screening lettuce cultivars for low nitrate content during summer and winter production. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 77(2): 232-237.
- Esmaili, M., Ariaei, P., Nasiraie, L.R., Pour, M.Y., 2021. Comparison of coating and nano-coating of chitosan- *Lepidium sativum* seed gum composites on quality and shelf life of beef. Journal of Food Measurement and Characterization, 15(1): 341-352.

- Espejo-Herrera, N. et al., 2015. Nitrate in drinking water and bladder cancer risk in Spain. *Environ Res*, 137: 299-307.
- Espejo-Herrera, N. et al., 2016a. Colorectal cancer risk and nitrate exposure through drinking water and diet. *Int J Cancer*, 139(2): 334-46.
- Espejo-Herrera, N. et al., 2016b. Ingested Nitrate and Breast Cancer in the Spanish Multicase-Control Study on Cancer (MCC-Spain). *Environ Health Perspect*, 124(7): 1042-9.
- Etemadi, A. et al., 2018. Anatomical subsite can modify the association between meat and meat compounds and risk of colorectal adenocarcinoma: Findings from three large US cohorts. *Int J Cancer*, 143(9): 2261-2270.
- Etemadi, A. et al., 2017. Mortality from different causes associated with meat, heme iron, nitrates, and nitrites in the NIH-AARP Diet and Health Study: population based cohort study. *BMJ*, 357: j1957.
- Faes, M.R. et al., 2009. Nitric oxide regulates steroid synthesis by bovine antral granulosa cells in a chemically defined medium. *Animal Reproduction Science*, 110(3): 222-236.
- FAO & WHO, 2021. Microbiological risk assessment - Guidance for food. , Rome.
- Fathmawati, Fachiroh, J., Gravitiani, E., Sarto, Husodo, A.H., 2017. Nitrate in drinking water and risk of colorectal cancer in Yogyakarta, Indonesia. *J Toxicol Environ Health A*, 80(2): 120-128.
- Félix, B. et al., 2018. Population genetic structure of *Listeria monocytogenes* strains isolated from the pig and pork production chain in France. *Frontiers in microbiology*, 9: 684.
- Feurer, C. et al., 2018. High load of hepatitis E viral RNA in pork livers but absence in pork muscle at French slaughterhouses. *International journal of food microbiology*, 264: 25-30.
- Flores, M., Toldrá, F., 2021. Chemistry, safety, and regulatory considerations in the use of nitrite and nitrate from natural origin in meat products - Invited review. *Meat Sci*, 171: 108272.
- Forauer, E., Wu, S.T., Etter, A.J., 2021. *Listeria monocytogenes* in the retail deli environment: A review. *Food Control*, 119: 107443.
- Ford, E., Hughes, M.N., Wardman, P., 2002. Kinetics of the reactions of nitrogen dioxide with glutathione, cysteine, and uric acid at physiological pH. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(12): 1314-1323.
- Fraqueza, M.J., Laranjo, M., Elias, M., Patarata, L., 2021. Microbiological hazards associated with salt and nitrite reduction in cured meat products: control strategies based on antimicrobial effect of natural ingredients and protective microbiota. *Curr. Opin. Food Sci*.
- Fredericks, J. et al., 2019. Low salt exposure results in inactivation of *Toxoplasma gondii* bradyzoites during formulation of dry cured ready-to-eat pork sausage. *Food and Waterborne Parasitology*, 15: e00047.
- Fredriksson-Ahoma, M. et al., 2020. Foodborne Zoonoses Common in Hunted Wild Boars. *EcoHealth*: 1-11.
- Freitag, A.R., Thayer, L.R., Leonetti, C., Stapleton, H.M., Hamlin, H.J., 2015. Effects of elevated nitrate on endocrine function in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 436: 8-12.
- FSIS, 2017. FSIS Compliance Guideline for Stabilization (Cooling and Hot-Holding) of Fully and Partially Heat-Treated RTE and NRTE Meat and Poultry Products Produced by Small and Very Small Establishment. <https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/import/Compliance-Guideline-Stabilization-Appendix-B.pdf>.
- Gallagher, D. et al., 2016. *Listeria monocytogenes* in retail delicatessens: an interagency risk assessment—risk mitigations. *Journal of food protection*, 79(7): 1076-1088.
- Galloway, J.N., Leach, A.M., Bleeker, A., Erisman, J.W., 2013. A chronology of human understanding of the nitrogen cycle. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1621): 20130120.

- Gandarilla-Esparza, D.D. et al., 2021. FOXE1 polymorphisms and chronic exposure to nitrates in drinking water cause metabolic dysfunction, thyroid abnormalities, and genotoxic damage in women. *Genet Mol Biol*, 44(3): e20210020.
- García-Rey, R., García-Garrido, J., Quiles-Zafra, R., Tapiador, J., De Castro, M.L., 2004. Relationship between pH before salting and dry-cured ham quality. *Meat Science*, 67(4): 625-632.
- Gardner, A.M., Gardner, P.R., 2002. Flavohemoglobin detoxifies nitric oxide in aerobic, but not anaerobic, *Escherichia coli*: evidence for a novel inducible anaerobic nitric oxide-scavenging activity. *Journal of Biological Chemistry*, 277(10): 8166-8171.
- Garriga, M., Aymerich, M.T., Costa, S., Monfort, J.M., Hugas, M., 2002. Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food Microbiology*, 19(5): 509-518.
- Gatseva, P., Vladeva, S., Pavlov, K., 1998. Incidence of goiter among children in a village with nitrate contamination of drinking water. *Folia Med (Plovdiv)*, 40(3): 19-23.
- Geeraerts, W., Pothakos, V., De Vuyst, L., Leroy, F., 2017. Diversity of the dominant bacterial species on sliced cooked pork products at expiration date in the Belgian retail. *Food microbiology*, 65: 236-243.
- GEMS/Food-EURO, 1995. GEMS/Food-EURO Second Workshop on Reliable Evaluation of Low-Level Contamination of Food.
- Gentile, F. et al., 2017. DNA damage by lipid peroxidation products: implications in cancer, inflammation and autoimmunity. *AIMS Genet*, 4(2): 103-137.
- Ghabraie, M., Vu, K.D., Huq, T., Khan, A., Lacroix, M., 2016. Antilisterial effects of antibacterial formulations containing essential oils, nisin, nitrite and organic acid salts in a sausage model. *Journal of Food Science and Technology*, 53: 2625-2633.
- Gill, A.O., Delaquis, P., Russo, P., Holley, R.A., 2002. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology*, 73: 83-92.
- Giuffrè, A., Borisov, V.B., Mastronicola, D., Sarti, P., Forte, E., 2012. Cytochrome bd oxidase and nitric oxide: from reaction mechanisms to bacterial physiology. *FEBS letters*, 586(5): 622-629.
- Glass, K. et al., 2016. Bayesian source attribution of salmonellosis in South Australia. *Risk Analysis*, 36(3): 561-570.
- Golden, M.C. et al., 2017. Effect of cultured celery juice, temperature, and product composition on the inhibition of proteolytic *Clostridium botulinum* toxin production. *J. Food Prot*, 80: 1259-1265.
- Gómez, B. et al., 2019. Application of pulsed electric fields in meat and fish processing industries: An overview. *Food Research International*, 123: 95-105.
- Gonzales-Barron, U., Redmond, G., Butler, F., 2010a. A consumer-phase exposure assessment of *Salmonella* Typhimurium from Irish fresh pork sausages: I. Transport and refrigeration modules. *Food Control*, 21(12, Supplement): 1683-1692.
- Gonzales-Barron, U.A., Redmond, G., Butler, F., 2010b. A consumer-phase exposure assessment of *Salmonella* Typhimurium from Irish fresh pork sausages: II. Cooking and consumption modules. *Food Control*, 21(12, Supplement): 1693-1702.
- Gossner, C. et al., 2012. Nationwide outbreak of *Salmonella* enterica serotype 4,[5], 12: i:-infection associated with consumption of dried pork sausage, France, November to December 2011. *Eurosurveillance*, 17(5): 20071.
- Gray, J. et al., 2021. Colonisation dynamics of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food production environments. *Scientific reports*, 11(1): 1-17.
- Guerrero, L., Gou, P., Arnau, J., 1999. The influence of meat pH on mechanical and sensory textural properties of dry-cured ham. *Meat science*, 52(3): 267-273.

- Guillier, L. et al., 2020. Risk factors for sporadic *Yersinia enterocolitica* infections: a systematic review and meta-analysis. *Microbial Risk Analysis*: 100141.
- Guillier, L. et al., 2021. Risk factors for sporadic salmonellosis: a systematic review and meta-analysis. *Microbial Risk Analysis*, 17: 100138.
- Gunvig, A., Borggaard, C., Hansen, F., Hansen, T.B., Aabo, S., 2016. ConFerm–A tool to predict the reduction of pathogens during the production of fermented and matured sausages. *Food Control*, 67: 9-17.
- Gunvig, A., Hansen, F., Borggaard, C., 2013. A mathematical model for predicting growth/no-growth of psychrotrophic *C. botulinum* in meat products with five variables. *Food Control*, 29(2): 309-317.
- Guo, M. et al., 2015. Qualitative assessment for *Toxoplasma gondii* exposure risk associated with meat products in the United States. *Journal of food protection*, 78(12): 2207-2219.
- Hächler, H. et al., 2013. Outbreak of listeriosis due to imported cooked ham, Switzerland 2011. *Eurosurveillance*, 18(18): 20469.
- Hamdi, M. et al., 2018. Improvement of the quality and the shelf life of reduced-nitrites turkey meat sausages incorporated with carotenoproteins from blue crabs shells. *Food Control*, 91: 148-159.
- Hamlin, H.J., Edwards, T.M., McCoy, J., Cruze, L., Guillette, L.J., Jr., 2016. Environmentally relevant concentrations of nitrate increase plasma testosterone concentrations in female American alligators (*Alligator mississippiensis*). *Gen Comp Endocrinol*, 238: 55-60.
- Hamlin, H.J. et al., 2008. Nitrate-induced elevations in circulating sex steroid concentrations in female Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) in commercial aquaculture. *Aquaculture*, 281(1): 118-125.
- Hammer, K.A., Carson, C.F., 2011. Antibacterial and antifungal activities of essential oils. In: Thormar, H. (Ed.), *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*. Wiley, Chichester, pp. 255-306.
- Harkouss, R., 2014. Effet du salage et du séchage sur la dynamique d'évolution de la protéolyse, de la structure et de la texture lors de la fabrication d'un jambon sec. Développement d'un modèle de «jambon numérique» couplant transferts d'eau, de sel et protéolyse, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II.
- Harkouss, R. et al., 2015. Quantitative study of the relationships among proteolysis, lipid oxidation, structure and texture throughout the dry-cured ham process. *Food Chemistry*, 166: 522-530.
- Harkouss, R., Chevarin, C., Daudin, J.-D., Sicard, J., Mirade, P.-S., 2018. Development of a multi-physical finite element-based model that predicts water and salt transfers, proteolysis and water activity during the salting and post-salting stages of the dry-cured ham process. *Journal of Food Engineering*, 218: 69-79.
- Hausladen, A., Gow, A.J., Stamler, J.S., 1998. Nitrosative stress: metabolic pathway involving the flavohemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(24): 14100-14105.
- Hebels, D.G.A.J. et al., 2012. Red meat intake-induced increases in fecal water genotoxicity correlate with pro-carcinogenic gene expression changes in the human colon. *Food and Chemical Toxicology*, 50(2): 95-103.
- Herrmann, S.S., Duedahl-Olesen, L., Granby, K., 2014. Simultaneous determination of volatile and non-volatile nitrosamines in processed meat products by liquid chromatography tandem mass spectrometry using atmospheric pressure chemical ionisation and electrospray ionisation. *Journal of Chromatography A*, 1330: 20-29.
- Higuero, N., Moreno, I., Lavado, G., Vidal-Aragón, M.C., Cava, R., 2020. Reduction of nitrate and nitrite in Iberian dry cured loins and its effects during drying process. *Meat Sci*, 163: 108062.
- Hill, D. et al., 2006. Effects of time and temperature on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in enhanced pork loin. *Journal of food protection*, 69(8): 1961-1965.

- Hill, D., Sreekumar, C., Gamble, H., Dubey, J., 2004. Effect of commonly used enhancement solutions on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork loin. *Journal of food protection*, 67(10): 2230-2233.
- Hoelzer, K. et al., 2012. Estimation of *Listeria monocytogenes* transfer coefficients and efficacy of bacterial removal through cleaning and sanitation. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2): 267-277.
- Holtrop, G., Johnstone, A.M., Fyfe, C., Gratz, S.W., 2012. Diet composition is associated with endogenous formation of N-nitroso compounds in obese men. *J Nutr*, 142(9): 1652-8.
- Hong, S.H., Kim, H.S., Yoon, K.S., 2016. Survival and Risk Comparison of *Campylobacter jejuni* on Various Processed Meat Products. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(6): 580.
- Honikel, K.-O., 2008. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat science*, 78(1-2): 68-76.
- Horita, C.N. et al., 2018. Combining reformulation, active packaging and non-thermal post-packaging decontamination technologies to increase the microbiological quality and safety of cooked ready-to-eat meat products. *Trends in Food Science & Technology*, 72: 45-61.
- Horsch, A. et al., 2014. The effect of pH and nitrite concentration on the antimicrobial impact of celery juice concentrate compared with conventional sodium nitrite on *Listeria monocytogenes*. *Meat science*, 96(1): 400-407.
- Hospital, X.F., Hierro, E., Fernandez, M., 2014. Effect of reducing nitrate and nitrite added to dry fermented sausages on the survival of *Salmonella* Typhimurium. *Food research international*, 62: 410-415.
- Hospital, X.F., Hierro, E., Fernández, M., 2012. Survival of *Listeria innocua* in dry fermented sausages and changes in the typical microbiota and volatile profile as affected by the concentration of nitrate and nitrite. *International journal of food microbiology*, 153(3): 395-401.
- Hospital, X.F., Hierro, E., Stringer, S., Fernández, M., 2016. A study on the toxigenesis by *Clostridium botulinum* in nitrate and nitrite-reduced dry fermented sausages. *International journal of food microbiology*, 218: 66-70.
- Hosseini, F. et al., 2021. Nitrate-nitrite exposure through drinking water and diet and risk of colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Clin Nutr*, 40(5): 3073-3081.
- Hughes, R., Cross, A.J., Pollock, J.R., Bingham, S., 2001. Dose-dependent effect of dietary meat on endogenous colonic N-nitrosation. *Carcinogenesis*, 22(1): 199-202.
- Hunault, C.C. et al., 2007. Effects of sub-chronic nitrate exposure on the thyroidal function in humans. *Toxicol Lett*, 175(1-3): 64-70.
- Hwang, H. et al., 2020. Selection and characterization of staphylococcus hominis subsp. hominis wikim0113 isolated from kimchi as a starter culture for the production of natural pre-converted nitrite. *Food Sci. Anim. Resour*, 40: 512-526.
- Hygreeva, D., Pandey, M., 2016. Novel approaches in improving the quality and safety aspects of processed meat products through high pressure processing technology-A review. *Trends in Food Science & Technology*, 54: 175-185.
- Iacumin, L. et al., 2019. Natural levels of nitrites and nitrates in San Daniele dry cured ham PDO, and in meat, salt and sugna used for its production. *Food Control*, 100: 257-261.
- Iammarino, M., Di Taranto, A., 2012. Nitrite and nitrate in fresh meats: a contribution to the estimation of admissible maximum limits to introduce in directive 95/2/EC. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(9): 1852-1858.

- IARC, 2010. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 94: v-vii, 1-412.
- Ifip, 2010. Etude de l'impact du nitrite ajouté en faible quantité sur le statut microbiologique des produits transformés plus ou moins riches en fer. (Document transmis suite à l'audition).
- Ifip, 2020. Code des Usages de la Charcuterie, de la Salaison et des Conserves de Viandes. <https://www.code-des-usages-charcuterie.fr/>.
- Inoue-Choi, M. et al., 2015. Nitrate and nitrite ingestion and risk of ovarian cancer among postmenopausal women in Iowa. *Int J Cancer*, 137(1): 173-82.
- Inoue-Choi, M., Sinha, R., Gierach, G.L., Ward, M.H., 2016. Red and processed meat, nitrite, and heme iron intakes and postmenopausal breast cancer risk in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Int J Cancer*, 138(7): 1609-18.
- Jackson, A.L., Kulchaiyawat, C., Sullivan, G.A., Sebranek, J.G., Dickson, J.S., 2011. Use of natural ingredients to control growth of *Clostridium perfringens* in naturally cured frankfurters and hams. *J. Food Prot*, 74: 417-424.
- Jakszyn, P. et al., 2006. Intake and food sources of nitrites and N-nitrosodimethylamine in Spain. *Public Health Nutrition*, 9(6): 785-791.
- JECFA, 1996. Nitrate (and potential endogenous formation of N-nitroso compounds).
- JECFA, 2002. Evaluation of certain food additives and contaminants, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.
- JECFA, 2003a. Nitrate (and potential endogenous formation of N-nitroso compounds).
- JECFA, 2003b. Nitrite (and potential endogenous formation of N-nitroso compounds).
- Jones-Carson, J. et al., 2008. Inactivation of [Fe-S] metalloproteins mediates nitric oxide-dependent killing of *Burkholderia mallei*. *PloS one*, 3(4): e1976.
- Jones, M.L., Ganopolsky, J.G., Labbé, A., Wahl, C., Prakash, S., 2010. Antimicrobial properties of nitric oxide and its application in antimicrobial formulations and medical devices. *Applied microbiology and biotechnology*, 88(2): 401-407.
- Jones, R.R. et al., 2019. Ingested nitrate, disinfection by-products, and risk of colon and rectal cancers in the Iowa Women's Health Study cohort. *Environ Int*, 126: 242-251.
- Jones, R.R. et al., 2016. Nitrate from Drinking Water and Diet and Bladder Cancer Among Postmenopausal Women in Iowa. *Environ Health Perspect*, 124(11): 1751-1758.
- Jones, R.R. et al., 2017. Ingested Nitrate, Disinfection By-products, and Kidney Cancer Risk in Older Women. *Epidemiology*, 28(5): 703-711.
- Joosen, A.M. et al., 2009. Effect of processed and red meat on endogenous nitrosation and DNA damage. *Carcinogenesis*, 30(8): 1402-7.
- Joosen, A.M.C.P. et al., 2010. Effect of dietary meat and fish on endogenous nitrosation, inflammation and genotoxicity of faecal water. *Mutagenesis*, 25(3): 243-247.
- Juedes, M.J., Wogan, G.N., 1996. Peroxynitrite-induced mutation spectra of pSP189 following replication in bacteria and in human cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 349(1): 51-61.
- Juneja, V.K., Marks, H., Mohr, T., Thippareddi, H.H., 2013. Predictive model for growth of *Clostridium perfringens* during cooling of cooked beef supplemented with NaCl, sodium nitrite and sodium pyrophosphate.
- Jung, S. et al., 2015. The use of atmospheric pressure plasma-treated water as a source of nitrite for emulsion-type sausage. *Meat Science*, 108: 132-137.

- Jurado-Sánchez, B., Ballesteros, E., Gallego, M., 2012. Occurrence of aromatic amines and N-nitrosamines in the different steps of a drinking water treatment plant. *Water Research*, 46(14): 4543-4555.
- Kalaycıoğlu, Z., Erım, F.B., 2019. Nitrate and Nitrites in Foods: Worldwide Regional Distribution in View of Their Risks and Benefits. *J Agric Food Chem*, 67(26): 7205-7222.
- Kamvar, Z.N., Cai, J., Pulliam, J.R., Schumacher, J., Jombart, T., 2019. Epidemic curves made easy using the R package incidence. *F1000Research*, 8.
- Karim, M., Fathi, M., Soleimani-Zad, S., 2020. Nanoencapsulation of cinnamic aldehyde using zein nanofibers by novel needle-less electrospinning: Production, characterization and their application to reduce nitrite in sausages. *Journal of Food Engineering*, 288: 110140.
- Kellock, K.A., Moore, A.P., Bringolf, R.B., 2018. Chronic nitrate exposure alters reproductive physiology in fathead minnows. *Environ Pollut*, 232: 322-328.
- Keto-Timonen, R., Lindström, M., Puolanne, E., Niemistö, M., Korkeala, H., 2012. Inhibition of toxigenesis of group II (nonproteolytic) *Clostridium botulinum* type B in meat products by using a reduced level of nitrite. *Journal of food protection*, 75(7): 1346-1349.
- Khalehgi, A., Kasaai, R., Khosravi-Darani, K., Rezaei, K., 2016. Combined use of black barberry (*Berberis crataegina* L.) extract and nitrite in cooked beef sausages during the refrigerated storage. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 18(3): 601-614.
- Khodavandi, A., Alizadeh, F., Razis, A.F.A., 2021. Association between dietary intake and risk of ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Nutr*, 60(4): 1707-1736.
- Kim, B. et al., 2011a. Effect of atmospheric pressure plasma on inactivation of pathogens inoculated onto bacon using two different gas compositions. *Food microbiology*, 28(1): 9-13.
- Kim, I.-S., Yang, M.-R., Lee, O.-H., Kang, S.-N., 2011b. Antioxidant activities of hot water extracts from various spices. *International journal of molecular sciences*, 12(6): 4120-4131.
- Kim, J.-S., Lee, M.-S., Kim, J.H., 2020. Recent updates on outbreaks of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and its potential reservoirs. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10: 273.
- Kim, T.-K., Yong, H.-I., Jung, S., Kim, H.-W., Choi, Y.-S., 2021. Technologies for the Production of Meat Products with a Low Sodium Chloride Content and Improved Quality Characteristics—A Review. *Foods*, 10(5): 957.
- Knochel, S., Huss, H., 1984. Ripening and spoilage of sugar salted herring with and without nitrate: II. Effect of nitrate. *International Journal of Food Science & Technology*, 19(2): 215-224.
- Knowles R., 1982. Denitrification. *Microbiological Reviews*, 46(1): 43-70.
- Ko, Y.M., Park, J.H., Yoon, K.S., 2017. Nitrite formation from vegetable sources and its use as a preservative in cooked sausage. *J. Sci. Food Agric*, 97: 1774-1783.
- Kobayashi, J., 2018. Effect of diet and gut environment on the gastrointestinal formation of N-nitroso compounds: A review. *Nitric Oxide*, 73: 66-73.
- Kostka, T. et al., 2020. Synthesis and in vitro characterization of the genotoxic, mutagenic and cell-transforming potential of nitrosylated heme. *Arch Toxicol*, 94(11): 3911-3927.
- Kouakou, P. et al., 2009. Effects of curing sodium nitrite additive and natural meat fat on growth control of *Listeria monocytogenes* by the bacteriocin-producing *Lactobacillus curvatus* strain CWBI-B28. *Food Microbiology*, 26: 623-628.
- Koukou, I., Mejlholm, O., Dalgaard, P., 2021. Cardinal parameter growth and growth boundary model for non-proteolytic *Clostridium botulinum*—Effect of eight environmental factors. *International Journal of Food Microbiology*, 346: 109162.
- Kuhnle, G.G.C. et al., 2007. Diet-induced endogenous formation of nitroso compounds in the GI tract. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(7): 1040-1047.

- Lamas, A., Miranda, J.M., Vázquez, B., Cepeda, A., Franco, C.M., 2016. An evaluation of alternatives to nitrites and sulfites to inhibit the growth of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in meat products. *Foods*, 5(4): 74.
- Larsson, K., Darnerud, P.O., Ilbäck, N.G., Merino, L., 2011. Estimated dietary intake of nitrite and nitrate in Swedish children. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28(5): 659-666.
- Le Guern, A.-S., Martin, L., Savin, C., Carniel, E., 2016. Yersiniosis in France: overview and potential sources of infection. *International Journal of Infectious Diseases*, 46: 1-7.
- Le Leu, R.K. et al., 2015. Butyrylated starch intake can prevent red meat-induced O6-methyl-2-deoxyguanosine adducts in human rectal tissue: a randomised clinical trial. *British Journal of Nutrition*, 114(2): 220-230.
- Lebrun, S. et al., 2020. Influence of reduced levels or suppression of sodium nitrite on the outgrowth and toxinogenesis of psychrotrophic *Clostridium botulinum* Group II type B in cooked ham. *International Journal of Food Microbiology*, 334: 108853.
- Leclercq, A., Charlier, C., Maury, M.M., Lecuit, M., 2019. Rapport annuel d'activité du Centre national de Référence des *Listeria* – Année 2018.
- Lee, B.-H. et al., 2019a. Biofilm formation of *Listeria monocytogenes* strains under food processing environments and pan-genome-wide association study. *Frontiers in microbiology*, 10: 2698.
- Lee, H.S., 2019. Literature compilation of volatile N-nitrosamines in processed meat and poultry products - an update. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 36(10): 1491-1500.
- Lee, S.H. et al., 2019b. Combined effect of high pressure and vinegar addition on the control of *Clostridium perfringens* and quality in nitrite-free emulsion-type sausage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 52: 429-437.
- Leistner, L., 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology, in. *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier: 181-186.
- Leth, T., Fagt, S., Nielsen, S., Andersen, R., 2008. Nitrite and nitrate content in meat products and estimated intake in Denmark from 1998 to 2006. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 25(10): 1237-1245.
- Lewin, M.H. et al., 2006. Red meat enhances the colonic formation of the DNA adduct O6-carboxymethyl guanine: implications for colorectal cancer risk. *Cancer Res*, 66(3): 1859-65.
- Li, L., Wang, P., Xu, X., Zhou, G., 2012. Influence of various cooking methods on the concentrations of volatile N-nitrosamines and biogenic amines in dry-cured sausages. *J Food Sci*, 77(5): C560-5.
- Lu, T.-T. et al., 2008. Anionic Roussin's red esters (RREs) syn-/anti-[Fe ( $\mu$ -SEt)(NO) 2] 2-: the critical role of thiolate ligands in regulating the transformation of RREs into dinitrosyl iron complexes and the anionic RREs. *Inorganic chemistry*, 47(13): 6040-6050.
- Lundberg, J.O., Weitzberg, E., Gladwin, M.T., 2008. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 7(2): 156-67.
- Lunn, J.C. et al., 2007. The effect of haem in red and processed meat on the endogenous formation of N-nitroso compounds in the upper gastrointestinal tract. *Carcinogenesis*, 28(3): 685-90.
- Lyu, K., Wang, Q., Chen, R., Lu, Q., Yang, Z., 2013. Inter-specific differences in survival and reproduction of cladocerans to nitrite gradient and the ecological implications. *Biochemical Systematics and Ecology*, 48: 151-156.
- Maekawa, A. et al., 1982. Carcinogenicity studies of sodium nitrite and sodium nitrate in F-344 rats. *Food Chem Toxicol*, 20(1): 25-33.
- Majou, D., Christieans, S., 2018. Mechanisms of the bactericidal effects of nitrate and nitrite in cured meats. *Meat science*, 145: 273-284.

- Mancini, F.R. et al., 2015. Dietary exposure to benzoates (E210–E213), parabens (E214–E219), nitrites (E249–E250), nitrates (E251–E252), BHA (E320), BHT (E321) and aspartame (E951) in children less than 3 years old in France. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(3): 293-306.
- Marimon, J. et al., 2017. Thirty years of human infections caused by *Yersinia enterocolitica* in northern Spain: 1985–2014. *Epidemiology & Infection*, 145(11): 2197-2203.
- Martuscelli, M., Lupieri, L., Chaves-Lopez, C., Mastrocola, D., Pittia, P., 2015. Technological approach to reduce NaCl content of traditional smoked dry-cured hams: effect on quality properties and stability. *Journal of food science and technology*, 52(12): 7771-7782.
- Mazuet, C., Bouvet, P., King, L.A., Popoff, M., 2011. Le botulisme humain en France, 2007–2009. *Bull. Épidémiol. Hebd.*, 2011: 49-53.
- Mazuet, C., Popoff, M., Sautereau, J., Legeay, C., Bouvet, P., 2014. Le botulisme humain en France, 2010-2012. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*(6): 106-114.
- Mazuet, C., Silva, J., Legeay, C., Sautereau, J., Popoff, R., 2018. Le botulisme humain en France, 2013–2016. *Bull. Épidémiol. Hebd.*, 3: 46-54.
- McDonnell, L.M., Glass, K.A., Sindelar, J.J., 2013. Identifying ingredients that delay outgrowth of *Listeria monocytogenes* in natural, organic, and clean-label ready-to-eat meat and poultry products. *Journal Food Protection*, 76: 1366-1376.
- Mead, P.S. et al., 2006. Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat. *Epidemiology & Infection*, 134(4): 744-751.
- Mejlholm, O. et al., 2010. Predicting growth rates and growth boundary of *Listeria monocytogenes*—an international validation study with focus on processed and ready-to-eat meat and seafood. *International journal of food microbiology*, 141(3): 137-150.
- Membré, J.-M. et al., 2015. Risk assessment of proteolytic *Clostridium botulinum* in canned foie gras. *International journal of food microbiology*, 210: 62-72.
- Menard, C., Heraud, F., Volatier, J.L., Leblanc, J.C., 2008. Assessment of dietary exposure of nitrate and nitrite in France. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 25(8): 971-988.
- Mensinga, T.T., Speijers, G.J.A., Meulenbelt, J., 2003. Health Implications of Exposure to Environmental Nitrogenous Compounds. *Toxicological Reviews*, 22(1): 41-51.
- Merialdi, G. et al., 2016. Study on potential *Clostridium botulinum* growth and toxin production in Parma ham. *Italian journal of food safety*, 5(2).
- Merino, L., Darnerud, P.O., Toldrá, F., Ilbäck, N.-G., 2016. Time-dependent depletion of nitrite in pork/beef and chicken meat products and its effect on nitrite intake estimation. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 33(2): 186-192.
- Merlotti, A. et al., 2020. Network approach to source attribution of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and its monophasic variant. *Frontiers in Microbiology*, 11: 1205.
- Mirade, P.-S., 2019. Réduire l'imprégnation en sel des charcuteries sèches—Conséquences sur les qualités technologiques et sensorielles des produits finis. *Innovations Agronomiques*, 78: 69-79.
- Mirvish, S.S., Davis, M.E., Lisowyj, M.P., Gaikwad, N.W., 2008. Effect of feeding nitrite, ascorbate, hemin, and omeprazole on excretion of fecal total apparent N-nitroso compounds in mice. *Chem Res Toxicol*, 21(12): 2344-51.
- Mirvish, S.S. et al., 2003. N -Nitroso compounds in the gastrointestinal tract of rats and in the feces of mice with induced colitis or fed hot dogs or beef. *Carcinogenesis*, 24(3): 595-603.
- Mirza Alizadeh, A. et al., 2018. A review on inactivation methods of *Toxoplasma gondii* in foods. *Pathogens and global health*, 112(6): 306-319.
- Mitch, W.A., Gerecke, A.C., Sedlak, D.L., 2003. A N-Nitrosodimethylamine (NDMA) precursor analysis for chlorination of water and wastewater. *Water Research*, 37(15): 3733-3741.

- Mughini-Gras, L. et al., 2019. Critical Orientation in the Jungle of Currently Available Methods and Types of Data for Source Attribution of Foodborne Diseases. *Frontiers in Microbiology*, 10(2578).
- Mughini-Gras, L., van Pelt, W., 2014. Salmonella source attribution based on microbial subtyping: Does including data on food consumption matter? *International Journal of Food Microbiology*, 191: 109-115.
- MUKHOPADHYAY et al., 2005. EVALUATION OF POSSIBLE GOITROGENIC AND ANTITHYROIDAL EFFECT OF NITRATE, A POTENTIAL ENVIRONMENTAL POLLUTANT. *Indian J Physiol Pharmacol*, 49(3).
- Munck, N. et al., 2020a. Four European Salmonella Typhimurium datasets collected to develop WGS-based source attribution methods. *Scientific Data*, 7(1): 1-12.
- Munck, N., Njage, P.M.K., Leekitchaenphon, P., Litrup, E., Hald, T., 2020b. Application of Whole-Genome Sequences and Machine Learning in Source Attribution of Salmonella Typhimurium. *Risk Analysis*.
- Musavian, H.S., Krebs, N.H., Nonboe, U., Corry, J.E., Purnell, G., 2014. Combined steam and ultrasound treatment of broilers at slaughter: A promising intervention to significantly reduce numbers of naturally occurring campylobacters on carcasses. *International Journal of Food Microbiology*, 176: 23-28.
- Myers, M.I. et al., 2016. Implications of decreased nitrite concentrations on Clostridium perfringens outgrowth during cooling of ready-to-eat meats. *Journal of food protection*, 79(1): 153-156.
- Nielsen, E.M. et al., 2017. Closing gaps for performing a risk assessment on Listeria monocytogenes in ready-to-eat (RTE) foods: activity 3, the comparison of isolates from different compartments along the food chain, and from humans using whole genome sequencing (WGS) analysis. *EFSA Supporting Publications*, 14(2): 1151E.
- Nolan, B.T., Ruddy, B.C., Hitt, K.J., Helsel, D.R., 1997. Risk of nitrate in groundwaters of the United States - A national perspective. *Environmental Science & Technology*, 31(8): 2229-2236.
- NTP, 2001. NTP Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of Sodium Nitrite (CAS No. 7632-00-0) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (drinking water studies), National Toxicology Program.
- Oliveira, R.B.A. et al., 2016. Processed cheese contamination by spore-forming bacteria: A review of sources, routes, fate during processing and control. *Trends in Food Science & Technology*, 57: 11-19.
- Ortiz-Santaliestra, M.E., Sparling, D.W., 2007. Alteration of larval development and metamorphosis by nitrate and perchlorate in southern leopard frogs (*Rana sphenoccephala*). *Arch Environ Contam Toxicol*, 53(4): 639-46.
- Overney, A. et al., 2017. Impact of environmental factors on the culturability and viability of Listeria monocytogenes under conditions encountered in food processing plants. *International journal of food microbiology*, 244: 74-81.
- Ozaki, M.M. et al., 2021. Beetroot and radish powders as natural nitrite source for fermented dry sausages. *Meat Sci*, 171: 108275.
- Pacher, P., Beckman, J.S., Liaudet, L., 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological reviews*, 87(1): 315-424.
- Panesar, N.S., Chan, K.W., 2000. Decreased steroid hormone synthesis from inorganic nitrite and nitrate: studies in vitro and in vivo. *Toxicol Appl Pharmacol*, 169(3): 222-30.
- Pardo-Marín, O., Yusà-Pelechà, V., Villalba-Martín, P., Perez-Dasí, J.A., 2010. Monitoring programme on nitrates in vegetables and vegetable-based baby foods marketed in the Region of Valencia, Spain: levels and estimated daily intake. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 27(4): 478-486.

- Parnaud, G., Pignatelli, B., Peiffer, G., Taché, S., Corpet, D.E., 2000. Endogenous N-Nitroso Compounds, and Their Precursors, Present in Bacon, Do Not Initiate or Promote Aberrant Crypt Foci in the Colon of Rats. *Nutrition and Cancer*, 38(1): 74-80.
- Patarata, L., Novais, M., Fraqueza, M.J., Silva, J.A., 2020. Influence of meat spoilage microbiota initial load on the growth and survival of three pathogens on a naturally fermented sausage. *Foods*, 9(5): 676.
- Payne W.J., 1986. 1986: Centenary of the Isolation of Denitrifying Bacteria. *ASM News*, 52(12): 627-629.
- Pernin, A., Bosc, V., Maillard, M.N., Dubois-Brissonnet, F., 2019a. Ferulic acid and eugenol have different abilities to maintain their inhibitory activity against *Listeria monocytogenes* in emulsified systems. *Front. Microbiol*, 10.
- Pernin, A., Guillier, L., Dubois-Brissonnet, F., 2019b. Inhibitory activity of phenolic acids against *Listeria monocytogenes*: Deciphering the mechanisms of action using three different models. *Food Microbiol*, 80.
- Peto, R., Gray, R., Brantom, P., Grasso, P., 1984. Nitrosamine carcinogenesis in 5120 rodents: chronic administration of sixteen different concentrations of NDEA, NDMA, NPYR and NPIP in the water of 4440 inbred rats, with parallel studies on NDEA alone of the effect of age of starting (3, 6 or 20 weeks) and of species (rats, mice or hamsters). *IARC scientific publications(57)*: 627-665.
- Peto, R., Gray, R., Brantom, P., Grasso, P., 1991a. Dose and time relationships for tumor induction in the liver and esophagus of 4080 inbred rats by chronic ingestion of N-nitrosodiethylamine or N-nitrosodimethylamine. *Cancer Res*, 51(23 Pt 2): 6452-69.
- Peto, R., Gray, R., Brantom, P., Grasso, P., 1991b. Effects on 4080 rats of chronic ingestion of N-nitrosodiethylamine or N-nitrosodimethylamine: a detailed dose-response study. *Cancer Res*, 51(23 Pt 2): 6415-51.
- Pierre, F.H. et al., 2013. Calcium and  $\alpha$ -tocopherol suppress cured-meat promotion of chemically induced colon carcinogenesis in rats and reduce associated biomarkers in human volunteers. *Am J Clin Nutr*, 98(5): 1255-62.
- Pinelli, J.J. et al., 2021. Essential oil nanoemulsions for the control of *Clostridium sporogenes* in cooked meat product: An alternative? *LWT*, 143: 111123.
- Pinna, A., Sacconi, G., Schivazappa, C., Simoncini, N., Virgili, R., 2020. Revision of the cold processing phases to obtain a targeted salt reduction in typical Italian dry-cured ham. *Meat science*, 161: 107994.
- Pinton, M.B. et al., 2021. Green technologies as a strategy to reduce NaCl and phosphate in meat products: An overview. *Current Opinion in Food Science*, 40: 1-5.
- Pott, S. et al., 2013. Effects of pH, sodium chloride, and curing salt on the infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *Journal of food protection*, 76(6): 1056-1061.
- Pouillot, R., Hoelzer, K., Chen, Y., Dennis, S.B., 2015. *Listeria monocytogenes* dose response revisited—incorporating adjustments for variability in strain virulence and host susceptibility. *Risk Analysis*, 35(1): 90-108.
- Poulsen, R., Cedergreen, N., Hansen, M., 2017. Is nitrate an endocrine disruptor? *Integr Environ Assess Manag*, 13(1): 210-212.
- Poulsen, R., Cedergreen, N., Hayes, T., Hansen, M., 2018. Nitrate: An Environmental Endocrine Disruptor? A Review of Evidence and Research Needs. *Environ Sci Technol*, 52(7): 3869-3887.
- Pugin, B. et al., 2017. A wide diversity of bacteria from the human gut produces and degrades biogenic amines. *Microb Ecol Health Dis*, 28(1): 1353881.
- Quijano, L. et al., 2017. Risk assessment and monitoring programme of nitrates through vegetables in the Region of Valencia (Spain). *Food and Chemical Toxicology*, 100: 42-49.

- Quist, A.J.L. et al., 2018. Ingested nitrate and nitrite, disinfection by-products, and pancreatic cancer risk in postmenopausal women. *Int J Cancer*, 142(2): 251-261.
- Radi, R., 2018. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(23): 5839-5848.
- Ramachandraiah, K., Chin, K.B., 2021. Antioxidant, antimicrobial, and curing potentials of micronized celery powders added to pork sausages. *Food Sci. Anim. Resour*, 41: 110-121.
- Reineke, K., Mathys, A., 2020. Endospore inactivation by emerging technologies: A review of target structures and inactivation mechanisms. *Annual review of food science and technology*, 11: 255-274.
- Ren, J. et al., 2008. Optimization of fermentation media for nitrite oxidizing bacteria using sequential statistical design. *Bioresource Technology*, 99(17): 7923-7927.
- Resconi, V.C. et al., 2015. Response surface methodology analysis of rice starch and fructo-oligosaccharides as substitutes for phosphate and dextrose in whole muscle cooked hams. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2): 946-958.
- Richardson, A.R., Dunman, P.M., Fang, F.C., 2006. The nitrosative stress response of *Staphylococcus aureus* is required for resistance to innate immunity. *Molecular microbiology*, 61(4): 927-939.
- Rivera, N., Bunning, M., Martin, J., 2019. Uncured-Labeled Meat Products Produced Using Plant-Derived Nitrates and Nitrites: Chemistry, Safety, and Regulatory Considerations. *J. Agric. Food Chem*, 67: 8074-8084.
- Robinson, A., Gibson, A.M., Roberts, T.A., 1982. Factors controlling the growth of *Clostridium botulinum* types A and B in pasteurized, cured meats V. Prediction of toxin production: Non-linear effects of storage temperature and salt concentration. *International Journal of Food Science & Technology*, 17(6): 727-744.
- Robinson, J.L., Brynildsen, M.P., 2013. A kinetic platform to determine the fate of nitric oxide in *Escherichia coli*. *PLoS computational biology*, 9(5): e1003049.
- Roila, R. et al., 2018. Contribution of vegetables and cured meat to dietary nitrate and nitrite intake in Italian population: Safe level for cured meat and controversial role of vegetables. *Ital J Food Saf*, 7(3): 7692.
- Sacher F., Schmidt C.K., C.L., L., 2008. Strategies for Minimizing Nitrosamine Formation During Disinfection Water Research Foundation.
- Said Abasse, K. et al., 2022. Association between Dietary Nitrate, Nitrite Intake, and Site-Specific Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, 14(3): 666.
- Saldaña, G., Minor-Pérez, H., Raso, J., Álvarez, I., 2011. Combined Effect of Temperature, pH, and Presence of Nisin on Inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* by Pulsed Electric Fields. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(7): 797-802.
- Saldaña, G., Monfort, S., Condón, S., Raso, J., Álvarez, I., 2012. Effect of temperature, pH and presence of nisin on inactivation of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* O157:H7 by pulsed electric fields. *Food Research International*, 45(2): 1080-1086.
- Santarelli, R.L. et al., 2013. Calcium inhibits promotion by hot dog of 1,2-dimethylhydrazine-induced mucin-depleted foci in rat colon. *International Journal of Cancer*, 133(11): 2533-2541.
- Santarelli, R.L. et al., 2010. Meat processing and colon carcinogenesis: cooked, nitrite-treated, and oxidized high-heme cured meat promotes mucin-depleted foci in rats. *Cancer Prev Res (Phila)*, 3(7): 852-64.
- Santé Canada, 2011. Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada : Document technique - N-Nitrosodiméthylamine (NDMA).
- Santé Canada, 2013. Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada : Document technique - Le nitrate et le nitrite.

- Santé Publique France, 2020. Nombre de cas de listérioses déclarés en France par année en France de 1999 à 2019. <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-infectieuses-d-origine-alimentaire/listeriose/donnees/#tabs>
- Satterthwaite, P., Pritchard, K., Floyd, D., Law, B., 1999. A case-control study of *Yersinia enterocolitica* infections in Auckland. *Australian and New Zealand Journal of Public Health*, 23(5): 482-485.
- SCCS, 2011. Opinion on nitrosamines and secondary amines in cosmetic products, Scientific Committee on Consumer Safety.
- SCF, 1992. Reports of the Scientific Committee for Food. Nitrates and nitrites (opinion expressed on 19th October 1990). Scientific Committee for Food.
- SCF, 1997. Opinions of the Scientific Committee for Food on: nitrates and nitrite.
- Schivazappa, C. et al., 2002. Analysis of raw meat to predict proteolysis in Parma ham. *Meat Science*, 60(1): 77-83.
- Schullehner, J., Hansen, B., Thygesen, M., Pedersen, C.B., Sigsgaard, T., 2018. Nitrate in drinking water and colorectal cancer risk: A nationwide population-based cohort study. *Int J Cancer*, 143(1): 73-79.
- Sebranek, J., Jackson-Davis, A., Myers, K., Lavieri, N., 2012. Beyond celery and starter culture: Advances in natural/organic curing processes in the United States. *Meat science*, 92(3): 267-273.
- Serra-Castelló, C. et al., 2021. Risk management tool to define a corrective storage to enhance *Salmonella* inactivation in dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 346: 109160.
- Seth, D., Hausladen, A., Wang, Y.-J., Stamler, J.S., 2012. Endogenous protein S-Nitrosylation in *E. coli*: regulation by OxyR. *Science*, 336(6080): 470-473.
- SeyyedSalehi, M.S., Mohebbi, E., Sasanfar, B., Toorang, F., Zendehdel, K., 2021. Dietary N-nitroso compounds intake and bladder cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *Nitric Oxide*, 115: 1-7.
- Siekman, L., Plötz, M., Krischek, C., 2021. Alternative Curing Methods. *Current Clinical Microbiology Reports*: 1-9.
- Sindelar, J.J., Cordray, J.C., Sebranek, J.G., Love, J.A., Ahn, D.U., 2007. Effects of varying levels of vegetable juice powder and incubation time on color, residual nitrate and nitrite, pigment, pH, and trained sensory attributes of ready-to-eat uncured ham. *J. Food Sci*, 72: 388-395.
- Sindelar, J.J., Milkowski, A.L., 2011. Sodium nitrite in processed meat and poultry meats: A review of curing and examining the risk/benefit of its use. *AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION, WHITE PAPER SERIES*(3).
- Singh, P., Singh, M.K., Beg, Y.R., Nishad, G.R., 2019. A review on spectroscopic methods for determination of nitrite and nitrate in environmental samples. *Talanta*, 191: 364-381.
- Skibsted, L.H., 2011. Nitric oxide and quality and safety of muscle based foods. *Nitric oxide*, 24(4): 176-183.
- Smith, B.C., Marletta, M.A., 2012. Mechanisms of S-nitrosothiol formation and selectivity in nitric oxide signaling. *Current opinion in chemical biology*, 16(5-6): 498-506.
- Sofos, J.N., Busta, F.F., Allen, C., 1979. Botulism control by nitrite and sorbate in cured meats: A review. *Journal of Food Protection*, 42(9): 739-770.
- Šojić, B. et al., 2019. Coriander essential oil as natural food additive improves quality and safety of cooked pork sausages with different nitrite levels. *Meat Science*, 157: 107879.
- Spalding, R.F., Exner, M.E., 1993. Occurrence of Nitrate in Groundwater—A Review. *Journal of Environmental Quality*, 22(3): 392-402.
- Spiro, S., 2006. Nitric oxide-sensing mechanisms in *Escherichia coli*. *Biochemical Society Transactions*, 34(1): 200-202.

- Stamler, J.S., Singel, D.J., Loscalzo, J., 1992. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*, 258(5090): 1898-902.
- Stayner, L.T. et al., 2021. Exposure to nitrate from drinking water and the risk of childhood cancer in Denmark. *Environ Int*, 155: 106613.
- Steen, L. et al., 2020. Impact of raw ham quality and tumbling time on the technological properties of polyphosphate-free cooked ham. *Meat science*, 164: 108093.
- Stoica M., 2019. Overview of sodium nitrite as a multifunctional meat curing ingredient. *Food Technology* 43(1): 155-167.
- Sullivan, G.A. et al., 2012. Inhibition of *Listeria monocytogenes* using natural antimicrobials in non-nitrate-or-nitrite-Added ham. *Journal of Food Protection*, 75: 1071-1076.
- Suomi, J. et al., 2016. Quantitative risk assessment on the dietary exposure of Finnish children and adults to nitrite. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 33(1): 41-53.
- Swart, A.N., van Leusden, F., Nauta, M.J., 2016. A QMRA Model for *Salmonella* in Pork Products During Preparation and Consumption. *Risk Analysis*, 36(3): 516-530.
- Szabó, C., Ischiropoulos, H., Radi, R., 2007. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature reviews Drug discovery*, 6(8): 662-680.
- Tamme, T. et al., 2006. Nitrates and nitrites in vegetables and vegetable-based products and their intakes by the Estonian population. *Food Additives & Contaminants*, 23(4): 355-361.
- Taneja, P., Labhasetwar, P., Nagarnaik, P., Ensink, J.H.J., 2017. The risk of cancer as a result of elevated levels of nitrate in drinking water and vegetables in Central India. *J Water Health*, 15(4): 602-614.
- Tassou, C.C., Drosinos, E.H., Nychas, G.J.E., 1995. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4° and 10°C. *Journal in Applied Bacteriology*, 78: 593-600.
- te Giffel, M.C., Zwietering, M.H., 1999. Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. *International journal of food microbiology*, 46(2): 135-149.
- Temme, E.H.M. et al., 2011. Average daily nitrate and nitrite intake in the Belgian population older than 15 years. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28(9): 1193-1204.
- Thebault, A., Kooh, P., Cadavez, V., Gonzales-Barron, U., Villena, I., 2021. Risk factors for sporadic toxoplasmosis: A systematic review and meta-analysis. *Microbial Risk Analysis*, 17: 100133.
- Thévenot, D., Dernburg, A., Vernozy-Rozand, C., 2006. An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. *Journal of Applied Microbiology*, 101(1): 7-17.
- Thøgersen, R. et al., 2020. Inulin-fortification of a processed meat product attenuates formation of nitroso compounds in the gut of healthy rats. *Food Chemistry*, 302: 125339.
- Thomas, C., Mercier, F., Tournayre, P., Martin, J.-L., Berdagué, J.-L., 2013. Effect of nitrite on the odourant volatile fraction of cooked ham. *Food chemistry*, 139(1-4): 432-438.
- Tourdjman, M., Laurent, É., Leclercq, A., 2014. Listériose humaine: une zoonose d'origine alimentaire. *Revue francophone des laboratoires*, 2014(464): 37-44.
- Vafania, B., Fathi, M., Soleimanian-Zad, S., 2019. Nanoencapsulation of thyme essential oil in chitosan-gelatin nanofibers by nozzle-less electrospinning and their application to reduce nitrite in sausages. *Food and bioproducts processing*, 116: 240-248.
- van Breda, S.G. et al., 2021. Replacement of Nitrite in Meat Products by Natural Bioactive Compounds Results in Reduced Exposure to N-Nitroso Compounds: The PHYTOME Project. *Molecular Nutrition & Food Research*, 65(20): 2001214.
- van Breda, S.G. et al., 2019. Impact of high drinking water nitrate levels on the endogenous formation of apparent N-nitroso compounds in combination with meat intake in healthy volunteers. *Environmental Health*, 18(1): 87.

- Van Cauteren, D. et al., 2015. Community incidence of campylobacteriosis and nontyphoidal salmonellosis, France, 2008–2013. *Foodborne pathogens and disease*, 12(8): 664-669.
- Van Cauteren, D. et al., 2017. Estimated annual numbers of foodborne pathogen-associated illnesses, hospitalizations, and deaths, France, 2008–2013. *Emerging infectious diseases*, 23(9): 1486.
- Van Damme, I., De Zutter, L., Jacxsens, L., Nauta, M., 2017. Control of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* in minced meat: Comparative analysis of different interventions using a risk assessment approach. *Food microbiology*, 64: 83-95.
- van den Brand, A.D. et al., 2020. Assessment of the combined nitrate and nitrite exposure from food and drinking water: application of uncertainty around the nitrate to nitrite conversion factor. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 37(4): 568-582.
- van den Brandt, P.A., 2019. Red meat, processed meat, and other dietary protein sources and risk of overall and cause-specific mortality in The Netherlands Cohort Study. *Eur J Epidemiol*, 34(4): 351-369.
- Van Hecke, T. et al., 2014. Nitrite Curing of Chicken, Pork, and Beef Inhibits Oxidation but Does Not Affect N-Nitroso Compound (NOC)-Specific DNA Adduct Formation during in Vitro Digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(8): 1980-1988.
- Van Hecke, T. et al., 2015. Increased oxidative and nitrosative reactions during digestion could contribute to the association between well-done red meat consumption and colorectal cancer. *Food Chemistry*, 187: 29-36.
- van Maanen, J.M.S. et al., 1994. Consumption of drinking water with high nitrate levels causes hypertrophy of the thyroid. *Toxicology Letters*, 72(1): 365-374.
- Vanden Bussche, J., Moore, S.A., Pasmans, F., Kuhnle, G.G.C., Vanhaecke, L., 2012. An approach based on ultra-high pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry to quantify O6-methyl and O6-carboxymethylguanine DNA adducts in intestinal cell lines. *Journal of Chromatography A*, 1257: 25-33.
- Vin, K. et al., 2013. Estimation of the dietary intake of 13 priority additives in France, Italy, the UK and Ireland as part of the FACET project. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30(12): 2050-2080.
- Vlachou, C. et al., 2020a. Probabilistic risk assessment of nitrates for Austrian adults and estimation of the magnitude of their conversion into nitrites. *Food Chem Toxicol*, 145: 111719.
- Vlachou, C. et al., 2020b. Risk assessment of nitrites for the Austrian adult population with probabilistic modelling of the dietary exposure. *Food Chem Toxicol*, 143: 111480.
- Vurma, M., Chung, Y.-K., Shellhammer, T.H., Turek, E.J., Yousef, A.E., 2006. Use of phenolic compounds for sensitizing *Listeria monocytogenes* to high-pressure processing. *International Journal of Food Microbiology*, 106(3): 263-269.
- Wang, H.Y., Qin, M., Dong, L., Lv, J.Y., Wang, X., 2017a. Genotoxicity of a Low-Dose Nitrosamine Mixture as Drinking Water Disinfection Byproducts in NIH3T3 Cells. *Int J Med Sci*, 14(10): 961-969.
- Wang, Q.-H. et al., 2017b. Methods for the detection and determination of nitrite and nitrate: A review. *Talanta*, 165: 709-720.
- Wang, W. et al., 2011. Occurrence of nine nitrosamines and secondary amines in source water and drinking water: Potential of secondary amines as nitrosamine precursors. *Water Research*, 45(16): 4930-4938.
- Ward, M.H. et al., 2005. Workgroup Report: Drinking-Water Nitrate and Health; Recent Findings and Research Needs. *Environmental Health Perspectives*, 113(11): 1607-1614.
- Ward, M.H. et al., 2010. Nitrate intake and the risk of thyroid cancer and thyroid disease. *Epidemiology*, 21(3): 389-95.

- Weiss, J., Loeffler, M., Terjung, N., 2015. The antimicrobial paradox: Why preservatives loose activity in foods. *Curr. Opin. Food Sci.*
- Wemmenhove, E., van Valenberg, H.J.F., van Hooijdonk, A.C.M., Wells-Bennik, M.H.J., Zwietering, M.H., 2018. Factors that inhibit growth of *Listeria monocytogenes* in nature-ripened Gouda cheese: A major role for undissociated lactic acid. *Food Control*, 84: 413-418.
- WHO, 2017. Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first addendum. [https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1080656/retrieve.](https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1080656/retrieve), World Health Organization.
- Wink, D.A. et al., 1991. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science*, 254(5034): 1001-1003.
- Wolff, A., Günther, T., Albert, T., Johne, R., 2020. Effect of sodium chloride, sodium nitrite and sodium nitrate on the infectivity of hepatitis E virus. *Food and environmental virology*, 12(4): 350-354.
- Wyngaarden, J.B., Stanbury, J.B., Rapp, B., 1953. The effects of iodine, perchlorate, thiocyanate, and nitrate administration upon the iodide concentrating mechanism of the rat thyroid. *Endocrinology*, 52(5): 568-74.
- Xie, L. et al., 2016. Association between dietary nitrate and nitrite intake and sitespecific cancer risk: evidence from observational studies. *Oncotarget*, 7(35): 56915-56932.
- Xu, L. et al., 2015. Urinary levels of N-nitroso compounds in relation to risk of gastric cancer: findings from the shanghai cohort study. *PLoS One*, 10(2): e0117326.
- Xu, Q., Oldham, R.S., 1997. Lethal and Sublethal Effects of Nitrogen Fertilizer Ammonium Nitrate on Common Toad (*Bufo bufo*) Tadpoles. *Arch Environ Contam Toxicol*, 32(3): 298-303.
- Yang, Z. et al., 2011. The interactive effects of microcystin and nitrite on life-history parameters of the cladoceran *Daphnia obtusa*. *J Hazard Mater*, 190(1-3): 113-8.
- Yong, H.I. et al., 2020. Clean Label Meat Technology: Preconverted Nitrite as a Natural Curing Agent. *Food Sci. Anim. Resour.*
- Yong, H.I. et al., 2017. Flexible thin-layer plasma inactivation of bacteria and mold survival in beef jerky packaging and its effects on the meat's physicochemical properties. *Meat Science*, 123: 151-156.
- Yong, H.I. et al., 2019. Color development, physiochemical properties, and microbiological safety of pork jerky processed with atmospheric pressure plasma. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 53: 78-84.
- Zaki, A. et al., 2004. Impact of nitrate intake in drinking water on the thyroid gland activity in male rat. *Toxicology Letters*, 147(1): 27-33.
- Zdolec, N., Kiš, M., 2021. Meat Safety from Farm to Slaughter—Risk-Based Control of *Yersinia enterocolitica* and *Toxoplasma gondii*. *Processes*, 9(5): 815.
- Zeegers, M.P., Selen, R.F.M., Kleinjans, J.C.S., Goldbohm, R.A., Brandt, P.A.v.d., 2006. Nitrate Intake Does Not Influence Bladder Cancer Risk: The Netherlands Cohort Study. *Environmental Health Perspectives*, 114(10): 1527-1531.
- Zeilmaker, M.J., Bakker, M.I., Schothorst, R., Slob, W., 2010. Risk assessment of N-nitrosodimethylamine formed endogenously after fish-with-vegetable meals. *Toxicol Sci*, 116(1): 323-35.
- Zeilmaker, M.J., Meulenbell, J., Kortboyer, J.M., Slob, W., 1996. Safety evaluation of nitrate: Mathematical modeling of nitrite formation in man and its application in the risk assessment of nitrate, NATIONAL INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH AND THE ENVIRONMENT, BILTHOVEN, THE NETHERLANDS.
- Zhang, F.X. et al., 2019a. Association Between Nitrite and Nitrate Intake and Risk of Gastric Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Med Sci Monit*, 25: 1788-1799.

- Zhang, S. et al., 2019b. Zoonotic source attribution of Salmonella enterica serotype Typhimurium using genomic surveillance data, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 25(1): 82.
- Zhang, T. et al., 2018. Determination of dietary nitrite in patients with esophageal pre-cancerous lesion and normal people: a duplicate diet study. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 35(12): 2298-2308.
- Zhao, Y.-Y. et al., 2008. Formation of N-Nitrosamines from Eleven Disinfection Treatments of Seven Different Surface Waters. *Environmental Science & Technology*, 42(13): 4857-4862.
- Zheng, J. et al., 2021. Dietary N-Nitroso Compounds and Risk of Hepatocellular Carcinoma: A USA-Based Study. *Hepatology*, 74(6): 3161-3173.
- Zheng, J. et al., 2019. Dietary N-nitroso compounds and risk of pancreatic cancer: results from a large case-control study. *Carcinogenesis*, 40(2): 254-262.
- Zhong, L. et al., 2022. Development of a Food Composition Database for Assessing Nitrate and Nitrite Intake from Animal-based Foods. *Molecular Nutrition & Food Research*, 66(1): 2100272.
- Zhu, Y. et al., 2014. Dietary N-nitroso compounds and risk of colorectal cancer: a case-control study in Newfoundland and Labrador and Ontario, Canada. *British Journal of Nutrition*, 111(6): 1109-1117.

---

# ANNEXES

---

## Annexe 1 Lettre de saisine

**GOVERNEMENT***Liberté  
Égalité  
Fraternité***MINISTÈRE DES SOLIDARITÉS ET  
DE LA SANTÉ**

Direction Générale de la santé

Sous-direction de la prévention des  
risques liés à l'environnement et à  
l'alimentationBureau de l'alimentation et de la  
nutrition14, avenue Duquesne  
75350 Paris 07 SPDossier suivi par : Mélanie PICHEROT  
Tél. : 01 40 56 54 24

Mél : melanie.picherot@sante.gouv.fr

Réf. : D-20-009637

**MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE  
ET DE L'ALIMENTATION**

Direction Générale de l'alimentation

Service de l'Alimentation

Sous-direction de la politique de  
l'alimentation251 rue de Vaugirard  
75732 Paris cedex 15Dossier suivi par : Mélanie LAVOIGNAT  
Tél. : 01 49 55 42 86

Mél : melanie.lavoignat@agriculture.gouv.fr

**MINISTÈRE DE L'ÉCONOMIE ET  
DES FINANCES**Direction générale de la concurrence, de  
la consommation et de la répression des  
fraudesSous-direction 4 – Produits et marchés  
agroalimentairesBureau 4B - Qualité et valorisation des  
denrées alimentaires8 Rue Louise Weiss  
75013 ParisDossier suivi par : Zoé BEDOUIN-BEN AYA  
Tél. : 01 4497 32 43Mél : zoe.bedouin-ben-  
aya@dgccrf.finances.gouv.fr

Paris, le

**29 JUIN 2020**

Le Directeur Général de la Santé,  
Le Directeur Général de l'Alimentation,  
La Directrice Générale de la concurrence, de la  
consommation et de la répression des fraudes,

à

Monsieur le Directeur Général  
de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de  
l'alimentation, de l'environnement et du travail

**OBJET: saisine de l'ANSES relative aux risques associés à la consommation de nitrites et de nitrates.**

La présence de nitrites dans l'organisme peut conduire à l'oxydation de l'hémoglobine réduisant la capacité des globules rouges à transporter l'oxygène. Elle peut également contribuer à la formation d'autres composés, tels que les nitrosamines, dont certains sont cancérigènes.

Il existe différentes sources d'exposition des consommateurs aux nitrites et notamment :

**i) La conversion de nitrates présents dans certaines denrées alimentaires, en nitrites.**

Les nitrates se retrouvent dans l'eau notamment en raison de leur utilisation en production primaire. Ils sont naturellement présents dans certaines denrées alimentaires, en particulier dans les légumes-feuilles comme les épinards ou la laitue. Chez l'homme, une partie des nitrates consommés peut être convertie en nitrites par les bactéries présentes dans la cavité buccale.

### ii) La présence non intentionnelle de nitrites dans les denrées alimentaires.

Les nitrites peuvent notamment être présents dans les légumes mais à des teneurs généralement très inférieures aux nitrates.

### iii) L'utilisation de nitrites et de nitrates en tant qu'additifs dans les denrées alimentaires

Les nitrites de potassium et de sodium (E249, E250) et les nitrates de sodium et de potassium (E251, E252) sont couramment utilisés pour préserver la viande et d'autres produits périssables. Ils contribuent également à limiter la prolifération de microorganismes nuisibles, en particulier *Clostridium botulinum*, responsable du botulisme. Il s'agit d'additifs alimentaires autorisés dans l'Union européenne. A ce titre, ils ont fait l'objet de travaux scientifiques d'évaluation pour caractériser les risques liés à leur utilisation.

Actuellement la réglementation européenne prévoit une teneur maximale d'incorporation de 150 mg/kg pour les produits de viande transformés, hors produits traditionnels. Pour les produits traditionnels dont la production est moindre en volume que les produits fabriqués par les industriels et qui contribuent donc moins à l'exposition des consommateurs, la réglementation prévoit une teneur de nitrites et nitrates résiduels pouvant aller jusqu'à 250 mg/kg. La teneur résiduelle varie selon différents facteurs liés au procédé de transformation (température de transformation, pH, présence d'acide ascorbique, etc.) et ne dépend pas uniquement de la teneur initialement incorporée. Les autorités danoises ont, pour leur part, souhaité maintenir un niveau d'emploi plus faible, à 60 mg/kg, qu'elles avaient fixé avant l'harmonisation européenne.

L'association du fer-hémique avec les nitrites ajoutés a notamment été envisagée comme une explication du risque accru observé de développement de cancers du côlon ou du rectum lié à la consommation de certains produits carnés (données CIRC-INCa 2018). Le fer-hémique contenu dans la viande favoriserait la conversion des nitrites en nitrosamines, substances classées cancérigène probable (groupe 2A).

Pour répondre à la demande des consommateurs, l'industrie a développé des solutions qu'elle présente comme alternatives à l'utilisation de sels nitrés (raccourcissement des DLC, bouillons de légumes, extraits de végétaux, etc). En outre, des opérateurs s'engagent de manière plus globale à diminuer l'utilisation des additifs conformément aux objectifs définis par le programme national de l'alimentation et de la nutrition (PNAN).

Dans le cadre de la réévaluation des additifs, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) a rendu des avis en juin 2017 et conclu, sur la base des éléments de preuve disponibles, que les niveaux de sécurité existants pour les nitrites et les nitrates ajoutés en tant qu'additif à la viande et à d'autres aliments constituaient une protection adéquate pour les consommateurs.

Plus précisément :

- S'agissant des nitrates en tant qu'additif, et en ayant recours à des données dites réalistes (c'est-à-dire, les niveaux de concentration effectivement observés dans les aliments), les experts ont estimé que l'exposition des consommateurs aux nitrates utilisés comme additifs alimentaires était inférieure à 5% de l'exposition globale aux nitrates dans les aliments et ne dépassait pas la DJA ;
- S'agissant des nitrites en tant qu'additif, les experts ont estimé que l'exposition se situait dans des limites sûres pour tous les groupes de population, à l'exception d'un léger dépassement chez les enfants dont le régime alimentaire est riche en aliments contenant ces additifs.

De plus, le panel de l'EFSA soulignait, lorsque l'ensemble des sources d'expositions alimentaires (présence naturelle dans les aliments, contamination environnementale, utilisation en tant qu'additifs) étaient prises en compte:

- pour les nitrates, des dépassements de la DJA pour l'ensemble des groupes d'âges (hypothèse d'exposition moyenne à haute) ;
- pour les nitrites, des dépassements de la DJA pour l'ensemble des groupes d'âges sous l'hypothèse d'exposition haute, et pour des groupes d'âges spécifiques (nourrissons, jeunes enfants et enfants) sous l'hypothèse d'une exposition moyenne.

L'EFSA a également émis des recommandations pour pallier certaines incertitudes.

A la suite de la publication de l'avis de l'EFSA, des travaux ont été engagés à l'ANSES et sont toujours en cours afin de caractériser les expositions aux nitrates par voie alimentaire (notamment légumes et eau destinée à la consommation humaine) propres à la France. Moyennant le fait de les compléter par les expositions alimentaires directes en nitrites, ces travaux pourraient permettre d'apprécier au plan national la situation d'exposition de la population et d'identifier les situations méritant une attention particulière.

**Dans ce contexte et dans la continuité des travaux déjà conduits par l'EFSA, il est demandé à l'Anses :**

- d'établir si possible, en prenant en compte les travaux de l'EFSA sur la préservation des produits carnés contre le risque de contamination par *Clostridium botulinum*, les situations – y compris en cas d'usage de procédés présentés par l'industrie comme un moyen de remplacement des sels nitrés - dans lesquelles une diminution des taux de nitrites/nitrates présents dans les denrées est susceptible d'accroître de manière significative les risques liés à la prolifération de bactéries pathogènes dans certains aliments.

- de recenser les leviers d'actions permettant de diminuer l'exposition globale des consommateurs, en fonction des caractéristiques de l'exposition propres à la France, aux nitrites et nitrates par ingestion quelle que soit leur origine, et donc *in fine* aux nitrosamines.

- d'évaluer si de nouvelles connaissances scientifiques, notamment en réponse aux recommandations de l'EFSA, sont susceptibles de lever les incertitudes sur les mécanismes de transformation des nitrates et nitrites dans l'organisme et dans les denrées alimentaires, ainsi que de justifier le réexamen des DJA/VTR déterminées par l'EFSA.

- d'évaluer si, depuis la publication du CIRC/Inca de 2018, de nouvelles connaissances scientifiques sont susceptibles de mieux caractériser le lien entre cancérogenèse chez l'Homme et apport de fer hémérique associé aux nitrites *via* la consommation de produits carnés. Pour ce faire, l'Anses prendra l'attache de l'Inca, en tant que de besoin.

Une réponse de votre part est attendue sous 10 mois.

Jérôme SALOMON



Le Directeur Général de la Santé

Bruno FERREIRA



Le Directeur Général de l'Alimentation

Virginie BEAUMEUNIER



La Directrice Générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes

Copie : Institut National du Cancer

## Annexe 2. Présentation des positions divergentes

/



## **Annexe 4. Données Oqali sur l'usage des nitrates et des nitrites en tant qu'additif alimentaire**

Le lien ci-dessous permet d'accéder au fichier excel reprenant les différents secteurs couverts par l'Oqali, le nombre de produits considérés ainsi que le nombre et le pourcentage de produits contenant des nitrates ou des nitrites.

<https://www.anses.fr/fr/system/files/ERCA2020SA0106-Anx4.xlsx>

Le tableau 48 présente le taux de couverture des différents secteurs suivis par l'Oqali (exemple : le taux de couverture du secteur de la charcuterie est de 64%).

**Tableau 48. Liste des 31 secteurs actuellement suivis par l'Oqali et effectifs de produits associés (données les plus récentes disponibles par secteur).**

Secteur Oqali	Années de recueil des données	Nombre total de produits considérés	Couverture estimative en pourcentage <sup>1</sup>
Aliments infantiles de diversification	2012	976	88
Aperitifs a croquer	2013	1082	59
Barres cerealieres	2016	181	82
Biscuits et gateaux industriels	2011	2300	65
Boissons Rafraichissantes Sans Alcool	2013	1421	86
Bouillons et potages	2017	788	66
Cereales pour le petit dejeuner	2018	659	87
Charcuterie	2013	1722	64
Chocolat et produits chocolates	2012	1041	74
Compotes	2017	972	90
Confiseries	2017	1255	78
Confitures	2017	781	81
Conserves de fruits	2017	245	76
Fromages	2015	2004	74
Glaces et sorbets	2015	1953	87
Jus et nectars	2013	1637	83
Laits infantiles	2012	129	89
Margarines	2016	109	86
Panification croustillante et moelleuse	2012	1023	76
Plats cuisines appertises	2016	1210	64
Plats cuisines frais	2016	1416	36
Plats cuisines surgelés	2016	2164	65
Preparations pour desserts	2013-2014	329	76
Produits laitiers frais et assimilés	2017	3115	87
Produits traiteurs frais	2015	2293	58
Produits transformés a base de pomme de terre	2017	791	85
Sauces chaudes	2017	609	78
Sauces condimentaires	2016	623	80
Sirops et boissons concentrees a diluer	2009-2010	304	69
Snacking surgelé	2015	1109	80
Viennoiseries et desserts surgelés	2015	571	72

<sup>1</sup> Couverture estimative en volume, d'après les données Kantar - Panel Worldpanel

## Annexe 5. Justification du caractère pertinent ou potentiel des couples danger / produits de charcuterie et de salaison

Cette partie apporte les justifications à la classification des couples danger/aliment dans les catégories « exclu », « potentiel » et « pertinent ». Le rapport de l'Anses publié en 2020 apporte des précisions sur les critères de classification des couples.

### ***Bacillus cereus sensu lato (Bacillus cereus, Bacillus thuringiensis, Bacillus cytotoxicus et Bacillus weihenstephanensis)***

Le groupe *Bacillus cereus sensu lato* est composé de bactéries sporulées, ubiquitaires et est traditionnellement divisé en différentes espèces. Néanmoins lors de l'analyse des aliments ou lors de l'investigation d'épidémies, les tests permettant de distinguer *B. thuringiensis*, *B. cereus sensu stricto*, *B. cytotoxicus* et *B. weihenstephanensis* ne sont généralement pas effectués. Le terme *B. cereus* inclut donc de façon indifférenciée ces quatre espèces. *B. cereus* est responsable d'intoxications se traduisant par des symptômes émétiques liés à la production de céréulide ; et de toxi-infections caractérisées par des symptômes diarrhéiques. Le céréulide est une toxine thermorésistante qui est préformée dans l'aliment. La dose de céréulide suffisante pour provoquer les symptômes émétiques serait retrouvée dans des aliments contenant  $10^6$  UFC/g. Un maintien de la denrée à température ambiante est nécessaire à la formation de la toxine. Les toxi-infections sont généralement reliées à des aliments dont la densité de population est de  $10^5$  UFC/g.

En 2019, 62 foyers de TIAC causées par *B. cereus* ont été confirmés en France et 293 suspectés, représentant 988 et 2 155 malades, respectivement (données TIAC 2019). Entre 2006 et 2015, *B. cereus* est impliqué dans 8,6 % des TIAC à agent confirmé en France (Anses, 2018). Sur cette période, les aliments identifiés à l'origine des TIAC à *B. cereus* sont majoritairement des plats composites (65 % des TIAC à *B. cereus* retenues sur la période). En Europe, *B. cereus* a représenté 155 épidémies avec 1 636 cas, 44 hospitalisations et 7 décès en 2019 (EFSA, 2021). *B. cereus* est alors l'agent le plus fréquemment signalé dans les foyers causés par des toxines bactériennes et les aliments incriminés sont majoritairement des plats composites. La contamination de l'aliment peut survenir par le biais des matières premières tels que les produits secs ou déshydratés, comme les épices, les herbes aromatiques, les céréales et les farines. En effet, de par la résistance et l'abondance des spores de *B. cereus* dans le sol, ces matières premières sont fréquemment contaminées à des taux variables. Garantir le refroidissement, la chaîne du froid, la chaîne du chaud et/ou le réchauffage apparaissent comme des mesures préventives du risque *B. cereus*. *B. cereus* ne fait pas l'objet de critères de sécurité des aliments selon la réglementation européenne. Toutefois, le règlement (CE) n°2073/2005 définit un critère d'hygiène des procédés applicables à *B. cereus* dans le cas des préparations déshydratées destinées aux enfants de moins de 6 mois.

Les valeurs de traitement thermique associées aux conserves de viandes bovines permettent d'exclure ces matrices pour le danger *B. cereus* (Anses, 2020a). Parmi les autres aliments d'intérêt pour ce rapport, l'ensemble des catégories est retenu comme potentiel pour *B. cereus*.

### ***Clostridium botulinum***

*C. botulinum* est une bactérie ubiquitaire. Comme les autres *Clostridium* le réservoir est l'environnement : sol, sédiments marins ou d'eau douce, eaux souillées.

Pour les produits charcuteries comprenant une cuisson (à l'exception des produits stérilisés), la maîtrise de ce danger passe notamment par un refroidissement rapide et le strict respect de la chaîne du froid au cours de la conservation (cf. Figure 9). Parmi ces produits, seuls les pâtés ont été à l'origine de cas de botulisme en France. A ce titre, ils sont retenus comme dans la catégorie des aliments pertinents. Tous les autres produits sont classés dans la catégorie potentiel.

Pour les produits de salaisons, la maîtrise du pH et de l'activité de l'eau est essentielle. Les jambons secs constituent la principale origine des foyers de botulisme (Anses, 2021). Seule la catégorie des pièces et produits secs est considérée à ce titre comme pertinente.

Les aliments à l'origine des cas de botulisme sont dans leur grande majorité des produits de fabrication familiale/artisanales.

### ***Clostridium perfringens***

*C. perfringens* est une bactérie ubiquitaire largement répandue dans l'environnement (sol, sédiments, eaux d'égout, lisiers, cadavres, poussières, surface des végétaux, etc.). Les animaux sains peuvent être porteurs de *C. perfringens* dans leur tube digestif. *C. perfringens* produit et sécrète de nombreuses toxines dont l'entérotoxine responsable d'intoxications alimentaires. Les souches de *C. perfringens*, dont le gène de l'entérotoxine (*cpe*) est porté par le chromosome bactérien, sont le plus souvent à l'origine d'intoxications alimentaires et sont différenciées de celles dont le gène *cpe* est porté par un plasmide de grande taille, qui sont communément impliquées dans des infections gastro-intestinales d'origine non alimentaire. *C. perfringens* représente 9,4% des TIAC à agent confirmé en France sur la période 2006-2015 (Anses, 2018a). Les aliments identifiés à l'origine des TIAC à *C. perfringens* sur la période 2016-2015 sont majoritairement des plats en sauce à base de viande (p. ex., sauté de dinde, blanquette de veau) ou des plats contenant de la viande (p. ex. couscous, lasagnes) (Anses 2018a). En Europe, *C. perfringens* a représenté 75 épidémies avec 2 426 cas, 27 hospitalisations et 3 décès en 2019 (EFSA and ECDC, 2021). Les aliments incriminés étaient des viandes et des aliments à base de viande. L'intoxication à *C. perfringens* survient après consommation d'aliments fortement contaminés par une souche entérotoxigène de cette bactérie. *C. perfringens* se développant rapidement dans un milieu à base de viande dans un intervalle de température entre 30 et 50°C, l'essentiel des mesures préventives repose sur la maîtrise de leur prolifération lors de la préparation et de la conservation des plats cuisinés ou sur un réchauffage suffisant avant la consommation permettant de détruire les formes végétatives (Anses, 2020a).

Les valeurs de traitement thermique associées aux conserves de viandes bovines permettent d'exclure ces matrices pour le danger *C. perfringens* (Anses, 2020a). Parmi les autres aliments d'intérêt pour ce rapport, l'ensemble des catégories est retenu comme potentiel pour *C. perfringens*.

### ***Campylobacter* spp.**

Le réservoir principal des *Campylobacter* est animal. Ces bactéries sont présentes chez les volailles, et d'autres animaux (notamment les porcins).

Les *Campylobacter* ne résistent pas à la chaleur de sorte qu'un assainissement des aliments est facilement obtenu par cuisson, pasteurisation et appertisation. Le traitement par le sel et/ou le séchage est également efficace. Les catégories d'aliment comprenant une étape de cuisson ou de salaison au cours du procédé de fabrication sont donc classées comme potentielles.

Parmi les produits destinés à être cuit par le consommateur, seule la catégorie des saucisses et saucissons à cuire est considérée comme pertinente (Anses, 2020a).

### **EHEC**

De nombreux animaux peuvent être le réservoir des EHEC (Kim et al., 2020). Mais, les ruminants sont à ce jour considérés comme le principal réservoir (Anses, 2020a).

Les produits comprenant une étape de stérilisation au cours de leur procédé de fabrication sont exclus pour ce danger.

Le danger EHEC apparaît comme potentiel pour les autres catégories (saucisses et saucissons secs, les pièces et morceaux secs, les pièces et morceaux crus, les saucisses et saucissons à cuire...). A ce jour, aucun produit de charcuterie n'est considéré comme pertinent de par l'absence d'implication de ces produits dans des cas d'infection à EHEC en France.

### ***Listeria monocytogenes***

*L. monocytogenes* peut se développer dans une large gamme de pH et de température, et notamment aux températures de réfrigération. Les données de plans de surveillance suggèrent une contamination relativement fréquente de ce pathogène dans les produits de charcuterie. Cependant leur présence n'est pas un critère suffisant pour identifier les aliments pertinents pour ce danger. Il est également nécessaire que les aliments soient favorables à sa multiplication. Ainsi les aliments appartenant à la catégorie 3 définie par la réglementation européenne (règlement (CE) n° 2073/2005 fixant les critères microbiologiques) ne sont pas considérés comme pertinents. Il s'agit des aliments prêts à être consommés et ne permettant pas le développement de *L. monocytogenes*.

### ***Salmonella***

L'incidence annuelle des infections à *Salmonella* spp. en France est estimée à 311 cas pour 100 000 habitants d'après les données de Santé publique France (Van Caeteren et al., 2017). En 2019, 139 foyers de salmonellose ont été confirmés avec 807 malades (données TIAC 2019). En Europe, *Salmonella* a été responsable de 926 épidémies avec 87 923 cas confirmés en 2019 (EFSA and ECDC, 2021).

Le principal réservoir des salmonelles non typhiques est le tractus intestinal des mammifères, notamment les porcs. Les produits de charcuterie et la viande sont impliqués respectivement dans 14% et 7% des TIAC à *Salmonella* (données TIAC 2019). Les produits de type saucisson sec sont souvent associés à des cas groupés des salmonelloses en France (Bone et al., 2010; Gossner et al., 2012).

La réglementation européenne (règlement (CE) n°2073/2005) fixe des critères microbiologiques de sécurité pour les produits à base de viande destinés à être consommés crus, excepté les produits dont le procédé de fabrication ou la composition permettent de supprimer le risque salmonelles (absence dans 25 g sur 5 échantillons) et pour les viandes hachées et préparations de viande d'autres espèces que les volailles destinées à être consommées cuites (absence dans 10 g sur 5 échantillons). Cependant, 0,33% des échantillons prélevés sur la viande et produits carnés de porc sont positifs pour *Salmonella*, valeur en légère diminution en comparaison avec la période 2015-2018 (0,42%) (EFSA and ECDC, 2021). Les souches humaines provenant de viande de porc sont majoritairement le variant monophasique de *S. Typhimurium* (26,6%), *S. Derby* (21,3%) et *S. Typhimurium* (14%) (EFSA and ECDC, 2021).

Concernant la viande de porc, la cuisson est un facteur efficace de maîtrise de *Salmonella* (Fiche Anses *Salmonella*). Chez le consommateur le défaut de maîtrise de la cuisson des produits ou les contaminations croisées dans la cuisine peuvent conduire à l'exposition à

*Salmonella* (Anses, 2018b). Pour les produits de salaison séchés et fermentés ou séchés (ex : jambon cru, saucisson sec), le procédé de fabrication peut-être un moyen de maîtrise de *Salmonella* mais son efficacité est fortement dépendante des conditions d'acidification et de séchage, ce qui doit être validé pour chacun des procédés (Anses, 2018b). Pour les saucissons secs, le pH et l' $a_w$  du produit évoluent au cours des étapes d'étuvage et de séchage, permettant une réduction de la contamination par *Salmonella* spp. La vitesse d'acidification (dépendante du ferment et de la concentration en sucre) ainsi que la cinétique de séchage (perte de poids) sont les principaux leviers pour assurer la maîtrise du risque *Salmonella* (Anses, 2018b). Le risque de salmonellose humaine liée à la consommation de saucisson est supérieur à celui associé à la consommation de chair de saucisse ou de viande fraîche, à cause de l'absence de cuisson (Anses, 2018b). Les produits destinés à être cuits par les consommateurs peuvent être à l'origine de cas de salmonellose suite à un défaut de maîtrise de l'hygiène pendant la préparation domestique ou à une cuisson insuffisante. Ainsi le danger *Salmonella* apparaît comme pertinent pour les saucisses et saucissons secs les pièces et morceaux secs, les pièces et morceaux crus, les saucisses et saucissons à cuire.

### ***Staphylococcus aureus***

*S. aureus* représente 10,4% des TIAC à agent confirmé sur la période 2006-2015 en France (Anses, 2018a). Les viandes représentent 30% des aliments identifiés à l'origine des TIAC liées aux entérotoxines de staphylocoques. Ce sont des viandes de volailles dans 45% des cas, des viandes porcines dans 35% des cas et bovines dans 20% des cas. L'information sur les modes de préparation et de consommation des aliments impliqués dans les TIAC à staphylocoques est inconnue dans 30% des cas. Lorsque l'information est connue, il s'agit, dans 65% des TIAC, d'aliments non crus et dans 25% des cas, d'aliments crus destinés à être cuits. Les aliments crus destinés à être consommés crus sont incriminés dans 10% des TIAC et sont surtout liés à la consommation de produits laitiers ; ces derniers représentent ainsi 85% des TIAC de cette catégorie.

En Europe, *S. aureus* a été responsable de 74 épidémies (16 avec des preuves fortes et 58 avec des preuves faibles) soit 1,4% des épidémies totales en 2019 (EFSA and ECDC, 2021). Parmi les aliments incriminés, les viandes et produit carnés représentent 31% des 16 et 17% des 58 épidémies mentionnées plus haut. Les viandes et produits carnés incriminés (15) incluent de la viande bovine (4), porcine (2), de volaille (2), autres ou viandes rouges mélangées (1) et produits carnés non spécifiées (6).

*S. aureus* est responsable d'une intoxication due à l'ingestion d'entérotoxines staphylococciques (SE), protéines thermorésistantes préformées dans l'aliment, dans lequel *S. aureus* producteur de SE a pu se développer et produire sa (ou ses) toxine(s). Pour les toxines les plus fréquentes, leur production est généralement associée à une densité de population de  $10^5$  bactéries/g.

La contamination de l'aliment peut survenir au cours du processus d'élaboration ou par contact avec un support contaminé. Elle est le plus souvent d'origine humaine par contact direct ou indirect. La production de toxine dans l'aliment implique des conditions de température favorables, entre +10°C et +45°C (rupture de la chaîne du froid ou du chaud, processus de cuisson à température basse) et une composition de l'aliment adaptée (les aliments riches en protéines et sucres sont particulièrement favorables à la croissance). *S. aureus* peut se multiplier à des  $a_w$  relativement faibles, jusqu'à 0,83, mais la toxinogénèse nécessite une  $a_w$  supérieure à 0,86. Dans le cas des produits carnés fermentés, une acidification mal conduite peut aussi permettre le développement de la bactérie et sa toxinogénèse.

L'ensemble des produits des charcuterie cuites visés dans le tableau est considéré comme pertinent (Anses, 2020a).

### ***Toxoplasma gondii***

Le réservoir de *Toxoplasma gondii* (parasite responsable de la toxoplasmose) est animal, mais aussi tellurique et hydrique, du fait de la grande résistance des oocystes dans l'environnement. La prévalence de l'infection suit un gradient décroissant selon les espèces animales suivantes : mouton, chèvre, porc (élevé en plein air), bovins, volailles et chevaux (Anses, 2011). L'Homme se contamine en ingérant la viande insuffisamment cuite d'animaux infestés (ovins principalement et éventuellement porcins élevés en plein air, venaisons), qui contient des kystes parasites, ou par ingestion accidentelle d'oocystes présents sur des supports souillés par des excréments de chat. Une méta-analyse des études épidémiologiques sur les cas sporadiques a identifié les viandes crues ou mal cuites, les végétaux, le lait cru et les coquillages comme des facteurs de risque significatifs pour la toxoplasmose en France (Anses, 2018a; Thebault et al., 2021).

Les kystes présents dans la viande sont sensibles à la chaleur et sont facilement détruits par la cuisson (1 à 2 minutes à 55°C-60°C (Dubey, 1998; Mirza Alizadeh et al., 2018)). En raison des protocoles thermiques utilisés pour leur fabrication, les produits cuits de charcuterie (pâtés, galantines et ballotines ; pièces et morceaux cuits ; rillettes ; saucisses et saucissons cuits) de même que les produits appertisés ne sont pas considérés « pertinents » au regard du danger *T. gondii*. Compte-tenu de la possible perte de maîtrise des protocoles de cuisson, mis en œuvre en principe avant consommation (voire la consommation possible en l'état), pour les pièces et morceaux crus (exemple lardons) et les saucisses et saucissons crus à cuire (ex. chipolatas), ces deux catégories de produits sont considérées comme pertinentes pour ce danger.

Les effets des procédés de salaison sont incertains (Anses, 2011). Diverses études démontrent que certains de ces procédés peuvent inactiver les kystes de toxoplasmes dans les viandes, mais l'effet obtenu dépend de la concentration en sel<sup>86</sup>, du temps de maturation, du pH et de la température (Alizadeh et al. 2018). La sensibilité des kystes au sel est particulièrement marquée. Pour de nombreux produits, le sel utilisé seul suffit à inactiver le parasite, mais l'ajout de nitrites renforce cet effet. Ainsi, Pott et al. (Pott et al., 2013) observent une totale inactivation en un jour des kystes dans du tissu musculaire en présence de 2,5 à 3,0% de chlorure de sodium. L'ajout de 0,5 % de nitrite permet d'observer un effet plus marqué. Dans le cas du saucisson sec, les travaux récents de l'IFIP montrent une action rapide du sel, avec ou sans nitrite, indépendant des processus d'étuvage/séchage. L'ajout de chlorure de sodium à raison de 26 g/kg (en présence de poivre, de lactose et de dextrose mais sans sel nitré ni nitrate de potassium ajoutés) permet d'inhiber la viabilité des kystes de *T. gondii* dès J0. Ces résultats confirment ceux d'une autre étude (Fredericks et al., 2019) qui observent une inactivation du parasite dans le cadre de la fabrication de salami de type pepperoni au cours des quatre premières heures d'étuvage (1,3% NaCl et 0,25% NaNO<sub>2</sub>). Hill et al. (Hill et al., 2004) rapportent l'inactivation des *Toxoplasma* dans de la viande de porc salée à 2%, sans ajout de nitrites, après sept jours d'entreposage à +4°C. Dans une autre étude, le même auteur (Hill et al., 2006) réalise l'inactivation des kystes de *Toxoplasma* dans de la longe de porc fraîche en 8 heures après injection de 2% de chlorure de sodium ou 1,4% de lactate de potassium.

Malgré la présence possible de ce parasite dans les viandes de porc, ainsi que du manque de connaissance quant à l'effet sur les *Toxoplasma* des protocoles utilisés en salaison, il existe

---

<sup>86</sup> En moyenne, le saucisson sec contient de l'ordre de 45 à 47 g de sel par kg, le jambon sec 52 g/kg, le jambon cuit 20 g/kg et les saucisses de 15 à 25 g/kg.

une incertitude sur la classification « potentielle » ou « pertinent » des pièces et morceaux secs ainsi que les saucisses et saucissons secs au regard du danger *T. gondii*. La publication des résultats d'une étude réalisée par l'Ifip et l'université de Reims fin 2021 permettra d'affiner cette classification.

### ***Trichinella* spp.**

Les *Trichinella* sont des nématodes parasites de très nombreuses espèces animales, mais la principale source de contamination humaine à l'échelle mondiale est la viande porcine. En Europe, les pratiques d'élevage ainsi que les contrôles en abattoirs permettent de réduire de manière drastique le risque lié aux viandes de porcs d'élevage, de sorte que l'essentiel des cas de trichinellose humaine est associé (Anses, 2020a; EFSA and ECDC, 2021) à des viandes issues de circuits de production non contrôlés (élevages familiaux) (Barruet et al., 2020) ou de la chasse (sanglier) (Fredriksson-Ahomaa et al., 2020).

Les larves de *Trichinella* présentes dans la viande peuvent être généralement inactivées (Anses, 2020b) par la cuisson (+71°C pendant quelques secondes ; +58°C pendant 3 minutes ; +51°C pendant 4 heures) et par la dessiccation/acidification ( $a_w \leq 0,92$  associée à un pH < 5,3). Les larves peuvent résister à la salaison lorsque la teneur en sel est inférieure à 4 %.

Il en résulte que le risque est essentiellement lié à la consommation de viandes crues ou peu cuites, n'ayant subi aucun traitement de salaison ou séchage.

Considérant :

- la faible incidence de la contamination des viandes par les trichines en France ;
  - les protocoles thermiques utilisés dans la fabrication des produits cuits de charcuterie (pâtés, galantines et ballotines ; pièces et morceaux cuits ; rillettes ; saucisses et saucissons cuits) ;
  - l' $a_w$  et le pH des produits secs ( $a_w$  entre 0,85 et 0,90 pour le saucisson sec pour un pH de 5,6 à 5,8, et  $a_w$  de 0,88 à 0,95 pour un pH de 5,5 à 6 pour le jambon sec) (AFSSA 2010 ; Christieans et al. 2018) relativement défavorables à la survie des larves;
  - les protocoles de cuisson mis en œuvre en principe avant consommation des pièces et morceaux crus et des saucisses et saucissons crus à cuire ;
- il n'y a pas lieu de considérer que les produits de charcuterie issus des filières commerciales officielles soient des denrées à risque en matière de trichinellose en France.

### **Virus de l'hépatite E (VHE)**

Le principal réservoir animal du VHE est le porc (et plus généralement les suidés). L'infection chez le porc domestique ou porc d'élevage est le plus souvent asymptomatique mais il réplique et excrète largement le virus. En France, la présence de l'ARN viral de l'hépatite E dans les foies de porc a pu être mise en évidence (Feurer et al., 2018). La risque de contamination des muscles du jambon par le VHE est faible.

Les aliments pasteurisés ou stérilisés ainsi que les aliments ayant subi une cuisson prolongée à cœur sont exclus (Anses, 2020a). Les catégories de produits de charcuterie listés sur la Figure 9 incluant cette étape sont donc exclues pour le VHE.

Les pièces et morceaux crus sont une catégorie d'aliments « potentiels » en raison l'absence de pasteurisation au cours de leur procédé de fabrication et de la faible prévalence dans les muscles (Feurer et al., 2018).

Les pièces et morceaux secs contenant du foie ont été à l'origine de cas de VHE (Anses, 2013a) et peuvent être considérés comme une catégorie d'aliments « pertinents ».

### ***Yersinia* entéropathogènes**

*Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica* sont les deux espèces les plus impliquées dans les cas de yersiniose. Le porc est considéré comme le principal réservoir des *Yersinia*

entéropathogènes (Le Guern et al., 2016). Bien que des épidémies soient identifiées (EFSA and ECDC, 2021), une majorité des cas de yersiniose ne sont associés à aucune épidémie connue et sont classés comme des cas sporadiques (Marimon et al., 2017). Une méta-analyse des d'études cas-témoins a montré que la consommation de viande de porc crue ou insuffisamment cuite est également un facteur de risque très important (Guillier et al., 2020). Parmi les produits destinés à être consommés cuits, la consommation de morceaux et pièces de porc crues, salées, saumurées ou étuvées n'est pas significativement associée à l'apparition de cas sporadiques de yersinioses (Satterthwaite et al., 1999). Parmi les catégories d'aliments d'intérêt, seule la catégorie des saucisses et saucissons crus à cuire est retenue comme pertinente pour les *Yersinia* entéropathogènes (les autres catégories de produits sont classées en potentiel).

## Bibliographie

- Anses, 2011. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : *Toxoplasma gondii*. <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2010sa0274Fi.pdf>.
- Anses, 2018a. Attribution des sources des maladies infectieuses d'origine alimentaire. Partie 2 : Analyse des données épidémiologiques. <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2015SA0162Ra-2.pdf>.
- Anses, 2018b. Avis relatif à la détermination d'une valeur sanitaire maximale (VMAX) pour le N,N - diméthylsulfamide dans l'eau destinée à la consommation humaine <https://www.anses.fr/fr/system/files/EAUX2017SA0063.pdf>.
- Anses, 2020. Avis et rapport d'expertise. Hiérarchisation des dangers biologiques et chimiques dans le but d'optimiser la sécurité sanitaire des aliments : Méthodologie et preuve de concept. <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2016SA0153Ra.pdf>.
- Anses, 2021. Rapport intermédiaire relatif à *Clostridium botulinum* : mise à jour des connaissances sur les différentes formes des types C, D, mosaïque C/D et D/C et E. <https://www.anses.fr/fr/system/files/SABA2019SA0114Ra.pdf>.
- Barruet, R. et al., 2020. A common source for a trichinellosis outbreak reported in France and Serbia in 2017. *Eurosurveillance*, 25(24): 1900527.
- Bone, A. et al., 2010. Nationwide outbreak of *Salmonella enterica* serotype 4, 12: i:-infections in France, linked to dried pork sausage, March-May 2010. *Eurosurveillance*, 15(24): 19592.
- Dubey, J., 1998. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International journal for parasitology*, 28(7): 1019-1024.
- EFSA, ECDC, 2021. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 19(2).
- Feurer, C. et al., 2018. High load of hepatitis E viral RNA in pork livers but absence in pork muscle at French slaughterhouses. *International journal of food microbiology*, 264: 25-30.
- Fredericks, J. et al., 2019. Low salt exposure results in inactivation of *Toxoplasma gondii* bradyzoites during formulation of dry cured ready-to-eat pork sausage. *Food and Waterborne Parasitology*, 15: e00047.
- Fredriksson-Ahomaa, M. et al., 2020. Foodborne Zoonoses Common in Hunted Wild Boars. *EcoHealth*: 1-11.
- Gossner, C. et al., 2012. Nationwide outbreak of *Salmonella enterica* serotype 4,[5], 12: i:-infection associated with consumption of dried pork sausage, France, November to December 2011. *Eurosurveillance*, 17(5): 20071.
- Guillier, L. et al., 2020. Risk factors for sporadic *Yersinia enterocolitica* infections: a systematic review and meta-analysis. *Microbial Risk Analysis*: 100141.

- Hill, D. et al., 2006. Effects of time and temperature on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in enhanced pork loin. *Journal of food protection*, 69(8): 1961-1965.
- Hill, D., Sreekumar, C., Gamble, H., Dubey, J., 2004. Effect of commonly used enhancement solutions on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork loin. *Journal of food protection*, 67(10): 2230-2233.
- Kim, J.-S., Lee, M.-S., Kim, J.H., 2020. Recent updates on outbreaks of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and its potential reservoirs. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10: 273.
- Le Guern, A.-S., Martin, L., Savin, C., Carniel, E., 2016. Yersiniosis in France: overview and potential sources of infection. *International Journal of Infectious Diseases*, 46: 1-7.
- Marimon, J. et al., 2017. Thirty years of human infections caused by *Yersinia enterocolitica* in northern Spain: 1985–2014. *Epidemiology & Infection*, 145(11): 2197-2203.
- Mirza Alizadeh, A. et al., 2018. A review on inactivation methods of *Toxoplasma gondii* in foods. *Pathogens and global health*, 112(6): 306-319.
- Pott, S. et al., 2013. Effects of pH, sodium chloride, and curing salt on the infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *Journal of food protection*, 76(6): 1056-1061.
- Satterthwaite, P., Pritchard, K., Floyd, D., Law, B., 1999. A case-control study of *Yersinia enterocolitica* infections in Auckland. *Australian and New Zealand Journal of Public Health*, 23(5): 482-485.
- Thebault, A., Kooh, P., Cadavez, V., Gonzales-Barron, U., Villena, I., 2021. Risk factors for sporadic toxoplasmosis: A systematic review and meta-analysis. *Microbial Risk Analysis*, 17: 100133.
- Van Cauteren, D. et al., 2017. Estimated annual numbers of foodborne pathogen-associated illnesses, hospitalizations, and deaths, France, 2008–2013. *Emerging infectious diseases*, 23(9): 1486.

## Annexe 6. La microbiologie prévisionnelle et la modélisation de l'effet des nitrites

La microbiologie prévisionnelle est une méthode complémentaire aux tests d'épreuve utilisée afin de prévoir le comportement des micro-organismes dans les aliments. Cette méthode s'appuie sur des données expérimentales (dont les données de tests de croissance et d'inactivation) et sur la formalisation mathématique du comportement des micro-organismes dans les aliments.

### A6.1 Principes de la microbiologie prévisionnelle

La microbiologie prévisionnelle est aujourd'hui un outil employé dans l'établissement des plans d'analyse des dangers et des points de contrôle critiques (*Hazard Analysis Critical Control Point*, HACCP), l'Appréciation Quantitative du Risque (AQR), la détermination de la durée de vie d'un aliment ou encore la mise au point de nouveaux produits ou procédés.

Le comportement des microorganismes peut être prévu à partir de connaissances sur le microorganisme lui-même et sur son environnement immédiat (McMeekin *et al.*, 2002). Ainsi, en intégrant une connaissance détaillée de la réponse microbienne aux conditions environnementales dans des modèles mathématiques, l'évaluation objective de l'effet des opérations de production alimentaire, de distribution ou de stockage sur la sécurité et la qualité microbiologiques des aliments est possible.

Ces modèles permettent de simuler différents phénomènes biologiques tels que la croissance, la survie et l'inactivation de microorganismes en fonction des facteurs environnementaux tels que la température, le pH, l'*a<sub>w</sub>* ou encore la concentration en nitrite.

La démarche de la microbiologie prévisionnelle est présentée dans la Figure 36. Les modèles de microbiologie prévisionnelle sont établis à partir d'une ou plusieurs souches d'une espèce donnée (étape 1). Un plan d'expériences est ensuite établi pour les facteurs environnementaux d'intérêt (étape 2). Les données sont collectées en milieu de culture et/ou dans les aliments (étape 3).

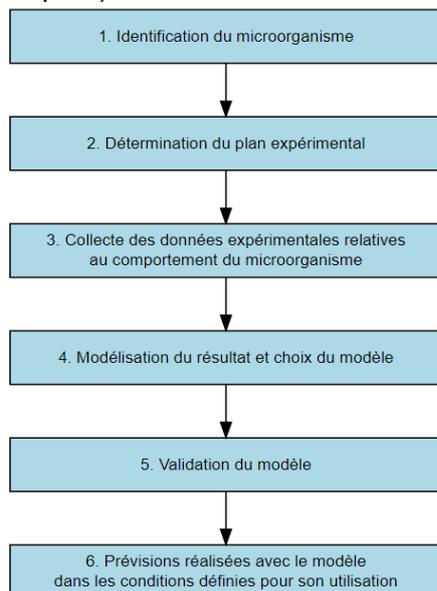


Figure 36 Démarche de la microbiologie prévisionnelle

Pour l'étape 4, les phénomènes biologiques d'intérêt (croissance, inactivation) sont d'abord décrits en fonction du temps par des modèles primaires (Figure 37).

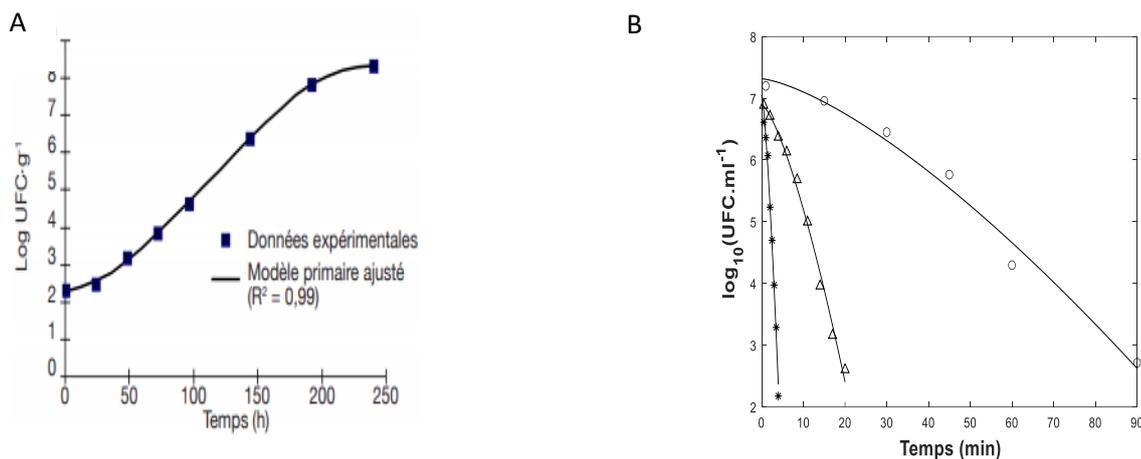


Figure 37 : A- Exemple d'ajustement d'un modèle primaire de croissance aux données obtenues lors d'un challenge test (d'après Delhalle et al., 2012 sur des données de test de croissance de *L. monocytogenes* dans de la viande hachée à 10°C) B- Ajustement d'un modèle primaire d'inactivation aux données de courbes d'inactivation thermiques obtenues à différentes températures (d'après Desriac et al., 2019, sur des données d'inactivation de *Bacillus pumilus* à 86°C (o), 92°C (Δ) et 98°C (\*)).

Les modèles secondaires permettent de décrire l'impact des conditions environnementales sur les paramètres du modèle primaire (Figure 38).

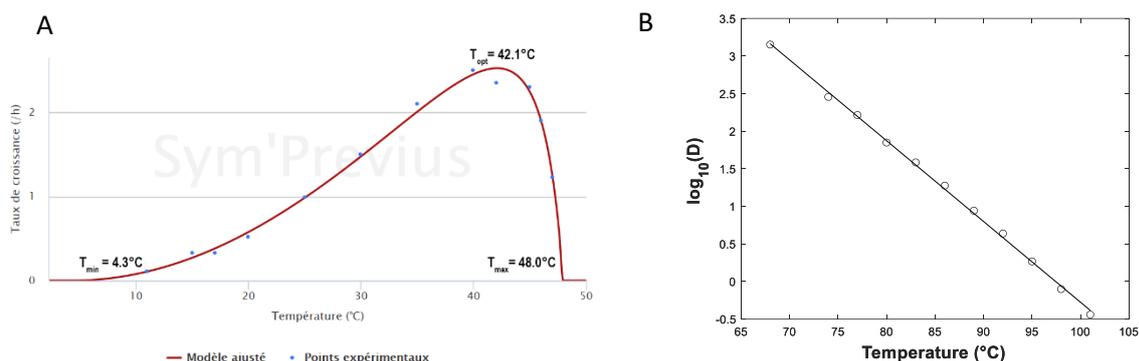


Figure 38 : A- Impact de la température sur le taux de croissance ([www.symprevius.eu](http://www.symprevius.eu)). B- Impact de la température sur le temps de réduction décimale (adaptée de (Desriac et al., 2019)).

Deux types d'approches sont utilisées en modélisation secondaire : les modèles polynomiaux et les modèles de type « gamma ». Les premiers décrivent le phénomène biologique à partir d'équations mathématiques dont les paramètres n'ont pas de signification biologique (Delhalle et al., 2012), il s'agit de modèles empiriques. Ces modèles permettent de décrire simultanément l'effet des facteurs étudiés mais leur application à de nouvelles combinaisons de facteurs environnementaux est impossible.

Les modèles de type « gamma » décrivent les phénomènes biologiques à l'aide des fonctions Gamma dont les paramètres ont une signification biologique (Brul et al., 2007), ces modèles peuvent être considérés comme semi-mécanistiques (Delhalle et al., 2012). L'approche « gamma » est basée sur l'hypothèse que l'effet de divers facteurs peut être combiné en multipliant les effets séparés (te Giffel and Zwietering, 1999) et leurs interactions quand elle sont connues ; permettant ainsi leur utilisation dans de nouvelles combinaisons de facteurs environnementaux. Ces modèles vont permettre de prévoir la croissance ou l'inactivation des microorganismes dans des conditions données.

Parallèlement, certains modèles se focalisent sur la description des interfaces de croissance/non croissance en fonction des conditions environnementales et permettent de prévoir une probabilité de croissance pour des conditions données.

Les prévisions issues de la combinaison des modèles primaires et secondaires sont ensuite confrontées à des données indépendantes (c'est-à-dire non utilisées pour construire le modèle). Si les indicateurs d'adéquation entre les prévisions et les données sont respectés, le modèle est considéré comme validé (étape 5). Le modèle développé peut alors être utilisé (étape 6) afin de prévoir le comportement du microorganisme d'intérêt dans des conditions données. La croissance, l'interface de croissance ainsi que l'inactivation microbienne peuvent être prévues en fonction des conditions environnementales (Figure 36) définies par le plan d'expérience et les données utilisées pour la validation.

## A6.2 Modèles de microbiologie prévisionnelle pour les nitrites

Cette annexe présente un bilan des modèles de microbiologie prévisionnelle validés qui prennent en considération la quantité de nitrites. Les modèles recensés ont fait l'objet de la démarche présentée sur la Figure 36. La validation est parfois réalisée sur des données acquises en milieu de laboratoire. Les modèles établis et validés sans données spécifiques dans les aliments peuvent toutefois être utilisés pour les conditions alimentaires car ils fournissent une prévision sécuritaire du comportement des micro-organismes.

Soixante-cinq modèles de prévision du comportement de différents genres bactériens (*Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Yersinia*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Clostridium*...) ont été répertoriés. En plus de la quantité de nitrite, et dépendant du modèle étudié, différents facteurs tels que la température, le pH, le sel (NaCl), les acides organiques, le CO<sub>2</sub> ou encore le pourcentage de gras peuvent être pris en compte dans la prévision du comportement microbien. Plus de 72% de ces modèles sont des modèles de croissance, 20% des modèles d'inactivation et environ 7% des modèles d'interface croissance/non croissance. La viande et les produits à base de viandes sont les matrices les plus représentées avec 26 modèles disponibles, suivi des modèles développés en milieu de culture (24 modèles) et les produits de la mer.

Microorganisme	Condition	Type de modèle	Variables considérées dans le modèle	Logiciel associé	Lien
<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Listeria innocua</i>	Milieu de culture	Croissance	temp, pH, aw, NaCl, sodium_nitrite	Combase	<a href="#">Link</a>
<i>Salmonella spp.</i>	Milieu de culture	Croissance	temp, pH, aw, NaCl, sodium_nitrite	Combase	<a href="#">Link</a>
<i>Shigella flexneri</i>	Milieu de culture	Croissance	temp, pH, aw, NaCl, sodium_nitrite	Combase	<a href="#">Link</a>
<i>Clostridium botulinum</i>	Produits à base de viandes	Croissance/Non Croissance	sodium_lactate, sodium_nitrite, pH, NaCl, humidité, %gras, CO <sub>2</sub> , temp	DMRI	<a href="#">Link</a>
<i>Escherichia coli</i>	Produits à base de viandes	Inactivation	NaCl, sodium_nitrite, KCl, temp, pH, pH_48, pH_final, total_weight_loss, time, humidité, meat_content	DMRI	<a href="#">Link</a>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Produits à base de viandes	Inactivation	NaCl, sodium_nitrite, KCl, temp, pH, pH_48, pH_final, total_weight_loss, time, humidité, meat_content	DMRI	<a href="#">Link</a>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Produits à base de viandes	Croissance	sodium_lactate, sodium_diacetate, sodium_nitrite, pH, NaCl, humidité, %gras, CO <sub>2</sub> , temp	DMRI	<a href="#">Link</a>
Bactéries psychrotrophes	Viandes	Croissance	NaCl, KCl, humidité, Temp, Init_level, time, Organic_acid, Nitrite	DMRI	<a href="#">Link</a>
<i>Salmonella spp.</i>	Produits à base de viandes	Reduction	NaCl, sodium_nitrite, KCl, temp, pH, pH_48, pH_final, total_weight_loss, time, humidité, meat_content	DMRI	<a href="#">Link</a>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Produits à base de viandes	Croissance	NaCl, KCl, sodium_nitrite, humidité, time, temp, init_level, pH, pH_final	DMRI	<a href="#">Link</a>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Produits à base de viandes	Croissance	NaCl, KCl, sodium_nitrite, humidité, time, temp, pH, init_level,	DMRI	<a href="#">Link</a>
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Produits à base de viandes	Inactivation	NaCl, sodium_nitrite, %gras, total_weight_loss, dry_matter_to_the_mince, pH_final	DMRI	<a href="#">Link</a>

Microorganisme	Condition	Type de modèle	Variables considérées dans le modèle	Logiciel associé	Lien
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Viandes	Croissance, réduction	NaCl, sodium_nitrite, %gras, humidité, pH, temp, time	DMRI	<a href="#">Link</a>
<i>Lactic acid bacteria</i>	Tout aliment	Croissance	time, temp, CO2, aw, pH, phenols, nitrite, acetic_acid, benzoic_acid, citric_acid, diacetic_acid, lactic_acid, sorbic_acid,	Food Spoilage and Safety Predictor (FSSP™) v. 4.0	<a href="#">Link</a>
<i>Lactobacillus spp.</i>	Viandes	Croissance	init_level, temp, CO2, NaCl, pH, phenols, nitrite, acetic_acid, benzoic_acid, citric_acid, diacetic_acid, lactic_acid, sorbic_acid, time	Food Spoilage and Safety Predictor (FSSP™) v. 4.0	<a href="#">Link</a>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Tout aliment	Croissance	time, temp, CO2, aw, pH, phenols, nitrite, acetic_acid, benzoic_acid, citric_acid, diacetic_acid, lactic_acid, sorbic_acid,	Food Spoilage and Safety Predictor (FSSP™) v. 4.0	<a href="#">Link</a>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Produit de la mer	Croissance/Non Croissance	init_level, temp, CO2, NaCl, pH, phenols, nitrite, acetic_acid, benzoic_acid, citric_acid, diacetic_acid, lactic_acid, sorbic_acid, time	Food Spoilage and Safety Predictor (FSSP™) v. 4.0	<a href="#">Link</a>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Produit de la mer	Croissance	temp, pH, time, NaCl, CO2, acetic_acid, citric_acid, benzoic_acid, diacetic_acid, lactic_acid, nitrite, sorbic_acid, phenols	Food Spoilage and Safety Predictor (FSSP™) v. 4.0	<a href="#">Link</a>
<i>Listeria monocytogenes, Lactic acid bacteria</i>	Produit de la mer	Croissance	init_level, competition LAB-Lm, init_level_LAB, temp, CO2, NaCl, pH, phenols, nitrite, acetic_acid, benzoic_acid, citric_acid, diacetic_acid, lactic_acid, sorbic_acid, time	Food Spoilage and Safety Predictor (FSSP™) v. 4.0	<a href="#">Link</a>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Milieu de culture	Inactivation	NaCl, pH, sodium_nitrite, temp	GroPIN	<a href="#">Link</a>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Milieu de culture	Inactivation	NaCl, lactic_acid, sodium_nitrite, temp	GroPIN	<a href="#">Link</a>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Milieu de culture	Inactivation	NaCl, lactic_acid, pH, sodium_nitrite, temp	GroPIN	<a href="#">Link</a>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Milieu de culture	Inactivation	NaCl, lactic_acid, pH, temp, undiss_nitrite	GroPIN	<a href="#">Link</a>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Milieu de culture	Croissance	aw, pH, sodium_nitrite, temp	GroPIN	<a href="#">Link</a>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Milieu de culture	Inactivation	aw, pH, sodium_nitrite, temp	GroPIN	<a href="#">Link</a>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Milieu de culture	Inactivation	aw, lactic_acid, pH, sodium_nitrite, temp	GroPIN	<a href="#">Link</a>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Milieu de culture	Inactivation	aw, lactic_acid, pH, temp, undiss_nitrite	GroPIN	<a href="#">Link</a>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Viandes de porc	Croissance	CO2, aw, pH, phenols, temp, undiss_acetic_acid, undiss_benzoic_acid, undiss_diacetate, undiss_lactic_acid, undiss_nitrite	GroPIN	<a href="#">Link</a>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Viandes	Croissance	CO2, aw, pH, phenols, sodium_nitrite, temp	GroPIN	<a href="#">Link</a>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Produit de la mer	Croissance	CO2, aw, nitrite, pH, phenols, temp	GroPIN	<a href="#">Link</a>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Viandes de volailles	Croissance	CO2, aw, pH, phenols, sodium_nitrite, temp	GroPIN	<a href="#">Link</a>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Produits laitiers	Croissance	CO2, aw, pH, phenols, sodium_nitrite, temp	GroPIN	<a href="#">Link</a>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Tout aliment	Croissance	CO2, aw, pH, phenols, sodium_nitrite, temp, undiss_acetic_acid, undiss_diacetate, undiss_lactic_acid	GroPIN	<a href="#">Link</a>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Tout aliment	Croissance	CO2, acetic_acid, aw, diacetic_acid, lactic_acid, pH, phenols, sodium_nitrite, temp	GroPIN	<a href="#">Link</a>
<i>Clostridium botulinum</i>	Milieu de culture	Croissance	CO2, NaCl, sodium_nitrite	GroPIN	<a href="#">Link</a>
<i>Clostridium botulinum</i>	Milieu de culture	Croissance	CO2, NaCl, sodium_nitrite	GroPIN	<a href="#">Link</a>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Tout aliment	Croissance	CO2, aw, pH, phenols, sodium_nitrite, temp, undiss_acetic_acid, undiss_benzoic_acid, undiss_diacetate, undiss_lactic_acid	GroPIN	<a href="#">Link</a>
<i>Clostridium botulinum</i>	Viandes	Croissance/Non Croissance	NaCl, pH, sodium_lactate, sodium_nitrite, temp	GroPIN	<a href="#">Link</a>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Viandes	Croissance	aw, nitrite	GroPIN	<a href="#">Link</a>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Viandes	Croissance	nitrite, pH	GroPIN	<a href="#">Link</a>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Viandes	Croissance	nitrite, pH	GroPIN	<a href="#">Link</a>
<i>Lactic acid bacteria</i>	Produit de la mer	Croissance	CO2, aw, pH, phenols, sodium_nitrite, temp, undiss_acetic_acid, undiss_benzoic_acid, undiss_diacetate, undiss_lactic_acid	GroPIN	<a href="#">Link</a>
<i>Lactobacillus spp.</i>	Produit de la mer	Croissance	CO2, aw, pH, phenols, sodium_nitrite, temp, undiss_acetic_acid, undiss_benzoic_acid, undiss_diacetate, undiss_lactic_acid	GroPIN	<a href="#">Link</a>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Produits laitiers	Croissance	CO2, aw, pH, phenols, temp, undiss_acetic_acid, undiss_benzoic_acid, undiss_diacetate, undiss_lactic_acid, undiss_nitrite	GroPIN	<a href="#">Link</a>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Produit de la mer	Croissance	CO2, aw, pH, phenols, temp, undiss_acetic_acid, undiss_benzoic_acid, undiss_diacetate, undiss_lactic_acid, undiss_nitrite	GroPIN	<a href="#">Link</a>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Viandes de volailles	Croissance	CO2, aw, pH, phenols, temp, undiss_acetic_acid, undiss_benzoic_acid, undiss_diacetate, undiss_lactic_acid, undiss_nitrite	GroPIN	<a href="#">Link</a>

Microorganisme	Condition	Type de modèle	Variabiles considérées dans le modèle	Logiciel associé	Lien
<i>Listeria monocytogenes</i>	Viandes	Croissance	CO2, aw, pH, phenols, temp, undiss_acetic_acid, undiss_benzoic_acid, undiss_diacetate, undiss_lactic_acid, undiss_nitrite	GroPIN	<a href="#">Link</a>
<i>Escherichia coli</i>	Viandes de volailles	Croissance	CO2, aw, pH, phenols, temp, undiss_acetic_acid, undiss_benzoic_acid, undiss_diacetate, undiss_lactic_acid, undiss_nitrite	GroPIN	<a href="#">Link</a>
<i>Escherichia coli</i>	Viande de bœuf	Croissance	CO2, aw, pH, phenols, temp, undiss_acetic_acid, undiss_benzoic_acid, undiss_diacetate, undiss_lactic_acid, undiss_nitrite	GroPIN	<a href="#">Link</a>
<i>Escherichia coli</i>	Viande de bœuf	Croissance	CO2, aw, pH, phenols, temp, undiss_acetic_acid, undiss_benzoic_acid, undiss_diacetate, undiss_lactic_acid, undiss_nitrite	GroPIN	<a href="#">Link</a>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Milieu de culture	Croissance	NaCl, pH, sodium_nitrite, temp	GroPIN	<a href="#">Link</a>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Milieu de culture	Croissance	aw, pH, sodium_nitrite, temp	GroPIN	<a href="#">Link</a>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Viandes	Croissance	pH, sodium_nitrite	MicroHibro	<a href="#">Link</a>
<i>Bacillus cereus</i>	Milieu de culture	Croissance/Non Croissance	aw, pH, temp, nitrite	MRV	<a href="#">Link</a>
<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Listeria innocua</i>	Tout aliment	Croissance/Non Croissance	aw, pH, temp, nitrite	MRV	<a href="#">Link</a>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Milieu de culture	Croissance	Init_level, time, temp, pH, NaCl, nitrite	USDA PMP	<a href="#">Link</a>
<i>Bacillus cereus</i>	Milieu de culture	Croissance	Init_level, time, temp, pH, NaCl, nitrite	USDA PMP	<a href="#">Link</a>
<i>Clostridium perfringens</i>	Viande de bœuf	Croissance	Init_level, NaCl, sodium_nitrite, temp, time	USDA PMP	<a href="#">Link</a>
<i>Escherichia coli</i>	Milieu de culture	Croissance	Init_level, time, temp, pH, aw, nitrite	USDA PMP	<a href="#">Link</a>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Milieu de culture	Croissance	Init_level, time, temp, pH, NaCl, sodium_nitrite	USDA PMP	<a href="#">Link</a>
<i>Shigella flexneri</i>	Milieu de culture	Croissance	Init_level, time, temp, pH, aw, nitrite	USDA PMP	<a href="#">Link</a>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Milieu de culture	Croissance	Init_level, time, temp, pH, aw, nitrite	USDA PMP	<a href="#">Link</a>

## Bibliographie

- Brul, S., Van Gerwen, S., Zwietering, M.H., 2007. Modelling microorganisms in food. Elsevier.
- Delhalle, L., Daube, G., Adolphe, Y., Crevecoeur, S., Clinquart, A., 2012. Les modèles de microbiologie prévisionnelle pour la maîtrise de la sécurité des aliments (synthèse bibliographique). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 16(3): 369-381.
- Desriac, N., Vergos, M., Achberger, V., Coroller, L., Couvert, O., 2019. Predicting heat process efficiency in thermal processes when bacterial inactivation is not log-linear. *International journal of food microbiology*, 290: 36-41.
- McMeekin, T.A., Olley, J., Ratkowsky, D.A., Ross, T., 2002. Predictive microbiology: towards the interface and beyond. *International Journal of Food Microbiology*, 73(2): 395-407.
- te Giffel, M.C., Zwietering, M.H., 1999. Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. *International journal of food microbiology*, 46(2): 135-149.

## Annexe 7. Modèle secondaire utilisé pour estimer le taux de croissance bactérienne dans le jambon cuit en fonction de neuf facteurs environnementaux (dont les nitrites)

### A5.1 Modèle primaire de croissance

La croissance de *L. monocytogenes* et de la flore lactique (LAB) dans le jambon cuit a été simulée à l'aide du modèle de croissance primaire de Baranyi et Robert (Baranyi & Roberts, 1994). Le temps de latence est modélisé par l'évolution de l'état physiologique Q(t). Le modèle inclut la compétition de croissance de type « Jameson » (ralentissement simultané de toutes les populations microbiennes), a été utilisé pour prévoir la croissance de *L. monocytogenes* et de LAB au fil du temps :

$$\frac{dy(t)}{dt} = \frac{1}{1 + e^{-Q(t)}} \times \mu_{max} \times (1 - e^{y_{Lm} - y_{max,Lm}}) \times (1 - e^{y_{LAB} - y_{max,LAB}})$$

$$\frac{dQ(t)}{dt} = \mu_{max}(T, pH, nitrites, \dots)$$

$$y(0) = y_0 \text{ and } Q(0) = Q_0$$

où y(t) est la population de bactéries, y<sub>max</sub> la population maximale (9 log<sub>10</sub> ufc/g), μ<sub>max</sub> le taux de croissance maximal, y<sub>0</sub> le niveau initial, et Q<sub>0</sub> caractérise l'état physiologique initial.

### A5.2 Modèle secondaire de croissance

Le modèle secondaire utilisé utilise le « gamma » concept pour modéliser l'effet de chaque facteur environnemental sur le taux de croissance de *L. monocytogenes* et de la flore lactique. L'équation utilisée est la suivante

$$\mu_{max} = \mu_{ref} \left[ \frac{(T - T_{min})}{T_{ref} - T_{min}} \right]^2 \cdot \frac{(a_w - a_{wmin})}{(a_{wopt} - a_{wmin})} \cdot [1 - 10^{(pH_{min} - pH)}] \cdot \left( 1 - \frac{[LAC_U]}{[MIC_U \text{ lactic acid}]} \right) \cdot \frac{(P_{max} - P)}{P_{max}}$$

$$\cdot \left[ \frac{(NIT_{max} - NIT)}{NIT_{max}} \right]^2 \cdot \frac{(CO_{2max} - CO_{2 \text{ equilibrium}})}{CO_{2max}} \cdot \left( 1 - \sqrt{\frac{[DAC_U]}{[MIC_U \text{ diacetate}]}} \right) \cdot \left( 1 - \sqrt{\frac{[AAC_U]}{[MI_U \text{ acetic acid}]}} \right)$$

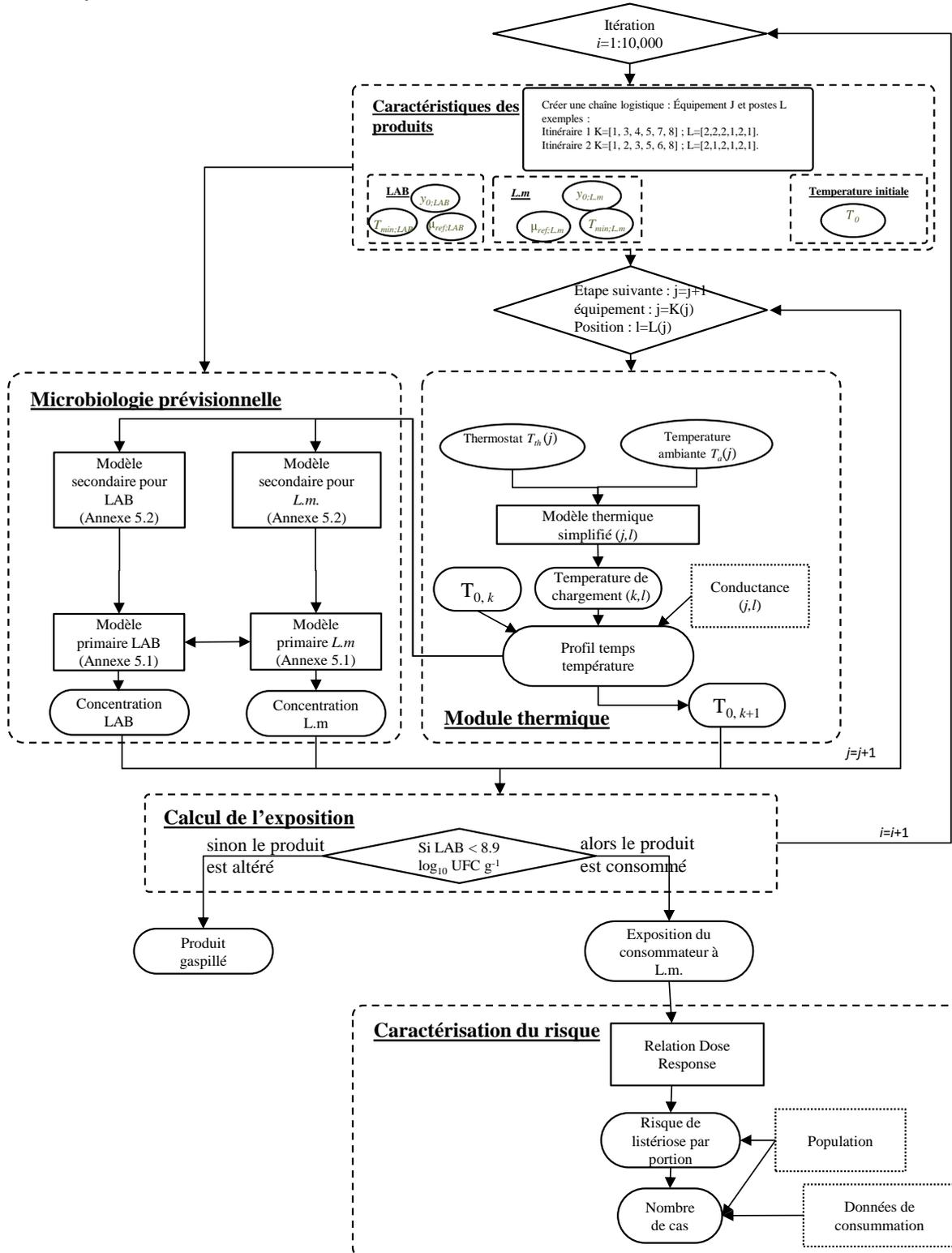
où μ<sub>ref</sub> est le taux de croissance spécifique de référence (correspondant à la valeur de μ<sub>max</sub> à la température de référence (T<sub>ref</sub>) de 25 °C ; a<sub>w</sub> est l'activité de l'eau calculée à partir de la concentration de NaCl dans la phase aqueuse du produit ; P<sub>max</sub>, NIT<sub>max</sub> et CO<sub>2max</sub> sont les concentrations maximales théoriques (mg/kg) des composants de la fumée (phénol), du nitrite et du CO<sub>2</sub>, respectivement, qui permettent la croissance de *L. monocytogenes* ; P et NIT sont les concentrations (mg/kg) de phénol et de nitrite, respectivement ; CO<sub>2</sub> équilibre est la concentration (mg/kg) de CO<sub>2</sub> dissous à l'équilibre ; [LAC<sub>U</sub>], [DAC<sub>U</sub>] et [AAC<sub>U</sub>] sont les concentrations (mM) d'acide lactique non dissocié, de diacétate et d'acide acétique, respectivement ; et [MIC<sub>U</sub> acide lactique], [MIC<sub>U</sub> diacétate] et [MIC<sub>U</sub> acide acétique] sont les concentrations minimale inhibitrices d'acide lactique non dissocié, de diacétate et d'acide acétique, respectivement, qui permettent de ralentir la croissance.

## Bibliographie

Baranyi, J., Roberts, T.A., 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. International Journal of Food Microbiology, 23(3): 277-294.

# Annexe 8. Description du modèle d'appréciation des risques utilisés pour apprécier le risque de listériose associé à la consommation de jambon cuit

## A6.1 Représentation du modèle AQR



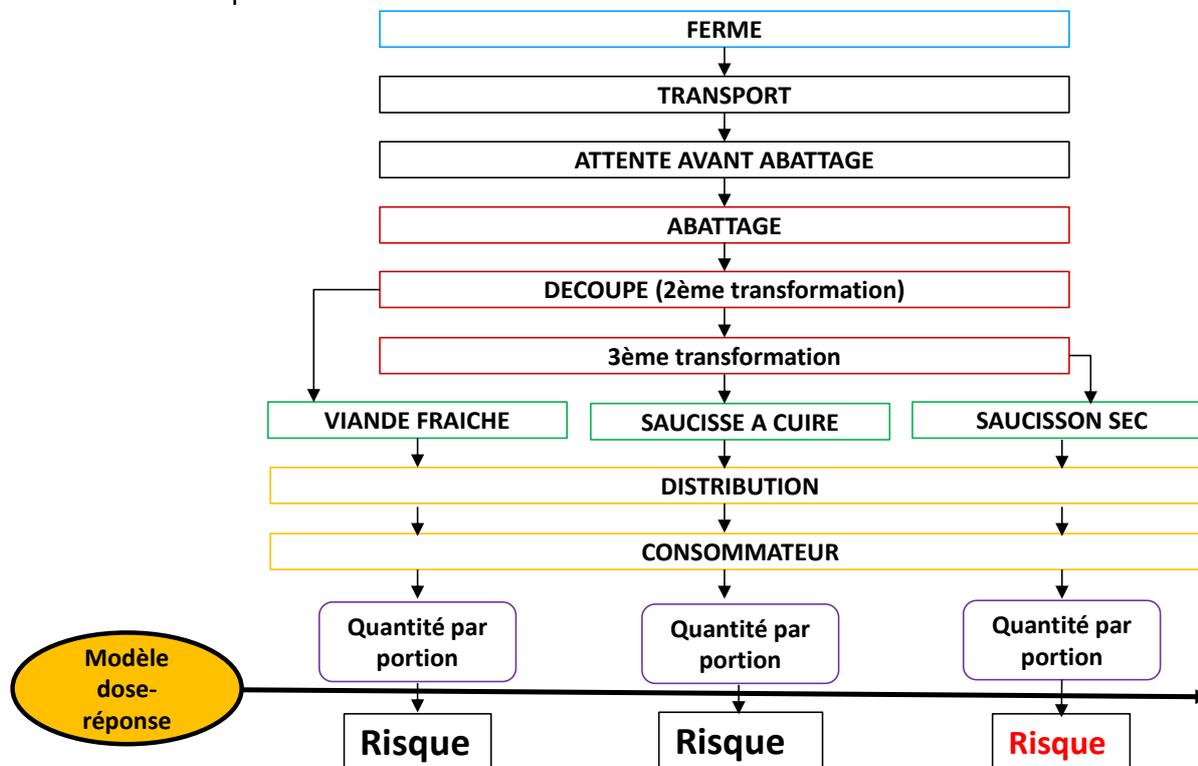
**A6.2 Paramètres du modèle modifié par rapport au modèle de Duret et al. 2019**

Paramètres	Duret et al. (2019)	Rapport GT NiNa
Proportion de produit concerné par l'altération	100%	50%
Seuil à partir de laquelle l'altération intervient	8,6 log <sub>10</sub> (UFC/g)	8,9 log <sub>10</sub> (UFC/g)
Fonction $\gamma$ décrivant l'effet des conditions environnementales (pH, aw, NIT, CO <sub>2</sub> ) sur la vitesse de croissance (en h <sup>-1</sup> )	$\gamma(\text{pH, aw, NIT, CO}_2)=0,519$	$\gamma(\text{pH, aw, NIT, CO}_2)=0,689 \times ((350/\text{NIT})/350)^2$

## Annexe 9. Modèle AQR pour évaluer le risque de salmonellose dans le saucisson sec

### A7.1 Représentation du modèle AQR (d'après (Anses, 2018b))

La structure générale du modèle AQR utilisée par l'Anses est présentée ici. L'ensemble des équations et les paramètres associés du modèle sont détaillés dans l'avis Anses. Seul le risque de salmonellose pour le saucisson sec a été considérée.



### A7.2 Modèle utilisé pour prédire la croissance et l'inactivation au cours du procédé de fabrication

La modélisation utilisée pour décrire l'évolution de *Salmonella* dans le saucisson sec a été adaptée afin de prendre en compte les nitrites

Pour la modélisation de la croissance, le modèle secondaire suivant a été utilisé pour prévoir la vitesse de croissance de *Salmonella* à une température de 22°C, un pH de 5,8 et une activité de l'eau de 0,973 :

$$\mu_{max}(NIT) = 0,1092 \cdot \exp(-0,02 \cdot NIT) \cdot 2,303$$

Où  $\mu_{max}$  est la vitesse de croissance en h<sup>-1</sup>, NIT la concentration en nitrites in mg/kg

Le temps de latence de *Salmonella* pour le modèle d'évaluation des risques a été déterminée à l'aide de la valeur de K=3,3

$$lag(NIT) = 3,3 / \mu_{max}(NIT)$$

La croissance de *Salmonella* a été déterminée à l'aide des valeurs de lag et  $\mu_{max}$  prévue à l'aide de ces équations et à l'aide du modèle primaire de Baranyi et Roberts (1994). Les valeurs de  $y_0$  sont issues du module « découpe » du modèle AQR (Anses, 2018b). La valeur de  $y_{max}$  a été fixée à 5,5 log<sub>10</sub> (UFC/g).

Concernant l'inactivation au cours du séchage (caractérisé par une perte en eau de 38%, une quantité d'eau finale de de 36,3% et un pH final de 5,2), le modèle *Conferm* a permis de déterminer l'inactivation de *Salmonella*. L'équation utilisée est la suivante

$$I(\text{temps}, NIT) = 0,2817681 - 0,07145346 \cdot t + 0,0002536294 \cdot t^2 - 0,005177503 \cdot NIT + 0,000007052893 \cdot NIT^2 - 0,00004586466 \cdot t \cdot NIT$$

Où  $I$  est la réduction décimale (en  $\log_{10}$  UFC/g) après un temps  $t$  à une concentration de nitrites  $NIT$ .

## Annexe 10. Modèle logistique utilisé pour évaluer la probabilité de croissance de *C. botulinum* non-proteolytique dans le jambon sec au cours du procédé de fabrication

La probabilité de croissance ( $z$ ) de *C. botulinum* non-protéolytique en fonction des facteurs environnementaux a été déterminée à l'aide du modèle logistique issu de la publication du DMRI (Gunvig et al., 2013)

$$\begin{aligned} z(T, pH, NIT, WPS, WPL) \\ = 0,322 \cdot T + 0,015 \cdot T^2 + 4,900 \cdot pH - 3,043 \cdot WPS - 0,039 \cdot NIT \\ - 0,409 \cdot WPL - 27,199 \end{aligned}$$

Où  $T$  est la température,  $WPS$  le pourcentage de sel dans la phase aqueuse,  $WPL$  le pourcentage de lactate dans la phase aqueuse et  $NIT$  la concentration en nitrites en mg/kg.

### Bibliographie

Gunvig, A., Hansen, F., Borggaard, C., 2013. A mathematical model for predicting growth/no-growth of psychrotrophic *C. botulinum* in meat products with five variables. *Food Control*, 29(2): 309-317.

## Annexe 11. Caractéristiques des extractions SISE-EAUX et modalités de traitement des données utilisées pour décrire les concentrations en nitrites et en nitrates dans les eaux consommées en France

### 1. - Caractéristiques des demandes d'extractions SISE-EAUX

L'Anses a adressé à la DGS deux demandes d'extractions de la base de données SISE-EAUX, dont les caractéristiques sont présentées dans le chapitre 7.2.2. Les extractions ont été effectuées en avril 2019 et juin 2020 par le pôle d'administration des données en santé environnement (PADSE) en charge du système d'information SISE-EAUX pour le ministère en charge de la santé.

**Tableau 49. Caractéristiques des extractions SISE-EAUX demandées par l'Anses dans le cadre de la saisine relative aux risques liés à la consommation de nitrites et de nitrates.**

	EDCH distribuées	Eaux embouteillées
<b>Zone</b>	France (métropole et DROM)	
<b>Paramètre</b>	Nitrates et Nitrites	
<b>Usage</b>	Adduction collective publique (AEP) et Adduction collective privée (PRV)	Eau conditionnée (CND)
<b>Types d'installations</b>	Unité de distribution (UDI) ou à défaut installation amont de niveau 1 (UDI logique : UDL)	
<b>État des installations</b>	Actives l'année de prélèvement	
<b>Types d'eau</b>	Eau distribuée sans désinfection (S), Eau distribuée après désinfection (T), eau distribuée après traitement (T1, T2, T3)*	Eau de source conditionnée (CD), Eau minérale (MI), Eau minérale naturelle (alimentation bébé) (N1), Eau conditionnée (alimentation bébé) (N2), Eau conditionnée potabilisée (PO)
<b>Motif du prélèvement</b>	Tous	
<b>Représentativité</b>	O et P	

\* T1 : eaux souterraines provenant de milieux fissurés ou non et ne présentant pas de turbidité périodique importante et supérieure à 2 NFU en sortie de production ; T2 : eaux souterraines et superficielles provenant de milieux fissurés et présentant une turbidité périodique importante et supérieure à 2 NFU pour lesquelles le débit de production est supérieur à 1000m<sup>3</sup>.j<sup>-1</sup> ; T3 : eaux souterraines et superficielles provenant de milieux fissurés et présentant une turbidité périodique importante et supérieure à 2 NFU pour lesquelles le débit de production est inférieur à 1000m<sup>3</sup>.j<sup>-1</sup>.

### 2 - Traitement des données :

Une première sélection des données a été effectuée afin de ne conserver que les données utiles à l'expertise :

- *Seules les données relatives aux EDCH distribuées en réseau ou aux eaux conditionnées ont été conservées :*
  - Les eaux distribuées ont été définies comme correspondant aux usages AEP (Adduction collective publique) ou PRV (Adduction collective privée) et aux type d'eau S (Eau distribuée sans désinfection) ou T (Eau distribuée après désinfection) ou T1 ou T2 ou T3 (eaux distribuée après traitement) ;
  - Les eaux conditionnées ont été définies comme correspondant à l'usage CND (Conditionné) et aux types d'eau CD (eau de source conditionnée), MI (Eau minérale), N1 (Eau minérale naturelle (alimentation bébé)), N2 (Eau conditionnée (alimentation bébé)) ou PO (eau conditionnée potabilisée) ;
  - Les données ne correspondant ni à de l'eau distribuée ni à de l'eau conditionnée ou pour lesquelles le type de l'eau n'a pu être déterminé ont été supprimées ;

- Afin d'être cohérent avec les données de consommation d'INCA3, seuls les résultats relatifs aux EDCH distribuées et aux eaux embouteillées consommées en France métropolitaine hors Corse ont été conservés :
  - Pour les eaux distribuées, les données relatives à des eaux produites en Corse et dans les DOM ont été supprimées, à l'exception d'une marque d'eau produite en Corse (eau de source St-Georges), consommée par un individu dans l'étude INCA3.
  - Les données relatives aux eaux à destination de fontaines ou de buvettes publiques, à la mise en bonbonne ou en coupelle ont été supprimées ;
- Les données dont la modalité de « Représentativité » est « non » (N) ont été supprimées.

Le Tableau 50 résume les données utilisées dans le cadre de ce travail.

**Tableau 50. Caractéristiques des données de la base SISE-EAUX retenues dans le cadre de la saisine relative aux risques liés à la consommation de nitrites et de nitrates.**

	EDCH distribuées	Eaux embouteillées
<b>Zone</b>	France métropolitaine hors Corse	
<b>Période</b>	2010 - 2019	
<b>Paramètre</b>	Nitrates et Nitrites	
<b>Usage</b>	Adduction collective publique (AEP) et Adduction collective privée (PRV)	Eau conditionnée (CND)
<b>Types d'installations</b>	Unité de distribution (UDI) ou à défaut installation amont de niveau 1 (UDI logique : UDL)	
<b>État des installations</b>	Actives l'année de prélèvement	
<b>Types d'eau</b>	Eau distribuée sans désinfection (S), Eau distribuée après désinfection (T), Eaux souterraines provenant de milieux fissurés ou non et ne présentant pas de turbidité périodique importante et supérieure à 2 NFU en sortie de production (T1), Eaux souterraines et superficielles provenant de milieux fissurés et présentant une turbidité périodique importante et supérieure à 2 NFU pour lesquelles le débit de production est supérieur à 1000m <sup>3</sup> j <sup>-1</sup> (T2), Eaux souterraines et superficielles provenant de milieux fissurés et présentant une turbidité périodique importante et supérieure à 2 NFU pour lesquelles le débit de production est inférieur à 1000m <sup>3</sup> j <sup>-1</sup> (T3)	Eau de source conditionnée (CD), Eau minérale (MI), Eau minérale naturelle (alimentation bébé) (N1), Eau conditionnée (alimentation bébé) (N2), Eau conditionnée potabilisée (PO)
<b>Motif du prélèvement</b>	Contrôle supplémentaire DDASS (CD), Contrôle sanitaire prévu par l'arrêté préfectoral (CS), Contrôle complémentaire volontaire (CV), Contrôle demandé à la demande d'un tiers (DT), Surveillance exercée par l'exploitant (F1), Surveillance exploitant (eaux conditionnées, eaux thermales) (F6), Recontrôle de l'eau distribuée en cas de non-conformité (S1), Contrôle supplémentaire tendance défavorable (S3), Contrôle supplémentaire dérogation temporaire (S4)	
<b>Représentativité</b>	O et P	

À la suite de l'étape de sélection des données, un nettoyage de la base a été effectué afin de supprimer les données inexploitable ou aberrantes. Ainsi ont été supprimés :

- les valeurs suivantes : « N.D. », « INCOMPT. », « <SEUIL », « <00,05 », « <05 », « <0 », « 0 », « <450 » ;
- les valeurs en dessous des seuils analytiques plausibles (quantifiées ou non). Pour cela, la borne inférieure de la distribution des limites de quantification revendiquées par les laboratoires agréés pour le contrôle sanitaire des eaux a été utilisée comme valeur de référence pour cette étape, à savoir 0,01 mg L<sup>-1</sup> pour les nitrates et 0,001 mg L<sup>-1</sup> pour les nitrites ;
- les résultats non quantifiés dont la limite de quantification ne respecte pas les exigences en termes de performances analytiques pour le contrôle sanitaire des eaux : 5 mg L<sup>-1</sup> pour les nitrates et 0,05 mg L<sup>-1</sup> pour les nitrites (Arrêté du 17 septembre 2003 relatif aux méthodes d'analyse des échantillons d'eau et à leurs caractéristiques de performance puis arrêté du 19 octobre 2017 relatif aux méthodes d'analyse utilisées dans le cadre du contrôle sanitaire des eaux) ;
- les résultats pour lesquels la variable « NatureEau » est vide ;
- les résultats pour lesquels les motifs de prélèvement sont : « Autosurveillance », « Autre », « Etudes », « Surveillance exploitant, pilotage des installations », « Recontrôle eau de piscine », « Prélèvement réalisé par autorité sanitaire en cas de pollution », « Réseau du bassin Seine-Normandie », « Contrôle supplémentaires – réseaux intérieurs », « Contrôle sanitaire Pb, Ni, Cu », « Contrôle supplémentaire épidémie », « Recontrôle eau brute », « Contrôle supplémentaire – Paramètre sans norme avec danger potentiel », « Contrôle supplémentaire – Travaux en cours »

Certaines analyses ont été conduites deux fois sur le même échantillon (analyse simple et complète) entraînant l'existence de deux valeurs de concentration en nitrates pour un même échantillon. Ces valeurs étant très proches, il a été décidé de ne garder que la valeur de concentration la plus élevée afin d'être protecteur lors de l'évaluation du risque.

Les résultats d'analyses effectuées en sortie d'usine de potabilisation (TTP) sont répercutés sur les UDI en aval direct de ces usines (résultats types « UDI logiques »). Dans certains cas, une même installation peut alimenter plusieurs UDI. Dans ce cas, deux modalités de traitement des données ont été retenues :

- Pour la description globale des concentrations dans les eaux de boisson, les résultats n'ont été conservés qu'une seule fois. Ainsi, les résultats obtenus en TT n'ont pas été répercutés à toutes les UDI en aval direct de l'installation ;
- Pour la description des concentrations des EDCH par UDI et pour l'évaluation de l'exposition, les résultats obtenus en TTP ont été répercutés sur chaque UDI en aval direct de l'installation. Ainsi, un même résultat peut apparaître plusieurs fois dans la base de données.

## Annexe 12. Niveaux de concentration en nitrites et nitrates dans les eaux distribuées en France - Répartition régionale

Tableau 51. Description des concentrations en nitrate et en nitrite en fonction des régions Unités : mg L<sup>-1</sup>

	Région	N	LB				UB			
			Moy	ET	Med	P95	Moy	ET	Med	P95
nitrates	Auvergne-Rhone-Alpes	144251	8,47	9,95	4,40	31,40	8,51	9,92	4,40	31,40
	Bourgogne-Franche-Comte	57057	16,55	14,38	12,00	44,90	16,68	14,25	12,00	44,90
	Bretagne	101333	20,72	10,56	21,00	38,00	20,78	10,45	21,00	38,00
	Centre-Val De Loire	81961	22,29	17,15	22,40	49,70	22,58	16,78	22,40	49,70
	Grand Est	135714	18,65	15,18	15,80	45,90	18,70	15,12	15,80	45,90
	Hauts-De-France	82108	28,61	14,15	31,00	47,90	28,64	14,09	31,00	47,90
	Ile De France	72027	25,79	11,32	24,70	44,00	25,81	11,27	24,70	44,00
	Normandie	115373	23,04	11,72	22,70	42,50	23,08	11,64	22,70	42,50
	Nouvelle-Aquitaine	118951	14,20	12,64	11,00	38,00	14,26	12,57	11,00	38,00
	Occitanie	115354	8,35	10,16	4,20	31,00	8,39	10,13	4,20	31,00
	Pays De La Loire	37233	17,94	13,30	15,80	41,30	18,00	13,23	15,80	41,30
	Provence-Alpes-Cote D'azur	86292	4,23	7,01	1,60	17,20	4,28	6,98	1,60	17,20
	nitrites	Auvergne-Rhone-Alpes	16480	0,00	0,01	0,00	0,00	0,02	0,01	0,02
Bourgogne-Franche-Comte		8478	0,00	0,05	0,00	0,00	0,02	0,05	0,02	0,02
Bretagne		399	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,02
Centre-Val De Loire		3048	0,00	0,04	0,00	0,00	0,02	0,04	0,02	0,02
Grand Est		13304	0,00	0,04	0,00	0,00	0,01	0,04	0,01	0,02
Hauts-De-France		10216	0,00	0,02	0,00	0,00	0,03	0,03	0,02	0,05
Ile De France		10631	0,00	0,05	0,00	0,00	0,02	0,05	0,02	0,04
Normandie		1984	0,00	0,08	0,00	0,00	0,05	0,07	0,05	0,05
Nouvelle-Aquitaine		12585	0,01	0,05	0,00	0,02	0,02	0,05	0,01	0,03
Occitanie		10517	0,00	0,01	0,00	0,00	0,02	0,01	0,02	0,05
Pays De La Loire		4408	0,00	0,01	0,00	0,00	0,02	0,02	0,01	0,05
Provence-Alpes-Cote D'azur		7949	0,00	0,02	0,00	0,00	0,02	0,02	0,02	0,02

**Tableau 52. Pourcentage de dépassement de la limite de qualité en nitrate (50 mg L<sup>-1</sup>) en fonction de la région sous les hypothèses LB et UB**

Région	LB		UB	
	Nombre de dépassements	Pourcentage de dépassements (%)	Nombre de dépassements	Pourcentage de dépassements (%)
Auvergne-Rhone-Alpes	175	0,12	175	0,12
Bourgogne-Franche-Comte	1359	2,38	1359	2,38
Bretagne	192	0,19	192	0,19
Centre-Val De Loire	3744	4,57	3744	4,57
Grand Est	3426	2,52	3426	2,52
Hauts-De-France	2344	2,85	2344	2,85
Ile De France	1163	1,61	1163	1,61
Normandie	495	0,43	495	0,43
Nouvelle-Aquitaine	122	0,10	122	0,10
Occitanie	591	0,51	591	0,51
Pays De La Loire	155	0,42	155	0,42
Provence-Alpes-Cote D'azur	117	0,14	117	0,14

*Un effet entre région sur les concentrations en nitrates et nitrites est constaté (méthode du Kruskal-Wallis) pour les deux hypothèses. A titre d'exemple, les concentrations sont significativement plus supérieures dans les Hauts-de-France que dans la région Auvergne-Rhône-Alpes.*

**Tableau 53. Pourcentage d'UDI dans lesquelles des dépassements de la valeur guide en nitrate ont été observés en fonction de la région sous les hypothèses LB et UB considérant la moyenne des analyses par UDI**

Région	LB		UB	
	Nombre d'UDI avec dépassement en moyenne	Pourcentage d'UDI (%)	Nombre d'UDI avec dépassement en moyenne	Pourcentage d'UDI (%)
Bourgogne-Franche-Comte	10	0,46	10	0,46
Bretagne	1	0,13	1	0,13
Centre-Val De Loire	59	5,08	59	5,08
Grand Est	28	0,74	28	0,74
Hauts-De-France	28	1,94	28	1,94
Ile De France	18	2,11	18	2,11
Normandie	1	0,09	1	0,09
Occitanie	13	0,29	13	0,29
Provence-Alpes-Cote D'azur	10	0,36	10	0,36

○

## Annexe 13. Revue de la littérature relative aux niveaux de concentration des nitrates et des nitrites dans les aliments

1 . SURVEY OF NITRATES AND NITRITES IN FOOD AND BEVERAGES IN AUSTRALIA; Food standards Australia-New Zealand (2011) - <a href="https://www.foodstandards.gov.au/consumer/additives/nitrate/Documents/Survey%20of%20nitrates%20and%20nitrites.pdf">https://www.foodstandards.gov.au/consumer/additives/nitrate/Documents/Survey%20of%20nitrates%20and%20nitrites.pdf</a>		
Base de données australienne élaborée sur base d'une campagne analytique comprenant 52 échantillons d'aliments. Informations limitées sur une investigation déjà assez ancienne.	Analytes : <a href="#">Nitrites /Nitrates</a>	
2.Development of a reference database for assessing dietary nitrate in vegetables ; Lauren C Blekkenhorst , Richard L Prince, Natalie C Ward, Kevin D Croft, Joshua R Lewis, Amanda Devine, Sujata Shinde, Richard J Woodman , Jonathan M Hodgson , Catherine P Bondonno (2017) Mol Nutr Food Res .61(8). Doi: 10.1002/mnfr.201600982 – <a href="https://ro.ecu.edu.au/ecuworkspost2013/3320/">https://ro.ecu.edu.au/ecuworkspost2013/3320/</a>		
Base de données australienne établie sur une recherche bibliographique exhaustive (1980-2016) au départ des référentiels Medline, Agricola et CAB abstracts database. 4237 données de teneurs en nitrate réparties sur 255 publications et relatives à 178 légumes et 22 épices ont été recensées – Ensemble d'informations « up-to-date ».	Analyte : <a href="#">Nitrates</a>	
3. Nitrate in fruits and vegetables ; - giuseppocola,Hye-jikim, Marios C.Kyriacou,Youssef Rouphael (2018) Scientia Horticulturae, 237, 221-238. - <a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304423818302656">https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304423818302656</a>		
Base de données italienne. Inventaire très exhaustif établi sur une large gamme de produits végétaux et de champignons. L'article propose en outre une catégorisation intéressante reproduite ci-dessous :	Analyte : <a href="#">Nitrates</a>	
4.Nitrate and Nitrites in Foods: Worldwide Regional Distribution in View of Their Risks and Benefits – Kalaycıoğlu Z. & F. Bedia Erim (2019) Journal of Agricultural and Food Chemistry 67 (26), 7205-7222 - <a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278691520306098">https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278691520306098</a>		
Base de données exhaustive établie via la réalisation de recherches bibliographiques	Analytes : <a href="#">Nitrites /Nitrates</a>	Intégrant tous les pays du monde – Période 2008-2018 – articles ( N=838) répertoriés SCI journals. Les concentrations compilées concernent plusieurs milliers de produits (8000 produits carnés – 11074 aliments d'origine végétale – 306 aliments pour bébé) ce qui représente la plus complète information actuellement disponible.

5. Assessment of the combined nitrate and nitrite exposure from food and drinking water: application of uncertainty around the nitrate to nitrite conversion factor - annick d. Van den brand, marja beukers, maryse niekerk, gerda van donkersgoed, monique van der aa, bianca van de ven, astrid bulder, hilko van der voet & corinne r. Sprong (2020), food additives & contaminants: part a, 37:4, 568-582 <a href="https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19440049.2019.1707294">https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19440049.2019.1707294</a>		
Base de données néerlandaise. Campagne de contrôle sur la période 2012-2018 – 1144 analyses réalisées sur des légumes, nombre imprécisé de dosage sur les produits carnés Très robuste travail sur un nombre très représentatif d'échantillons.	Analyte : <a href="#">Nitrates/Nitrites</a>	
6. PROBABILISTIC RISK ASSESSMENT OF NITRATES FOR AUSTRIAN ADULTS AND ESTIMATION OF THE MAGNITUDE OF THEIR CONVERSION INTO NITRITES - CHRISTINA VLACHOU, DANIELA HOFSTÄDTER, ELKE RAUSCHER-GABERNIG, ANTONIA GRIESBACHER, KLEMENS FUCHS, JÜRGEN KÖNIG (2021) FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY VOLUME 145, NOVEMBER 2020, 111719. <a href="https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278691520306098">HTTPS://WWW.SCIENCEDIRECT.COM/SCIENCE/ARTICLE/ABS/PII/S0278691520306098</a>		
Base de données autrichienne. Campagne autrichienne de contrôle – Période 2010-2017 – 7398 analyses réalisées : 3031 échantillons appartenant à 20 catégories de produits viandoux, 1174 échantillons de 33 catégories de légumes, 38 échantillons divers de mélanges de fruits/légumes et Jus, 2147 échantillons d'eau de consommation et 1008 échantillons d'eau potable. Très robuste travail sur un nombre très représentatif d'échantillons.	Analyte : <a href="#">Nitrates</a>	
7. NITRATE IN VEGETABLES AND THEIR IMPACT ON HUMAN HEALTH. A REVIEW -A. Hmelak Gorenjak and A. Cencič, Acta Alimentaria, Vol. 42 (2), pp. 158–172 (2013); DOI: 10.1556/aalim.42.2013.2.4		

## Annexe 14. Nettoyage de base de données contaminée

La base de données initiale envoyée comptait 11 036 observations. Les traitements suivants ont été réalisés pour la rendre exploitable :

- suppression des produits destinés à l'alimentation animale ;
- conversion des résultats en ion nitrate et en ion nitrite (résultats quantifiés et limites analytiques) : résultats (Nitrate de sodium) $\times 0,73$  et résultats (Nitrite de sodium) $\times 0,67$  ;
- harmonisation des unités ;
- traitement des doublons : lorsque l'information complémentaire était disponible: seules les parties comestibles ont été gardées (jambon saumuré : jambon + saumure), une moyenne de contamination a été appliquée lorsque les contaminants ont été mesurés dans différentes parties d'un même aliment, Lorsqu'aucune information n'était disponible la valeur de concentration la plus élevée a été gardée ;
- Requalification des libellés notamment en intégrant le code des usages de la charcuterie, Travail sur la nomenclature des aliments selon Foodex 2, Correction des aliments mal classés ;
- non prise en compte des valeurs machine pour les résultats non quantifiés ;
- suppression de 4 valeurs quantifiées aberrantes car inférieures à la LOQ la plus petite disponible pour d'autres aliments,
- suppression des aliments non quantifiés pour lesquels la LOQ  $\geq 20$  mg/kg (jugée trop élevée) ;
- traitement des valeurs censurées, 2 cas :  $< LOD$  et  $< LOQ$ , 1er cas : les valeurs sont remplacées par 0 en LB et par LOD en UB, 2ème cas : les valeurs sont remplacées par 0 en LB et par la LOQ en UB, Pas de cas de valeur détectée mais non quantifiée ;
- suppression d'un échantillon d'alcool car seul représentant de sa catégorie ;
- suppression des aliments infantiles et des aliments pour régimes spécifiques (boissons protéinées) ;

Au final, 9788 données ont été exploitées dans le cadre de cette saisine.

## Annexe 15. Données de cytotoxicité des nitrosothiols

### Etudes *in vitro*

L'oxyde nitrique peut réagir avec le glutathion pour créer du S-nitrosoglutathion (GSNO), qui peut à son tour conduire à des protéines S-nitrosées. L'impact du GSNO sur la fonction des enzymes de réparation de l'ADN est particulièrement intéressant et a été étudié par Parrish et al. (2018). Les auteurs ont montré que le GSNO augmente l'activité de l'alkyl-adénine glycosylase (AAG), une glycosylase monofonctionnelle qui élimine les bases méthylées dans la voie de réparation par excision de bases (BER). De plus, l'analyse des dommages à l'ADN par le test des comètes sur des fibroblastes embryonnaires murins traités au GSNO (0,25 ou 0,5 mM) a montré une augmentation des niveaux intermédiaires de réparation de l'ADN par la voie BER. Les auteurs ont également constaté que l'exposition au GSNO est associée à une augmentation de la cytotoxicité induite par la méthylation. Cette étude montre donc que le GSNO augmente l'initiation de la voie BER alors que le traitement des sites abasiques est diminué, ce qui conduit à une augmentation toxique des intermédiaires de la BER.

L'exposition de cellules endothéliales de type EA.hy926 à du GSNO (0,5, 1 ou 2 mM) pendant 24 ou 48h a induit une augmentation de la mortalité cellulaire de manière dose-dépendante (test MTT). La mortalité des cellules traitées avec 0,5 mM de GSNO pendant 12, 24 ou 48h a été confirmée par une condensation de la chromatine, une fragmentation nucléaire et par cytométrie en flux après marquage à l'iodure de propidium (Liu et al. 2010). La prolifération de cellules endothéliales de type ECV304 était inhibée par le GSNO de manière dose-dépendante (125-1000 µM, test MTT avec un suivi de 6 jours) (Mitsumoto et al. 2001). La toxicité initiale du GSNO sur les cellules gingivales S-G a été évaluée à 0,75 mM, après 24h d'exposition (test au rouge neutre) (Babich et Zuckerbraun 2001).

La S-Nitroso-N-acétylpénicillamine (SNAP) est un dérivé de la pénicillamine qui agit comme inhibiteur des protéases à cystéine et qui est un donneur spontané de NO en conditions physiologiques.

La cytotoxicité du SNAP et de trois glyco-SNAP (glucose-1-SNAP, glucose-2-SNAP et fructose-1-SNAP) a été évalué, après 24h d'exposition, sur des cellules épithéliales gingivales S-G et sur trois lignées cancéreuses orales (CAL27, HSG1 et HSC-2) par des tests au rouge neutre (Babich et Zuckerbraun 2001). Les valeurs initiales de toxicité sont représentées dans le tableau ci-dessous pour chaque lignée et composé testés.

**Tableau 54. Valeurs initiales de toxicité du SNAP et de trois glyco-SNAP**

	S-G	CAL27	HSG1	HSC-2
Glucose-2-SNAP	0,5 mM	0,25 mM	0,5 mM	0,25 mM
Glucose-1-SNAP		0,5 mM		0,1 mM
SNAP				
Fructose-1-SNAP	2 mM	1,5 mM	2 mM	2,5 mM

En se basant sur les valeurs NR50, les glucose-SNAPs étaient plus cytotoxiques que le SNAP qui lui était plus cytotoxique que le fructose-1-SNAP. L'apoptose des cellules S-G après exposition au glucose-2-SNAP a été confirmée par la présence de bi- ou multi-nucléation, par la présence de chromatine hypercondensée et par la présence de fragments de taille correspondante aux oligonucléosomes après électrophorèse. La cytotoxicité du glucose-2-SNAP était attribuée à son groupement NO. Cette étude met également en évidence que le GSNO est plus toxique que les SNAP et glyco-SNAP dans les cellules S-G avec une toxicité initiale à 0,75 mM. La séquence de toxicité des donneurs de NO n'était pas corrélée, directement ou indirectement, avec leurs demi-vies (Babich et Zuckerbraun 2001).

La S-nitrosocystéine (CSNO) est également un important médiateur de la signalisation du NO. Le traitement d'hépatocytes humains pendant 6h à des doses de CSNO de 2 ou 5  $\mu\text{M}$  n'a pas induit d'apoptose (test ELISA) (López-Sánchez et al. 2007).

## Bibliographie

Babich, H., Zuckerbraun, H.L., 2001. In vitro cytotoxicity of glyco-S-nitrosothiols. a novel class of nitric oxide donors. *Toxicol In Vitro*, 15(3): 181-90.

Liu, Q.-b. et al., 2010. The induction of reactive oxygen species and loss of mitochondrial Omi/HtrA2 is associated with S-nitrosoglutathione-induced apoptosis in human endothelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 244(3): 374-384.

López-Sánchez, L.M. et al., 2007. S-nitrosation of proteins during d-galactosamine-induced cell death in human hepatocytes. *Free Radical Research*, 41(1): 50-61.

Mitsumoto, A., Kim, K.-R., Oshima, G., Nakagawa, Y., 2001. Chelation of Cellular Cu(I) Raised the Degree of Glyoxalase I Inactivation in Human Endothelial Cells upon Exposure to S-Nitrosoglutathione through Stabilization of S-Nitrosothiols. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 24(4): 336-341.

## Annexe 16. Définition d'un perturbateur endocrinien

Un perturbateur endocrinien (PE) est « une substance ou un mélange de substances qui altère les fonctions du système endocrinien et, de ce fait, induit des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants et ou de (sous)-populations » selon la définition de l'organisation mondiale de la santé (OMS) proposée en 2002, mise à jour en 2012<sup>1</sup>.

Depuis 2002 de nombreux travaux scientifiques ont permis d'améliorer les connaissances sur l'effet des PE sur la santé. Ces données sont rapportées dans un rapport récent de la commission européenne<sup>2</sup> et dans un rapport de l'OMS de 2012 (rapport OMS-PNUE 2012)<sup>1</sup>. Le rapport de l'OMS pointe les lacunes de connaissances et les efforts considérables de recherche nécessaires pour comprendre tous les mécanismes à l'œuvre derrière la perturbation endocrinienne. Mais le travail des experts souligne l'importance des preuves scientifiques accumulées sur le rôle des perturbateurs endocriniens dans plusieurs tendances sanitaires alarmantes comme les cancers du sein chez la femme, ou de la prostate chez l'homme, les troubles neurocomportementaux comme l'hyperactivité ou le déficit d'attention, les maladies métaboliques comme le diabète de type 2 et l'obésité et les problèmes de l'appareil de reproduction, comme la cryptorchidie et l'infertilité.

Les PE peuvent interférer avec le système endocrinien de différentes façons. Ils peuvent imiter l'action d'une hormone naturelle, empêcher sa fixation sur des récepteurs spécifiques au niveau des cellules cibles, interférer avec sa synthèse ou celle de son récepteur et modifier ainsi le signal hormonal.

Ils présentent un certain nombre de spécificités par rapport à des composés toxiques classiques. Ils peuvent agir à faible dose et leur effet suit une courbe dose-réponse non-monotone. La période périnatale qui est très sensible à l'action des hormones constitue une fenêtre de susceptibilité critique par rapport à l'effet des PE. Les conséquences de cette exposition périnatale peuvent ne se révéler que des années après en raison d'effets sur la programmation et la différenciation cellulaire prédisposant parfois les organes à certains dysfonctionnements. Ces effets peuvent être transgénérationnels se manifestant sur plusieurs générations successives.

Toutes ces spécificités rendent difficile toute démarche d'évaluation du risque et la définition même de ce qu'est un perturbateur endocrinien fait encore l'objet d'un débat. En juin 2016, pour ce qui concerne les produits biocides, la Commission européenne a établi qu'une substance est considérée comme perturbatrice endocrinienne impactant l'homme si elle présente un effet indésirable chez un individu ou ses descendants, si elle a un mode d'action endocrinien et si l'effet indésirable est une conséquence du mode d'action endocrinien.

### Bibliographie

Kortenkamp et al., 2011. STATE OF THE ART ASSESSMENT OF ENDOCRINE DISRUPTERS.

OMS, PNUE, 2012. Rapport de l'OMS et du PNUE sur les perturbateurs endocriniens | Association SERA Santé Environnement Auvergne Rhône Alpes. <https://www.sera.asso.fr/index.php/rapport-de-loms-et-du-pnue-sur-les-perturbateurs-endocriniens/>.





# anses

**CONNAÎTRE, ÉVALUER, PROTÉGER**

AGENCE NATIONALE DE SÉCURITÉ SANITAIRE  
de l'alimentation, de l'environnement et du travail

14 rue Pierre et Marie Curie 94701 Maisons-Alfort Cedex  
Tél : 01 42 76 40 40  
[www.anses.fr](http://www.anses.fr) — @Anses\_fr