

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE & POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR & DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE DJILLALI LIABES
FACULTE DES SCIENCES
DE LA NATURE ET DE LA VIE
SIDI BEL ABBES

THESE **DE DOCTORAT DE TROISIEME CYCLE**

Présentée par :

Mr BELHADJ BENZIANE Abdelhammid

Spécialité : Sciences biologiques
Option : Immunochimie alimentaire et santé

Intitulé

Dosage de l'acrylamide dans quelques produits alimentaires
et son effet sur les paramètres biochimiques et statut
immunochimique des rats wistar

Soutenue en : 2018

Devant le jury composé de :

Président :

Pr BENALI Mohammed

UDL-Sidi Bel-Abbés

Examineurs :

Pr ABBOUNI Bouziane

UDL- Sidi Bel-Abbés

Dr MEZIANI Samira

UDL-Sidi Bel-Abbés

Rapporteur :

Pr DILMI BOURAS Abdelkader

Université de Chlef

Coencadreur :

Dr MEZAINI Abdelkader

Université de Chlef

REMERCIEMENTS

C'est avec une grande joie que d'arriver à la fin de ces années de labeur et de sacrifices. Cette thèse doit beaucoup aux nombreuses personnes qui m'ont encouragée et soutenue durant ces quelques années qui sont passées si rapidement. Je voudrais leur adresser ces quelques mots afin de les remercier...

J'adresse mes sincères remerciements à Mon Directeur de thèse **M. DILMI BOURAS Abdelkader**, Professeur à l'Université H. B. de Chlef, Je lui suis reconnaissant pour la confiance et le soutien permanent qu'il m'a témoigné durant ce travail ainsi que pour la grande autonomie qu'il m'a accordé. J'espère être à la hauteur de sa confiance et de ses espérances.

Je tiens à remercier le directeur de l'option Immunochimie alimentaire et santé, **M. BENALI Mohamed**, Professeur au département de Biologie, Faculté SNV, Université Djilali Liabès Sidi-Bel-Abbès, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et pour l'honneur qu'il m'a fait d'avoir accepté la présidence du jury de ma thèse. Qu'il soit assuré de ma respectueuse considération.

Je tiens à remercier le co-directeur **M. MEZAINI Abdelkader**, Maître de conférences à l'Université H.B. de Chlef, je lui adresse mes vifs remerciements pour son aide, sa gentillesse et tous ses encouragements et son soutien dans les moments difficiles.

Mes vifs remerciements pour Mr BELHADRI Ahmed, MAA à l'Université H.B. de Chlef, pour ses conseils et ses encouragements.

Mes remerciements vont également aux examinateurs de cette thèse pour avoir accepté la lourde tâche de lire l'intégralité de ce manuscrit et d'examiner ces travaux de recherche : Pr ABBOUNI Bouziane de l'Université Djilali Liabès Sidi-Bel-Abbès et Dr MEZIANI Samira de l'Université Djilali Liabès Sidi-Bel-Abbès. Je leurs suis particulièrement reconnaissant.

Je remercie tous ce qui m'ont aidé à réaliser cette thèse :

- M. *Achour* Taieb, MAA à l'Université H.B. de Chlef,
- Pr Aïchouni Ahmed, Directeur du laboratoire BNL Bio-ressources naturelles locales à l'Université H.B. de Chlef,
- Professeur MERZOUK Hafida, Directrice du laboratoire PPABIONUT *Physiologie, Physiopathologie et Biochimie de la Nutrition*, Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen,

- Dr Francisco J Morales de l'Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Madrid, Spain ; Dr André Sales, Laboratoire d'Anatomie Pathologique Vétérinaire (VETOPATH), Marseille, France; Dr Véronique Bachy, laboratoire d'Anatomie Pathologique et de Biologie Vétérinaire (ORBIO), Lyon ,France; Dr Inès Birlouez Fondatrice, Directrice scientifique Spectralys Innovation; Jennifer BAUDIN (Assistante commerciale) et Denis CHASTAGNIER (Directeur Vétérinaire) membres JANVIER LABS (Société internationale et indépendante, spécialisée dans les modèles de recherche et services associés) d'avoir fourni les informations et documentations nécessaires à la réalisation de notre protocole expérimentale.

Je tiens aussi à remercier tous les enseignants et le corps technique du département de Biologie de l'Université H.B. de Chlef et l'université D.L. de Sidi-Bel-Abbès, qui m'ont aidé, guidé et encouragé. Merci pour tous les bons moments passés ensemble au laboratoire.

Je voudrais également remercier mes collègues doctorants et mes *amis pour leur aide psychologique...*

RESUME - L'acrylamide est un contaminant chimique cancérigène qui se forme pendant les traitements thermiques de certains aliments. Dans la première partie, la teneur en acrylamide était analysé dans les aliments trouvés dans le régime alimentaire algérien typique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem selon ISOEN-16618: 2015. Par la suite, différents niveaux de consommation ont été étudiés afin d'obtenir une évaluation préliminaire de l'exposition l'acrylamide. Pour estimer la fréquence de consommation et le degré d'exposition à l'acrylamide, 788 ménages ont été interrogés par moyens d'un questionnaire alimentaire. Les résultats de l'enquête ont montré que les Algériens sont exposés à une concentration moyenne d'acrylamide de 0,2 à 0,4 µg par kg de poids corporel par jour. Les principaux contributeurs à cette exposition étaient les frites de pommes de terre et les biscuits. Dans la seconde partie, nous avons examiné l'effet de l'acrylamide sur les paramètres biochimiques et hématologiques des rats Wistar et exploré la fonction rénale et hépatique de ces animaux à travers une étude anatomopathologique complémentaire. Les résultats ont clairement montré que l'acrylamide affecte divers paramètres biochimiques, tels que la créatinine, l'urée et les taux de globuline sérique et l'équilibre lipidique, qui sont directement liés à la dysfonction rénale et hépatique et à la perturbation du système hématologique (changements dans l'hémogramme; des augmentations significatives du nombre de leucocytes et lymphocytes et baisse des concentrations totales de protéines, albumine et α -1 globuline) dans le groupe traité avec 10mg /L et la DL50. L'étude anatomopathologique a confirmé les lésions hépatiques chez les animaux soumis à un régime contenant de l'acrylamide.

MOTS-CLÉS Acrylamide; paramètres biochimiques; système immunitaire; Rats Wistar, contaminant du procédé, exposition, fréquence de consommation alimentaire

ABSTRACT - Acrylamide is a carcinogenic chemical contaminant that forms during heat treatments of certain foods. In the first part, the content of acrylamide was analyzed in foods found in the typical Algerian diet by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry according to ISOEN-16618: 2015. Subsequently, different levels of consumption were studied. to obtain a preliminary assessment of acrylamide exposure. To estimate the frequency of consumption and the degree of exposure to acrylamide, 788 households were interviewed by means of a food questionnaire. The results of the survey showed that Algerians are exposed to an average acrylamide concentration of 0.2 to 0.4 μg per kg of body weight per day. The main contributors to this exhibition were potato chips and biscuits. In the second part, we examined the effect of acrylamide on the biochemical and hematological parameters of Wistar rats and explored the renal and hepatic function of these animals through a complementary pathological study. The results clearly showed that acrylamide affects various biochemical parameters, such as créatinine, urea and serum globulin levels and lipid balance, which are directly related to renal and hepatic dysfunction and system disruption. hematologic (changes in the blood count, significant increases in the number of leukocytes and lymphocytes and decreased total protein, albumin and α -1 globulin) in the 10 mg / L group and the LD50. The pathological study confirmed liver injury in animals on a diet containing acrylamide.

KEYWORDS: Acrylamide; biochemical parameters; immune system; Wistar rats, process contaminant, exposure, frequency of food consumption

ملخص - مادة الأكريلاميد هي مادة كيميائية مسببة للسرطان تتشكل خلال المعالجة الحرارية لبعض الأطعمة. في الجزء الأول من هذه الدراسة، تم تحليل محتوى الأكريلاميد في الأطعمة الموجودة في النظام الغذائي الجزائري النموذجي عن طريق CL-ESI-SM-SM وفقاً للمعيار رقم: ISOEN-16618 2015. تم بعد ذلك دراسة مستويات مختلفة من الاستهلاك للحصول على تقييم أولي لتعرض مادة الأكريلاميد. لتقدير تواتر الاستهلاك ودرجة التعرض للأكريلاميد، تمت مقابلة 788 أسرة بواسطة استبيان غذائي. أظهرت نتائج المسح أن الجزائريين يتعرضون لتركيز أكريلاميد في المتوسط من 2,0 إلى 4,0 ميكروغرام لكل كيلوغرام من وزن الجسم يومياً. الاغذية المعرضة اكثر لمادة الأكريلاميد هي رقائق البطاطا والبسكويت. في الجزء الثاني، درسنا تأثير الأكريلاميد على الخصائص البيوكيميائية والدموية لجرذان ويستار واستكشفت الوظيفة الكلوية والكبدية لهذه الحيوانات من خلال دراسة تشريحية للأعضاء مكتملة. وأظهرت النتائج أن مادة الأكريلاميد تؤثر بوضوح على معايير كيميائية حيوية مختلفة، مثل الكرياتينين واليوريا ومستويات المصل الغلوبولين وتوازن الدهون، والتي ترتبط مباشرة باختلال الكلوي والكبدية وتعطل النظام عمل خلايا الدم من خلال تغيرات في عدد الكريات الحنراء، والزيادات الكبيرة في عدد الكريات البيضاء والخلايا اللمفاوية وانخفاض البروتين الكلي والألبومين و α -1 الجلوبيولين للجرذان التي تعرضت لجرعة 10 ملغم / لتر و LD50. وأكدت الدراسة الباثولوجية إصابة كبد الحيوانات التي تتبع نظام غذائي يحتوي على مادة الأكريلاميد.

الكلمات الرئيسية: الأكريلاميد؛ الخصائص البيوكيميائية؛ جهاز المناعة؛ فئران ويستار، التعرض، تكرار استهلاك الغذاء.

Table des matières

| | |
|--|------|
| Remerciement..... | I |
| Résumé..... | II |
| Table de matière..... | III |
| Liste des d'abréviation..... | VI |
| Liste tableaux..... | VIII |
| Liste des figures..... | IX |
| 1ère partie. Synthèse bibliographique | |
| Introduction générale..... | 02 |
| Chapitre I : Acrylamide | |
| 1. Introduction..... | 06 |
| 2. Définition et structure de l'acrylamide..... | 06 |
| 3. Propriétés physico-chimique de l'acrylamide..... | 07 |
| 3.1. Formule chimiques..... | 07 |
| 3.2. Propriétés chimiques..... | 07 |
| 3.3. Propriétés physiques..... | 07 |
| 4. Production industriel et utilisation..... | 08 |
| 4.1. Production industriel..... | 08 |
| 4.2. Utilisation..... | 09 |
| 5. Acrylamide dans les aliments..... | 09 |
| 5.1. La réaction de Maillard..... | 09 |
| 5.1.1. Les différentes étapes de la réaction..... | 10 |
| 5.1.2. Les produits de Maillard indésirables dans les aliments..... | 11 |
| 5.1.3. Impact santé des produits de Maillard alimentaires..... | 11 |
| 5.2. Formation de l'ACR dans les aliments par la réaction de Maillard..... | 12 |
| 5.2.1. Mécanisme de formation d'ACR par la réaction de Maillard..... | 13 |
| 5.2.2. Acides aminés et glucides réducteurs nécessaires..... | 13 |
| a. Acides aminés..... | 13 |
| b. Glucides réducteurs..... | 13 |
| 5.3. Autres mécanismes de formation d'ACR..... | 13 |
| 6. Dosage de l'ACR dans les aliments..... | 14 |
| 7. Métabolisme de l'acrylamide..... | 15 |
| 8. Cinétique de l'ACR..... | 16 |
| Chapitre II : Effet de l'exposition à l'ACR sur la santé | |
| 1. Exposition à l'ACR..... | 18 |
| 1.1. Exposition professionnelle..... | 18 |
| 1.2. Exposition par le tabac..... | 18 |
| 1.3. Exposition alimentaire..... | 18 |
| 1.4. Autres sources d'exposition..... | 20 |
| 2. La toxicité de l'ACR..... | 21 |
| 2.1. Toxicité expérimentale..... | 21 |
| 2.1.1. Toxicité aiguë..... | 21 |
| 2.1.2. Toxicité sub-chronique et chronique..... | 21 |
| a. Neurotoxicité..... | 21 |
| b. Effets génotoxiques..... | 22 |
| c. Effets cancérogènes..... | 22 |
| d. Effets sur la reproduction..... | 23 |
| 2.2. Toxicité sur l'homme..... | 23 |
| 2.2.1. Toxicité aiguë..... | 23 |
| 2.2.2. Toxicité chronique..... | 24 |
| a. Effets génotoxiques..... | 24 |
| b. Effets cancérogènes..... | 24 |
| 2.3. Caractérisation du risque..... | 25 |
| 2.4. Gestion du risque : recommandations des experts..... | 26 |

2ème partie : Matériel et méthodes

I. Dosage de l'ACR et évaluation de l'exposition

| | |
|--|----|
| 1. Echantillonnage et choix des aliments..... | 30 |
| 2. Dosage de l'acrylamide dans les aliments..... | 30 |
| 3. Évaluation de l'exposition à l'ACR en fonction de la fréquence de consommation..... | 35 |
| 3.1. Estimation de la fréquence de consommation..... | 35 |
| 3.2. Évaluation de l'exposition déterministe à l'acrylamide..... | 38 |
| 4. Etudes statistiques..... | 38 |

II. Effets de l'ACR sur les paramètres biochimiques et hématologiques des rats Wistar

| | |
|--|----|
| 1. Matériels..... | 40 |
| 1.1. Matériel biologique..... | 40 |
| 1.2. Appareillages et outils..... | 40 |
| 1.3. Produits et réactifs..... | 41 |
| 2. Méthodes..... | 42 |
| 2.1. Expérimentation animale..... | 42 |
| 2.2. Composition du régime..... | 44 |
| a. Régime alimentaire (ONAB)..... | 44 |
| b. Eau minérale (Nestlé)..... | 45 |
| 2.3. Prélèvement du sang..... | 45 |
| 2.4. Analyses biologiques..... | 47 |
| 2.5. Analyse statistique..... | 49 |
| 2.6. Etude anatomopathologique des reins et foie des rats..... | 49 |
| 2.6.1. Découpage..... | 49 |
| 2.6.2. Coloration..... | 50 |

3ème partie : Résultats et discussion

I Dosage de l'ACR dans les aliments et évaluation de l'exposition

| | |
|--|----|
| 1. Structure de la dépense de consommation alimentaire..... | 53 |
| 2. Dosage de l'ACR dans les aliments..... | 55 |
| 2.1. Pomme de terre et dérivés..... | 60 |
| 2.2. Céréales, et produits céréaliers..... | 60 |
| 2.3. Viandes, poissons, œufs et charcuteries..... | 61 |
| 2.4. Lait et boissons..... | 61 |
| 2.5. Stimulants et analogues..... | 61 |
| 3. Evaluation de l'exposition en fonction de la fréquence de consommation..... | 62 |
| 3.1. Estimation de l'exposition selon le sexe..... | 67 |
| 3.2. Estimation de l'exposition selon l'âge..... | 68 |
| 3.3. Estimation Selon le poids..... | 71 |

II Effets de l'ACR sur les paramètres biochimiques et hématologiques des rats Wistar

| | |
|--|----|
| 1. Examen clinique..... | 77 |
| 2. Évaluation de l'exposition intestinale..... | 78 |
| 3. Effet de l'ACR sur les paramètres biochimiques et hématologiques..... | 78 |
| 3.1. Enzymologie, Ionogramme et biochimiques sanguine..... | 78 |
| 3.2. Exploration d'une anomalie lipidique..... | 82 |
| 3.3. Dosage des protéines sériques..... | 83 |
| 3.4. Formule sanguine complète..... | 86 |
| 4. Evaluation de l'impact d'ACR sur le poids des rats..... | 90 |
| 5. Evaluation de l'impact d'ACR sur le poids des organes..... | 91 |
| 6. Analyse factorielle exploratoire..... | 92 |
| 7. étude anatomopathologique des reins et foie..... | 93 |

| | |
|--------------------------------|----|
| Conclusion et perspective..... | 96 |
|--------------------------------|----|

| | |
|----------------------------------|----|
| Références bibliographiques..... | 98 |
|----------------------------------|----|

| | |
|-------------|-----|
| Annexe..... | 114 |
|-------------|-----|

| | |
|---|-----|
| Valorisation des travaux de la thèse..... | 142 |
|---|-----|

Liste des tableaux

| | Page |
|--|-------------|
| Tableau 01 : Résumé des concentrations d'acrylamide relevées dans les aliments..... | 19 |
| Tableau 02 : Résumé des estimations d'ingestion d'acrylamide par voie alimentaire..... | 20 |
| Tableau 03 : Principaux automates utilisés dans les analyses..... | 41 |
| Tableau 04 : Composition de régime rationnelle (OANB)..... | 41 |
| Tableau 05 : Composition de l'eau minérale..... | 41 |
| Tableau 06 : répartition des Aliments les plus consommés..... | 53 |
| Tableau 07 : caractéristiques des échantillons et plan d'échantillonnage..... | 55 |
| Tableau 08 : concentrations d'ACR mesurées dans divers aliments par CL-ESI-SM/SM) | 59 |
| Tableau 09 Exposition et fréquence de consommation alimentaires..... | 62 |
| Tableau 10: La quantité consommée par jour par groupes d'aliments..... | 63 |
| Tableau 11: effet de l'ACR sur la variation des paramètres de la biochimie sanguine..... | 79 |
| Tableau 12: Exploration d'une anomalie lipidique de l'effet de l'ACR..... | 82 |
| Tableau 13: effet de l'acrylamide sur les paramètres hématologiques..... | 86 |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 01 : Formule chimique de l'acrylamide..... | 06 |
| Figure 02 : Formule brute de L'AC..... | 07 |
| Figure 03: Formule semi-développée de l'ACR..... | 07 |
| Figure 04: Réactivité de l'ACR..... | 07 |
| Figure 05: Schéma des étapes de la réaction de Maillard..... | 10 |
| Figure 06: Formation de l'ACR dans les aliments..... | 12 |
| Figure 07: Schéma général de l'analyse de l'ACR dans les aliments..... | 14 |
| Figure 08 : Structure d'ACR (a droite) et le majeur métabolite..... | 33 |
| Figure 09: Triple quadripôle conditionné..... | 33 |
| Figure 10: purification des échantillons..... | 33 |
| Figure 11: Séparation de l'hexane de la phase aqueuse..... | 33 |
| Figure 12 : Agitateur de tube multi reax..... | 34 |
| Figure 13 : Échantillons analysés..... | 34 |
| Figure 14 : Protocole de réalisation de l'enquête nutritionnelle..... | 37 |
| Figure 15 : Protocole expérimentation animale..... | 43 |
| Figure 16 : Le prélèvement sanguin au niveau d'aorte abdominale..... | 46 |
| Figure 17: tubes de prélèvement de sang..... | 47 |
| Figure 18: Analyseurs Cobas® 6000..... | 47 |
| Figure 19 : Analyseurs XT-4000i..... | 48 |
| Figure 20 : Minicap de SEBIA..... | 48 |
| Figure 21: appareils pour étude anatomie pathologique..... | 50 |
| Figure 22 : la fréquence de consommation et l'exposition à l'ACR dans les aliments..... | 64 |
| Figure 23: Exposition a l'ACR selon le sexe..... | 67 |
| Figure 24: la fréquence de consommation et l'exposition en ACR d'enfants..... | 68 |
| Figure 25: La fréquence de consommation et l'exposition en ACR d'adolescents..... | 69 |
| Figure 26 : La fréquence de consommation et l'exposition en ACR jeunes adultes..... | 70 |
| Figure 27 : La fréquence de consommation et l'exposition en ACR adultes..... | 70 |
| Figure 28: Fréquence de consommation et l'exposition en ACR (poids < 55kg) | 72 |
| Figure 29: Fréquence de consommation et l'exposition en ACR (poids 55 - 60 kg) | 73 |
| Figure 30: Fréquence de consommation et l'exposition en ACR (poids > 60 kg) | 74 |
| Figure 31:: Effet de l'ACR sur la variation des paramètres biochimiques..... | 81 |
| Figure 32: Exploration d'une anomalie lipidique suivant l'effet de l'ACR..... | 83 |
| Figure 33: Effet de l'ACR sur la variation des protéines et de la sérum globuline..... | 84 |
| Figure 34: Effet de l'ACR administré sur la numération globulaire complète..... | 89 |
| Figure 35: Effet de l'acrylamide sur l'évolution de poids corporel des rats..... | 90 |
| Figure 36: Evolution de poids d'organes des rats..... | 91 |
| Figure 37: Pourcentage de lésions hépatiques et rénales chez les rats atteints d'ACR..... | 94 |
| Figure 38: coupes Histologiques des foies des rats..... | 95 |

Introduction
Générale

INTRODUCTION

Une nouvelle voie d'exploration s'est ouverte récemment avec la découverte (depuis 2002) de molécules potentiellement toxiques formées dans les aliments cuits à très haute température, telles que l'acrylamide (ACR). Il a rendu nécessaire d'exécuter des expériences additionnelles afin de déterminer les effets négatifs de cette molécule sur la santé [1][2]. L'ACR est un produit chimique carcinogène pour les animaux [3] [4] [5] et peut présenter un risque pour la santé humaine. Des études épidémiologiques montrent un effet neurotoxique de l'ACR sur l'être humain, il se forme lorsque l'asparagine entre en réaction de Maillard avec des sucres comme le glucose [4]. L'exposition à l'ACR peut avoir lieu de trois façons, la source la plus importante est l'exposition via l'alimentation[6].

L'acrylamide a été détecté dans tous les types d'aliments, notamment la viande, le pain et les produits de pommes de terre préparés à des températures élevées[7]. Parmi les aliments ayant les plus grandes concentrations d'ACR, on retrouve les croustilles et les frites de pommes de terres, certains produits à bases de céréales ainsi que les substituts de café et produits dérivés de celui-ci [8]. Depuis la détection d'ACR dans différents types d'aliments, le Comité mixte FAO/OMS d'experts sur les additifs alimentaires (JECFA) a conclu que l'ACR constitue un risque pour la santé humaine, puisqu'il peut induire des cancers et des mutations héréditaires chez les animaux de laboratoire [9].

Plusieurs méthodes analytiques sont utilisées pour quantifier l'ACR dans les aliments. Les méthodes les plus courantes sont basées sur la chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse (analyse dérivative), (GC-MS) et la détection par la chromatographie en phase liquide de haute performance/spectrométrie de masse en tandem [10][11]. Dans notre cas, cette méthode peut permettre de déceler des concentrations d'ACR $\geq 15\mu\text{g} / \text{kg}$ [96] et mettre en évidence des données intéressantes sur la présence de l'ACR dans les aliments algériens ainsi que de son origine, d'engager une enquête sur l'évaluation de l'exposition chez les ménages de consommation en Algérie et son effet sur les rats Wistar.

Les niveaux élevés d'acrylamide peuvent causer des mutations génétiques et la transformation cellulaire [12]. Chez l'homme, les effets toxiques de l'ACR sur le système nerveux faisant suite à une importante exposition professionnelle ou accidentelle sont bien

connus. Des travaux ont aussi montré que l'ACR est génotoxique, perturbe la reproduction et le développement et entraîne des cancers chez les animaux de laboratoire [13]. Le choix du rat repose essentiellement sur le fait que ces animaux présentent des similitudes immunologiques et génétiques avec l'homme et que les études fonctionnelles seront plus faciles à réaliser [14]. L'exposition à l'ACR a stimulé l'immuno-réaction chez les rats mâles [15] et active le système immunitaire [16]. Puisque la molécule d'ACR est petite et a une structure hydrophile, ceci lui permet d'atteindre chaque organe et chaque tissu dans le corps [5]. Pour cette raison, que théoriquement, tous les tissus peuvent être des cibles aux effets négatifs d'ACR [1]. Dans une autre étude l'ACR à 150 mg/l d'eau potable a été appliquée aux rats mâles albinos pour étudier les effets toxiques sur le cerveau, la glande thyroïde, les testicules, le foie et les reins. Les résultats ont montrés l'accumulation de l'ACR dans le système nerveux, testicules, foie et les reins [17].

Ce travail de recherche, réalisé au sein du Laboratoire de Bio toxicologie (BioTox) Université Djilali Liabès Sidi-Bel-Abbès en collaboration avec le Laboratoire de bio ressources naturelles locales (LBLN) Université H.B de Chlef., est centré sur les effets de l'acrylamide, composant toxique présent dans l'alimentation quotidienne, sur la santé humaine et animale.

La démarche poursuivie dans la réalisation de cette thèse consiste à faire une étude sur l'état de la consommation alimentaire, suivie par un dosage de l'acrylamide dans quelques produits alimentaires, une évaluation préliminaire à l'exposition alimentaire à l'acrylamide chez des ménages algériens qui pourrait avoir une importance pour la prévention de la toxicité de l'ACR; Enfin une expérimentation animale étudiant l'effet de l'acrylamide sur les rats Wistar.

Dans une première partie, nous présentons une mise au point bibliographique décrivant les notions essentielles sur le danger de l'acrylamide. La seconde décrit la partie expérimentale, avec une présentation des modalités de l'échantillonnage et choix des aliments pour le dosage de l'acrylamide par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-ESI-SM-SM), une expérimentation animale utilisant model rats Wistar tout en réalisant des tests biologiques simples et peu coûteux pour détecter les changements immunitaires et biochimiques causés par les ACR. Enfin, une conclusion générale qui permettra de tirer quelques perspectives de prolongement à ce travail.

*1ère partie. Synthèse
bibliographique*

Chapitre 1 :
Acrylamide

1. Introduction

La découverte de la possible toxicité de l'ACR formée dans les aliments cuits à très haute température [2] a conduit à une impressionnante mobilisation internationale pour comprendre les mécanismes de formation, développer des méthodes de quantification, évaluer le niveau d'exposition alimentaire, et identifier les risques pour la santé des populations [18].

2. Définition et structure de l'acrylamide

L'acrylamide ou 2-propénamide est un composé vinylique transparent, inodore et soluble dans l'eau pouvant facilement s'assembler en polymères (polyacrylamide) et qui est largement utilisé en génie chimique [19]. L'ACR est une molécule (Figure 01) produite lors de la cuisson à haute température des aliments. Il est également connu sous les noms d'amide acrylique, d'amide de vinyle et d'ACR monomère [20].

Il est employé pour le traitement des eaux, la construction de barrages, de tunnels, de routes ou de réservoirs. Il est également utilisé dans l'industrie des pâtes et papiers, la fabrication de cosmétiques et en chimie analytique (chromatographie, électrophorèse) [19].

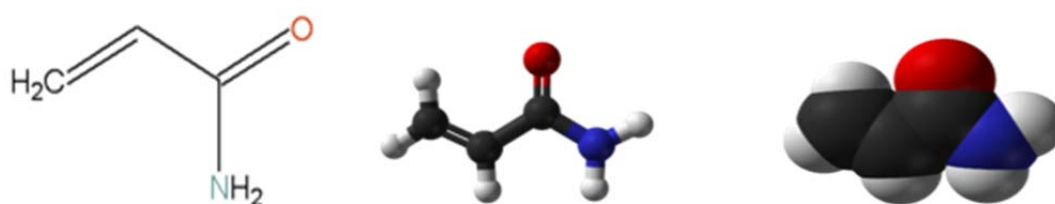


Figure 01 : Formule chimique de l'ACR en 2D et 3D[21].

3. Propriétés physico-chimique de l'acrylamide

3.1. Formule chimiques

Les formules brute et semi-développée de l'ACR sont présentées dans les Figures 02 et 03.

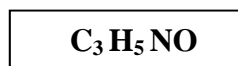


Figure 02 : Formule brute [22].

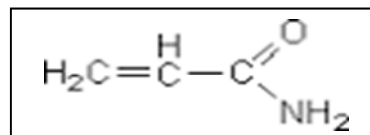


Figure 03 : Formule semi-développée [21].

3.2. Propriétés chimiques :

L'ACR possède les propriétés chimiques de la fonction vinyle et de la fonction amide (Figure 04) :

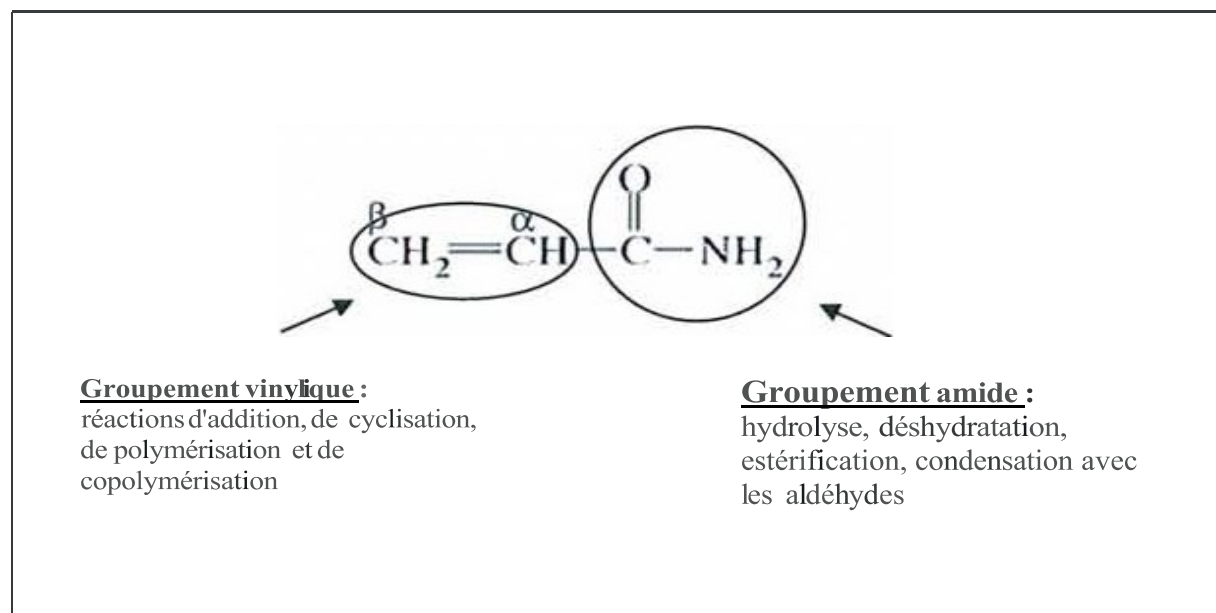


Figure 04 : Réactivité de l'ACR [21].

L'ACR contient une double liaison électrophile réactive et un groupe amide réactif. Il présente de faibles propriétés acides et à la fois basiques [20]. Elle peut également réagir avec les agents oxydants forts ainsi que les bases fortes. Sa décomposition thermique donne lieu à un dégagement de fumées acides et d'oxydes d'azote [23].

3.3. Propriétés physiques

L'ACR est un composé qui se présente sous forme de poudre cristalline blanche inodore. C'est une molécule très polaire avec un poids moléculaire de 71 g/mol, un point de fusion de $84,5 \pm 0,3^\circ\text{C}$ et un point d'ébullition élevé de 136°C à 3,3 kPa [24].

L'ACR se sublime lentement à température ambiante. Il est très soluble dans l'eau (2155 g/l à 30°C) et soluble dans de nombreux solvants organiques (méthanol à 1555 g/l, éthanol à 862 g/l, acétone à 631 g/l, acétate d'éthyle à 126 g/l). Il est également commercialisé sous la forme de solutions aqueuses à 30 - 60 % d'ACR stabilisé (pH = 5 à 6,5) [23].

Le chauffage, l'humidité ou les radiations UV provoquent sa polymérisation en polyacrylamide. Les solutions commerciales contiennent du cuivre (< 100ppm) ou d'autres antioxydants pour le stabiliser et éviter qu'il ne se polymérise. Le polyacrylamide peut se dépolymériser en ACR sous l'effet de la température et de la lumière [25].

4. Production industriel et utilisation

4.1. Production industriel

La production de l'ACR sous forme de monomère débuta dans les années 1955 aux Etats-Unis, depuis les années 60, Allied Colloids Ltd, fabrique toute une série de polymères à partir de l'ACR et de l'acide acrylique [26].

Un procédé utilisant une enzyme, le nitrile hydratase, a été mis en place par la société *Nitto Chemical industry* au Japon pour produire de l'ACR [27]. De même, il permet la transformation de l'acrylonitrile en ACR. En modifiant génétiquement le microorganisme produisant cette enzyme, de bons rendements de production peuvent être atteints [28].

L'ACR peut aussi être produit à partir de microorganismes. Un des premiers à être utilisé est *Rhodococcus rhodochrous*, qui transforme l'acrylonitrile en ACR à l'aide d'une nitrile hydratase [29].

4.2. Utilisation

L'ACR est un monomère très utilisé en industrie et fut disponible commercialement dès les années 1955. Au début des années 1990, il a été produit à grande échelle (50 000 à 75 000 tonnes par an au Japon, aux Etats-Unis et en Europe).

L'ACR est employé dans la fabrication des plastiques, y compris le conditionnement des aliments, et dans la production du caoutchouc synthétique et de quelques copolymères, également il est employé dans la purification d'eau. Une fois ajouté à l'eau, il coagule et emprisonne les solides en suspension qui peuvent alors être facilement enlevés pendant le traitement de l'eau potable. L'ACR qui ne coagule pas reste dans l'eau comme contaminant. L'ACR monomérique est principalement employé dans les laboratoires de recherche pour la préparation de gel [30].

5. L'Acrylamide dans les aliments

Des réactions du type Maillard ont été montrées comme une réaction principale, en particulier en présence de l'asparagine, qui fournit directement l'épine dorsale de la molécule d'ACR [31].

5.1. La réaction de Maillard

La formation de couleur par l'interaction des acides aminés avec du glucose a été identifiée la première fois par L.C. Maillard en 1912 [32].

Cependant, c'était Hodg en 1953 qui a essayé la première fois d'élaborer un arrangement pour expliquer les étapes essentielles dans la réaction complexe[33]. Il est remarquable qu'environ 50 ans après l'arrangement de Hodg constituent toujours la base pour notre compréhension de la réaction. Cette réaction extrêmement complexe entre les composés aminés (principalement acides aminés) et les sucres réducteurs a été le sujet de beaucoup de recherche par des scientifiques cherchant à identifier les composés qui fournissent les caractéristiques de saveur et de couleur des aliments cuites[34].

5.1.1. Les différentes étapes de la réaction

La réaction de Maillard constitue un ensemble très complexe de réactions encore mal connues. La réaction était décrite comme la succession de trois étapes majeures (Figure 05) [35] :

- 1- l'étape précoce initiée par la condensation entre le sucre réducteur et le composé aminé et produisant le produit d'Amadori dans le cas où le sucre est un aldose, ou le produit de Heyns, s'il s'agit d'un cétose.
- 2- l'étape avancée, correspondant à la formation à partir du produit d'Amadori, de nombreux produits plus stables, de scission et déshydratation (aminocétoses, réductones, furanes, etc.) ou encore de cyclisation et/ou condensation (composés de type pyrazine, pyrrol et pyrimidine).
- 3- l'étape finale découlant de la polymérisation de composés formés en étape 2 et produisant les mélanoidines brunes.

Cette réaction, à des vitesses très diverses dépendant de la température et des conditions physicochimiques du milieu (pH, teneur en eau, concentration et réactivité des substrats), peut se dérouler dans les aliments, dans les sols et dans les milieux biologiques. Il est cependant admis que les mélanoidines ne peuvent se former aux températures physiologiques, parce qu'ils nécessitent une énergie d'activation élevée.

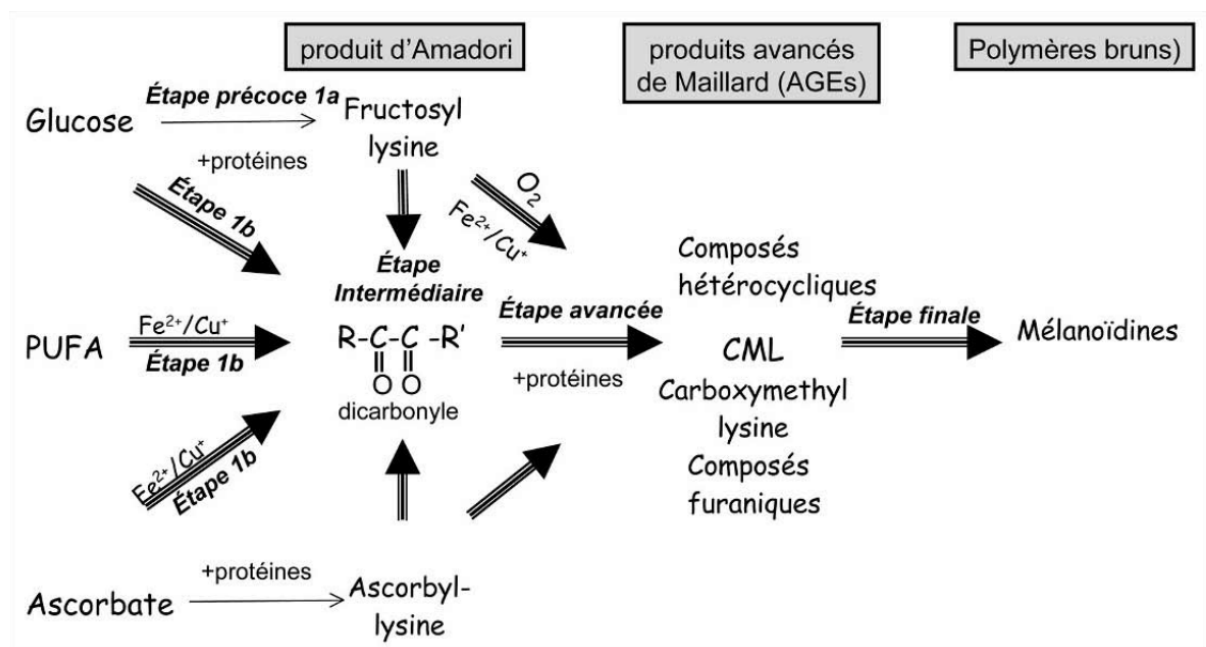


Figure 05 : Schéma des étapes de la réaction de Maillard : rôle-clé des produits intermédiaires dicarbonylés [35]

5.1.2. Les produits de Maillard indésirables dans les aliments

Parmi les multiples molécules formées au cours des différentes étapes de la réaction de Maillard, certaines font aujourd'hui l'objet de recherches intenses du fait du risque possible que leur ingestion peut entraîner sur la santé. Citons les amines hétérocycliques formées essentiellement dans les produits carnés riches en créatinine [36], l'ACR issu de la réaction de Maillard sur l'asparagine et le furane issu de la décomposition des sucres, vitamine C et AGPI, facilitée par les amines [37] [2]. Ces trois molécules sont reconnues comme cancérogènes et sont présentes dans de nombreux aliments que nous consommons quotidiennement. De son côté, la carboxyméthyllysine (CML) est un composé très étudié pour trois raisons :

- 1)- c'est un produit avancé de Maillard stable et provient de voies réactionnelles mettant en jeu des substrats initiaux différents (sucres, vitamine C et lipides insaturés) [38],
- 2)- il se forme aussi bien dans l'aliment [39] qu'au sein de l'organisme [40], et
- 3)-il est directement impliqué dans les cascades de réactions intracellulaires inflammatoires, du fait d'une reconnaissance de la molécule par les récepteurs RAGE (*Receptors for advanced Glycation End Products*), eux-mêmes impliqués dans la réponse inflammatoire [41].

5.1.3. Impact santé des produits de Maillard alimentaires

Nous ne possédons que très peu de données relatives à cette question et celles-ci sont déduites d'études animales, le plus souvent après induction d'un diabète non insulino-dépendant ou d'une néphropathie. En effet, le diabète et l'insuffisance rénale constituent des facteurs de risque d'accumulation des produits de Maillard endogènes ou AGEs. Dans le premier cas, celle-ci résulte de l'augmentation moyenne de la glycémie, dans le second cas, elle est liée à une excrétion incomplète de ces produits.[35]

L'administration de produits de Maillard alimentaires à des animaux par différents moyens (aliments autoclavés, supplémentation du régime avec des protéines modifiées par réaction de Maillard) révèle une aggravation des processus dégénératifs, concernant notamment les complications diabétiques, la néphropathie et l'athérosclérose [42][43]. Quelques études ont été conduites chez l'Homme, essentiellement chez des patients diabétiques de type II. Les deux études majeures réalisées à ce jour [44][45] confirment que l'absorption de PM en forte

concentration au travers d'aliments grillés augmente le taux de cytokines circulantes (notamment CRP, TNF alpha) et le stress oxydant. Les résultats d'une autre étude [46]. [47] montrent que la diminution du taux d'ingestion des PM a permis de diminuer significativement le stress oxydant comme en atteste l'élévation conjointe de la vitamine C et E plasmatiques.

5.2. Formation de l'ACR dans les aliments par la réaction de Maillard

L'ACR est formé essentiellement dans les aliments riches en amidon, cuits à haute température, lors de la Réaction de Maillard. Les premiers travaux visant à déterminer l'origine de la formation de l'ACR dans les aliments furent réalisés par des laboratoires indépendants dans différents pays. Ils établirent que l'asparagine était à la base de la formation de l'ACR [21].

Cette réaction débute par la condensation du glucose (glucide réducteur) avec l'acide aminé asparagine, Comme nous l'avons vu, la réaction de Maillard comprend de nombreuses étapes, mais peut être résumée de la façon suivante (Figure 06):

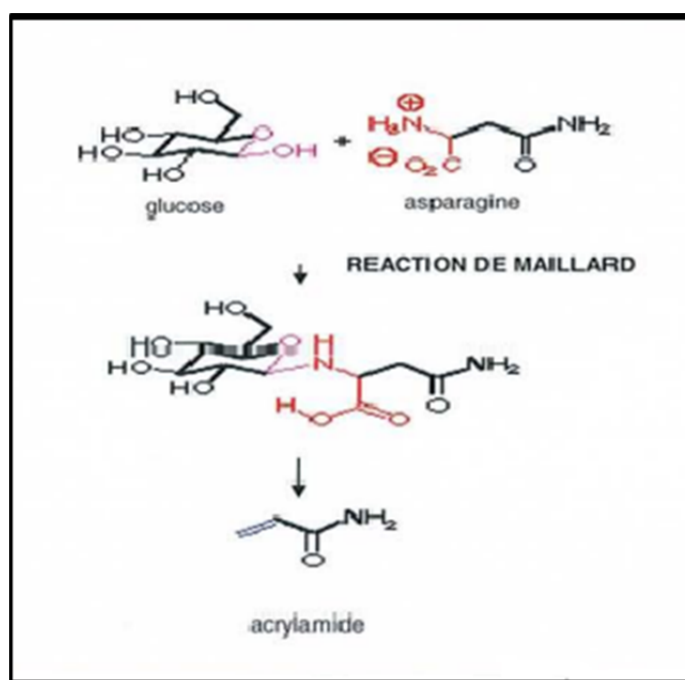


Figure 06 : Formation de l'ACR dans les aliments à partir de l'asparagine et du glucose par la réaction de Maillard [21].

5.2.1. Mécanisme détaillé de la formation d'ACR par la réaction de Maillard

Le premier stade de la réaction, la condensation de Maillard, est la condensation d'un composé aminé (principalement l'asparagine) avec le groupement carbonyle d'un glucide réducteur (principalement le glucose) lors d'une réaction équimolaire, entraînant la formation d'un dérivé N-glycosyl de l'asparagine, en équilibre avec une base de Schiff. Selon Zyzak *et al.* (2003) et Yaylayan *et al.* (2003), la base de Schiff de l'asparagine subit une décarboxylation à la température facilitée par la délocalisation de la charge négative [48][49].

Ensuite, selon Zyzak *et al.* (2003), cette base peut soit entraîner la formation de 3-aminopropionamide par hydrolyse de la base de Schiff et élimination d'ammonium, soit se décomposer et aboutir directement à l'ACR par élimination d'un groupement imine[48], Yaylayan *et al.* (2003), proposèrent une cyclisation intramoléculaire de la base de Schiff en dérivé oxazolidine-5-one [49]. Le rendement de cette réaction est faible: seulement 0,1% à 0,3% des molécules d'asparagine libres sont converties en ACR [50].

5.2.2. Acides aminés et glucides réducteurs nécessaires

a. Acides aminés

Bien que différentes voies de synthèse aient été proposées, celle qui semble être la plus probable met en jeu la dégradation d'un acide aminé libre, l'asparagine, par réaction de Maillard. La preuve du rôle central joué par l'asparagine a été apportée par l'utilisation d'une enzyme spécifique de la dégradation de l'asparagine (asparaginase) dans certaines matrices alimentaires pour réduire efficacement la formation d'ACR [51].

b. Glucides réducteurs

L'autre groupe de substrats important pour la formation de l'ACR dans les aliments est constitué de sucres réducteurs et de composés dicarbonylés, molécules peu abondantes mais hautement réactives [18]. Stadler *et al.* (2004), ont montré qu'un mélange d'asparagine et de composés carbonylés pouvait, au mieux, générer une molécule d'ACR pour cent molécules d'asparagine mises en jeu [50].

5.3. Autres mécanismes de formation d'ACR

Le rôle possible des lipides dans la formation d'ACR a été le sujet d'une certaine discussion, avec l'itinéraire d'acroléine en tant qu'une voie possible [52].

6. Dosage de l'ACR dans les aliments

Les récentes observations concernant l'ACR peuvent être considérées comme fiables au regard des critères actuels de la chimie analytique. S'il est vrai qu'aucune des méthodes utilisées pour le dosage de ce composé dans les denrées alimentaires n'a fait l'objet d'une validation en bonne et due forme par des essais collectifs inter laboratoires, il n'en demeure pas moins que la plupart d'entre elles satisfont aux exigences de tout laboratoire pour une validation et une habilitation "en interne"[53].

Le Centre de recherche de la Commission européenne, (*European commission's Joint Research Centre*, JRC April 2003), conclut qu'il n'existait pas de méthode unique de dosage applicable pour toutes les matrices à analyser. Les protocoles doivent être adaptés à chaque matrice (préparation de l'échantillon, extraction, lavages, technique d'analyse...)[54].

Le Comité d'experts FAO/OMS sur les additifs alimentaires (*JECFA*), dans un rapport de février 2005, a conclu que les méthodes analytiques de dosage utilisées par les différents laboratoires travaillant sur l'ACR nécessitaient d'être améliorées et validées [55]. Dans les pays d'Afrique ou d'Asie, peu d'études sont réalisées sur les méthodes de dosage de l'ACR dans les aliments. [56]

Les méthodes classiques de dosage de l'ACR sont basées sur l'utilisation de la HPLC ou de la CPG [57]. La figure 07 donne le schéma général de l'analyse de l'ACR dans les aliments [58].

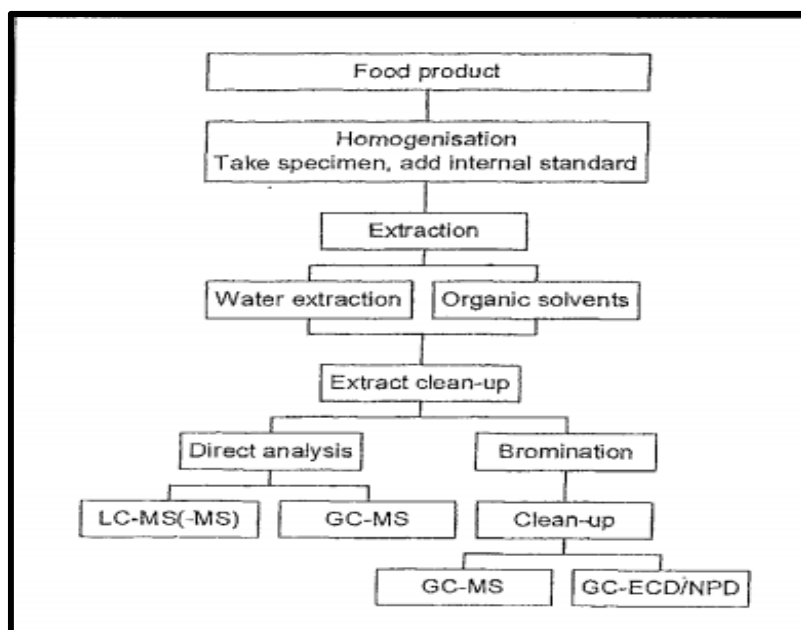


Figure 07 : Schéma général de l'analyse de l'ACR dans les aliments.[58]

Tout d'abord les échantillons subissent un prétraitement (extraction de l'ACR par un ou plusieurs solvants puis purification de l'extrait), puis le dosage en lui-même peut être réalisé par chromatographie en phase liquide ou gazeuse [58].

Plusieurs méthodes analytiques sont utilisées pour quantifier l'acrylamide dans les aliments. Les méthodes les plus courantes sont basées sur la chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse (analyte dérivatisé), (GC-MS) et la détection par la chromatographie en phase liquide de haute performance/spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS) [59][11].

En Algérie la méthode référentielle d'analyse de l'acrylamide est mentionnée dans l'annexe 4 du Décret exécutif n° 09-414 du 28 Dhou El Hidja 1430 correspondant au 15 décembre 2009 fixant la nature, la périodicité et les méthodes d'analyse de l'eau de consommation humaine.

7. Métabolisme de l'acrylamide

Les voies métaboliques de l'acrylamide sont qualitativement semblables chez l'homme et chez l'animal mais des différences quantitatives existent.

La voie majeure est une conjugaison avec le glutathion catalysée par la glutathion-S-transférase (GST) hépatique menant à la formation de deux métabolites principaux : N-acétyl-S-(2-carbamoyléthyl) cystéine (AAMA) et N-acétyl-S-(2-carbamoyl-2-hydroxyéthyl) cystéine (GAMA) chez le rat et la souris.

La formation de glycidamide, métabolite génotoxique, par l'intermédiaire du cytochrome CYP2E1, est une voie saturable (51 % des molécules à 5 mg/kg et 13 % à 100 mg/kg) [60]. Elle est plus importante chez la souris que chez le rat ; le rapport des métabolites urinaires GAMA/ AAMA est de 0,2 chez le rat et 0,5 chez la souris [61]. L'acrylamide et le glycidamide forment des adduits avec les groupements sulfhydryles de l'hémoglobine (Figure 08) ; ces adduits persistent dans les érythrocytes avec une demi-vie estimée à 10,5 jours. In vivo, la formation d'adduits acrylamide-ADN n'a pas été décelée ; cependant, des adduits glycidamide-ADN ont été observés chez le rat.



Figure 08 : Structure d'ACR (droite) et le majeur métabolite le glycidamide (gauche)[62].

Chez l'humain, l'ACR est principalement métabolisé par conjugaison avec le glutathion. Les métabolites formés sont le N-acétylcystéine-S-propionamide (NACP) et le NACP sulfoxyde. Une seconde voie oxydative conduit à l'époxydation de l'ACR en glycidamide [63].

Le métabolisme est semblable à celui de l'animal avec formation de 2 métabolites urinaires majeurs sous forme de dérivés de l'acide mercapturique : AAMA (52 % de la dose) et GAMA (5 % de la dose) [61], avec un rapport GAMA / AAMA de 0,16 en moyenne, se rapprochant de celui du rat.

L'ACR non transformé en glycidamide et le glycidamides ont conjugués au glutathion par une glutathion-S-transférase pour former des acides mercapturiques. Le glycidamide peut aussi être hydrolysé par un époxyde hydrolase en dihydroxypropionamide, Sumner *et al.* (1992) ont détecté dans l'urine de rongeurs ces métabolites [64]. Ils ont aussi été retrouvés chez l'homme et peuvent être utilisés comme biomarqueurs d'exposition à l'ACR dans l'urine, mais aussi le plasma ou les tissus [60].

8. Cinétique de l'ACR

L'ACR est absorbé presque complètement, que ce soit par inhalation, par contact cutané ou par ingestion dans le cas de l'ACR alimentaire[65]. Selon l'U.S. EPA (2010), il n'existe pas de données sur l'homme quant à la distribution de l'ACR. Toutefois, les résultats sur l'animale montrent que cette substance se distribue dans tous les tissus et fluides de l'organisme, dont le lait, et ne s'accumule spécifiquement que dans les globules rouges [66].

À la suite d'une exposition orale chez des sujets humains, le NACP et le NACP sulfoxyde représentent environ 86 % de l'ensemble des métabolites urinaires de l'ACR[63]. Après une exposition orale, une partie de l'ACR (10%) est éliminée sous forme inchangée dans l'urine avec une demi-vie d'élimination d'environ 3,5 heures. En 24 heures, la récupération de l'ACR et de ses métabolites dans l'urine, exprimée en pourcentage de la dose administrée, correspond à 40-50 % de la dose orale. La récupération suite à une exposition cutanée est beaucoup plus faible, soit d'environ 4 % après 24 h [67].

*Chapitre II : Exposition à
l'acrylamide et son effet
sur la santé*

1. Exposition à l'ACR

L'exposition à l'ACR peut avoir lieu de nombreuses façons. Cependant, la source la plus importante d'exposition à l'ACR est via l'alimentation [68].

1.1. Exposition professionnelle

Les personnes travaillant dans les industries de production ou de transformation de l'ACR peuvent être exposées à ce composé par voie dermique ou par inhalation. D'après les études sur l'exposition professionnelle à l'acrylamide, la limite dangereuse est rarement atteinte [69].

Des travailleurs présentant des symptômes de neurotoxicité à la suite de leur exposition professionnelle à l'acrylamide ont conduit les autorités locales d'un pays à déclarer l'état d'urgence [70]. Cependant, d'autres études épidémiologiques dans les milieux de travail n'ont pas établi un lien solide entre l'exposition à l'acrylamide et cancers humains [71].

1.2. Exposition par le tabac

Parmi les sources non alimentaires d'ACR, la fumée de tabac peut représenter un apport important d'ACR, même de manière passive [72][73][74][75].

1.3. Exposition alimentaire

En 2002, l'ACR a été détecté dans plusieurs types d'aliments cuits, incluant les aliments de base (EFSA, 2008). Il peut se former dans les aliments d'origine végétale, en particulier les aliments riches en glucides et faibles en protéines, lors des processus de cuisson tels que la friture, la cuisson au four ou au gril et le rôtissage à des températures égales ou supérieures à 120 °C [76].

Parmi les groupes d'aliments contenant le plus d'ACR, il y a les produits à base de pommes de terre (frites, chips), de céréales, de pâtisseries (cookies et cakes) et enfin le café et le pain. Becalski *et al.* (2003), ont observé que les concentrations d'ACR dans les croustilles de pommes de terre et les pommes de terre frites varient respectivement de 530 à 3700 µg/g et de 200 à 1900 µg/g[4]. Le fait de trouver de l'ACR dans les olives et les pruneaux est plus surprenant [77]. D'après Dybing *et al.* (2005), les aliments contribueraient à plus de 80 % des doses d'ACR ingérées[78].

Frédéric *et al.* (2012), montrent que les principaux contributeurs à l'exposition chez les adultes sont les pommes de terre sautées ou frites (45%), le café et les substituts de café (29%) et les biscuits salés ou sucrés (9%). Chez les enfants, les mêmes contributeurs majoritaires sont retrouvés à l'exception du café [18].

Cette exposition par les aliments correspondrait à environ 0,5 à 1 µg/kg de masse corporelle / jour [76]. Il existe de nombreuses différences de consommation alimentaire entre les populations de différents pays ou de différentes régions. Par exemple, les pommes de terre frites sont consommées en très forte quantité aux Etats-Unis et représentent 35% en moyenne de la consommation journalière d'ACR [78].

D'autres études ont été réalisées pour caractériser indirectement le niveau d'exposition à partir des concentrations mesurées dans les aliments. Les doses moyennes d'ACR dans la population générale ainsi estimées variaient de 0,3 à 0,8 µg / kg p.c./j [53].

Le tableau 1 donne un résumé de résultats d'analyses de l'ACR présent dans les aliments.

Tableau 1: Résumé des concentrations d'ACR relevées dans les aliments [79]

| Groupes d'aliments | Groupes de produits alimentaires | Concentration d'ACR | |
|---------------------------------|---|---------------------|----------|
| | | Minimale | Maximale |
| Pommes de terre | Chips | 117 | 3770 |
| | Pommes frites | 59 | 5200 |
| | Pommes de terre (cruées) | <10 | <50 |
| | Beignets/croquettes de pommes de terre (frits) | 42 | 2779 |
| Produits à base de Céréales | Pain | <10 | 130 |
| | Produits de boulangerie et biscuits | 18 | 3324 |
| | Pain grillé | 25 | 1430 |
| | Popcorn (sucré et salé) | 57 | 300 |
| Riz et nouilles | Riz frit | <3 | 67 |
| | Crackers à base de riz, grillé ou frits | 17 | 500 |
| Fruit et légumes | Olives noires en conserve | 123 | 1925 |
| | Jus de prune en bouteille | 53 | 267 |
| | Légumes frits (y compris les beignets de légumes) | 34 | 34 |
| Poissons et viande | Poisson et produits de la mer, frits dans la | <2 | 39 |
| | Viande, volaille et poisson en carcasse (frite) | <5 | 52 |
| Produits à base de Cacao | Produits de chocolaterie | <2 | 826 |
| | Poudre de cacao | <10 | 909 |
| Boissons | Café (torréfié) | 45 | 975 |
| | Extrait/poudre de café | 195 | 4948 |
| Aliments pour nouveau-nés/bébés | Biscuits/biscottes pour bébés | <20 | 910 |
| | Aliments pour bébés en bocaux/conserves | <10 | 121 |

Un certain nombre d'études ont été faites pour estimer l'exposition alimentaire à l'ACR. Les estimations des doses à court terme allaient de 0,2 µg/kg de poids corporel par jour pour une consommation moyenne à 3,4 µg/kg de poids corporel par jour pour une forte consommation [78]. Ces concentrations sont résumées dans le tableau 2.

Tableau 02: Résumé des estimations d'ingestion d'ACR par voie alimentaire [78]

| Pays/Organisation | Estimation des doses d'ingestion (µg/kg) |
|----------------------|--|
| FAO/OMS, 2002 | 0,3 –0,8 |
| UE CSA, 2002 | 0,2-0,4 |
| BfR, Allemagne, 2003 | 1,1 –3,4 |
| BAG, Suisse, 2002 | 0,28 |
| SNT, Norvège, 2003 | 0,32 – 1,35 |
| AFSSA, France, 2003 | 0,5 –2,9 |
| SNFA, Suède, 2003 | 0,45 – 1,03 |
| NFCS, Pays-Bas, 2003 | 0,48 – 1,1 |
| États-Unis, 2004 | 0,43-2,31 |
| Royaume-Uni, 2005 | 0,3 –1,8 |

1.4. Autres sources d'exposition

L'utilisation de polyacrylamide pour le traitement (clarification) de l'eau visant à la rendre potable peut être à l'origine de l'introduction d'ACR (EC, 2000)[80]. Dans l'eau potable, la limite d'ACR résiduel a été fixée à 0,1µg/L par la directive européenne 98/83/EC du 3 novembre 1998. La limite est de 0,5µg/L aux Etats-Unis, limite fixée par l'Agence des Etats-Unis pour la protection de l'environnement (U.S. Environmental protection Agency, EPA).

En Algérie la valeur limite de l'acrylamide dans l'eau de consommation est de 0,5 µg/L selon le Décret exécutif n°14-96 du 2 Joumada El Oula 1435 correspondant au 4 mars 2014 modifiant et complétant le décret exécutif n° 11-125 du 17 Rabie Ethani 1432 correspondant au 22 mars 2011 relatif à la qualité de l'eau de consommation humaine.

Selon EC (2000), les produits cosmétiques peuvent aussi être source d'ACR Ces produits peuvent contenir du polyacrylamide qui peut être une source d'ACR. L'exposition se fait alors de manière cutanée. Les quantités en ACR ingérées par ces deux voies sont cependant bien inférieures à celles trouvées dans les aliments [80].

2. La toxicité de l'ACR

Le polymère de l'acrylamide est non toxique, mais le monomère est neurotoxique pour l'être humain et les animaux de laboratoire[81]

2.1. Toxicité expérimentale

2.1.1. Toxicité aiguë

L'ACR est toxique par voie orale chez les animaux de laboratoire (rongeurs, chat, porc, lapin) après administration aiguë. L'ACR a entraîné des phénomènes d'ataxie, de convulsions, de faiblesse musculaire et de perte de poids [82]. Chez les rats la Dose Létale 50 (DL₅₀) se situe autour de 107 à 203 mg/kg [83][80].

2.1.2. Toxicité sub-chronique et chronique

L'acrylamide est essentiellement un agent toxique pour le système nerveux et les testicules.[84] [23]

a. Neurotoxicité

L'exposition des animaux à l'acrylamide par voie orale provoque l'apparition de signes cliniques de neurotoxicité (perte de l'usage des membres, tremblements et manque d'équilibre) chez toutes les espèces utilisées (primates, chiens, chats, rongeurs). À l'examen microscopique, des modifications dégénératives (perte de myéline sur les fibres nerveuses des cellules ganglionnaires et axonales) des nerfs périphériques et optique ont été observées.

La dose sans effet est 0,5 mg/kg/j pendant 2 ans chez le rat et 0,3 mg/kg/j pendant 1 an chez le chat. Ces lésions sont réversibles à l'arrêt de l'exposition après 30 semaines chez les primates et après 5 semaines chez les rongeurs. Chez la souris (gavage, 36 mg/kg/j, 2 fois/sem, 8 sem) et le rat (eau de boisson, 20 mg/kg/j, 90 j), en plus des effets neurologiques, une atrophie testiculaire avec diminution du nombre de spermatides, de spermatocytes et de spermatozoïdes et apparition de cellules géantes multinucléées ont été observés.[23][84]

b. Effets génotoxiques

L'acrylamide et le glycidamide peuvent former des adduits d'hémoglobine mais seul le glycidamide peut former des produits d'addition avec des groupes amino de l'ADN (acide désoxyribonucléique) [81]. Cette fonction du glycidamide implique la génotoxicité. En outre, les niveaux élevés d'acrylamide peuvent causer des mutations génétiques et la transformation cellulaire [12].

L'acrylamide est clastogène *in vitro* et *in vivo* ; il est mutagène pour les cellules germinales des animaux, et induit des lésions génétiques héréditaires. Son métabolite principal, le glycidamide, serait responsable de la génotoxicité.[85]

- *- *In vitro*, l'acrylamide n'est pas mutagène pour les bactéries et est peu ou pas mutagène pour les cellules de mammifère en culture
- *- *In vivo*, l'acrylamide provoque chez la drosophile, une augmentation équivoque du taux des mutations somatiques et provoque chez les rats et souris des mutations et une clastogénèse dans les cellules somatiques et germinales

Le glycidamide induit l'apparition de micronoyaux dans la moelle osseuse de la souris, en relation avec la dose (12 - 50 mg/kg, ip), et à un taux moindre dans celle du rat (50 - 100 mg/kg, ip) ainsi qu'une synthèse non programmée de l'ADN dans les spermatides du rat. [1, 5, 10 à 13, 24]. [23]

c. Effets cancérrogènes

L'acrylamide est cancérogène pour de nombreux organes chez le rat et la souris. Il est classé comme probablement cancérogène pour l'homme[81], Administré par voie orale, l'acrylamide provoque chez le rat une augmentation, chez le mâle, du taux d'adénomes folliculaires de la thyroïde et de mésothéliomes testiculaires et, chez la femelle, des tumeurs de la glande mammaire, du système nerveux central, de la thyroïde, de la cavité orale, de l'utérus et de la glande clitoridienne. Chez la souris A/J, il induit une augmentation du taux et du nombre d'adénomes pulmonaires. Il a également été montré comme agent initiateur de cancérogenèse cutanée chez la souris après administration orale. Un essai de cancérogenèse à long terme chez la souris, plus sensible que le rat, est en cours pour le National Toxicology Program [23][86]

d. Effets sur la reproduction

L'acrylamide est toxique pour la reproduction : il produit des modifications génétiques dans le sperme du mâle, une baisse de poids des petits et des effets neurologiques à des doses neurotoxiques pour les mères[86][23].

2.2. Toxicité sur l'homme

Chez l'homme, l'exposition à l'ACR par voie orale ou dermique en milieu professionnel a été largement étudiée. On observe des effets comparables à ceux observés chez les animaux de laboratoire, c'est-à-dire principalement des signes de toxicité nerveuse périphérique comme des fourmillements, une incoordination motrice, de toxicité centrale comme des troubles de la mémoire, de la concentration ou du sommeil. De plus, on observe des signes généraux comme de la fatigue ou une perte de poids après quelques jours d'exposition [82] [23] .

2.2.1. Toxicité aiguë

En milieu professionnel, les sujets sont principalement exposés par voies inhalatoire et cutanée. [23]. Des cas d'intoxication aiguë sont rapportés après ingestion volontaire d'acrylamide. Dans un cas, les symptômes sont apparus 5 heures après l'ingestion (d'une dose de l'ordre de 375 mg/kg) associant hallucinations avec hypotension, suivies par des convulsions, puis au 3ème jour par une gêne respiratoire (avec toux), une atteinte neurologique périphérique (persistante 2 mois plus tard) et une atteinte hépatique [23].

Plusieurs cas d'irritation cutanée sont rapportés lors d'expositions professionnelles à l'acrylamide : irritation, un rash cutané, une desquamation palmaire, une sudation et une dermatose de type acnéiforme de la face et des mains. Ces symptômes précèdent pratiquement constamment les signes d'atteinte neurologique [87].

Plus récemment un cas d'eczéma des mains, des poignets et de la face est rapporté chez une biochimiste travaillant avec des gels de polyacrylamide depuis 9 mois ; les patchtests avec de l'acrylamide à 1 % dans la vaseline sont positifs et 2 mois plus tard, ils sont toujours positifs même à 0,001 % dans la vaseline [88].

2.2.2. Toxicité chronique

Les études épidémiologiques et les rapports de cas retrouvent dans tous les cas des atteintes neurologiques périphériques lors d'expositions par voies cutanée et/ou inhalatoire à l'acrylamide ; ces mêmes effets sont apparus lors d'expositions répétées par voie orale[89]. La part de l'absorption cutanée dans l'apparition de ces symptômes ne peut être quantifiée [23].

Le rôle de l'exposition par voie dermale dans l'apparition des symptômes cutanés (érythème, desquamation et hypersudation des mains) ainsi que dans l'apparition des signes systémiques est très probable [87][75]. Toutes ces anomalies semblent réversibles 16 mois après arrêt de l'exposition[90].

Il a été constaté après 2 mois des atteintes neurologiques du bétail notamment, mais aussi des travailleurs [75]. Ces études épidémiologiques chez l'homme après des expositions professionnelles, ont suggéré que le système nerveux était le principal site de toxicité chez l'homme[91].

a. Effets génotoxiques

L'acrylamide et le glycidamide peuvent être décontaminés dans les cellules par combinaison avec le glutathion, ou par hydrolyse [81]. En outre, une teneur élevée d'acrylamide dans les produits d'addition d'hémoglobine est détectée chez les fumeurs[86], car l'acrylamide se trouve également dans la fumée de tabac à la suite d'une combustion incomplète ou de chauffage de la matière organique [7].

b. Effets cancérigènes

L'acrylamide est un cancérigène probable pour l'être humain [81][92]. Les 23 experts scientifiques de la consultation, spécialisés en cancérogenèse, toxicologie, technologies alimentaires, biochimie et chimie analytique, ont retenu un certain nombre de questions importantes à étudier d'urgence. Si l'on sait que l'acrylamide provoque le cancer chez l'animal de laboratoire, il n'y a pas encore eu d'étude sur la relation entre cette molécule et le cancer chez l'être humain[93].

2.3. Caractérisation du risque

La caractérisation du risque la plus récente est celle du JECFA (2005). Afin d'estimer le risque pour l'homme, le comité mixte JECFA a utilisé une démarche d'évaluation des risques faisant appel à la marge d'exposition. La valeur de cette marge indique un niveau de préoccupation pour aider les autorités réglementaires à fixer des priorités pour prendre des mesures. Elle correspond au rapport entre la dose sans effet chez l'animal et le niveau d'exposition estimé. Plus elle est faible et plus la toxicité est importante[9].

Le calcul de l'exposition permet de déterminer s'il existe une exposition réelle de la population. Ensuite, les experts caractérisent le risque en calculant la Dose Journalière Admissible (DJA, en mg de substance/kg de poids corporel/jour). Pour cela, ils appliquent un facteur de sécurité au *NOAEL*. Ce facteur varie en général de 100 à 1000 en fonction de la qualité des études qui ont permis de déterminer le *NOAEL* et des variabilités inter- et intra-espèces principalement. La DJA représente la quantité que peut absorber un individu quotidiennement pendant toute sa vie sans aucun effet secondaire sur sa santé. Si l'exposition est inférieure à la DJA, le risque pour le consommateur est acceptable. Enfin, les autorités réglementaires se basent sur ces études pour prendre leurs décisions (dernière étape correspondant à la gestion du risque). [21]

Selon le JECFA au vu des marges d'expositions calculées, le risque lié aux effets neurotoxiques est considéré comme faible bien que l'ACR, comme il a été dit précédemment, induise des signes de neuropathie périphérique, de perturbation de la fertilité et du développement chez l'animal.

En ce qui concerne le risque cancérigène, la marge d'exposition a été estimée à 300 pour la population générale et 75 pour les personnes fortement exposées. Les experts ont utilisé une dose sans effet de 0,3mg/kg/jour et une exposition de 1 à 4µg/kg/jour. Ces marges sont relativement faibles pour une substance génotoxique cancérigène.[94]

2.4. Gestion du risque : recommandations des experts

Au vu des marges d'exposition calculées, les experts ont conclu qu'il existe un risque préoccupant pour la santé humaine lié à la présence d'ACR dans les aliments. Cependant, ils estiment qu'il est encore difficile de déterminer précisément et de manière sûre ce risque. En effet, les résultats des études épidémiologiques en milieu professionnel et dans l'alimentation sont insuffisants pour conclure à une absence de risque de cancer chez l'homme.[95][21]

Les études sont peu nombreuses, ont des limites dues aux faibles effectifs et n'ont pas assez de puissance pour détecter de faibles augmentations de l'incidence tumorale. Elles manquent aussi de précision dans l'évaluation des doses d'ACR ingérées dans l'alimentation. De plus, la quantité d'ACR peut varier de façon considérable dans un même produit alimentaire en fonction de différents facteurs, notamment la température et le temps de cuisson. En ce qui concerne les données sur les animaux, il semblerait qu'elles ne permettent pas une transposition parfaite à l'homme. Il n'y a pas de raisons scientifiques de penser que l'homme pourrait présenter les mêmes réponses que l'animal. Les deux espèces ont une sensibilité différente aux cancérigènes dues à des différences qualitatives et quantitatives de métabolisme notamment [21].

En conclusion, les experts du comité mixte JEFCA ont jugé qu'il était impossible d'établir une dose seuil en dessous de laquelle on pourrait consommer l'ACR dans les aliments sans danger pour la santé humaine.

Les experts du JECFA recommandent :

- De réévaluer le risque lié à l'ingestion d'ACR lorsque les résultats des études en cours sur la cancérogénicité et la neurotoxicité à long terme seront disponibles.
- De poursuivre l'évaluation du risque en utilisant les études cinétiques afin de pouvoir trouver une relation entre les bios marqueurs chez l'homme (adduits à l'hémoglobine ou métabolites urinaires comme les acides uriques de l'ACR et du glycidamide), les données de consommation et les données toxicologiques trouvées chez l'animal.

*2ème partie : Matériel
et méthodes*

L'ensemble de ce travail a été réalisé en collaboration avec les structures et institution suivante durant la période 2013/2017 :

- ✓ Université Djilali Liabès Sidi-Bel-Abbès : Laboratoire de Bio-toxicologie & Département de Biologie, Algérie,
- ✓ Université Hassiba Benbouali de Chlef : Laboratoire de Bio-Ressources Naturelles Locales & Département de Biologie, Algérie,
- ✓ Laboratoire d'analyses Médicales Dr Mihoubi à Chlef, Algérie,
- ✓ Institut des Sciences et Technologies Alimentaires et Nutrition ICTAN, Espagne,
- ✓ Laboratoire d'anatomie Pathologique et de Biologie Vétérinaire, France,
- ✓ Laboratoire d'Anatomie Pathologique Vétérinaire Vetopath, France.

Les grandes lignes de recherche sont :

1. Dosage de l'Acrylamide dans quelques produits alimentaires algériens et évaluation de l'exposition en fonction de la fréquence de consommation ;
2. Effets de l'ACR sur les paramètres biochimiques et hématologiques des rats Wistar ;
3. Etude anatomopathologique des reins et rats exposés à différentes doses d'ACR.

*I. Dosage de l'ACR dans
les aliments et évaluation
de l'exposition*

1. Echantillonnage et choix de l'aliment

L'échantillonnage a été précédemment défini pour couvrir les aliments les plus représentatifs d'un régime algérien standard et il a été réalisé dans les cinq régions en octobre 2015. Les noms de produits, les lots et la présence sur les rayons correspondent aux produits offerts au moment de l'échantillonnage et peuvent ne pas représenter tous les produits vendus.

Au moins trois marques de chaque aliment ou type d'aliment ont été récoltées puisque les concentrations d'acrylamide peuvent varier considérablement.

Suite à l'analyse des données collectées ; une mini enquête est menée sur les aliments les plus consommées en Algérie dont 80/100 ménages ont été interrogé de façon anonyme par questionnaire numérique (réalisé via le site <https://www.mon-enquete-enligne.fr>)

Un total de 35 échantillons appartenant à six groupes alimentaires ont été sélectionnés pour la détermination de l'acrylamide (Tableau 07). Les groupes d'aliments identifiés sont i) pomme de terre et dérivés, ii) céréales et dérivés, iii) aliments riches en protéines comme la viande, poisson et œufs, iv) lait et jus de fruits, v) stimulants, vi) autres.

Pour la détermination de l'acrylamide dans l'eau potable, nous avons analysé le «polyélectrolyte», produit chimique utilisé pour le traitement de l'eau potable au niveau de la station de traitement d'eau de barrage *SIDI-YAAKOUB* à raison de 0,1 g / L.

2. Dosage de l'acrylamide dans les aliments

L'analyse de l'acrylamide dans les aliments est réalisée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS / MS) avec dilution isotopique à l'Institut des Sciences et Technologies Alimentaires (ICTAN-CSIC, Madrid, Espagne) selon la norme EN-16618: 2018 avec des modifications mineures [96]

Les prélèvements des échantillons sont réalisés à partir des portions homogènes d'aliments de façon suivante :

- ✓ croûte de pain : prélèvement d'environ 50 g de \geq à 250 g ;
- ✓ croûte de poulet rôti (peau bien cuite) : pour assurer l'homogénéité, prélèvement de 50g d'un échantillon haché de \geq à 250 g ;
- ✓ lait UHT et produits laitiers, jus et boissons aérées, café : prélèvement de 100 ml ;
- ✓ viande de veau (émincées) : prélèvement de 50g d'un échantillon haché de \geq à 250 g ;
- ✓ conserves de thons, sardine et cachet : après avoir retiré l'excès d'huile, prélever 50g d'un échantillon haché de \geq à 250 g ;
- ✓ tomate de conserve et purée de pommes de terre : prélèvement d'environ 50 g ;
- ✓ chips de pommes de terre : craquer 50g en petites pièces de \geq à 250 g.

Le mode opératoire du dosage de l'acrylamide dans les produits alimentaires est effectué par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-ESI-SM-SM) est résumé comme suit (pour le protocole expérimentale intégral voir Annexe 1).

Les réactifs utilisés :

- ✓ Acrylamide (CAS 79-06-1) ;
- ✓ Deutérium (CAS 122775-19-3) ;
- ✓ Méthanol (CAS 67-56-1) ;
- ✓ Acide acétique glaciaire (CAS 64-19-7) ;
- ✓ N-hexane (CAS 110-54-3) ;
- ✓ ferrocyanure de potassium ;
- ✓ acétate de zinc.

Chaque échantillon est broyé et homogénéisé afin de récupérer une quantité représentative de 250g dont 50g sont prélevés pour l'extraction et la détermination de l'acrylamide (Figure 13). Un échantillon (0,500 g) a été pesé et mélangé avec 9,4 ml d'eau dans des tubes centrifuges en polypropylène (Figure 12).

Deux mL d'hexane ont été ajoutés aux tubes afin d'éliminer la teneur en graisse. La procédure a été répétée deux fois (Figure 11).

Le mélange a été additionné de 100 μ l d'une solution méthanolique de [$^{13}\text{C}_3$] -acrylamide à 5 μg / ml comme étalon interne et homogénéisé ensuite (Ultra Turrax, IKA, Mod-T10, Allemagne) pendant 10 minutes (Figure 10).

Ensuite, l'échantillon a été traité avec des solutions Carrez I (15 g de ferrocyanure de potassium / 100 ml d'eau) et Carrez II (30 g d'acétate de zinc / 100 ml d'eau) et centrifugé (9000 g pendant 10 minutes) à 4 °C. en utilisant des cartouches Oasis-HLB. Les cartouches ont été préconditionnées avec 1 ml de méthanol et 1 ml d'eau. Une partie aliquote du surnageant clair a été chargée sur la cartouche à un débit de 2 ml / min et les premières gouttes ont été déchargées et le reste a été recueilli. La solution a été filtrée à travers un filtre de 0,45 µm dans un flacon d'amberlite LC-MS.

Les extraits d'échantillons et les standards d'étalonnage ont été analysés sur une chromatographie liquide Agilent 1200 couplée à un détecteur (Figure 09) Agilent Triple Quadrupole MS (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

La séparation analytique a été réalisée avec une colonne Inertsil ODS-3 (250 x 4,6 mm, 5 µm, GL Sciences Inc., Tokyo, Japon) ou une colonne Hypercarb (50 x 2,1 mm, 5 µm, Thermo Scientific, Bremen, Allemagne) à 30 ° C. L'élution isocratique a été réalisée avec une phase mobile d'acide formique dans de l'eau (0,2 ml / 100 ml) à un débit de 0,4 ml / min. Le volume d'injection était de 10 µL. Une ionisation par pulvérisation électrique en mode d'ionisation positive a été utilisée. Dans ces conditions chromatographiques, l'acrylamide s'est élué à 6,1 min. L'aiguille a été réglée à 1,0 kV.

L'azote a été utilisé comme gaz nébuliseur (12,0 L / min) et la température de la source a été réglée à 350 ° C. Des signaux à m / z 72,1 - m / z 55,1 et m / z 75,1 - m / z 58,1 ont été isolés pour l'acrylamide et [13C3] -acrylamide, respectivement. Pour les transitions m / z 72.1 > m / z 55.1 et m / z 75.1 > m / z 58.1, la fragmentation a été fixée à 76 V et l'énergie de collision à 8V. Les masses ont été enregistrées en utilisant la surveillance des réactions multiples (MRM). Pour la quantification, les signaux à m / z 75.1 et 78.1 ont été utilisés, tandis que les signaux à m / z 58.1 et 55.1 ont servi à la qualification.



Figure 09: Triple quadripôle conditionné

Légende : Conditionnement de la méthodologie de détermination ACR par chromatographie liquide-ionisation par électrospray-spectrométrie de masse en tandem



Figure 10. Purification des échantillons

Légende : L'extrait aqueux de l'échantillon est purifié avec des cartouches HLB avant la détermination de l'ACR

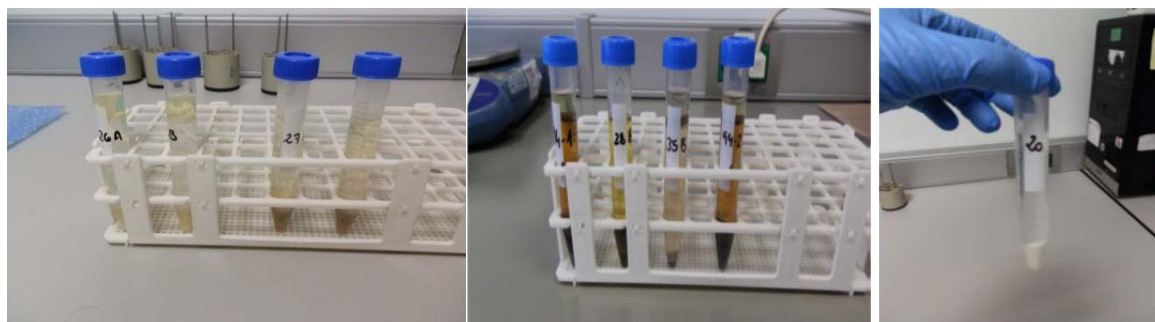


Figure 11. Séparation de l'hexane de la phase aqueuse

Légende : Pour les échantillons à forte teneur en matière grasse, l'hexane est ajouté avec l'eau pour effectuer l'extraction aqueuse. Après agitation et centrifugation, la phase organique (dans la couche supérieure) sera éliminée, éliminant ainsi la graisse de l'échantillon.

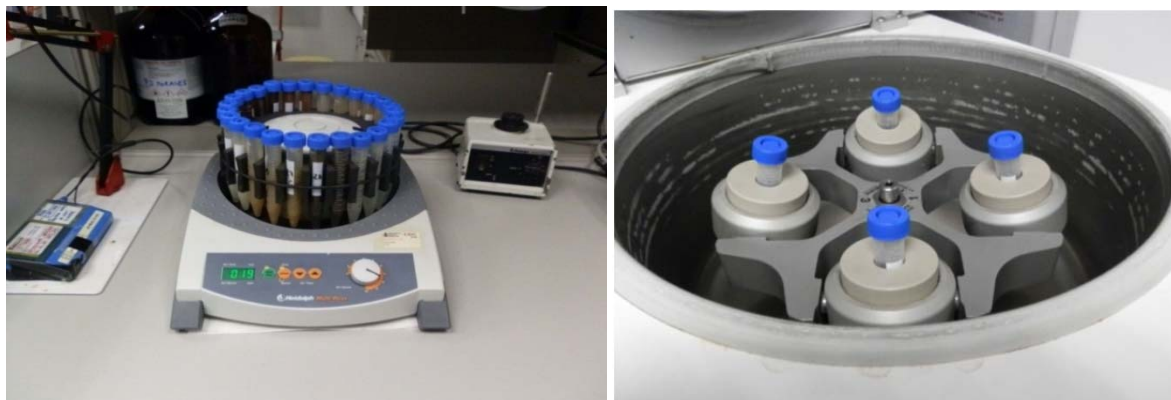


Figure 12. Agitateur de tube multi reax

Légende : Dix millilitres d'eau milli-Q sont ajoutés aux échantillons puis les échantillons sont agités dans un agitateur à tubes Multi reax pour obtenir les extraits aqueux.

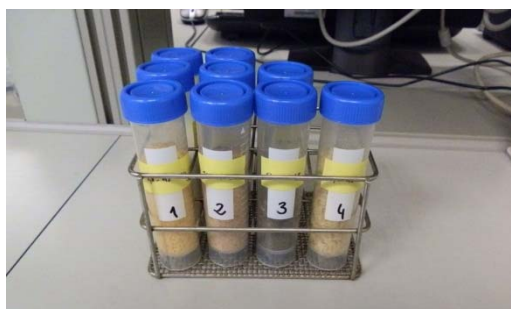


Figure 13. Échantillons analysés

Légende : Les échantillons sont broyés, homogénéisés et stockés dans des tubes de 50 ml

3. Évaluation de l'exposition à l'acrylamide en fonction de la fréquence de consommation

3.1. Estimation de la fréquence de consommation

La fréquence de la consommation alimentaire est estimée par le rapport entre le nombre de fois qu'un aliment a été consommé par jour, semaine et mois et exprimé par Foies / jour. Les fréquences de consommation de six groupes d'aliments (25 aliments) ont été estimés par une enquête transversale descriptive auprès de 900 ménages répartis sur trois wilayas de l'Ouest algérien (Mostaganem, Tissemsilt et Chlef).

Notre travail a été effectué durant une période nécessaire pour toucher le maximum des sujets et pour réunir le nombre d'échantillon espéré et traitable statistiquement. Ainsi, les personnes ont été interrogées durant la période allant du 10/03/2017 au 10/05/2017 inclus, pour couvrir l'ensemble des variations journalières des prises alimentaires.

La population ciblée pour notre enquête est un échantillon de population constitué d'enfants, adolescents et adultes. Avant chaque entretien, nous avons expliqué au sujet le but et le contenu du travail que nous devons mener. Il lui est précisé l'absence totale de tout risque concernant les réponses et nous lui avons donné la garantie qu'aucune donnée nominative n'est divulguée et que ces données d'identification ne sont pas saisies dans un fichier informatique.

Avec la sécurité et le respect de la confidentialité et l'anonymat des informations recueillies destinées exclusivement à une utilisation scientifique et à des fins de recherche.

Après l'accord du sujet, chaque question est bien expliquée de sorte qu'il comprenne le sens et chaque réponse est ainsi notée. La conduite de l'entretien a été faite d'une façon semi-directive. Les individus devaient remplir un questionnaire qui comporte deux parties, la première permet d'identifier les sujets (sexe, âge, lieu de résidence) et une mesure anthropométrique : le poids (Annexe 2).

Dans la seconde partie; le questionnaire a donc permis de documenter de façon détaillé la consommation des aliments et de boisson contenant l'ACR, soit les groupes de pommes de terre et croustille (chips, pommes de terre frites, pomme de terre bouillies, purée de pomme de terre), les produits à base de céréales (chips à base de maïs, biscuits, pain traditionnel, pâtes alimentaires, couscous, gaufrette), les stimulants (café, chocolats, thé), les fruits et légumes (fruit, légume frais, tomate en conserve), les viandes et poissons hachées (thon, sardine, viande hachée croute de poulet, l'œuf cuit), et les boissons (boissons gazeuses, jus, lait UHT).

L'individu doit inscrire dans le questionnaire, la fréquence de consommation, indiquant l'une des trois réponses possibles de la fréquence de consommation et la quantité ingérée à chaque fois des mêmes aliments ou boissons qui apparaissaient dans le questionnaire pendant un jour ou une semaine ou un mois. Chaque sujet a été interrogé pendant 20 - 25 min.

Les étapes de la réalisation de l'enquête sont résumées dans le schéma suivant (Figure 14).

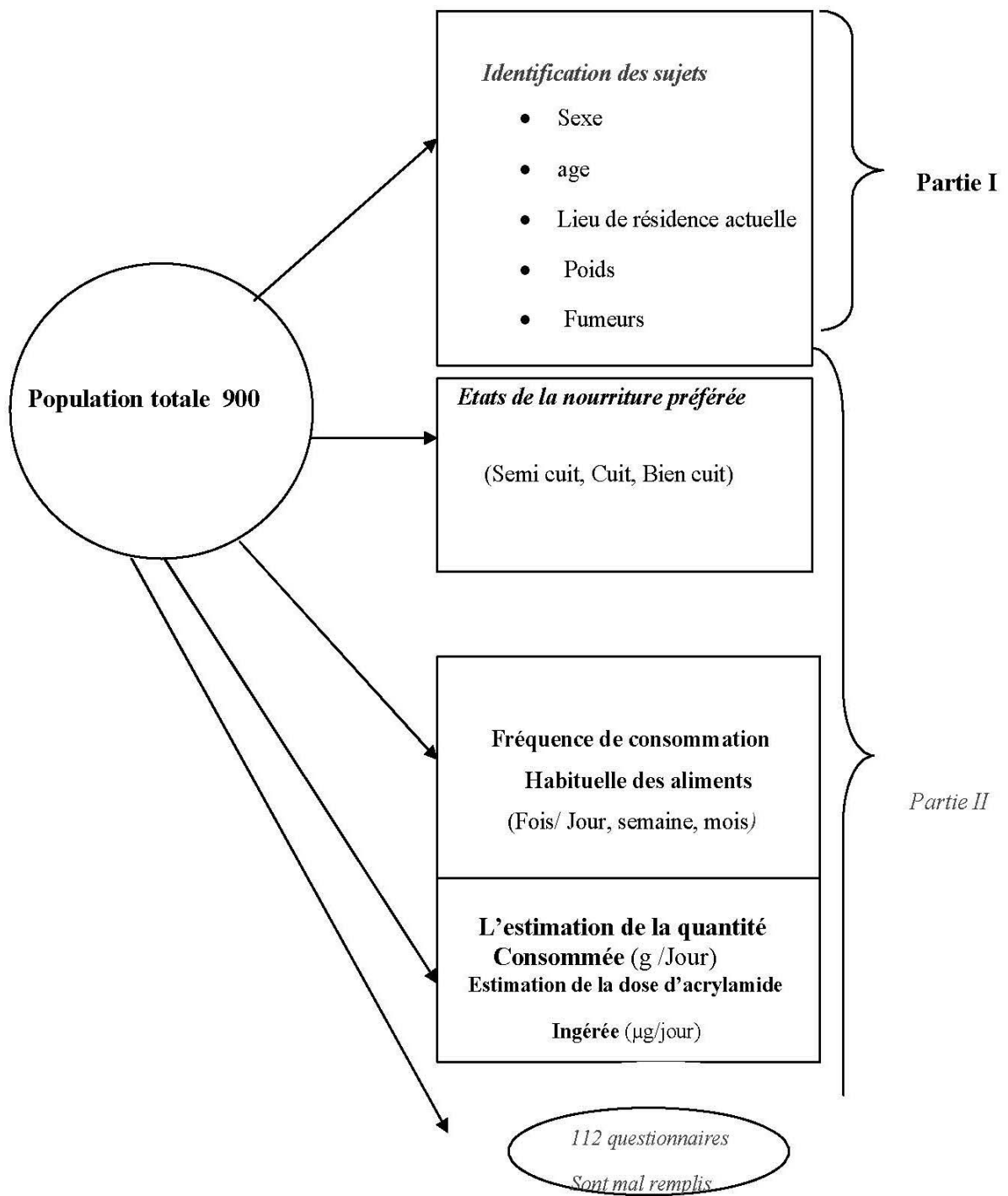


Figure 14 : Protocole de réalisation de l'enquête nutritionnelle

3.2. Évaluation de l'exposition déterministe à l'acrylamide

L'évaluation de l'exposition primaire à l'acrylamide est effectuée selon la méthode canadienne d'évaluation des risques Santé Canada [97] selon laquelle l'exposition à un produit chimique dans les aliments est affectée par (1) la concentration du produit chimique dans les aliments et (2) consommé. Les deux sont nécessaires pour évaluer l'exposition, qui est généralement exprimée en fonction du poids corporel.

Par exemple, l'exposition à l'ACR d'un adulte pesant 60 kg et consommant 24 µg d'ACR par jour selon les aliments et les quantités habituellement ingérées serait de 0,4 µg par kg de poids corporel par jour.

En utilisant les données des réponses dans le journal alimentaire sur la consommation, l'apport alimentaire total en acrylamide et le poids en grammes de chaque aliment consommé ont été calculés. L'exposition a été exprimée en µg / jour / kg poids corporel et évaluée comme suit:

$$\text{Exposition } (\mu\text{g} / \text{jour} / \text{kg pc}) = [\text{quantité de nourriture consommée (g / j)} \times \text{dose d'acrylamide par aliment } (\mu\text{g} / 1000\text{g})] / (\text{poids moyen (kg)}).$$

Il est important de souligner que seule l'exposition moyenne à l'ACR a été calculée. Une valeur moyenne fournit des renseignements au sujet des personnes dont le poids corporel et les habitudes alimentaires se situent dans la moyenne, mais elle ne fournit pas une perspective d'ensemble des taux d'exposition qui peuvent être observés au sein d'une population diversifiée. Selon les habitudes alimentaires, le taux d'exposition de certaines personnes sera plus élevé ou plus faible que le taux moyen d'exposition à l'ACR.

4. Etudes statistiques

Les résultats obtenus sont traités après analyse statistique ANOVA par logiciel Excel 2007 avec mention de la moyenne, écart-type.

*II Effets de l'ACR sur les
paramètres biochimiques
et statut hématologiques
des rats wistar*

1. Matériels

1.1. Matériel biologique

Le matériel biologique que nous avons choisi est le rat *albinos Rattus rattus* de la souche « Wistar », provenant de l'institut Pasteur d'Alger (Centre d'élevages EL-Kouba, Alger IPA).

Le **WISTAR** est une souche non consanguine polyvalente utilisée dans toutes les disciplines de la recherche médicale et biologique. Sa longévité ainsi que sa pathologie tumorale en font un modèle de choix pour les études à long terme, notamment pour les études de vieillissement [98].

Les principaux domaines de recherche et applications sont comme suit : Maladie infectieuse, Métabolisme, Nutrition, Oncologie, Pharmacologie, Physiologie, Tératologie, Toxicologie, Vieillessement (Annexe 3).

1.2. Appareillages et outils

- Balance de précision,
- Centrifugeuse,
- Sonde de gavage
- Bistouris
- Aiguille et Seringue Médical, Micro-perfuseur et tubes prélèvements sanguins
- Principaux automates utilisés dans les analyses sont mentionnés dans le tableau 03.

Tableau 03 : Principaux automates utilisés dans les analyses

| Paramètre | automates utilisés | Origine |
|--|--|----------------|
| Hémogramme : Leucocyte Hématie Hémoglobine Eosinophile Basophiles Lymphocyte Monocyte | (Sysmex XT 4000i) X | Chlef, Algérie |
| Bilan lipidique : Cholestérol Triglycéride | T colorimétrique enzymatique cobas 6000 roche | |
| Glycémie | HK/G6PDH roche cobas6000 | |
| Créatinine | Jaffé cobas 6000 roche | |
| Urée | Uréase GLDH cobas 6000 roche | |
| Ionogramme sanguine : Sodium Potassium Chlore | ISE indirecte | |
| Bilirubine total, conjuguai | Diazo cobas 6000 roche | |
| Enzymologie : Transaminase SGOT UI/L Transaminase SGPT UI/L Phosphatases alcalines UI/L | IFCC cobas 6000 roche | |
| La CRP | Immunoturbidimétrie dosage ultra sensible cobas-roche | |
| L'analyse des protéines sérique (Ig) | électrophorèse capillaire automatisée : Capillarys® - Sebia | Lyon, France |

1.3. Produits et réactifs

- ACR (Sigma Aldrich pureté chimique supérieure 99% pour l'électrophorèse) produit blanc cristallin inodore solide fournis par PROCHIMA-SIGMA Société (Tlemcen, Algérie).
- Régime alimentaire standard (Office National Alimentation Bétails) Alger
- Eau minérale (Nestlé)
- Eau distillée
- Chloroforme
- Hypochlorite de sodium
- Alcool 99%
- Formole 90%

2. Méthodes

Nous avons exposé les rats dans notre étude a des doses d'acrylamide de 5 et 10 mg / L ont été , ces valeurs correspondent aux niveaux élevés d'ACR enregistrés dans les croustilles ($4755 \pm 468 \mu\text{g} / \text{kg}$) et la quantité cumulée dans les groupes d'aliments ($9985 \mu\text{g} / \text{kg}$), respectivement. Les rats ont reçu l'ACR par gavage ou dans de l'eau. Toutefois, nous avons remarqué que la période expérimentale de l'étude était trop longue pour administrer cette substance par gavage ; en raison de la dégénérescence de l'œsophage du rat. A cet effet, nous avons administré l'ACR aux rats via l'eau potable (5 et 10 mg / L) pendant 2 mois et par gavage (DL50) une fois pendant 14 jours. Notant que la solubilité de l'ACR dans l'eau est élevée ($2,16 \text{ g} / \text{mL}$ à 30°C). Les animaux avaient un accès ad-libitum à l'eau et à la nourriture tout au long de l'étude.

2.1. Expérimentation animale

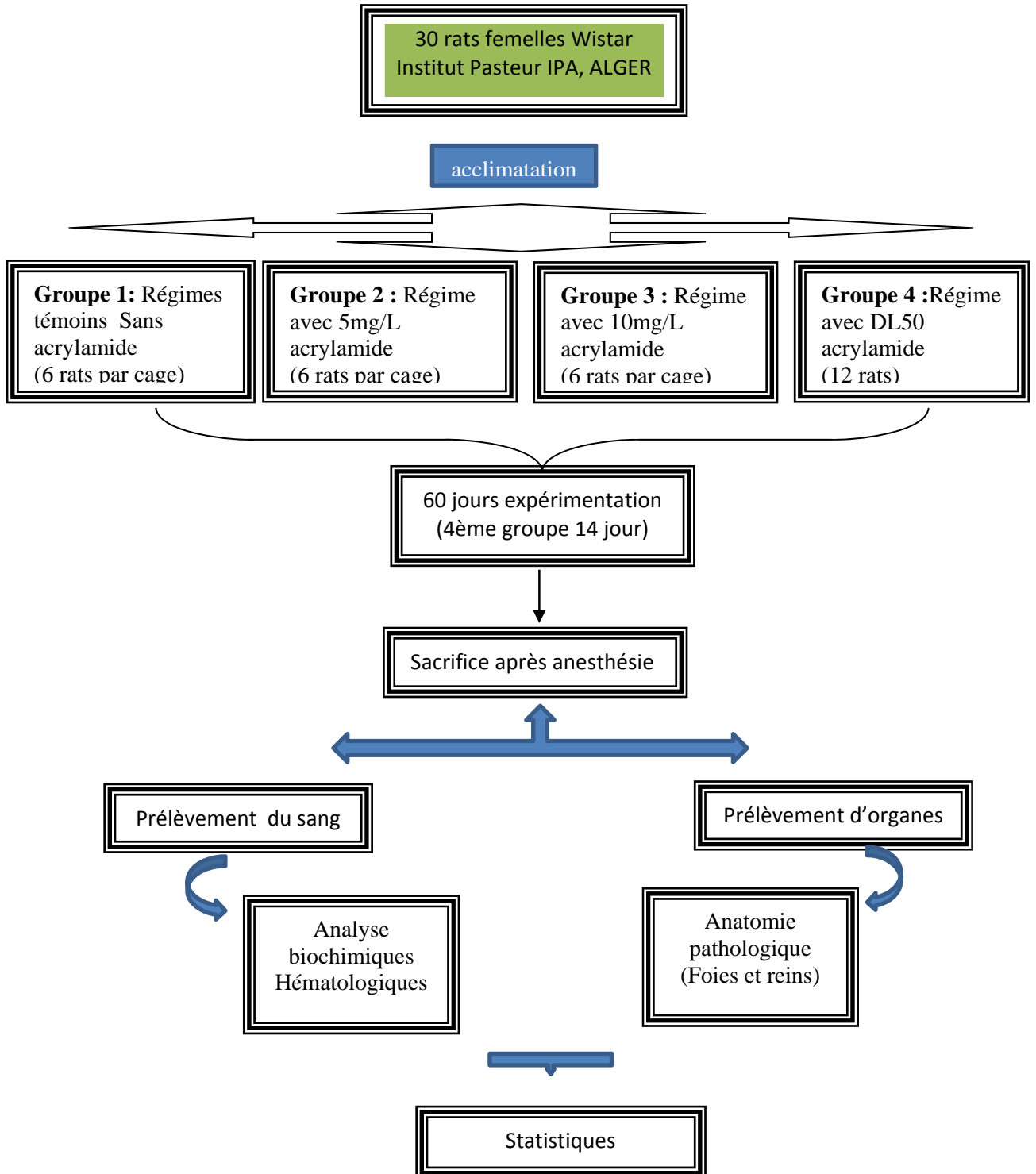
Un total de 30 rats femelles Wistar ont été obtenus de l'Institut Pasteur, Alger (IPA) et logé dans des cages en plastique (06 rats / cage) dans des conditions de laboratoire standard (Figure 15). Après 2 semaines d'acclimatation, les rats ont été divisés en quatre groupes : 03 groupes composés de six rats par cage et 01 groupe composé de 12 rats réparties en deux cages.

La répartition des rats est résumée comme suit :

- **Groupe 1 (témoin)** : durant deux mois, les animaux reçoivent un régime alimentaire standard (Tableau 05) avec de l'eau de boisson minérale (Tableau 06) ;
- **Groupe 2 (5mg)** : durant deux mois, les animaux reçoivent un régime alimentaire standard avec de l'eau de boisson minérale contenant 5 mg/L d'ACR ;
- **Groupe 3 (10mg)** : durant deux mois, les animaux reçoivent un régime alimentaire standard avec de l'eau de boisson minérale contenant 10 mg/L d'ACR ;
- **Groupe 4 (DL50)** : durant deux mois, les animaux reçoivent un régime alimentaire standard avec de l'eau de boisson minérale et une seule dose DL50 ($150 \text{ mg} / \text{kg}$ /poids corporel) par gavage [99] avant 14 jours de la fin de l'expérimentation.

L'alimentation et l'eau sont distribuées et ajustés quotidiennement. La pesée des rats est effectuée chaque semaine.

La période d'acclimatation recommandée est de 2 semaines. Toutefois, cette période peut être prolongée au-delà de cette durée en particulier si les animaux sont inclus dans un protocole très invasif [100].

**Figure 15 :** Protocole expérimentation animale

2.2. Composition du régime

a. Régime alimentaire (ONAB) : le régime utilisé est celui préconisé par l'OANB (tableau 04)

Tableau 04 : Composition de régime rationnelle (OANB) [101].

| Caractéristiques | Composition |
|---------------------------|-------------------|
| Au minimum | |
| Energie digestible | 3000/kg kcal |
| Protéines brutes | 22% |
| ENA | 38% |
| Matières grasse | 3% |
| Calcium | 1% |
| Phosphore | 0.6% |
| Au maximum | |
| Humidité | 14% |
| Cellulose | 4% |
| Matières minérale | 6% |
| Vitamines/100kg | |
| Vit A | 1230000 UI |
| Vit D₃ | 205000 UI |
| Vit B₁ | 150 mg |
| Vit B₂ | 500 mg |
| Vit B₃ | 1000 mg |
| Vit B₆ | 500 mg |
| Vit B₁₂ | 02 mg |
| Vit E | 2000 mg |
| Acide folique | 100 mg |
| Oligo-éléments/100kg | |
| Fer | 7600 mg |
| Cuivre | 760 mg |
| Zinc | 4600 mg |
| Cobalt | 90 mg |
| Sélénium | 03 mg |
| Iode | 98 mg |
| Magnésium | 2500 mg |
| Manganèse | 4600 mg |
| Soufre | 4700 mg |
| Supplémentations | |
| Antibiotique | Flavomycine 2 ppm |
| Acide aminé | DL-Metionine 0.1% |
| Antioxydant | BHT 125 ppm |

b. Eau minérale (Nestlé) : l'eau minérale utilisée est de source Nestlé (tableau 05)**Tableau 05** : Composition de l'eau minérale Nestlé en mg/l.

| | |
|----------------------------|-------------|
| Calcium | 57.9 |
| Magnésium | 16.3 |
| Potassium | 0.5 |
| Sodium | 12 |
| Bicarbonates | 210 |
| Sulfates | 31 |
| Chlorures | 15 |
| Nitrates | 8.0 |
| Nitrites | 0 |
| Silice | 12 |
| Résidus sec à 180°C | 300 |
| pH | 7.6 |

2.3. Prélèvement du sang

A la fin de l'expérience, les rats ont été anesthésiés par le chloroforme (94%). Les échantillons du sang (5 ml / rat en moyenne) ont été recueillis à travers l'aorte abdominale pour réaliser des bilans sanguins [paramètres biochimiques (créatinine, l'urée, la glycémie, etc.); hématologie (leucocytes, Hématies et numération sanguine complète (CBC)); et les protéines sériques (gammaglobuline).] et d'évaluer la fonction rénale et hépatique.

Les prélèvements du sang sont effectués de la manière suivante (Figure 16):

- Placer le rat en décubitus dorsal,
- Vérifier la profondeur de l'anesthésie,
- Ouvrir la cavité abdominale en forme de « V »,
- Déplacer les intestins vers l'extérieur à l'aide d'une pince à disséquer sans griffe,
- Localiser et isoler l'aorte abdominale,
- Utiliser une aiguille 23G ou 25G selon la grosseur du rat,
- Insérer l'aiguille BISEAU VERS LE BAS à la base de l'aorte pour éviter de recevoir du sang au visage dû à la pression sanguine élevée,

- Aussitôt l'aiguille insérée, soutirer le maximum de sang,
- Procéder à une deuxième méthode d'euthanasie et vérifier la mort de l'animal avant de disposer de la carcasse [102].



Figure 16 : Le prélèvement sanguin au niveau d'aorte abdominale.

Le prélèvement au niveau de l'aorte abdominale donne de 5 à 15ml [103], [104][105].

Le sang est collecté dans des tubes (Figure 17) :

- EDTA (Éthylène Diamine Tétra-Acétique) : le tube doit être agité pour éviter la formation de micro caillots. Utilisé pour les dosages d'échantillons de sang total en hématologie, les épreuves d'immunohématologie et la qualification des donneurs de sang.
- Héparinate de Lithium avec gel : prélèvement pour la biochimie, protéines spécifique et ionogramme.
- Secs : les échantillons prélevés sont centrifugés à 3000 tours / 15min, le sérum obtenu est réservé pour le dosage des protéines sériques.

Après le prélèvement sanguin, le foie et les reins sont prélevés soigneusement, pesés et conservés.







| Tube EDTA Bouchon violet | Tube citrate /CTAD («coagulation») Bouchon bleu +/-anneau jaune | Tube hépariné Bouchon vert | Tube sec Bouchon rouge | Tube iodacétate Bouchon gris | Tube VS Bouchon noir |
|---|---|---|---|---|---|
|  |  |  |  |  |  |
| Sang total EDTA / plasma EDTA | Sang total citraté / plasma citraté | Sang total hépariné / plasma hépariné | Sérum | Sang total fluoré / plasma fluoré | Sang total citraté |

Figure 17 : Tubes de prélèvement de sang

2.4. Analyses biologiques

Au moins 10 paramètres de la Biochimie sanguine (Exploration d'une anomalie lipidique, Enzymologie et protéines sériques) et 14 paramètres hématologiques sont exploités par des automates analyseurs utilisés en biologie médicale et clinique.

La gamme d'analyseurs cobas® 6000 (Figure 18) offre des solutions sur mesure aux laboratoires de taille moyenne grâce aux modules combinables de manière flexible pour la chimie clinique (module cobas c 501) et pour l'immunologie (module cobas e 601).



Figure 18 : Analyseurs Cobas® 6000

Le XT-4000i (Figure 19) est véritablement un analyseur d'hématologie exceptionnel. Utilisant la fluoro-cytométrie en flux, l'analyseur détermine non seulement la taille des cellules, mais aussi leur teneur en ARN/ADN (La pureté d'un échantillon ARN ou ADN est définie par les valeurs de ratio 260/230 et 260/280) et leur complexité interne en vue de délivrer des résultats.



Figure 19 : Analyseurs XT-4000i

L'électrophorèse capillaire est réalisée sur l'appareil Minicap de SEBIA (figure 20). Le Capillarys® est un analyseur dont le principe est l'électrophorèse capillaire de zone en veine liquide.

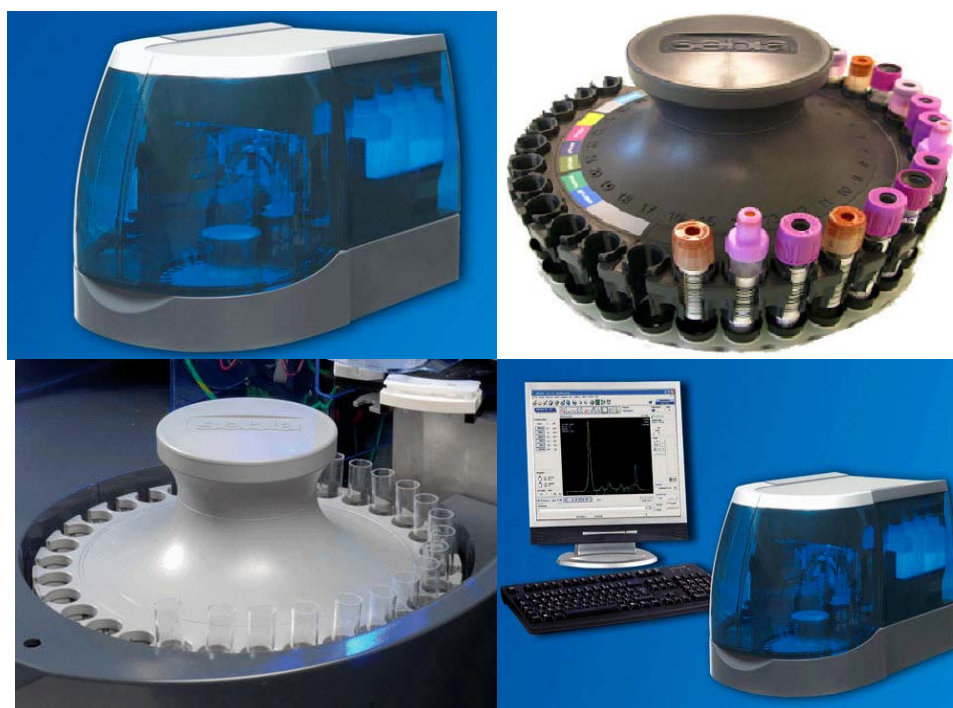


Figure 20 : Minicap de SEBIA.

Les réactifs utilisés sont :

- Capiclean (PN 2251)
- Tampon CAPILLARYS/MINICAP PROTEIN(E) 6
- Solution de lavage CAPILLARYS
- Sérum de contrôle normal et Sérum de contrôle hypergamma
- Eau de javel et Eau distillée.

2.5. Analyse statistique

Après prélèvement et dosage, Les données ont été traitées par une analyse ANOVA (moyenne, l'écart-type et la signification statistique P et L'analyse en composantes principales (ACP) en utilisant le logiciel IBM SPSS

2.6. Etude anatomopathologique des reins et foie des rats

Les coupes histologiques sont réalisées au niveau du laboratoire d'anatomie pathologique Vetopath. Les tissus sont déshydratés à l'imprégnateur Miles Scientific VIP 200 avec imprégnation en paraffine (Figure 21).

2.6.1. Découpage

Les prélèvements du bloc hépatique et des reins des Rats Wistar femelles, fixés dans le formol, à 10%, sont recoupés au laboratoire selon une coupe sagittale des deux lobes hépatiques principaux et d'une coupe sagittale ou transversale du rein passant par le bassin.

Les sections ainsi obtenues sont mises en cassettes identifiées au N° correspondant au groupe de l'animal (groupes A (Témoin), B (5mg/L), C (10mg/L), D (DI50) et lames 1 à 6 pour les foies, 7 & 8 pour les reins).

- groupe A : régime témoin sans ACR (6 Foies et 10 reins) N°1 7/02/0076 - lames A 1 à 8,
- groupe B : régime à 5mg ACR (6 Foies et 12 reins) N°1 7/02/0077 - lames B- 1 à 8,
- groupe C régime à 10mg ACR (6 Foies et 10 reins) N°17/02/0078 - lames C- 1 à 8,
- groupe D administration unique dl50 ACR à 14 jours (6 Foies et 8 reins) N°17/02/0079 - lames D- 1 à 8.

Les tissus sont déshydratés à l'imprégnateur Miles Scientific VIP 200 avec imprégnation en paraffine associée à des résines synthétiques après passage en Xylène ; puis les blocs sont coulés dans la paraffine sur console Myr EC 350-1 et coupés à 4-5 microns sur microtome Microm HM 315.

2.6.2. Coloration

Après étalement au bain-marie, identification sur lame et séchage, les coupes sont colorées à l'HES par l'automate Shandon Carrousel Varistain 24-4 ; puis nous procédons à un montage des lames manuel en milieu de montage Eukitt pour la lecture après séchage sur microscope Olympus BH T.

Les observations histologiques sont faites en aveugle avant connaissance des traitements attribués aux groupes d'étude. Elles sont rapportées individuellement sur une fiche de compte-rendu histologique informatisée par groupe {A - 17 /02/0076, B - 17 /02/0077, C -17 /02/0078 et D - 17 /02/0079).



Figure 21: Appareils pour l'étude d'anatomie pathologique

*3ème partie : Résultats et
discussion*

*I Dosage de l'ACR dans quelques
produits alimentaires et évaluation
de l'exposition*

1. Structure de la dépense de consommation alimentaire

Les résultats de l'enquête alimentaire, via le site Monenquete, sur les aliments les plus consommés en Algérie sont mentionnés dans le tableau 06.

Tableau 06 : Répartition des Aliments les plus consommés en Algérie

| Aliments | N / 80 | % |
|----------------------------|--------|-------|
| Pomme de terre | 61 | 76.25 |
| pain | 57 | 71.25 |
| couscous | 56 | 70.00 |
| Repas préparés à la maison | 49 | 61.25 |
| laits | 45 | 56.25 |
| œufs | 42 | 52.50 |
| Boissons gazeuses | 37 | 46.25 |
| lentille | 37 | 46.25 |
| Haricot | 32 | 40.00 |
| Fruits | 30 | 37.50 |
| Riz | 30 | 37.50 |
| Légumes | 28 | 35.00 |
| Salade | 26 | 32.50 |
| Poissons | 25 | 31.25 |
| Eau | 24 | 30.00 |
| Pois chiche | 24 | 30.00 |
| Viandes | 21 | 26.25 |
| Fabacées | 21 | 26.25 |
| Biscuits | 17 | 21.25 |
| Makroud | 15 | 18.75 |
| Merguez - saucisse | 13 | 16.25 |
| Chawarma | 12 | 15.00 |
| Divers | 11 | 13.75 |
| Cacher & Pâté | 10 | 12.50 |
| Boissons | 9 | 11.25 |
| Aliments cuits | 9 | 11.25 |
| Chips | 7 | 8.75 |
| Aliments stérilisés | 7 | 8.75 |

D'après les résultats de l'enquête, la consommation des aliments est répartit et classée dans l'ordre suivant : les légumes avec 41,6% (plus de 70% pomme de terre), les céréales avec 34,5% (plus de 70% pain), les viandes avec 20,3% .

D'après l'enquête de l'ONS (2011) sur les dépenses de la consommation alimentaire, avec un échantillon représentatif de 12150 ménages algériens, les produits céréaliers occupent la première place avec 17,5% de la dépense alimentaire totale, la semoule et le pain constituent à eux deux plus de 50% de la dépense de ce sous-groupe. La farine, les gâteaux et viennoiseries affichent une dépense mensuelle par ménage de près de 25% de la dépense en produits céréaliers [106].

La consommation de pain a nettement augmentée en Algérie, précisant que, d'après les statistiques du FAO, l'Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, en collaboration avec la Fédération mondiale des boulangers, les algériens consomment 48 600 000 de pains chaque jour, occupant de ce fait, le premier rang des consommateurs de pain dans le monde [107] [106].

Les légumes frais représentent 13,4% et la viande rouge 13,3% des dépenses. D'après les données de l'ONS, près de 25% des légumes et fruits frais est destinée à l'achat de pommes de terre et 11,2 % à la tomates [106].

Une enquête menée sur les ménages algériens fait ressortir que la catégorie de produits « lait et produits laitiers » occupe la 4ème position avec 7,5% du total des dépenses de ces ménages, après les céréales (24,6%), viande rouge (18,4%) et légumes et fruits frais (13,7%) [108][109][110].

Les produits laitiers et la viande blanche viennent en 3ème position avec 8,4% et 8,3%, respectivement. La viande de mouton constitue près de 45% de cette dépense, au niveau national, suivi de la viande blanche avec 36,1%. La viande de bœuf ne représente que 12% du budget alloué aux différents types de viandes [106][111].

En effet, l'Algérie est considérée comme un pays grand consommateur de lait et dérivés, et cela est dû aux traditions alimentaires, à la valeur nutritive du lait, à sa substitution aux viandes relativement chères et le soutien de l'état, qui sont autant de paramètres qui ont dopé la demande [108][112].

2. Dosage de l'ACR dans les aliments

Le plan d'échantillonnage des produits alimentaires analysés est mentionné dans le tableau 07.

Tableau 7 : Caractéristiques des échantillons et plan d'échantillonnage

| Nature d'échantillons | | Ingrédient | Origine | Remarque |
|-------------------------|---------------------------------|--|---|--|
| Chips | Ech1 LYNX | Semoule de maïs; huile végétale ; arôme naturel gout cacahuète ; sel | Produit en Algérie SARL CHIPALGI Groupe 135 classe 02 Bouaguab Boufarik W Blida Algérie | P 16/08/15 E 16/02/16 LOTA051 Barre code 6130868000097 |
| | Ech2 MAHBOUL | Pomme de Terre naturelle ; huile végétale ; arôme paprika ; sel. | Produit en Algérie par SPA SNAX ; Zone industrielle baba Ali W Alger Algérie | E 05/03/16 LOT248W1 Barre code 6130336001984 |
| Croute de pain | Ech3 traditionnel | Farine; sel, eau; levure de bière | | |
| | Ech4 industriel | Farine ; sel, eau ; levure de bière ;additifs | Boulangerie de W CHLEF Algérie | |
| | Ech5 pain chocolat | Farine ; sel ; chocolat ; beurre ; additif | Produit en Algérie Boulangerie W Mostaganem Algérie | E 09/10/15 F 11/10/15 LOT5 Barre code 6130252000001 |
| Café en poudre | Ech6 NIZIERE | Café 100% ARABICA | Produit en Algérie SARL NIZIERE ;reghaia W Alger Algérie | F 02/05/15 E 01/05/17 LOT 0002 Barre code 6130443000184 |
| | Ech7 TOREFACTO | Café 100% ROBUSTA | Produit en Algérie SARL Dahra Industrie ; Yellel W Relizane Algérie | F 12/09/15 E 12/09/16 LOT E-0060 Barre code 6130368000160 |
| | Ech8 MANY | 50% ARABICA 50% ROBUSTA | Produit en Algérie EURL CAFTEG ; zone activité Hassi ben Okba 26 W Oran Algérie | F 28/07/15 E 28/07/17 LOT003 Barre code 6133566000017 |
| couscous | Ech9 AMOR-BENAMOR | Semoule de blé dur de qualité supérieure | Produit en Algérie La société moulins Amor Ben Amor ; El fedjouj W Guelma Algérie | F 21/09/15 EX 21/09/17 LOT L5.1.264 Barre code 6130837000233 |
| Pate alimentaire | Ech10 PATES BENHAMA DI EXTRA | Semoule de blé dur de qualité Extra | Produit en Algérie SARL GIPATES ;zone industrielle W B.B ARRERIDJ Algérie | F 26/03/15 E 25/03/17 LOT 152603 Barre code 6132500630204 |
| Frite de pomme de terre | Ech11 Frite var1 | Pomme de terre désirée | Region W CHLEF Algérie | |
| | Ech12 Frite var2 | Pomme de terre Spunta | Region W CHLEF Algérie | |
| L'œuf cuit | Ech13 VIAVI | Œufs frais ; huile végétale | Produit en Algérie Corso W Boumerdes Algérie | F 28/09/15 E 28/10/15 |

| | | | | Barre code 6133053000032 |
|------------------|-----------------------------------|--|---|---|
| croute de poulet | Ech14 | <i>Partie grée d'une poulie rôti</i> | Restaurations W CHLEF Algérie | |
| consERVE tomate | Ech15 ZAHRA TOMATO PASTE | Tomate ; sel (Residues sec 28%) | Produit en Algérie conserverie Amor Ben amor ; Bouati Mahmoud W Guelma Algérie | F 09/03/15 E09/03/17 LOT LR2C3/44218 Barre code 6130384000359 |
| Lait stérilisé | Ech16 CANDIA | Eau; poudre de lait écrémé; matière grasse laitière | Produit en Algérie TCHIN LAIT sous License Candia ; 12 Bir Slam-W Bejaïa Algérie | E 04/12/15 H_17136 373872 Barre code 6130433000026 |
| | Ech17 SOUMMAM | Eau ; poudre de lait entier & écrémé. | Produit en Algérie Laiterie SOUMMAM Z-A-C.TAHARACHT-AKBOU W Bejaia Algérie | F 07/10/15 E 05/01/16 LOT S280 Barre code 6130760003936 |
| biscuit | Ech18 MAJOR | Farine de blé; sucre; graisses végétales (palme -oprah); cacao en poudre; sirop de sucre; sirop de glucose; agents de levée (bicarbonate d'ammonium et de sodium-pyrophosphate acide de sodium); lactosérum; lait en poudre; extrait de malt; sel; émulsifiant (lécithine de soja E322); arômes identiques nature (vanille-chocolat) | Produit en Algérie LU ALGERIE SPA. Zone industrielle Rouïba-reghaia RN5 W Alger Algérie | F 23/06/15 E 21/06/16 ORG0452632 Barre code 6132011100494 |
| | Ech19 BIMO | Farine; sucre; matière graisses végétales; poudre de lait; poudre de lactosérum; dextrose; extrait de malt; poudre à lever (SIN503-SIN500); sel; SIN405; SIN322; arômes N | Produit en Algérie Biscuiterie BIMO ; route briqueterie 06A BABA Ali Bertoua W Alger Algérie | F 31/05/15 E 30/05/16 LOT22 Barre code 6130015060035 |
| | Ech20 TOUMI MADELEINE | Farine de blé; œufs frais; sucre; huile végétale; levure chimique; SIN202; arôme. | Produit en Algérie Biscuiterie & produits de régime junior toumi ; EL harria 02 part 161, Alger Algérie | F 28/09/15 E 27/12/20 Barre code 6133655000010 |
| Boissons | Ech21 OJU | Eau; sucre; concentré et pulpe de jus d'orange; arôme; cellule d'orange; additif alimentaire; citrate; ascorbate; antioxydant | Produit en Algérie SPA hamoud boualem SARL SUN LOT 331 N°24 Sétif, Algérie | F 20/09/15 E 20/03/16 LOT 02 Barre code 6130695112222 |
| thon | Ech22 MARATUN | Thon entier; huile végétale; sel. | Produit en Algérie SARL HAAL Hispano Algérienne de l'alimentation ; Z.I Hassi Ameer W Oran Algérie | F 01/10/15 E 01/10/20 LOT 3-LTH1274 Barre code 6130504000894 |
| SARDINE | Ech23 ALBA | Sardine; huile végétale; sel | Produit en Algérie SARL HAAL Hispano Algérienne de l'alimentation ; Z.I Hassi Ameer W Oran Algérie | F 04/03/15 E 04/03/20 -3-LSHO63 Barre code 6130504000443 |
| viande | Ech24 | Viande de bœuf congelée | Produit en Algérie | F 27/05/15 |

| | | | | |
|-------------------------|---------------------------------|--|--|---|
| hachée | BELLAT CORNE D BEFF | hachée; 0.6% de nitrite de sodium; carraghénane-BP ; 2g/kg Di-Tri et poly phosphate de sodium. | SARL conserverie de viande d'Algérie ; RN 08 Eucalyptus W Alger Algérie | E 26/05/17 LOT P01 Barre code 6130586001888 |
| purée de pomme de terre | Ech25 VARIO | 99% pomme de terre; mono stéarate de glycérol; anti oxygène; ascorbate; désulfite de sodium; di phosphate de sodium; arôme; épice. | Produit en Algérie EURL VARIO ; cité Casnaf N514 Gué de Constantine, Alger Algérie | F 01/03/15 E01/0317 LOT8209 Barre code 6133766000015 |
| Nature d'échantillons | | Ingrédient | Origine | Remarque |
| chips | Ech26 MASTER | Pomme de Terre naturelle déshydratée; huile végétale; arôme fruit de mer | Produit en Algérie par EURL MABA SNACK ; RN 63 Elrahmania W Alger Algérie | F 09/01/16 LOT Barre code 6133079000238 |
| Croute de pain | Ech27 industriel amélioré | Farine ; sel, eau ; levure de bière ; additifs | Boulangerie de W Chlef Algérie | JAN2016 |
| thé | Ech28 KHAIMA | Thé déshydraté | Produit en Algérie SARL KOFT N 23 mouradia W Alger Algérie | F 09/2014 E 09/2019 LOT TL1314 Barre code 6131058000026 |
| Pomme de terre frite | Ech 19 Frite | Pomme de terre de restauration Rapide | Region W Chlef Algérie | JANV2016 |
| poly électrolyte | Ech30 | poly électrolyte | Traitement des eaux en Algérie | |
| Tabac | Ech31 ASSILA | Tabac ,eau ,fleur de chaus ,kieselguhr | ETS B.K zone industrielle N2 senia N45601 W Oran Algérie | F03/12/15 E03/06/16 LOT003 Barre code 61306011 |
| Gaufrette | Ech32 BIMO | sucre; graisse végétale; farine, cacao ; amidon ; poudre de lait;dextrose ; SIN322 ; arômes NI | Produit en Algérie Biscuiterie BIMO ; route briqueterie 06A BABA Ali Bertoua W Alger Algérie | F 27/09/15 E 26/09/16 LOT270 Barre code 6130014300224 |
| Boissons | Ech33 RAMY | Eau ; sucre ; concentré et pulpe de jus orange ; arôme ; cellule orange ; additif alimentaire ; Vitamine | Produit en Algérie TAIBA FOOD COMPANY zone industrielle rouiba w Alger Algérie | F 17/03/15 E 17/03/16 LOT 602 Barre code 6134091000015 |
| Biscuit au chocolat | Ech34 BRINO | Farine de blé ; sucre ; graisse végétale ; sel, arôme, additifs | Produit en Algérie SOALTUBI zone industrielle didouche morad W Constantine Algérie | F 13/12/15 E 13/03/16 LOT 39 Barre code 6132501540403 |
| Chocolat | Ech35 ambassador | Sucre, masse de cacao ; beurre de cacao ; additif ; arôme | Produit en Algérie Biscuiterie BIMO ; route briqueterie 06A BABA Ali Bertoua, Alger, Algérie | F 26/12/15 LOT 52C Barre code 6130014080119 |

L'analyse de l'acrylamide dans les produits de la pomme de terre a révélé une concentration très élevée en copeaux de $4755 \pm 468 \mu\text{g} / \text{kg}$ et de $636 \pm 70,4 \mu\text{g} / \text{kg}$ dans les pommes de terre frites (Tableau 08). Les valeurs de l'acrylamide dans les produits céréaliers ont été détectées dans la plupart des échantillons à l'exception des pâtes ayant une valeur de $666 \pm 9,6 \mu\text{g} / \text{kg}$ dans les biscuits.

Le pain (ou gâteau) est la céréale consommée régulièrement contient une dose d'acrylamide inférieure à celle des biscuits, elle est de $93 \pm 2,0 \mu\text{g} / \text{kg}$. Nous avons, également, détecté de l'acrylamide dans les échantillons de café et de chocolats.

Selon la FAO / OMS, les pommes de terre frites font partie des aliments ayant la plus forte concentration d'acrylamide (Joint *et al.*, 2006) ; mais avec des concentrations moyennes moins élevées que celles des chips de pomme de terre. Les chips de pomme de terre apparaissent comme la catégorie d'aliments contenant le plus d'ACR avec une valeur moyenne de $2656,5 \mu\text{g}/\text{kg}$. Cependant le pain traditionnel montre une teneur en ACR la plus faible, soit une valeur moyenne de $18 \mu\text{g}/\text{kg}$ [8].

Les concentrations moyennes en ACR des biscuits, gaufrettes, chocolat sont remarquables avec des moyennes de $297,75 \mu\text{g}/\text{kg}$, $259 \mu\text{g}/\text{kg}$ et de $220 \mu\text{g}/\text{kg}$, respectivement. Le café et le pain industriel montrent des teneurs faibles de $167,33 \mu\text{g}/\text{kg}$ et de $59,77 \mu\text{g}/\text{kg}$, respectivement. Pour toutes les catégories d'aliments, les niveaux d'ACR varient considérablement à l'intérieur d'une même catégorie et à l'intérieur du lot d'un même produit.

Ces valeurs sont en parfaite concordance avec celles trouvées dans l'étude réalisées par les chercheurs de Santé Canada sur l'ACR [68], [113] et celle réalisée en 2003 par Becalski *et al.* Ces derniers ont mis au point une méthode analytique pour étudier le processus de formation de l'ACR. Ils ont également vérifié les concentrations de ce composé dans des aliments (pains, céréales, pommes de terre frites et croustilles de pommes de terre) achetés à Ottawa [114]. Pour les différentes classes d'aliments les concentrations variaient : pommes de terre frites : 200 à 1 900 $\mu\text{g}/\text{g}$, céréales : 100 à 170 $\mu\text{g}/\text{g}$, pains : 14 à 290 $\mu\text{g}/\text{g}$ et autres (café, amandes, graines) : 25 à 260 $\mu\text{g}/\text{g}$.

Tableau 08 : Concentrations d'ACR (μg d'ACR/Kg d'aliment) mesurées par CL-ESI-SM/SM

| Groupe aliments | Moyenne $\mu\text{g}/\text{Kg}$ | Ecart type |
|---|---------------------------------|------------|
| Pomme de terre et dérivée (n=6) | 1385,60 | 1753,93 |
| Chips de pomme de terre | 4755,00 | 468,00 |
| Frite Pomme de terre désirée | 636,00 | 70,00 |
| Frite de Pomme de terre | 491,00 | 7,00 |
| Chips de pomme de terre | 558,00 | 2,00 |
| Purée de pomme de terre | | |
| Céréales et produits céréaliers (n=12) | 168,13 | 187,65 |
| Chips de maïs | 106,00 | 4,00 |
| Pain traditionnel | 18,00 | 0,00 |
| Pain industriel | 93,00 | 2,00 |
| Pain chocolat | 16,33 | 1,53 |
| Biscuit cacao en poudre | 172,00 | 5,00 |
| Biscuit poudre de lait | 235,00 | 3,00 |
| Pate alimentaire | <LOQ | |
| Couscous | | |
| Biscuit aux œufs | 46,00 | 3,00 |
| Pain industriel amélioré | 70,00 | 2,00 |
| Biscuit au chocolat d'enfant | 666,00 | 10,00 |
| Gaufrette | 259,00 | 6,00 |
| Poisson, viande, poulet et œufs (n=5) | | |
| Thon et Sardine | < LOQ | |
| Viande haché corned beff , Poulet rôti | < LOQ | |
| Œufs cuit | < LOQ | |
| lait et Boissons (n=4) | < LOQ | |
| Lait entier UHT | < LOQ | |
| Jus pasteurisé aux fruits | < LOQ | |
| Lait écrémé UHT | < LOQ | |
| Stimulants et analogues (n=6) | 182,75 | 41,14 |
| Café Arabica | 172,00 | 3,00 |
| Café Robusta | 125,00 | 7,00 |
| Café Arabica & Robusta | 205,00 | 11,00 |
| Tabac | <LOQ | 0,00 |
| Thé | <LOQ | 0,00 |
| Chocolat | 229,00 | 2,00 |
| Divers | <LOQ | 0,00 |
| Purée de tomate | <LOQ | 0,00 |
| TOTAL (moyenne) | 9985 | 526 |

LOQ : The *limit of quantitation* : $15\mu\text{g}/\text{kg}$

2.1. Pomme de terre et dérivés

L'analyse de l'ACR dans les produits à base de pomme de terre (FAO/OMS, 2005) a révélé des valeurs très élevées dans les chips avec $4755 \pm 468 \mu\text{g}/\text{kg}$ et les frites de pomme de terre avec $636 \pm 70.4 \mu\text{g}/\text{kg}$. Les pommes de terres frites et en croustilles sont parmi les aliments ayant les plus grandes concentrations d'ACR [115][116] [55].

Le contenu en sucres (glucose et fructose) des pommes de terre crues est corrélé avec la quantité d'ACR formé durant la cuisson des aliments [117][118]. Tandis que la purée de pomme de terre ne contient pas d'ACR. Les facteurs liés à la formation d'ACR ont surtout été identifiés dans les aliments à base de pommes de terre et de céréales. Dans les aliments à base de pommes de terre, la teneur en sucres réducteurs est un facteur important de la formation d'ACR, le taux d'asparagine ayant moins d'importance.

Un certain nombre de facteurs affectent la teneur en sucres dans la pomme de terre, comme la variété, la température du milieu de culture, la teneur en humidité des sols et les conditions d'entreposage [118]. Dans les aliments à base de céréales, le taux inhérent des sucres réducteurs est plus bas et varie moins que dans la pomme de terre [119].

2.2. Céréales, et produits céréaliers

Des valeurs l'ACR dans les produits céréaliers sont détectées dans la plupart des échantillons sauf pour les pâtes. Les biscuits riches avec $666 \pm 9.6 \mu\text{g}/\text{kg}$; alors que le pain (ou galette), céréale faisant partie de la consommation habituelle, n'en contient que $93 \pm 2.0 \mu\text{g}/\text{kg}$.

Les études de Santé Canada sur les aliments susceptibles de contenir de l'ACR révèlent que la teneur varie considérablement d'un produit à un autre, qu'il s'agisse de croustilles de pommes de terre, de frites, de biscuits, de céréales, du pain ou de tout autre aliment soumis à une température élevée comme le café, les amandes grillées et les succédanés de café à base de céréales. Parmi les aliments analysés par Santé Canada, ce sont les croustilles de pommes de terre et les pommes de terre frites qui contiennent le plus d'ACR, tandis que le pain et les céréales en contiennent moins. Puisque la température atteinte pendant l'ébullition n'est pas suffisamment élevée pour provoquer la formation d'ACR, ce dernier n'a pas été détecté dans les pommes de terre bouillies [79][120][121].

2.3. Viandes, poissons, œufs et charcuteries

Aucune valeur d'ACR n'a été enregistrée dans la catégorie des viandes et charcuterie. L'ACR serait surtout détecté dans les aliments riches en amidon (l'amidon ne réagit pas facilement avec d'autres substances et ne contribuerait donc pas non plus à la dégradation de l'ACR) et dans une bien moindre mesure dans les produits de viande[80] [122]. D'autres aliments qui subissent le traitement semblable peuvent également contenir l'ACR. Cependant, aucune donnée n'était disponible pour beaucoup de denrées, telles que la viande[123] [53].

L'ACR n'est retrouvé qu'en faible quantité dans les fruits ou les légumes bouillis ou crus avec des concentrations inférieures à 30 pg/kg. Parmi les aliments ne contenant pas d'ACR ou ayant un taux d'ACR inférieur à la limite de quantification (LOQ), figurent les aliments pour enfants aux fruits ou aux céréales, le caramel, le poulet cru ou cuit, le poisson cru ou cuit, les pommes de terres crues, les légumes surgelés, la sauce au soja, le jus de viande ou la gélatine[124][56] [21].

2.4. Lait et boissons

L'analyse de lait (UHT) et boissons pasteurisé ne révèle aucune présence d'ACR ce qui exclut en plus la notion de contamination non alimentaire (voir section).

En ce qui a trait à l'alimentation humaine, l'OMS a publié une valeur guide dans l'eau potable de 0,5 µg/L. Comme les concentrations d'ACR retrouvées en Suède et dans d'autres pays se situent à des taux moyens autour de 300 µg/kg pour les frites et de 1 300 µg/kg pour les chips, il est évident que l'apport par ingestion de ces aliments représente plusieurs dizaines, voire des centaines de fois la quantité journalière maximale qui pourrait être apportée par une eau de boisson respectant cette limite de l'OMS [125].

2.5. Stimulants et analogues

Des valeurs d'ACR sont détectées dans un échantillon de café et de chocolat avec 205 ± 11.0 et 229 ± 2.4 µg / g respectivement. Le thé noir et le thé pure ne contiennent pas des quantité détectable d'ACR (< 9 µg/g) [126]. Andrzejewski et *al.* (2004) ont rapporté des niveaux moyens d'ACR allant de 45 µg/g à 374 µg/g dans 31 échantillons de café [127].

3. Evaluation de l'exposition en fonction de la fréquence de consommation

Parmi les 788 personnes qui ont fait l'objet de cette étude figurent 371 femmes (soit 47,08 %) et 417 hommes (soit 52,92%).

L'âge moyen était de $22,2 \pm 9,68$ ans, avec $21,3 \pm 8,22$ ans pour les femmes et $23,0 \pm 10,76$ ans pour les hommes. Le poids moyen était de $58,5 \pm 15,54$ kg, avec $61,7 \pm 16,71$ kg pour les femmes et $55,0 \pm 13,29$ kg pour les hommes.

La fréquence de consommation et l'exposition à l'acrylamide dans quelques aliments en Algérie sont reportées dans le Tableau 9.

Tableau 09 : Exposition et fréquence de consommation alimentaires par groupes d'aliments

| Groupes | Aliments | Fois /jour | Expo ($\mu\text{g}/\text{jour}/\text{poids}$) |
|---------------------------------|---------------------------|-----------------|---|
| Pomme de terre et dérivée | Chips (pomme de terre) | $0,24 \pm 0,57$ | $0,03 \pm 0,11$ |
| | Pommes de terre frites | $0,45 \pm 0,39$ | $0,65 \pm 1,90$ |
| | pommes de terre bouillies | $0,31 \pm 0,43$ | 0 |
| | purée de pomme de terre | $0,08 \pm 0,15$ | 0 |
| Céréales et produits céréaliers | Chips de maïs | $0,15 \pm 0,44$ | $0,00 \pm 0,01$ |
| | Biscuits | $0,70 \pm 2,11$ | $0,23 \pm 0,52$ |
| | Pain traditionnel | $0,91 \pm 0,82$ | $0,07 \pm 0,09$ |
| | Pain industriel | $0,99 \pm 1,72$ | $0,12 \pm 0,18$ |
| | Pâtes alimentaires | $0,27 \pm 0,36$ | 0 |
| | Couscous | $0,18 \pm 0,15$ | 0 |
| | Gaufrette | $0,28 \pm 0,42$ | $0,06 \pm 0,19$ |
| Stimulants et analogues | Café | $1,02 \pm 1,15$ | $0,15 \pm 0,27$ |
| | Chocolat | $0,37 \pm 0,60$ | $0,10 \pm 0,70$ |
| | Thé | $0,38 \pm 2,11$ | 0 |
| Lait et boissons | Boissons gazeuse | $0,74 \pm 1,66$ | 0 |
| | Jus de boissons | $0,62 \pm 1,22$ | 0 |
| | Lait UHT | $0,63 \pm 2,14$ | 0 |
| Fruit et légumes | Fruit | $0,16 \pm 0,24$ | 0 |
| | Légumes (y frits) | $0,63 \pm 2,11$ | 0 |
| | Tomate en conserve | $0,81 \pm 2,12$ | 0 |
| Poisson, Viande, poulet et œufs | Thon | $0,19 \pm 1,02$ | 0 |
| | Sardine | $0,10 \pm 0,20$ | 0 |
| | Viande hachée | $0,17 \pm 0,45$ | 0 |
| | croute de poulet | $0,31 \pm 0,36$ | 0 |
| | Œuf cuit | $0,60 \pm 1,18$ | 0 |
| Total /jour | | 11,3 | 1,32 |
| Moyenne /jour | | $0,43 \pm 0,29$ | $0,19 \pm 0,21$ |

La fréquence habituelle de consommation d'aliments et l'exposition à l'acrylamide ont été estimées en nombre de fois par jour (fois/ jour) et en μg d'acrylamide par jour par poids corporel ($\mu\text{g} / \text{kg pc} / \text{jour}$) pendant lesquels les aliments en question ont été consommés. L'ingestion est calculée suite après évaluation quantitative en fonction de la fréquence de consommation (Tableau 10)

Tableau 10 : La quantité consommée par jour par groupes d'aliments

| Groupe aliment | Fréquence de consommation | Quantité (g) |
|--------------------------------|---------------------------|--------------|
| Pomme de terre et dérivée | Une fois par jour | 32 |
| céréales céréaliers | | 50,40 |
| Stimulants et analogues | | 26,77 |
| Lait et boissons | | 79,14 |
| Fruit et légume | | 32,29 |
| Poisson, viande, poulet et œuf | | 23,85 |

Les pommes de terre et leurs dérivés sont les plus exposés à l'acrylamide ($0,34 \mu\text{g} / \text{kg pc} / \text{jour}$) avec une faible fréquence de consommation ($0,27 \text{ fois} / \text{jour}$). Dans le même groupe, nous avons constaté que les frites de pommes de terre présentaient l'exposition la plus élevée ($0,65-2,55 \mu\text{g} / \text{kg pc} / \text{jour}$) avec une fréquence de consommation moyenne de $0,45$ et un maximum de $0,84 \text{ fois} / \text{jour}$. (Figure 22)

La teneur en sucre (glucose et fructose) des pommes de terre crues est corrélée avec la quantité d'acrylamide formée pendant la cuisson. La teneur en sucres réducteurs est un facteur important dans la formation de l'acrylamide, tandis que la teneur en asparagine est moins importante [120].

Les stimulants et analogues ont une fréquence de consommation de $0,59 \text{ fois} / \text{jour}$ avec une exposition qui peut atteindre $0,13 \mu\text{g} / \text{kg pc} / \text{jour}$ après les pommes de terre et leurs dérivés. L'aliment le plus exposant à l'acrylamide dans ce groupe été le café ($0,15-0,42 \mu\text{g} / \text{kg pc} / \text{jour}$) avec une fréquence de consommation de $1,02$ à $2,17 \text{ fois}$ par jour.

Cette teneur peut être expliquée par les recherches indiquant que l'asparagine est probablement le principal déterminant de la présence d'acrylamide dans le café et les chocolats[77][128][127].

Les céréales et les produits céréaliers sont consommés régulièrement par tous les sujets interrogés avec une moyenne de 0,50 fois par jour et une exposition de 0,12 $\mu\text{g} / \text{kg pc} / \text{jour}$. Ainsi, dans cette catégorie, les biscuits et le pain industriel ont été les plus consommés ($0,70 \pm 2,11$ et $0,99 \pm 1,72$ fois par jour) avec une exposition de $0,23 \pm 0,52$ et $0,12 \pm 0,18 \mu\text{g} / \text{kg pc} / \text{jour}$ respectivement.

Le lait et les boissons ne représentent pas une source d'exposition à l'acrylamide compte tenu de leur QLT. Leur fréquence de consommation était de 0,66 et 0,53 fois par jour.

Le poisson, la viande, le poulet et les œufs ont une fréquence de consommation presque équivalente à celle des pommes de terre (0,28 fois par jour). Les valeurs de l'acrylamide étaient inférieures à la limite de quantification (LOQ: 15 $\mu\text{g} / \text{kg}$) dans la viande, le poisson, les œufs et les saucisses.

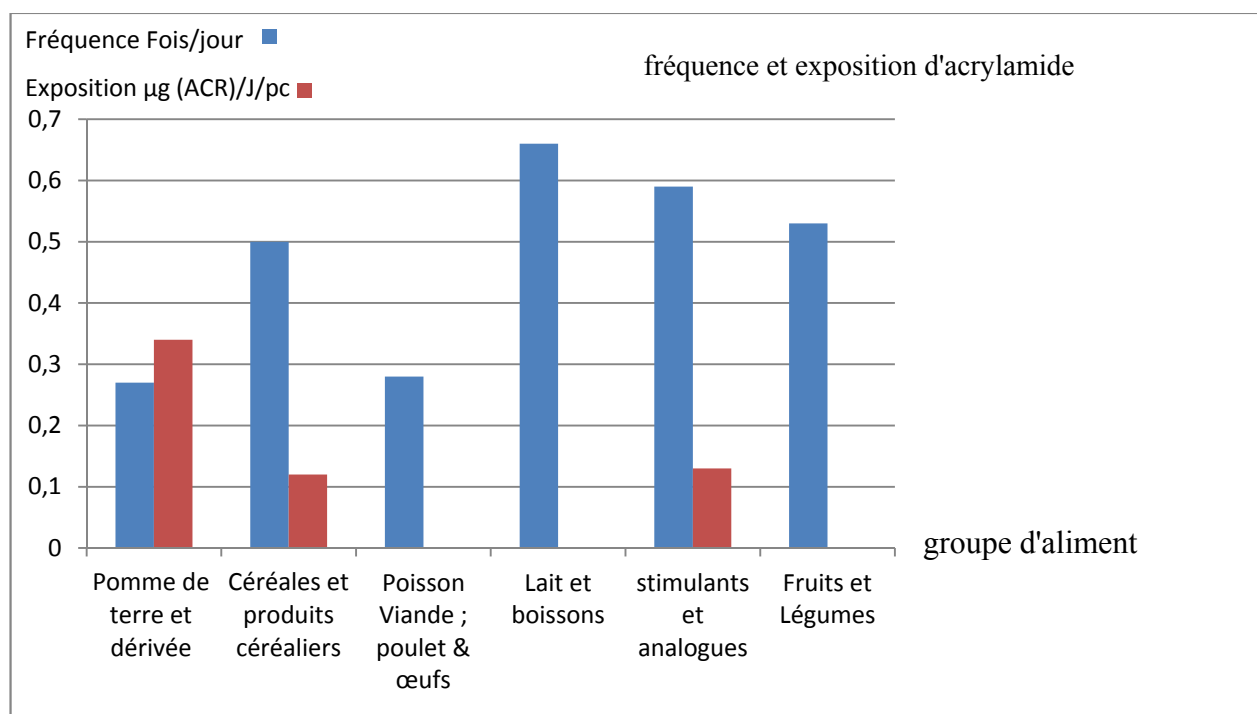


Figure 22 : la fréquence de consommation et l'exposition à l'ACR dans les aliments

L'acrylamide est principalement détecté dans les aliments riches en amidon et, dans une moindre mesure, dans les produits carnés[129]. Les aliments qui ne contenaient pas d'acrylamide ou avaient une teneur en acrylamide inférieure à la limite de quantification (LOQ: 10 ppm) comprenaient du poulet cru ou cuit, du poisson cru ou cuit, des pommes de terre crues, des légumes surgelés, de la sauce soja, du jus de viande ou de la gélatine.

Le dosage de l'acrylamide est effectué sur des échantillons d'eau traitée (collectés soit à la sortie d'une station d'épuration, au niveau des structures et des installations d'alimentation, de stockage et de distribution, soit sur des échantillons d'eau prélevés au point d'utilisation eaux traitées destinées à la fabrication de boissons gazeuses et de glace ou à la préparation au conditionnement et à la conservation des aliments) et différenciés selon les types d'eau potable et / ou de contrôle de qualité prévus par le décret exécutif n ° 09-414 (déterminant la nature, la périodicité et les méthodes d'analyse de l'eau destinée à la consommation humaine).

La valeur limite pour l'acrylamide dans l'eau destinée à la consommation humaine est de 0,5 µg/L en vertu du décret exécutif n ° 14-96 modifiant et complétant le décret exécutif n ° 11-125 relatif à la qualité de l'eau potable pour l'homme.

L'analyse des boissons pasteurisées et du lait stérilisé (contenant 90% d'eau potable) a révélé la présence d'acrylamide à des seuils inférieurs à la limite de quantification (LOQ: 15 µg / kg), ce qui est conforme à la réglementation.

Des résidus de monomères (acrylamide) sont présents dans les coagulants utilisés pour le traitement de l'eau potable. La dose maximale admissible est habituellement de 1 mg / L. Si ce produit (coagulants) contient 0,05% de monomère, nous trouverons une concentration maximale théorique de 0,5 g / L d'acrylamide dans l'eau potable [130].

Il est important de noter que seule l'exposition moyenne à l'acrylamide a été calculée. Une valeur moyenne fournit de l'information sur les personnes dont le poids corporel et les habitudes alimentaires sont moyens, mais ne fournit pas une perspective globale des niveaux d'exposition observables dans une population diversifiée. En fonction des habitudes alimentaires, le taux d'exposition de certaines personnes sera supérieur ou inférieur à l'exposition moyenne à l'acrylamide[97].

En outre, le JECFA (2005) précise que, pour la majorité des pays, les frites représentent la catégorie d'aliments qui contribue le plus à l'apport alimentaire (16 - 30%), suivies des croustilles (6 - 46%), du café (13 - 39%), des biscuits sucrés et des pâtisseries (10 - 20%) et des toasts (10 -30%) [9].

Dybing et *al.* (2005) ont comparé la contribution de l'acrylamide de différentes catégories d'aliments mesurées dans différents pays pour différents groupes d'âge. Chez les adolescents belges, l'apport alimentaire de frites a contribué à environ 50% de l'exposition [78], ce qui est comparable à la présente étude.

Selon une étude sur la fréquence de consommation en Algérie, les céréales constituent la base de l'alimentation des ménages (pain / gâteau: 2,6 fois par jour, pâtes: une fois par semaine). Le lait complète ce régime de base avec une consommation moyenne deux fois par jour. Une faible consommation est observée pour les fruits et légumes (moins d'une fois par jour), les viandes rouges (2,2 fois par semaine), les volailles (4,3 fois par semaine) et les poissons (moins d'une fois par semaine). Dans le cas des sodas et des produits sucrés, la consommation était une fois par jour [131].

La FDA a constaté que huit groupes alimentaires (frites, frites cuites au four, céréales de petit déjeuner, pain grillé, biscuits, pain blanc, café) étaient la cause de plus de 80% de la portion moyenne d'acrylamide absorbée par la population [10]. La nourriture seule était entièrement responsable de la quantité moyenne d'acrylamide ingérée. Les estimations des expositions alimentaires calculées au Royaume-Uni ont également montré que les produits céréaliers et les pommes de terre sont les principales sources d'acrylamide dans les aliments du Royaume-Uni. Les principales catégories d'aliments responsables de l'exposition à l'acrylamide semblent être les mêmes en Amérique du Nord et en Europe (FAO / OMS, 2006). Cependant, les valeurs d'exposition rapportées dans cette étude sont inférieures à celles rapportées par le JECFCA et Santé Canada en 2012[10][59][97].

Compte tenu de la consommation moyenne générale de tous les aliments, l'exposition moyenne par habitant algérien est de 0,2 à 0,4 μg d'acrylamide par jour en poids corporel ($\mu\text{g} / \text{kg pc} / \text{jour}$). L'exposition alimentaire à l'acrylamide chez l'adulte se situe entre 0,3 et 0,4 μg par kilogramme de poids corporel et par jour ($\mu\text{g} / \text{kg pc} / \text{jour}$). Les valeurs moyennes de concentration d'acrylamide pour chaque produit et les données de consommation alimentaire moyenne ont été utilisées pour calculer une seule valeur d'exposition pour l'ensemble de la population plutôt qu'une plage de valeurs et, par conséquent, l'évaluation déterministe de l'évaluation préliminaire. Les résultats de l'évaluation déterministe préliminaire de l'exposition à Santé Canada sont semblables à d'autres évaluations de l'exposition alimentaire à l'acrylamide dans d'autres pays comme la Suède et les États-Unis [97]. Les mêmes résultats sont confirmés par cette étude.

3.1. Estimation de l'exposition selon le sexe

Les résultats de la fréquence de consommation habituelles et l'exposition en ACR chez les femmes et les hommes sont mentionnées dans figure 23.

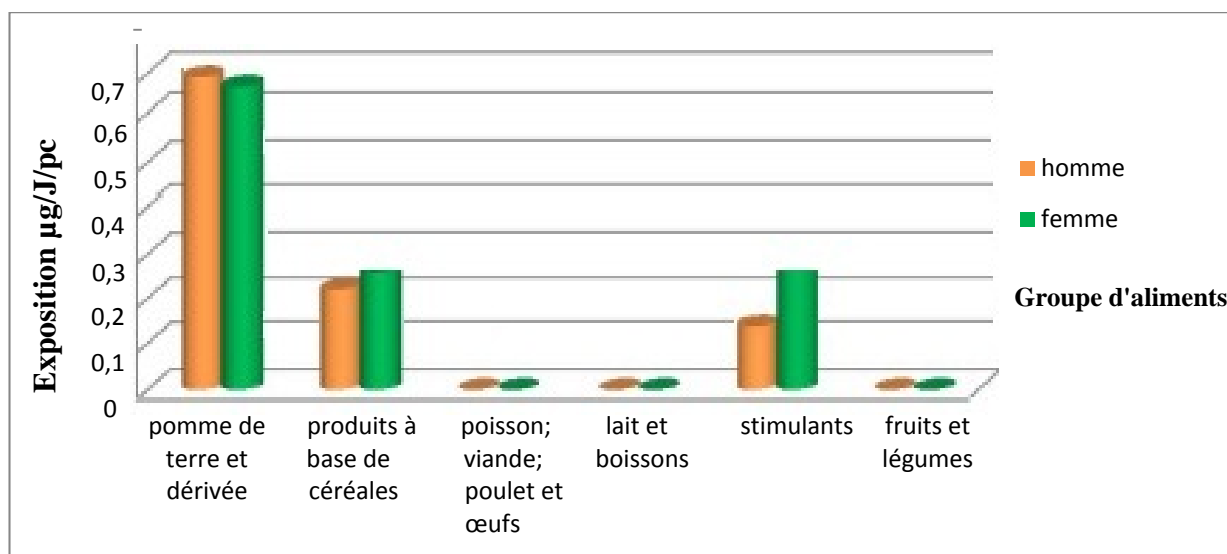


Figure 23 : Exposition à l'ACR selon le sexe

D'après les résultats, nous déduisons que, quel que soit le sexe, la pomme de terre et dérivées est le groupe d'aliment le plus exposant à l'ACR malgré la faible fréquence de consommation. Les stimulants, les céréales et produits céréales représentent la deuxième catégorie d'aliments les plus exposant à l'ACR respectivement avec des fréquences de consommation très élevée. Le groupe lait et boissons malgré leur consommation modérée ne constitue pas une source d'exposition importante à l'ACR.

Le groupe poissons, viandes, poulet et œufs présentent une faible fréquence de consommation et source d'exposition par rapport aux autres aliments.

Les résultats de fréquence de consommation obtenus pour chaque sexe (féminin, masculin) sont donnés dans l'annexe 4.

Les résultats trouvés montrent qu'il n'y a pas de différences significatives entre les hommes et les femmes à l'exposition à l'ACR, pour le groupe de pomme de terre et dérivés. Alors que pour le groupe de stimulants et les produits céréales les hommes sont moins exposés (0,07 µg/J/pc, 0,11 µg/J/pc) que les femmes (0,14 µg/J/pc, 0,13 µg/J/pc).

3.2. Estimation de l'exposition selon l'âge

L'âge semble comme étant un caractère pouvant influencer les fréquences de consommation et d'exposition à l'ACR. A cet effet, nous avons présenté les résultats enregistrés comme suit :

- ✓ **Enfants de 6 à 13 ans :** Parmi les 788 sujets questionnés figurent 104 enfants. Les résultats enregistrés sont illustrés dans la figure 24.

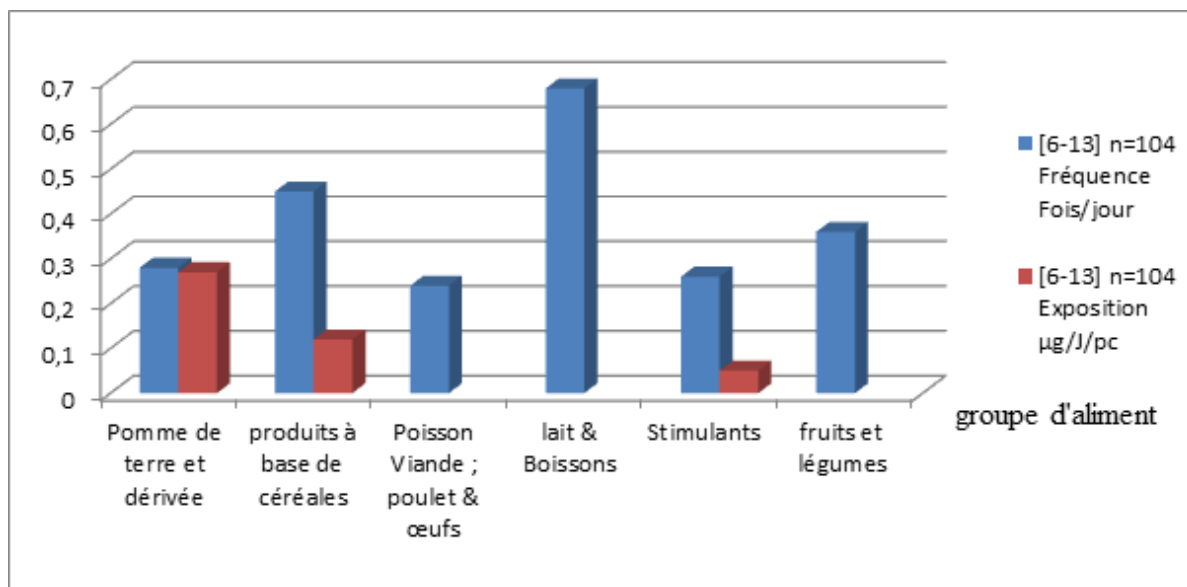


Figure 24 : Fréquence de consommation et d'exposition à l'ACR d'enfants de 6-13 ans.

Les résultats de la figure 24 montrent que le groupe de pomme de terre et dérivées présentent toujours la forte exposition à l'ACR malgré la faible fréquence de consommation, suivi par les produits à base de céréales et stimulants avec une exposition à fréquences de consommation moyennes

Le groupe fruits et légumes et le groupe poissons, viandes, poulet et œufs représentent une fréquence moyenne de consommation, respectivement : $0,26 \pm 0,24$ F/J, $0,24 \pm 0,20$ F/J sans être définie parmi les aliments exposant à d'ACR .

Malgré que le lait et boisson constituent la base de l'alimentation des enfants ($0,68 \pm 0,23$ F/J) mais ne présente pas un risque d'exposition ACR.

- ✓ **Adolescents de 14 à 19 ans** : Pour cette tranche nous avons interrogé 262 individus et les résultats enregistrés sont illustrés dans la figure 25.

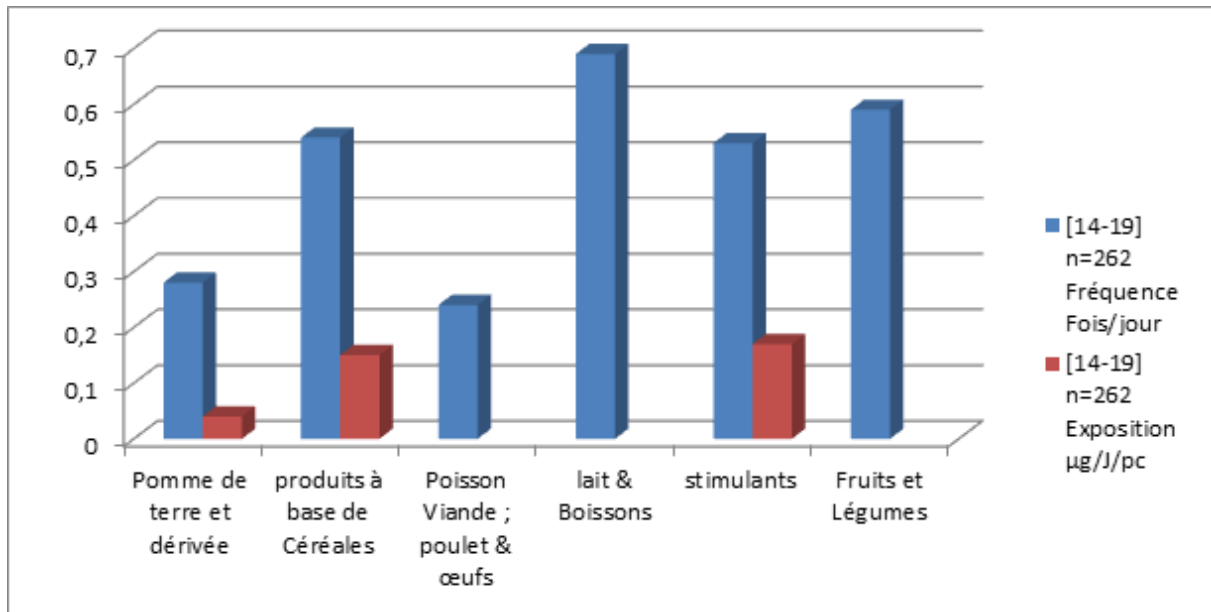


Figure 25 : Fréquence de consommation et d'exposition à l'ACR d'adolescents de 14 à 19 ans

Les résultats montrent que le groupe de pomme de terre présente toujours une forte exposition à l'ACR malgré la faible fréquence de consommation. Alors que les autres groupes : fruits - légumes, lait - boissons, poissons - viandes - poulet - œufs ne présentent toujours une source d'exposition à l'ACR, malgré les fortes fréquences de consommation.

- ✓ **Jeunes adultes de 20 à 27 ans** : Pour cette tranche nous avons interrogé 273 individus et les résultats enregistrés sont illustrés dans la figure 26.

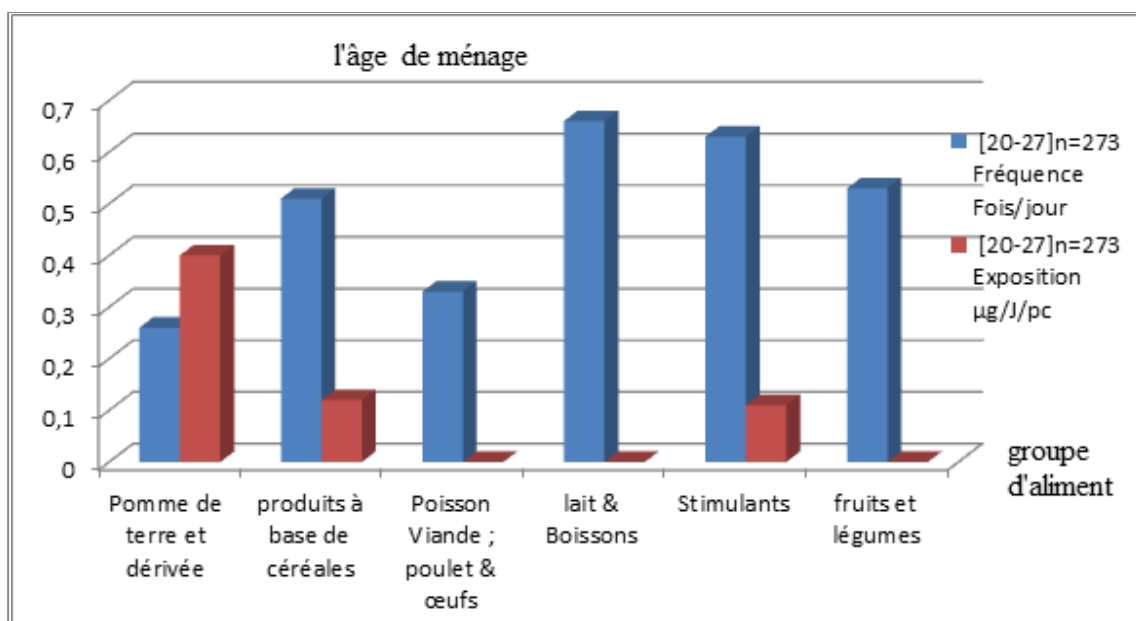


Figure 26 : Fréquence de consommation et d'exposition à l'ACR de jeunes adultes de 20 à 27 ans. Les résultats trouvés sont similaires à ceux trouvés pour les autres tranches d'âges et montrent que le groupe de pomme de terre présente toujours une forte exposition à l'ACR malgré la faible fréquence de consommation.

- ✓ **Adulte de plus de 27 ans** : Pour cette tranche nous avons interrogé 273 individus et les résultats enregistrés sont illustrés dans la figure 27.

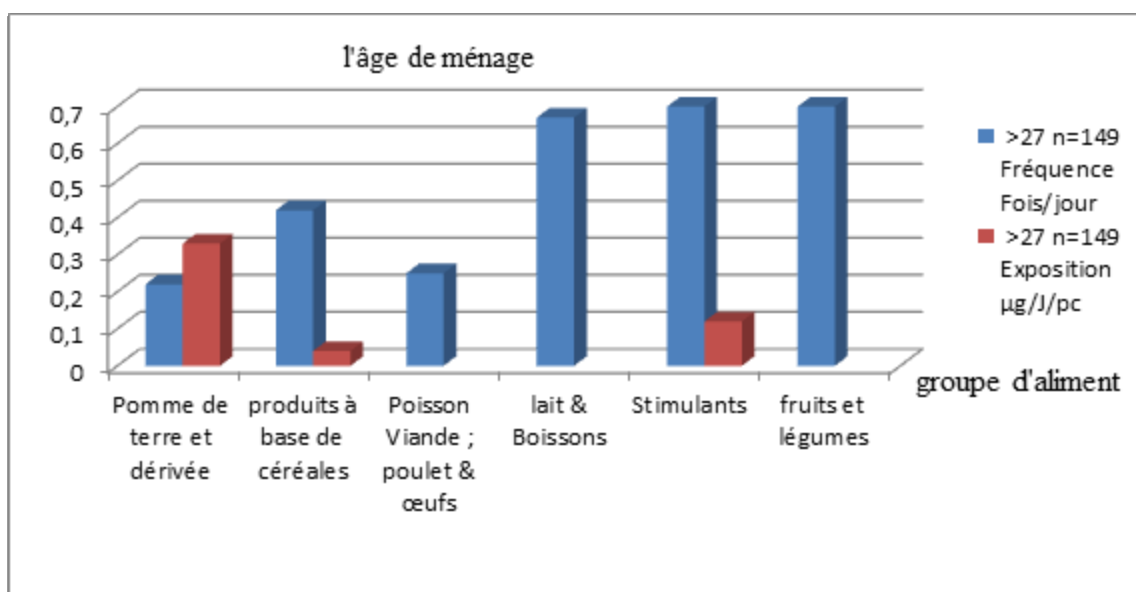


Figure 27 : Fréquence de consommation et d'exposition à l'ACR d'adultes de plus de 27ans.

Contrairement aux autres groupes d'âge, celui-ci présente la plus forte fréquence de consommation pour les divers (ex. fruits) ($1,04 \pm 0,45$ F/J) ;. Comme pour les autres groupes, les pommes de terre ont enregistré l'exposition la plus élevée ($0,33 \mu\text{g}/\text{J}/\text{pc}$) à l'ACR, malgré que la fréquence de consommation était la plus faible ($0,22 \pm 0,18$ fois/J). Les stimulants et les céréales se classe Après les pommes de terre avec une fréquence de consommation importante avec une exposition à l'ACR remarquable.

D'après ces résultats nous pouvons dire que les groupes d'âges de 20 à 27 ans et celui des 14 à 19 ans présentent les plus fortes fréquences de consommation, suivi par les groupes d'âges de plus de 27 ans et enfin par le groupe des 6 à 13 ans.

Par ailleurs, les groupes des 20 à 27 ans et celui des 14 à 19 ans présentent une forte exposition à l'ACR, suivi par les groupes des enfants de 6 à 13 ans puis des plus de 27 ans. La moyenne de fréquence de consommation de l'ACR, pour chaque groupe d'âge, est reportée dans l'annexe 05.

Ce niveau d'exposition plus élevé chez les jeunes adultes et adolescents peut être expliquer par une ingestion moyenne d'aliments plus élevée par kilogramme de poids corporel que celle des enfants. De plus, les jeunes adultes et les adolescents consomment plus régulièrement certains types d'aliments comme : les croustilles de pommes de terre et les pommes de terre frites que le reste de la population.

Des résultats différents ont été trouvés par Dybing *et al.*, (2005), ils rapportent que les enfants, les adolescents et les jeunes hommes ont un apport en ACR de source alimentaire significativement plus élevé que celui des adultes [78].

3.3. Estimation de l'exposition en fonction du poids

Dans cette partie nous avons présenté les résultats en fonction de la fréquence de consommation habituelle et d'exposition à l'ACR en fonction du poids. Nous avons réparti les résultats comme suit :

✓ **Moins de 55 kg** : Les résultats sur la fréquence de consommation et l'exposition à l'ACR des individus pesant moins de 55 kg sont représentés dans la figure 28.

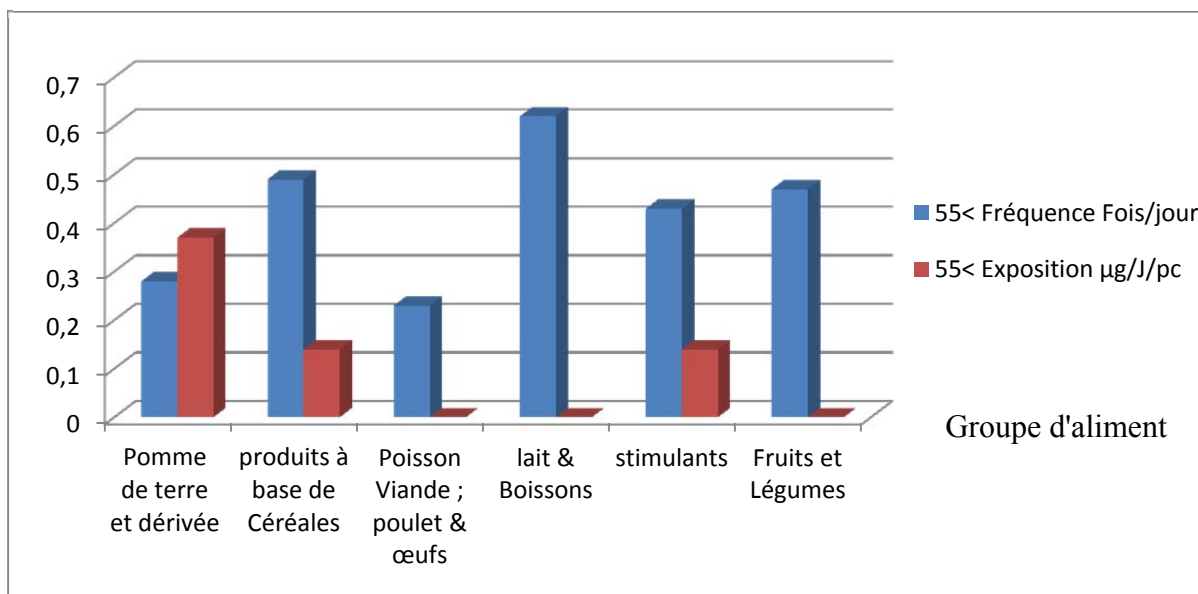


Figure 28 : Fréquence de consommation et d'exposition à l'ACR en fonction du poids (< 55kg).

Nous avons remarqué que les aliments du groupe des pommes de terre présentent une source d'exposition en ACR, malgré la faible fréquence de consommation de ce groupe d'aliments par rapport aux autres. En deuxième position viennent le groupe des stimulants et celui des produits à base de céréales qui présentent aussi une source d'exposition à l'ACR avec des fréquences de consommation similaires. Alors que le groupe du lait et des fruits et légumes, malgré qu'ils sont à la base de la consommation ont une faible exposition à l'ACR.

- ✓ **De 55 à 60 kg :** Les résultats sur la fréquence de consommation et d'exposition à l'ACR des individus de ce groupe d'individus sont représentés dans la figure 29.

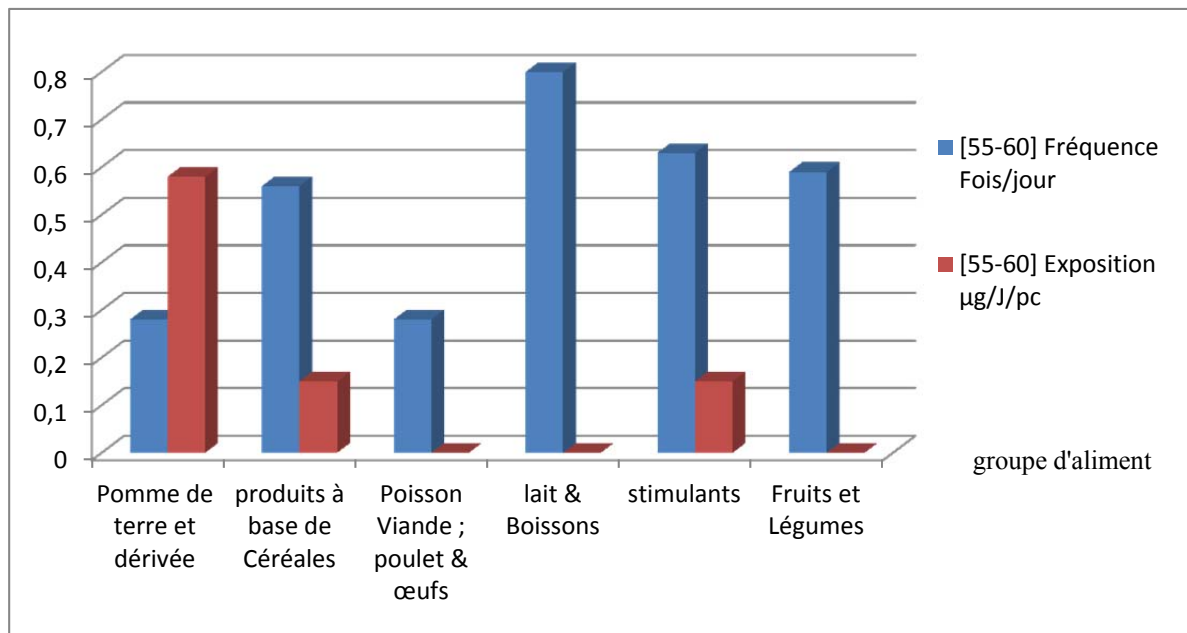


Figure 29: Fréquence de consommation et d'exposition à l'ACR en fonction du poids (55 - 60 kg).

Le groupe d'aliments de pomme de terre présente toujours l'exposition à l'ACR la plus élevée, malgré leur faible fréquence de consommation par rapport aux cinq autres groupes, suivi par le groupe des stimulants et produits à base de céréales.

Les fruits et légumes, le lait et boissons présentent une faible risque d'exposition à l'ACR, malgré leur forte fréquence de consommation.

- ✓ **Plus de 60 kg** : Les résultats sur la fréquence de consommation et d'exposition à l'ACR des individus pesant plus de 55 kg sont représentés dans la figure 30.

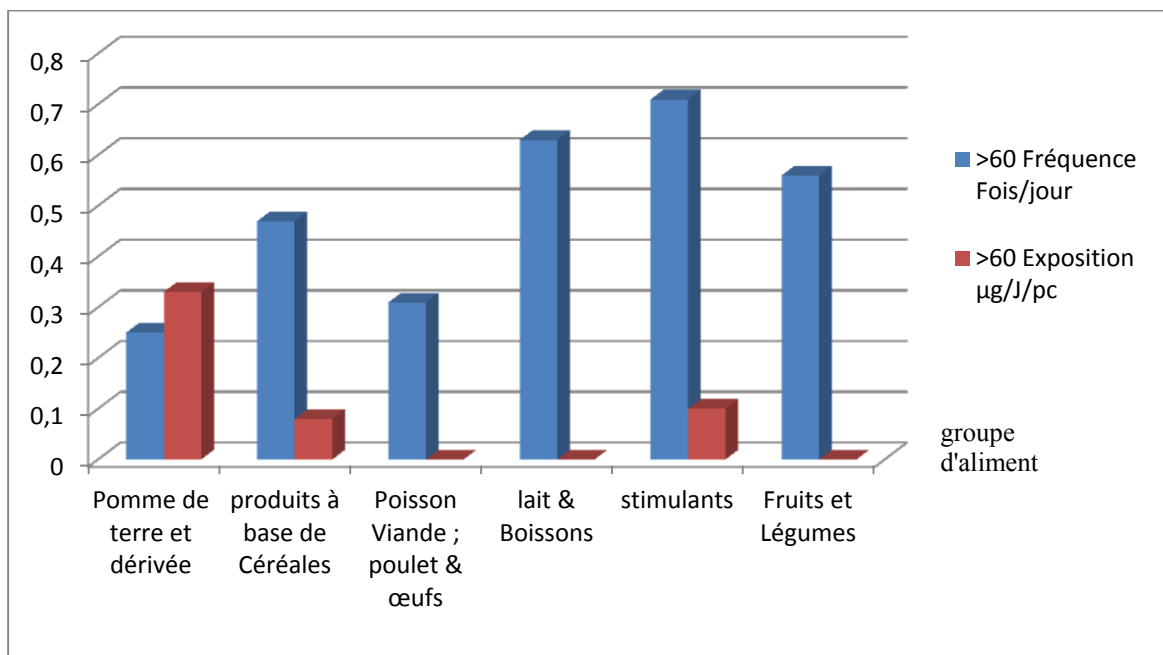


Figure 30 : Fréquence de consommation et d'exposition à l'ACR selon le poids (> 60 kg).

La pomme de terre et dérivés restent significativement le groupe prédominant dans l'exposition à l'ACR, malgré une fréquence de consommation faible par rapport aux autres aliments.

Le lait et boissons, fruits et légumes sont les groupes les moins exposés à l'ACR, malgré les fréquences de consommation très élevées.

Nous avons remarqué que les individus ayant un poids compris entre 55 et 60 kg sont les plus exposés à l'ACR ($0,18 \mu\text{g}/\text{J}/\text{pc}$), avec une fréquence de consommation ($0,50 \pm 0,29 \text{ F}/\text{J}$) des aliments exposés à l'ACR (pomme de terre $0,58 \pm 0,39 \mu\text{g}/\text{J}/\text{pc}$; $0,15 \pm 0,14 \mu\text{g}/\text{J}/\text{pc}$; $0,15 \pm 0,10 \mu\text{g}/\text{J}/\text{pc}$) par rapport aux autres groupes.

A la lumière de cette enquête nous avons remarqué que le groupe d'aliments pomme de terre et dérivées présente l'exposition la plus importante parmi les autres groupes étudiés. Ces aliments renferment des teneurs élevées en ACR et les pommes de terre frites sont généralement les plus exposées aux températures élevées.

Selon Santé Canada (2012), les pommes de terre frites préparées au four à partir de produits congelés et achetés en détail ne contribuaient que très peu à l'apport en ACR, ne représentant qu'environ 1 % de l'exposition alimentaire globale chez la population totale. Cette contribution

est nettement inférieure à celle des pommes de terre frites préparées dans une friture à huile et vendues dans les restaurants [97].

La FDA rapporte que plus de 80 % de la dose moyenne d'ACR ingérée par la population générale provient des huit catégories d'aliments suivantes : les croustilles de pommes de terre, les frites tranchées grossièrement, les frites cuites au four, les céréales de petit déjeuner, le pain grillé, les biscuits, le pain blanc et le café [10]

*II Effets de l'ACR sur les paramètres
biochimiques et hématologiques des
rats wistar*

1. Examen clinique

Le diagnostic des pathologies et du comportement chez les rats « wistar » durant l'expérimentation nous a permis de noter ce qui suit :

- Aucun changement anormal n'a été remarqué chez le groupe témoin ;
- Une diarrhée sanglante remarquée 05 jours avant la fin de l'expérimentation chez le Groupe 2 (traité avec 5mg/L d'ACR) ;
- Gonflement du côté droit du cou de l'un des rats du groupe 3 (10mg/L d'ACR) après 50 jours d'exposition ;
- Pour les rats du Groupe 4 (traités par DL50) par gavage :
 - Décès de 7 sur 12 après des rats après 24 heures de l'administration de l'ACR ;
 - Gonflement des tissus (à la face et autour des yeux) chez 5/12 des rats survivus ;
 - Paralysie des membres antérieurs d'un rat après 48 heures de l'administration de l'ACR.

Ces phénomènes sont probablement le résultat des dysfonctionnements hépatiques et rénaux induisant le déficit immunitaire suscité. La paralysie des membres antérieurs est due à un début de développement (2ème jour) d'une neurotoxicité suite au traitement d'ACR (DL50).

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés dans l'étude réalisée par Barber *et al.* (2001), qui a déterminé le moment du début du développement de la neurotoxicité, observée le 11ème jour après traitement par 50mg/kg d'ACR [132]. De même, Bohi *et al.* (2011) ont constaté que l'exposition des rats à l'ACR a causé la paralysie des membres postérieurs et attribuent ces résultats à la neurotoxicité d'ACR [133].

Le dysfonctionnement des membres et la démarche anormale enregistrés vont dans le même sens que les résultats trouvés par Shukla *et al.* (2002), qui ont constaté que l'exposition des rats à l'ACR a causé la paralysie des membres postérieurs dans 58% des animaux après le 10ème jour. Ils attribuent ces résultats à la neurotoxicité d'ACR[134].

2. Évaluation de l'exposition intestinale

Les animaux ont un accès ad-libitum à l'eau et à l'alimentation. Dans la présente expérience, la consommation moyenne d'eau (selon les enregistrements) est de $12,45 \pm 5,11$ ml / jour / rat.

Les doses d'acrylamide ingérées quotidiennement sont donc estimées en moyenne à $80,23 \pm 22,10$ µg /jour/ rats pour le Groupe 2, $108,09 \pm 23,92$ µg /jour/ rats pour le Groupe 3 et 22 mg /jour/ rat chez le Groupe 4.

Comme à l'exposition intestinale est estimée à $462,42$ µg /jour/kg pc pour le Groupe 2, $594,45$ µg /jour/kg pc pour le Groupe 3 et $117,52$ mg /jour/kg pc chez le Groupe 4.

L'ingestion moyenne d'un rat est de 10-12 ml / 100 g de poids corporel / jour [135]. [136].

Selon les études toxicocinétiques, l'acrylamide a une demi-vie dans le corps allant de 2,2 à 7 heures [68]. La biodisponibilité orale de l'acrylamide varie selon le véhicule et l'espèce. En général, l'acrylamide administré avec l'eau potable est mieux absorbé que celui contenu dans les aliments. Chez la souris B6C3F1, la biodisponibilité de l'acrylamide dans les aliments est d'environ 40 % alors que chez le rat Fischer 344, elle est passée à 60-80% [137].

Les études chez l'homme tendent à démontrer que l'acrylamide administré par voie orale est presque complètement absorbé par la paroi intestinale [68]. Chez les animaux, l'acrylamide administré par voie orale est rapidement et largement absorbé par le tractus gastro-intestinal et largement distribuée dans les tissus et le fœtus [120].

3. Effet de l'ACR sur les paramètres biochimiques et hématologiques

L'ensemble des résultats obtenus durant l'expérimentation courante sont mentionnés dans le tableau 11,12 et 13, exprimés en moyenne et écart type et la valeur P.

3.1. Enzymologie, Ionogramme et biochimiques sanguine

Les résultats montrent une variation significative ($P < 0.05$) de quelques paramètres de la biochimie sérique à savoir une baisse chez le Groupe 3 et 5 (10 mg/L et DL50 d'ACR) du taux de sodium ($139,16 \pm 1,47$ et $134,50 \pm 7,34$ mmol/L), d'urée ($0,35 \pm 0,05$ et $0,38 \pm 0,07$ g/l) et du chlore chez les 3 groupes traités ($95,66 \pm 2,06$, $97,16 \pm 2,04$ et $98,16 \pm 3,43$ mmol/L). Nous avons remarqué une augmentation significative de la bilirubine libre ($0,62 \pm 0,11$ & $1,73 \pm 1,72$ mg/l) chez le Groupe 3 et 4 (Tableau 11).

Tableau 11 : Effet de l'acrylamide sur la variation des paramètres de la biochimie sanguine

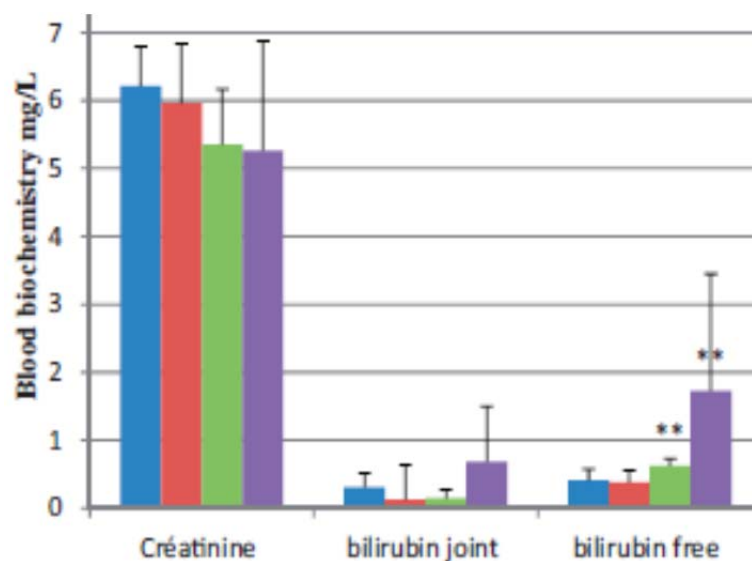
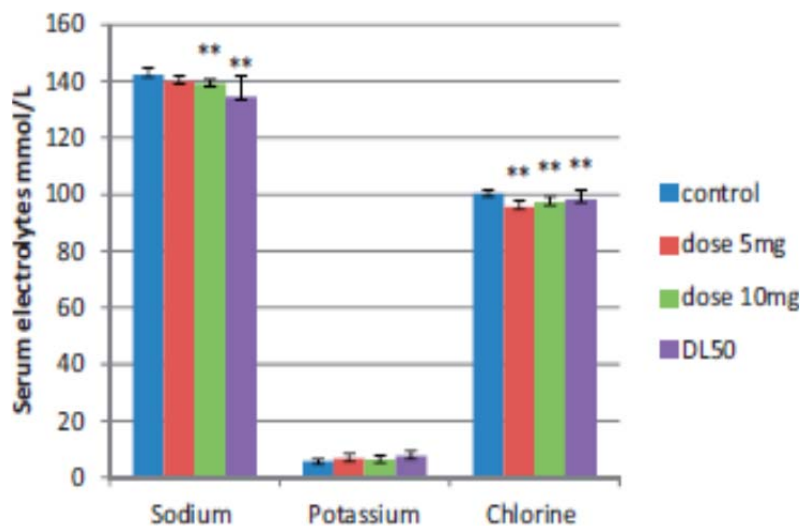
| | Témoin | Dose 5mg | Dose 10mg | DL50 |
|----------------------------|---------------|--------------|--------------------------|---------------|
| Sodium (mmol/l) | 142,33 ± 2,42 | 140,00 ± | 139,16 ± | 134,50 ± |
| Potassium (mmol/l) | 5,73 ± 0,75 | 6,62 ± 1,94 | 6,16 ± 1,64 | 7,61 ± 1,74 |
| Chlore (mmol/l) | 100,33 ± 1,21 | 95,66 ± | 97,16 ± 2,04* | 98,16 ± 3,43* |
| Glycémie g/l | 1,26 ± 0,38 | 1,10 ± 0,52 | 0,92 ± 0,33 | 1,14 ± 0,44 |
| Créatinine mg/l | 6,21 ± 0,59 | 5,96 ± 0,88 | 5,35 ± 0,82 ² | 5,26 ± 1,62 |
| Urée g/l | 0,47 ± 0,05 | 0,45 ± 0,66 | 0,35 ± 0,05* | 0,38 ± 0,71* |
| B totale g/l | 0,73 ± 0,24 | 0,51 ± 0,13 | 0,76 ± 0,05 | 2,23 ± 2,23 |
| B conjugué mg/l | 0,31 ± 0,21 | 0,13 ± 0,51 | 0,15 ± 0,12 | 0,68 ± 0,82 |
| B libre mg/l | 0,41 ± 0,17 | 0,38 ± 0,18 | 0,62 ± 0,11* | 1,73 ± 1,72* |
| Transaminase | 168,16 ± | 144,50 ± | 164,16 ± | 183,16 ± |
| Transaminase SGPT | 54,50 ± 20,22 | 45,66 ± | 59,33 ± 11,52 | 111,66 ± |
| Phosphatases | 49,50 ± 16,13 | 46,83 ± 6,43 | 62,16 ± 48,97 | 99,17 ± 94,29 |
| CRP µg/ml | 0,18 ± 0,20 | 0,1 ± 1,52 | 0,1 ± 1,52 | 0,22 ± 0,16 |

Légende *: différence significative : P < 0,05 comparer au groupe témoin

Les concentrations basses en urée sont rares et peuvent être due à un résultat de la synthèse altérée d'urée suite à une insuffisance hépatique en raison de dommages au foie [138]. D'autres examens de laboratoire peuvent être demandé pour préciser la cause de l'hyponatrémie (Ex.: L'urée et sodium) [139]. Le taux de sodium est bas (Hyponatrémie) en cas d'une insuffisance cardiaque, rénale, ou hépatique ou un œdème [139][140]. L'hyponatrémie représente, en général, une incapacité de l'organisme à excréter l'excès d'eau par les reins [141].

Ainsi, une hyponatrémie est généralement associée au syndrome hépatorénal, à une ascite ou encore à un décès d'étiologie hépatique [141]. Dans une autre étude, en raison de la toxicité d'acrylamide, ils ont déterminé qu'il y avait des variations de certains paramètres biochimiques tels que la diminution significative de la concentration en urée. Les organes les plus affectés étaient le cerveau, la glande thyroïde et les testicules suivis du foie et des reins selon l'évaluation histopathologique [13]. En cas de pertes digestives (diarrhée) et rénales, le taux de chlore peut diminuer [142]. Ces changements sont dus à une déshydratation extracellulaire DEC (Figure 31) suite probablement aux pertes rénales caractérisées par diminution de poids (Figure 35) parallèle au degré de déshydratation [143] [140].

La bilirubine libre circule dans le sang, pour la plus grande part, liée à l'albumine qui assure son transport jusqu'au foie. De faibles fractions de bilirubine sont liées aux lipoprotéines et aux α -globulines. La production de bilirubine peut être accrue par toute hémolyse surajoutée (immunisations de groupes sanguins, résorption d'hématomes) [144]. L'augmentation pathologique de la bilirubine libre est due à une destruction massive des hématies [145].



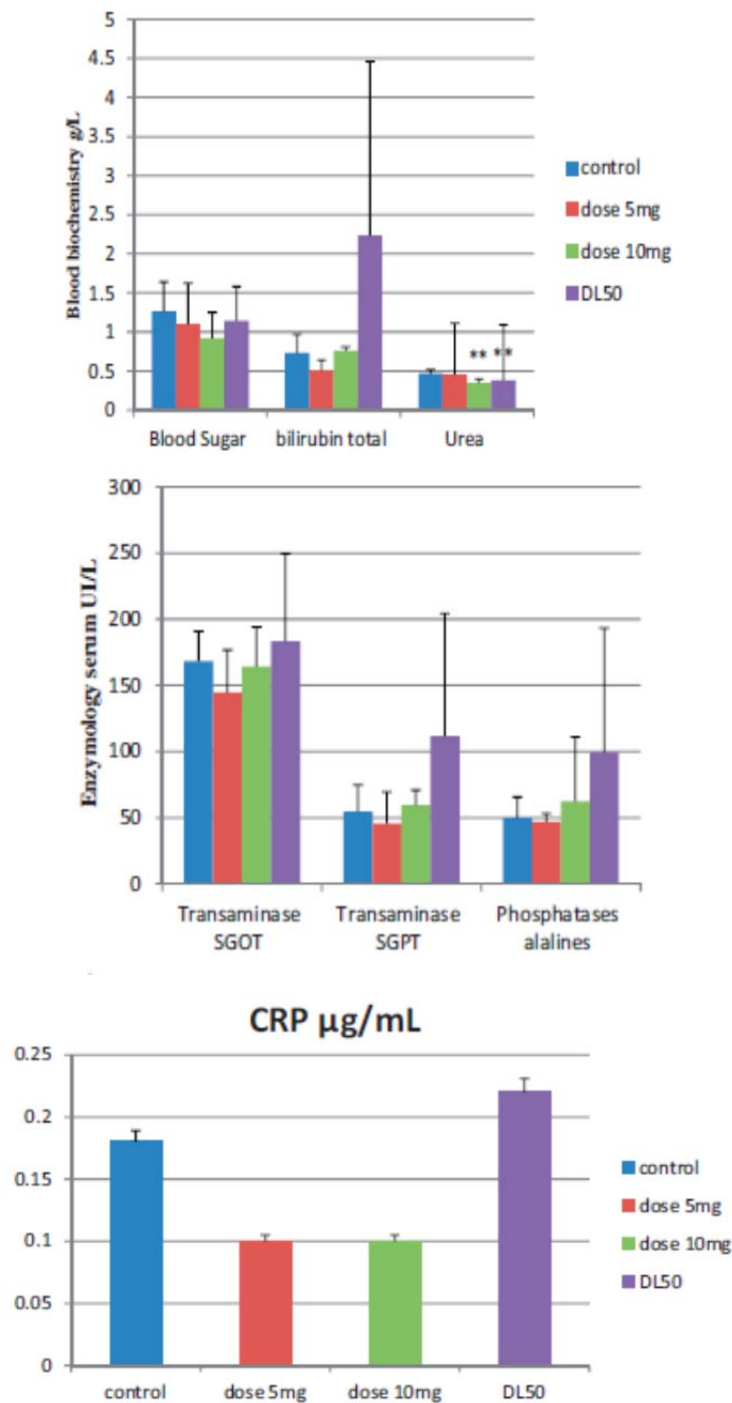


Figure 31 : Effet de l'ACR sur la variation des paramètres biochimiques : électrolytes sériques (mesurés à l'aide d'électrodes indirectes spécifiques aux ions (ISE)), biochimie sanguine (mesurée en utilisant HK / G6PDH ROCHE COBAS 6000 pour la Glycémie, Jaffe COBAS 6000 ROCHE pour Créatinine, GLDH COBAS 6000 ROCHE pour l'urée, et Diazo COBAS 6000 ROCHE pour la bilirubine), enzymologie sérique (mesurée en utilisant IFCC COBAS 6000 ROCHE) et Protéine C-réactive (CRP)- (tests utilisant le dosage immunoturbidimétrique ultrasensible ROCHE COBAS).

Chaque valeur représente la moyenne \pm écart-type.

** Statistiquement significatif par rapport au groupe témoin; $p < 0,05$

3.2. Exploration d'une anomalie lipidique

L'exploration d'une anomalie lipidique est mentionnée dans le tableau 12. Les résultats montrent une augmentation significative des triglycérides ($0,66 \pm 0,13^*$ & $0,86 \pm 0,27^*$ g/l) des Groupes 3 et 4 (10mg/L et DL50 d'ACR) respectivement, des lipoprotéines de très basse densité VLDL ($0,13 \pm 0,02$ et $0,17 \pm 0,05$) et du rapport Cholestérol total/ lipoprotéines de haute densité HDL ($1,48 \pm 0,39$) du Groupe 4 (Figure 32).

Tableau 12 : Exploration d'une anomalie lipidique de l'effet de l'ACR

| lipide profile | Témoin | Dose 5mg | Dose 10mg | DL50 |
|------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-------------------|
| Cholestérol total g/l | $0,79 \pm 0,15$ | $0,79 \pm 0,12$ | $0,79 \pm 0,14$ | $0,73 \pm 0,21$ |
| Cholestérol HDL g/l | $0,72 \pm 0,13$ | $0,76 \pm 0,12$ | $0,67 \pm 0,13$ | $0,52 \pm 0,20^2$ |
| Triglycéride g/l | $0,45 \pm 0,10$ | $0,52 \pm 0,14$ | $0,66 \pm 0,13^*$ | $0,86 \pm 0,27^*$ |
| VLDL | $0,09 \pm 0,02$ | $0,10 \pm 0,03$ | $0,13 \pm 0,02^*$ | $0,17 \pm 0,05^*$ |
| Cholestérol LDL g/l | $0,06 \pm 0,04$ | $0,06 \pm 0,03$ | $0,03 \pm 0,04$ | $0,06 \pm 0,08$ |
| Cholestérol total/ HDL | $1,09 \pm 0,08$ | $1,05 \pm 0,02$ | $1,17 \pm 0,10$ | $1,48 \pm 0,39^*$ |

Légende *: différence significative : $P < 0,05$ comparer au groupe témoin

L'ACR cause des augmentations significatives au niveau du cholestérol total, des lipoprotéines de basse densité (LDL) et des triglycérides pour des faibles doses par rapport aux témoins. Ceci mène à une augmentation de la synthèse des lipoprotéines du plasma et de la mobilisation élevée des lipides à partir du foie, en conséquence, les résultats peuvent être expliqués par la participation d'ACR dans la peroxydation des lipides [146]. Le foie joue un rôle central dans la synthèse des lipides dans tout le corps et le métabolisme d'hydrates de carbone [147][148].

L'hypoprotéïnémie chez les rats alimentés par différentes concentrations d'acrylamide pourrait avoir résulté du dysfonctionnement hépatocellulaire. Une hypercholestérolémie importante entraîne des dommages du foie caractérisé par le développement de vacuoles grasses cytoplasmique et la nécrose des hépatocytes centriolaire avec l'infiltration lymphocytaire [148].

La prise d'ACR mène à la diminution de la résistance acide des membranes des érythrocytes et active la peroxydation des lipides [149]. En outre, l'acrylamide a induit de manière significative des niveaux d'expression des gènes liés aux synthèses de métabolisme des lipides et de triphosphate d'adénosine de phosphorylation oxydante en particulier [150].

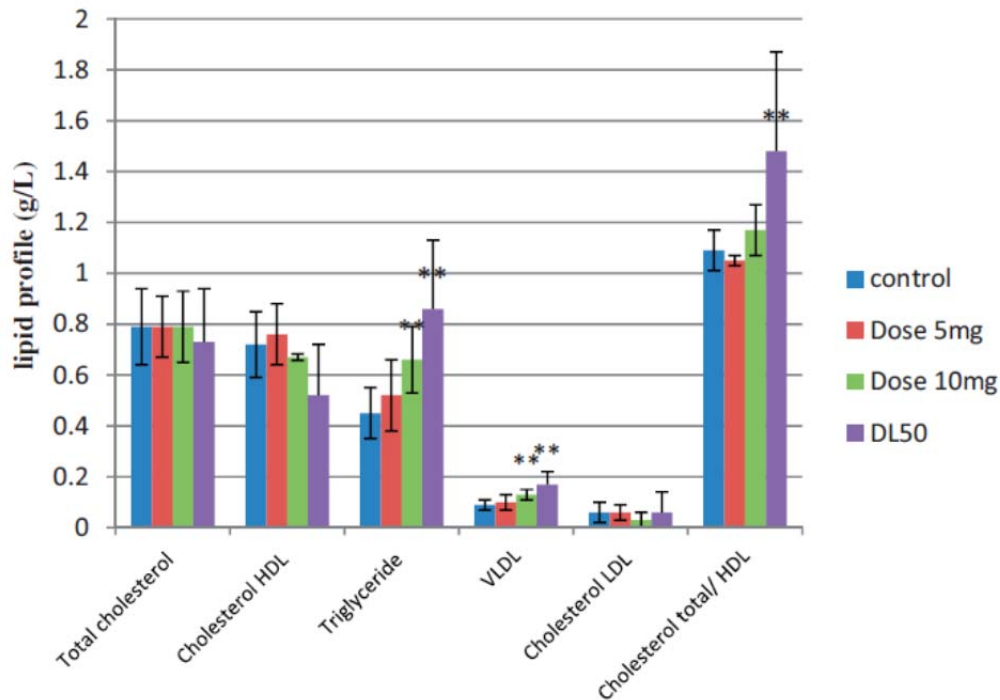


Figure 32 : Exploration d'une anomalie lipidique due à l'effet de l'ACR (mesurée par des méthodes colorimétriques enzymatiques à l'aide d'analyseurs automatiques : COBAS 6000 ROCHE) Chaque valeur représente la moyenne \pm écart-type.

** Statistiquement significatif par rapport au groupe témoin ; $p < 0,05$.

3.3. Dosage des protéines sériques

Les analyses par l'électrophorèse des protéines sériques montrent une variation des taux des globulines sériques. La Figure 33 résume la signification des différences et indique une diminution des protéines totaux ($88,95 \pm 6,36$), d'albumine ($37,65 \pm 1,65$), d' $\alpha 1$ globuline ($24,84 \pm 2,10$) et de $\beta 2$ globulines ($10,47 \pm 1,71$) chez les rats exposés à 10 mg/l d'ACR (Groupe 3). De même, une diminution des $\alpha 1$ globulines ($26,04 \pm 1,46$) et une tendance d'augmentation des δ -globulines ($13,33 \pm 1,85$) chez les rats exposés à 5 mg/l d'ACR.

Les variations des globulines sont plus marquées chez les rats exposés à la dose de 5 et 10 mg/l d'ACR (Groupe 2 et 3) que celles de la DL50 (Groupe 4); du fait que l'exposition journalière durant 2 mois, même à dose inférieure à la DL50, a provoqué des effets toxiques sur les rats. Tandis que la DL50 a engendré des mortalités et des lésions de congestion et d'hémorragie chez les survivants après 48 heures seulement.

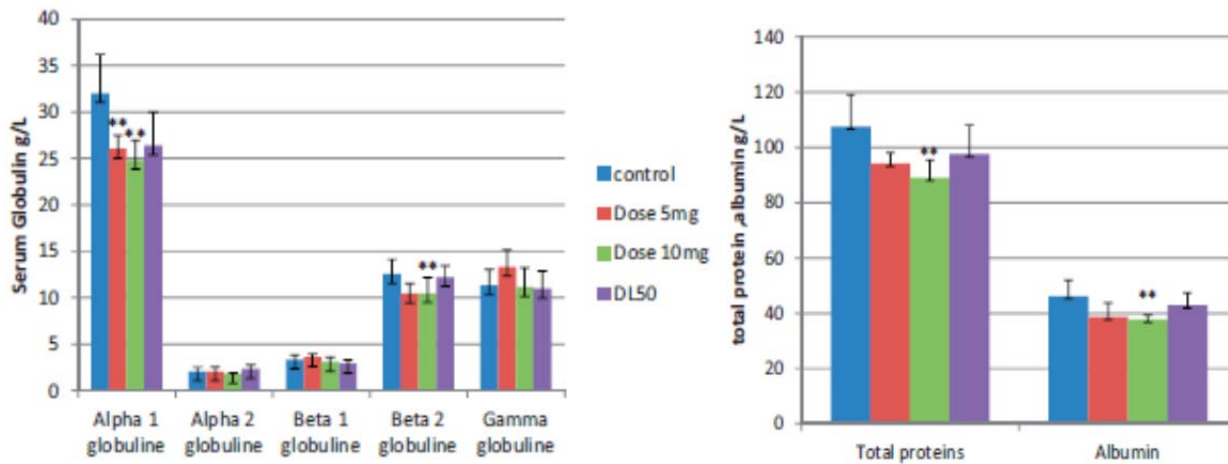


Figure 33 : Effet de l'ACR sur la variation des protéines et sérum globuline (mesuré en utilisant l'électrophorèse capillaire automatisée: Capillarys® - Sebia)

Chaque valeur représente la moyenne \pm écart-type.

** Statistiquement significatif par rapport au groupe témoin; $p < 0,05$.

L'Électrophorèse des protéines sériques permet de confirmer le diagnostic de certaines atteintes du système immunitaire, d'une maladie infectieuse, d'auto-immune ou de système (zone $\alpha 1$, $\beta 2$, et surtout δ), d'un déficit congénital ou acquis des immunoglobulines ou d'autres protéines (albumine et gammaglobulines notamment) ou d'évaluer le retentissement d'une pathologie connue, voire d'en assurer le suivi : atteinte hépatique, atteinte rénale et digestive, etc. [151][152][153].

La protéine sérique, l'albumine et la globuline ont diminué dans tous les groupes traités avec l'ACR comparé au témoin. Cette diminution est peut-être dû à la synthèse ou aux changements du métabolisme des protéines qui explique un autre indicateur de dysfonctionnement hépatocellulaire (Figure 33).

Les hépatocytes sont les cellules principalement responsables de la biosynthèse des protéines de la réaction inflammatoire aiguë (RIA), durant laquelle la concentration plasmatique de l'albumine peut diminuer [154]. L'albuminémie est diminuée en cas d'insuffisance hépatocellulaire [145]. Dans une autre étude, il y a diminution significative de toutes les protéines. Cette hypoprotéïnémie dans le sang chez les rats exposés à différentes concentrations d'ACR pourrait avoir résulté du dysfonctionnement hépatocellulaire [138].

Le taux α_1 et de β_2 -globulines peut diminuer en raison d'une insuffisance hépatocellulaire [151]. L'ACR peut causer des anomalies dans l'expression de gènes des cellules hépatiques. De même, tous les groupes traités avec l'ACR ont enregistré des diminutions significatives des niveaux de globuline dans le sang comparé au groupe de témoin [138]. La fraction gammaglobulines, appelées immunoglobulines (ou Ig), sont des protéines sériques regroupant les IgG, IgM, IgD, IgE et IgA[155] ; augmente dans les cas de maladies inflammatoires chroniques et en cas de déficits immunitaires primitifs (DPI) accompagnant les pathologies hépatiques, infectieuses, parasitaires ou auto-immunes [151][156].

Le diagnostic d'un déficits immunitaires primitifs DPI repose sur des tests biologiques simples (numération formule sanguine (Figure 34), dosage des immunoglobulines (Figure 33)[33]; chez le rat, les variations des γ globulines et d'albumine sérique pourraient jouer un rôle non négligeable dans l'établissement de l'immunité [157].

La toxicité à long terme (toxicité chronique) entraînant des troubles résulte de l'administration prolongée de faibles doses de toxique (effet d'accumulation). À chaque exposition, la quantité de toxique éliminée est inférieure à la quantité absorbée. La concentration du toxique dans l'organisme augmente progressivement, jusqu'à atteindre une concentration susceptible de faire apparaître des effets toxiques. Les effets toxiques de l'accumulation de l'effet sont dus au retard de la mise en place des phénomènes d'échappement (détoxification, neutralisation, élimination, etc.). Ces phénomènes sont difficiles à gérer avec des toxiques cumulatifs comme les cancérogènes [158]

3.4. Formule sanguine complète

Des variations de la formule sanguine (FNS) sont également notées et montrent une augmentation significative du nombre de leucocytes ($9,95 \pm 1,44$ et $10,44 \pm 1,21$), lymphocytes ($6,11 \pm 0,48$ et $6,33 \pm 0,76$) et monocytes ($2,46 \pm 1,14$ et $2,68 \pm 0,58$) avec une diminution des éosinophiles ($0,1 \pm 0,01$ & $0,10 \pm 0,036$) et des hématies ($7,61 \pm 0,36$ & $7,50 \pm 0,40$) chez le Groupe 3 (10 mg/L) et Groupe 4 (DL50) d'ACR respectivement (Tableau 14).

Par ailleurs, une augmentation du volume globulaire moyen VGM ($58,40 \pm 1,34$), de la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine TCMH ($16,80 \pm 0,54$) et des basophiles ($69.40 \pm 22,29^*$) chez les rats traités par la DL50 (groupe 4).

Tableau 13: effet de l'acrylamide sur les paramètres hématologiques

| Paramètres hématologiques | Témoin | Dose : 5mg | Dose : 10mg | DL50 |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|---------------------|
| Leucocyte 103/mm ³ | $7,43 \pm 0,25$ | $26,65 \pm 41,54$ | $9,95 \pm 1,44^*$ | $10,44 \pm 1,21^*$ |
| Hématie 106/mm ³ | $8,035 \pm 0,17$ | $7,76 \pm 0,69$ | $7,61 \pm 0,36^*$ | $7,50 \pm 0,40^*$ |
| Hémoglobine g/dl | $12,87 \pm 0,33$ | $12,40 \pm 1,04$ | $12,35 \pm 0,64$ | $12,62 \pm 0,68$ |
| VGM μm^3 | $55,50 \pm 1,38$ | $55,50 \pm 1,97$ | $56,50 \pm 1,87$ | $58,40 \pm 1,34^*$ |
| TCMH picog | $16,02 \pm 0,38$ | $15,98 \pm 0,59$ | $16,23 \pm 0,65$ | $16,80 \pm 0,54^*$ |
| Eosinophile 103/mm ³ | $0,20 \pm 0,07$ | $0,14 \pm 0,11$ | $0,099 \pm 0,01^*$ | $0,10 \pm 0,036^*$ |
| Basophiles/mm ³ | $35,86 \pm 22,25$ | 00* | 00* | $69.40 \pm 22,29^*$ |
| Lymphocyte 103/mm ³ | $4,56 \pm 0,21$ | $6,37 \pm 2,19^2$ | $6,11 \pm 0,48^*$ | $6,33 \pm 0,76^*$ |
| Monocyte 103/mm ³ | $1,37 \pm 0,21$ | $2,12 \pm 1,45$ | $2,46 \pm 1,14^*$ | $2,68 \pm 0,58^*$ |

Légende *: différence significative : $P < 0,05$ comparer au groupe témoin

Les globules blancs (leucocytes) sont des cellules qui constituent le système immunitaire; si leur nombre est supérieur, on parle d'hyperleucocytose. Dans notre étude, le taux des leucocytes totaux est sensiblement plus élevé que dans le groupe témoin. Ce qui indique l'activation du système immunitaire par l'acrylamide, reflétant l'incidence de l'inflammation.

Des résultats similaires ont été rapportés dans l'étude de Mahmoud *et al* ,(2016) réalisée sur des souris, [146] et celle de Raju *et al* (2015) chez des rats mâles F344 [159] ;En comparaison avec le groupe de Témoin ; Une diminution des niveaux du taux de globule rouge.(Érythrocytes RBC), Hémoglobine(HB) et les Plaquettes sanguines (PLT), et l'élévation du compte des globule blanc (WBC) ont été montré dans le groupe administré ACR.

Nous avons remarqué une augmentation des taux des macrophages (monocytes) et des dépôts pigmentaires dans les cellules de Kupfer (Figure 38). Les cellules de Kupfer sont des macrophages et le foie représente la plus importante réserve de macrophages de l'organisme [154].

Les polynucléaires éosinophiles sont essentiellement des cellules pro-inflammatoires, ils diminuent avec la dose 10 mg/L et DL50 (Figure 34). Les polynucléaires basophiles augmentent avec la DL50 (Tableau 14), ils possèdent des fonctions importantes dans la régulation des réponses immunitaires et participent aussi à la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th2 durant la réponse immunitaire primaire et lymphocytes B au cours des réponses immunitaires secondaires [160].

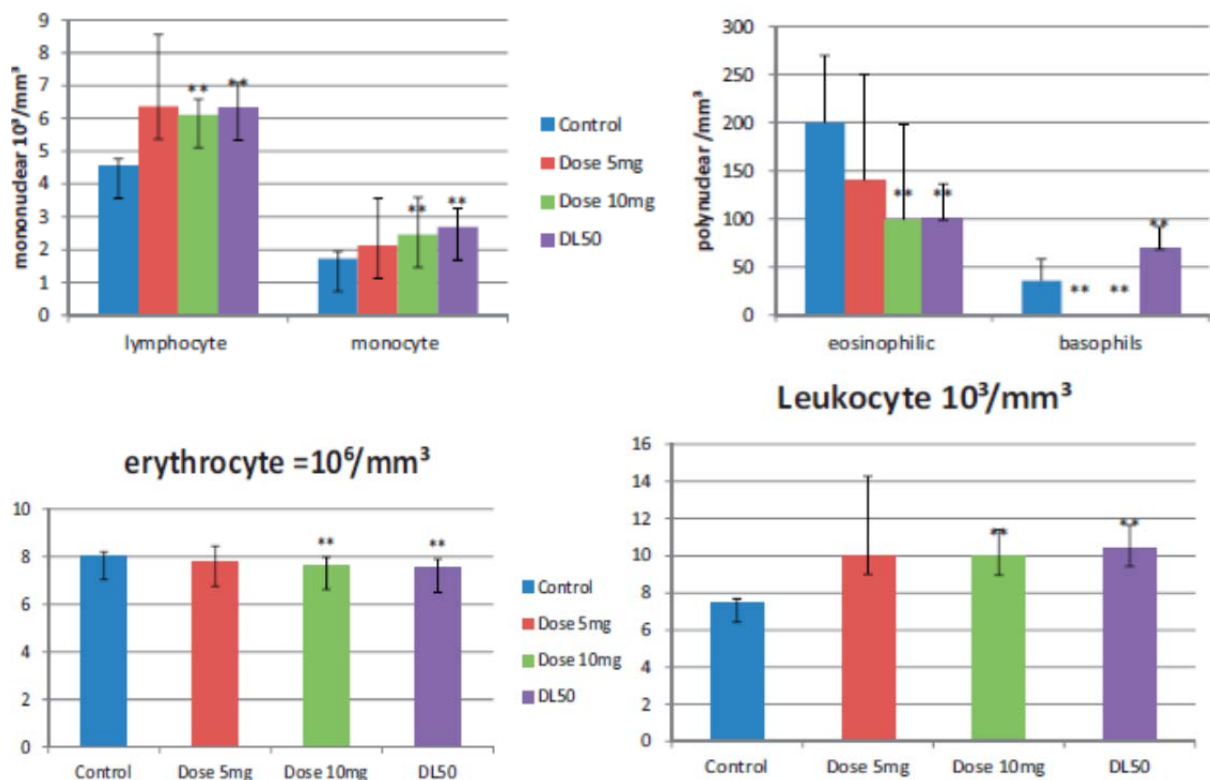
Les monocytes macrophages, augmentent avec la dose 10 mg/l et DL50, sécrètent des quantités importantes de cytokines (environ 10 à 100 fois plus que les polynucléaires neutrophiles) et jouent ainsi un rôle majeur dans la régulation des réponses immunitaires ; sous l'influence d'un gradient de concentration de molécules chimio-attractantes (ACR) dans notre cas. Elles sont capables de migrer de façon orientée vers un site infectieux ou inflammatoire [160].

Les concentrations faibles des hématies (dose 10 mg/l et DL50) correspondent à un taux de globules rouges inférieur à la normale (témoin). L'anémie est négociée par des cytokines produites par les cellules inflammatoires, qui mènent aux diminutions de la disponibilité de fer. L'anémie hypochrome de microcyte résulte principalement de l'insuffisance de fer [146]. Ces résultats peuvent indiquer un état d'érythropoïèse fer-déficiente chronique [159] et, à un certain degré, des résultats de la maladie chronique [146]. L'anémie hypochrome de microcyte résulte d'une réponse insuffisante à l'érythropoïétine. Cependant, ce mécanisme peut être important dans l'échec rénal chronique, qui pourrait se produire à la suite de l'administration d'ACR [19].

Des changements des caractéristiques physico-chimiques des membranes biologiques d'érythrocyte accompagné d'une diminution de leurs nombres est observé après administration d'ACR [149].

D'autre part, selon Vert, (2000) La bilirubine libre circule dans le sang liée à l'albumine. Ainsi De faibles fractions de bilirubine sont liées aux lipoprotéines et aux α -globulines [144] et d'après Le bilan biologique établi par Bertrand, (2010) chez des enfants atteints d'un déficit immunitaire primitif a montré une anémie (Hb < 11 g/dl) chez 35 enfants (57,3%) et une hypo albuminémie (< 30g/l) chez 2/25 patients [161], on peut attribue l'anémie enregistré dans notre étude en combinaisons avec les autre variations biochimiques et sériques signalées a un début de déficit immunitaire primitif chez les rats Wistar traité a l'ACR.

Les résultats du profil hématologique, indiqués dans la Figure 34, prouvent qu'il y a une différence significative ($p < 0.05$) entre le Groupe témoin et les Groupes 3 (10 mg/L) et 4 (DL50). A savoir une diminution des hématies ($7,61 \pm 0,36$) chez le Groupe 3 et Groupe 4 ($7,50 \pm 0,40$), avec une augmentation de VGM ($58,40 \pm 1,34$) et de TCMH ($16,80 \pm 0,54$) chez le Groupe 4 (DL50).



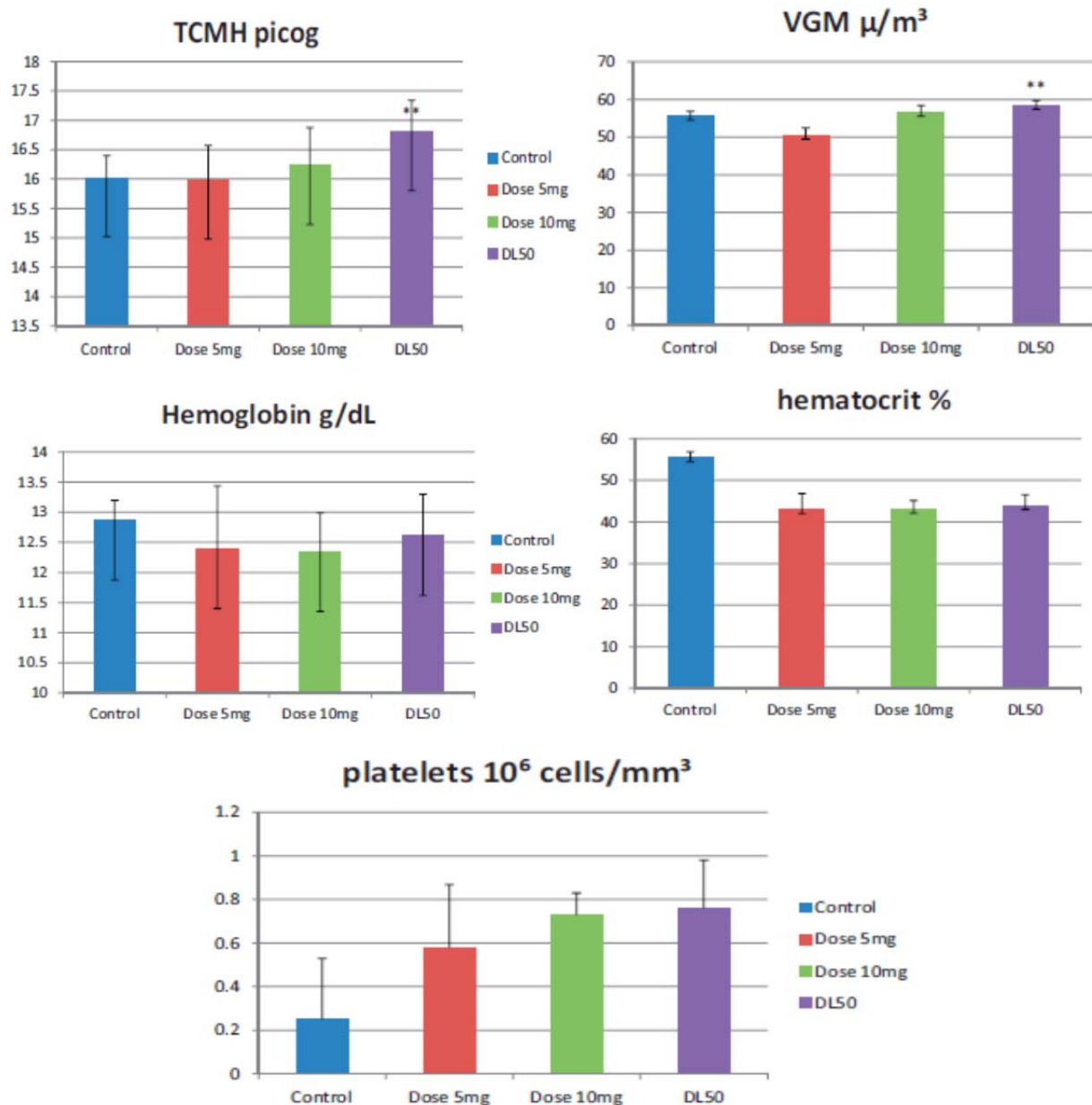


Figure 34: Effet de l'ACR administré sur la numération globulaire complète (CBC) (réalisée en utilisant la méthode de détection de courant continu (Sysmex XT 4000i Automated Hematology Analyzer)

Chaque valeur représente la moyenne \pm écart-type.

** Statistiquement significatif par rapport au groupe témoin; $p < 0,05$.

4. Evaluation de l'impact d'ACR sur le poids des rats

L'évolution du poids des rats exposés à divers doses d'ACR est mentionnée dans la Figure 35.

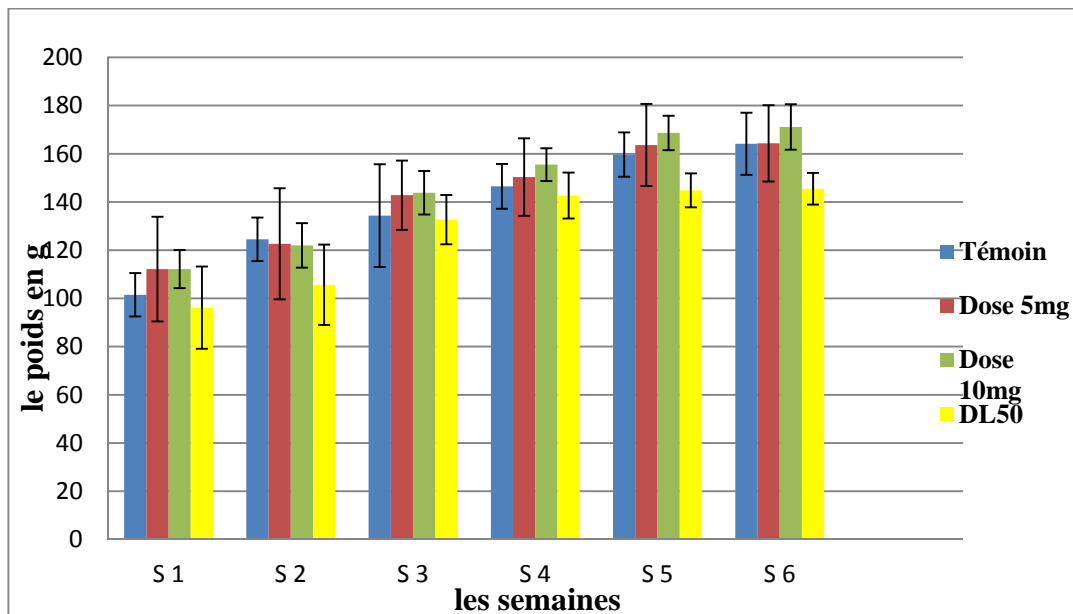


Figure 35 : Effet de l'acrylamide sur l'évolution de poids corporel des rats.

Chaque valeur représente la moyenne \pm écart-type.

** Statistically significant compared to control group; $p < 0.05$.

Au début de l'expérimentation, les rats utilisés dans cette étude ont un poids homogènes autour de 100 ± 10 g, une augmentation du poids des 4 Groupes est enregistrée à la fin de l'expérimentation avec un gain $55,79 \pm 6,11$ g par rapport au poids initiale des rats. Une baisse de poids est signalée à partir du14ème jour avant la fin de l'expérimentation (deux dernières semaines après le gavage) pour le Groupe 4 (DL50) par rapport au témoin. Une diminution significative de poids corporel chez le rat traité avec diverses concentrations d'ACR par rapport aux groupes témoin. (Figure 35).

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Shler et *al.* (2015), qui confirment une diminution significative du poids corporel chez le rat Wistar traité avec divers concentrations d'ACR par rapport aux groupes témoins et l'attribut a la dégradation des tissus et des cellules sanguines dans le foie et les reins [138].

L'effet de l'acrylamide sur le poids corporel a été démontré de façon répété chez de nombreux modèles animaux [162][163][164]. Des études chez l'animal ont montré que l'exposition à l'acrylamide réduit le poids corporel, il a été démontré que l'exposition quotidienne à de fortes

doses d'acrylamide peut entraîner une diminution de la motivation de l'appétit ou un gain de poids réduit, qui pourrait être dû à une augmentation du stress oxydatif [162].

5. Evaluation de l'impact d'ACR sur le poids des organes

Les résultats de l'évaluation de l'impact d'ACR sur le poids des organes des rats « Wistar » sont représentés dans la Figure 36.

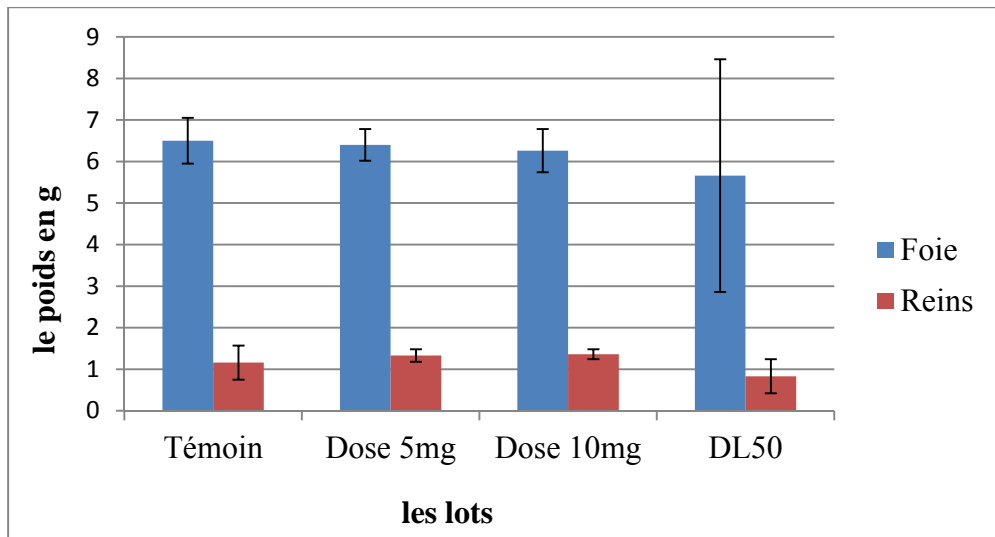


Figure 36 : Evolution du poids des organes des rats.

Les données sont présentées sous forme de moyenne (\bar{X}) \pm ET, n=6

Les résultats montrent qu'il n'y a aucune différence significative ($p > 0.05$) du poids des reins et des foies entre le témoin et le Groupe 2 (5mg/L) et Groupe 4 (DL50). Une diminution significative ($p < 0.05$) du poids du foie ($6,26 \pm 0,52g$) est enregistrée chez le Groupe 3 (10mg/L) par rapport au témoin (Figure 36).

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par kalipci et *al.* (2012), les poids du foie des rats exposaient à 5 mg/kg/jour et 10 mg/kg/jour d'acrylamide comparés entre eux et avec ceux des autres groupes, n'ont montré aucune différence significative ($p > 0.05$). [165]. Les résultats d'Osman et *al.* (2016), ont montré une diminution significative du poids relatif du foie, du cerveau et des testicules dans le groupe à 0.11 mg/kg/jour d'ACR comparé au groupe témoin [166].

Vu la discordance dans les résultats, des recherches supplémentaires sont donc nécessaires pour obtenir une meilleure compréhension des effets d'ACR sur le poids des organes chez les rats «wistar».

6. Analyse factorielle exploratoire

Cette analyse a permis de regrouper les éléments dont les variations sont similaires entre les valeurs dans l'augmentation et la diminution afin de faire le lien l'effet de la néphrotoxicité ou de l'hépatotoxicité sur le changement immunitaire, ces similitudes sont remarquées du côté :

-Biochimie sérique : variation similaire entre (bilirubine conjugué, totale et libre),(Créatinine Sodium ,Chlore et Phosphatase alcaline) et (SGOTT ,SGPTT et Potassium).

-Bilan lipidique : variation similaire entre (Triglycéride, VLDLT, et Cholestérol total /HDL), (Cholestérol total et HDL) et (Cholestérol LDL et Cholestérol LDLHDL)

-FNS : variation similaire entre (Leucocyte Lymphocyte Monocyte Plaquettes Neutrophile) ,(TCMH CCMH Hémoglobine VGM) ,(Lymphocyte Neutrophile Monocyte Basophiles) et(Hématie Hématocrite)

-Globulines sériques : variation similaire entre (Gammaglobuline Beta1globuline Beta2globuline) ,(Alpha1globuline Alpha2globuline) et (Albumine Protéines totales).

L'étude anatomopathologique a permis la mise en place l'intervention des cellules de Kupffer, Les cellules de Kupffer sont un composant essentiel du système phagocytaire mononucléaire et sont essentielles à la réponse hépatique et systémique aux agents pathogènes[167]. Les cellules de Kupffer réapparaissent en tant que médiateurs critiques de la lésion et de la réparation du foie. Les cellules de Kupffer présentent une plasticité énorme; en fonction de l'environnement métabolique et immunitaire local, peuvent alors s'exprimer et se différencier en macrophages pro-inflammatoire (M1) ou anti-inflammatoire (M2) en fonction des cytokines en présence, chacun impliqué dans la résolution de l'inflammation et de la cicatrisation[168]

D'autre part, Ces variations est due à l'existence d'une relation fonctionnelle entre les différents organes suite à l'intervention des médiateurs de l'expression génétique[169].

L'action cancérogène de l'acrylamide a été confirmée par la mise en œuvre expérimentale des recherches sur des animaux de laboratoire et par des études épidémiologiques. On s'est avéré que l'acrylamide est un initiateur de cancer de foie où des structures néo-plastiques et le changement histopathologique[148]et semble exercer des effets génotoxique en cellules par des dommages oxydants d'ADN induits par des espèces réactives intracellulaires de l'oxygène (ROS) et épuisement du glutathion (GSH) qui est impliqué dans son détoxification[170].

Selon une étude sur les Dioxines dans l'environnement en 2000 ; Après la découverte par Poland en 1976 du récepteur Ah, des résultats privilégient une fonction de « chef d'orchestre » de AhR dans le contrôle des effets toxiques des dioxines, des paramètres pharmacologiques (capacité de liaison, affinité, liaison à l'ADN) des AhR de hamster, de rat et de cobaye sont d'ordres comparables. Enfin L'expression d'AhR, considérable dans le poumon, est modérée dans le foie et le rein et plus faible dans le coeur, la rate et le muscle squelettique. Arnt s'exprime à niveau constant dans ces tissus[171].

Suite à l'expression de quelques gènes d'immuno-réaction, les résultats d'une étude ont indiqué que des gènes ont été réglés dans des échantillons de testicule et de foie traités avec les doses moyennes et élevées de l'acrylamide au traitement de 4 semaines et plus fortement vers le haut-ont été réglés avec toutes les doses d' acrylamide au traitement de 12 semaines. À notre connaissance, les effets toxicologiques de l'acrylamide sur le profil d'expression de gènes d'immuno-réaction chez le rat n'ont pas été rapportés dans la littérature[12][172].

7. Etude anatomopathologique des reins et foies

Les résultats de l'étude anatomopathologique du foie et des reins des rats exposés à différentes doses d'ACR sont illustrés par les figures 39 et 40. Aucune lésion spécifique n'a été identifiée au niveau des reins dans les trois groupes traités par l'ACR (Figure 38). Cependant, des lésions hépatiques avec dépôts de pigments bruns (métabolisation / déchets d'ACR) plus ou moins dispersés dans les cellules de Kupfer ont été observées dans les trois groupes traités (B : 100%, C : 83.33% et D : 100%) et sont associées à des lésions de congestion et d'hémorragie sur 33% des animaux du groupe D (Figure 37).

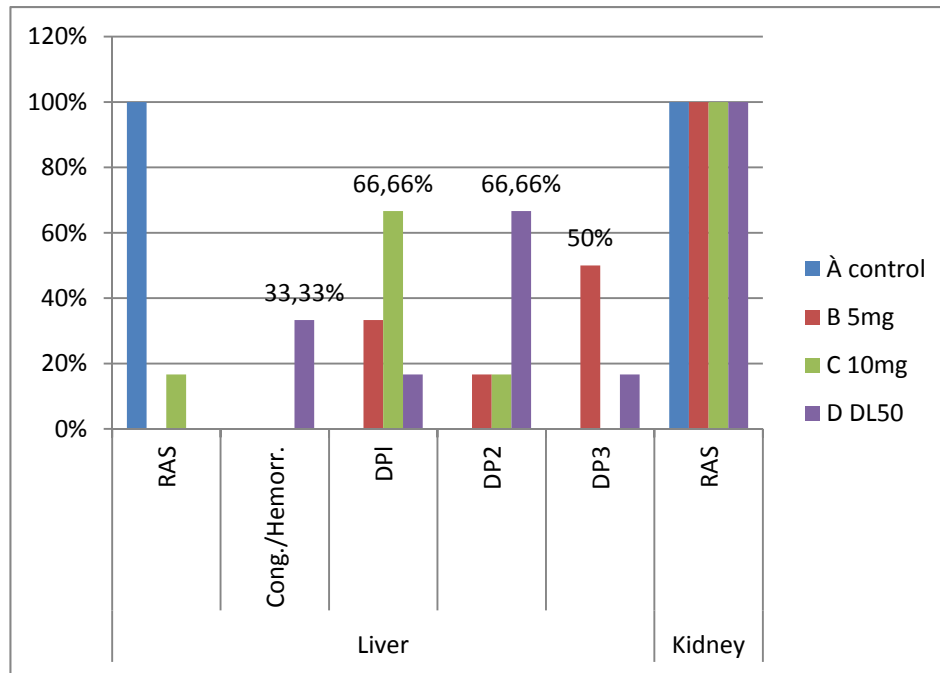


Figure 37 : Pourcentage de lésions hépatiques et rénales chez les rats atteints d'ACR

A: Foie d'un rat témoin; ne montrant aucune lésion spécifique. **B:** Foie de rats traités avec 5 mg / L d'ACR; montrant 50% de dépôt de pigment (DP3) dans des cellules de Kupffer. **C:** Foie de rats traités avec 10 mg / L d'ACR montrant 66% de dépôt de pigment (DP1) dans des cellules de Kupffer. **D:** foie de rats traités avec DL50 montrant 66% de dépôt de pigment (DP2) dans les cellules de Kupffer et 33% de la congestion et des hémorragies des sinusoides du foie.

Légende RAS = Aucune lésion spécifique; Cong./Hemorr. = Congestion et hémorragies; DP = Dépôts pigmentaires Cellules de Kupffer DP1 = +, DP2 = ++, DP3 = +++

Parmi les très nombreuses protéines de la réaction inflammatoire aiguë (RIA) on compte : l' α -antitrypsine et la protéine C-réactive. L'expression et la synthèse de l' α -antitrypsine augmentent au cours d'une RIA dans les cellules de Kupffer [173]. Les cellules de Kupffer sont des macrophages et peuvent aussi, en plus de leur rôle dans la production de certaines protéines de la RIA, sécréter des médiateurs de l'inflammation, en particulier l'interleukine [154].

Les reins des rats traités ne montrent aucune lésions spécifiques par rapport aux témoins

La figure 38 illustre l'activation des cellules de Kupffer (Flèche noire). Ces résultats peuvent être interprétés comme suit : le foie des rats dans les groupes traités avec trois doses différentes d'ACR a montré des changements dégénératifs des hépatocytes avec une congestion des vaisseaux sanguins (veinules portales) et l'infiltration de quelques cellules inflammatoires mononucléaires, particulièrement des secteurs portaux.

Le foie des rats dans le groupe traité à la dose élevée a également montré une infiltration modérée des cellules inflammatoires mononucléaires, a encombré des vaisseaux sanguins et la plupart des hépatocytes souffraient de la nécrose.

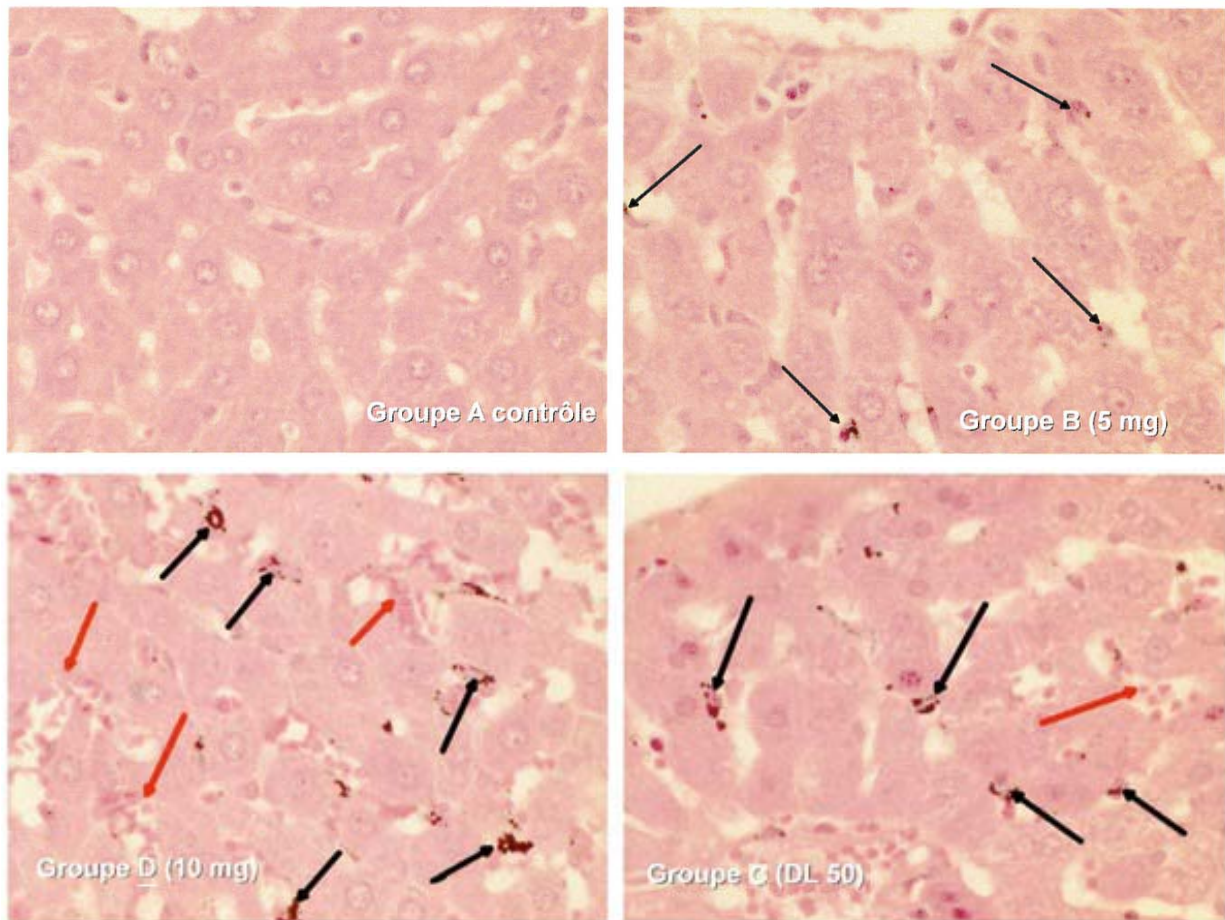


Figure 38: **A:** Foie d'un rat témoin montrant une histologie normale et pas de lésion spécifique ; **B:** Foie de rats traités avec 5 mg / L d'ACR montrant un faible dépôt de pigment dans les cellules de Kupffer ; **C:** Foie de rats traités avec 10 mg / L d'ACR montrant un fort dépôt de pigment dans les cellules de Kupffer et une faible congestion sinusoidale ; **D:** foie de rats traités avec DL50 de ACR montrant un fort dépôt de pigment dans les cellules de Kupffer, une forte congestion et des hémorragies des sinusoides hépatiques. Section des foies; Obj 40 ×12,5. A (témoin), B (5 mg), C (10 mg) et D (DL50). **Légende:** Flèche rouge: congestion sinusoidale; Flèche noire: dépôt de pigment dans les cellules de Kupffer

Les changements dégénératifs observés dans cette étude indiquent l'action locale de l'ACR sur le foie et les reins ; car ils sont les lieux d'exploitation principaux de la désintoxication et excréation des matériaux toxiques des substances administrées [138]. D'ailleurs, les dommages dans les hépatocytes étaient beaucoup plus marqués que ceux observés dans les lymphocytes périphériques du sang, suggérant que le foie soit une cible primaire chez les rats pour la génotoxicité d'ACR [138].

Conclusion générale

D'après les résultats de cette étude, nous pouvons conclure que l'exposition à l'acrylamide des produits alimentaires chez les citoyens algériens est similaire à celle des autres pays. Conformément aux recommandations de l'OMS-FAO, de l'EFSA et de la FDA, l'exposition et la concentration d'acrylamide dans les aliments couramment présents dans le régime alimentaire devrait être réduite notamment celle liée à la consommation du pain et de la pomme de terre.

L'étude *in vivo* sur les rats Wistar montre clairement que l'administration par voie orale de l'acrylamide à différentes doses a induit des changements de profil des différents systèmes hématologiques, biochimiques et immunologiques, ainsi que dans le foie et les reins.

L'équilibre leucocytaire a montré des différences significatives pour toutes les lignées : leucocytes, basophiles, monocytes, lymphocytes et les éosinophiles. D'après les résultats trouvés, nous pouvons déduire que l'acrylamide perturbe l'équilibre du statut leucocytaire.

L'électrophorèse des protéines sériques a montré des différences significatives qui touchent les protéines totales, l'albumine, l'alpha 1 et beta globuline, avec une tendance d'augmentation des gamma globuline. D'après ces résultats, nous pouvons déduire que l'acrylamide a un effet sur certains paramètres du système immunitaire.

Les différences significative dans les paramètres biochimiques ont confirmé les effets toxique de l'acrylamide. A noté que les différences non significative ne peuvent pas être ignorées vue les autres changements et qu'elles signifient l'incapacité des organes impliqués à réagir face à la toxicité de l'acrylamide.

Le suivi du poids corporels et le poids des organes (foie et reins) des rats, pendant la durée de l'expérimentation, a montré des diminutions significatives chez les groupes recevant l'acrylamide par rapport au témoin.

Le diagnostic des pathologies et comportements chez les rats durant l'expérimentation a montré des changements anormaux, tels que des diarrhées sanglantes, des gonflements des tissus et une paralysie des membres chez les lots soumis à l'acrylamide. Ces phénomènes résultant du dysfonctionnement hépatique et rénal induisant le déficit immunitaire et confirmant la neurotoxicité d'acrylamide.

L'étude anatomopathologique a confirmé l'effet toxique de l'acrylamide sur le foie et les reins et permet de confirmer et justifié les causes des changements sur les paramètres étudiés

La combinaison des analyses biochimiques, analyses immunologiques, études anatomopathologiques et les résultats d'autres études similaires indiquent la présence d'une l'immunodéficience primaire et perturbation immunohématologiques suite aux effets génotoxiques et neurotoxiques de l'acrylamide sur l'organisme et dans les reins et le foie .

Pour approfondir plus, cette étude, notre travail pourra être complété par :

- L'effet d'acrylamide sur les cellules de système immunitaire, et pour une meilleure compréhension, il serait souhaitable d'utiliser des approches moléculaires pour examiner les gènes responsables de l'expression de l'immunoréaction pour l'acrylamide ;
- L'effet toxique par accumulation à long de terme de l'acrylamide ;
- Des mesures et des recommandations sont nécessaires afin de déduire les taux d'acrylamide dans les aliments ;

Références bibliographiques

- [1] A. Toker, "Evaluation of Some Renal Function Parameters in Rats Treated with Acrylamide," *ARC J. Anim. Vet. Sci.*, vol. 2, no. 1, pp. 1–8, 2016.
- [2] M. A. Slayne and D. R. Lineback, "Acrylamide: considerations for risk management," *J. AOAC Int.*, vol. 88, no. 1, pp. 227–233, 2005.
- [3] I. Birlouez-aragon, "LA RÉACTION DE MAILLARD DANS LES ALIMENTS : QUELS ENJEUX POUR LA SANTÉ HUMAINE ?," *Cah. Nutr. Diététique*, vol. 43, no. 6, pp. 289–295, 2002.
- [4] A. Becalski, B. P. Y. Lau, D. Lewis, and S. W. Seaman, "Acrylamide in foods: Occurrence, sources, and modeling," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, no. 3, pp. 802–808, 2003.
- [5] F. Mendel, "Chemistry , Biochemistry , and Safety of Acrylamide . A Review," pp. 4504–4526, 2003.
- [6] B. Brisson-gauthier and F. D. E. Medecine, "RELATION ENTRE L ' EXPOSITION A L ' ACRYLAMIDE PAR L ' ALIMENTATION , LES MARQUEURS DE DOSE INTERNE ET LES CASSURES À L ' ADN LYMPHOCYTAIRE CHEZ DES," 2012.
- [7] E. Tareke, P. Rydberg, P. Karlsson, S. Eriksson, and M. Törnqvist, "Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, no. 17, pp. 4998–5006, 2002.
- [8] WHO, *Evaluation of certain food contaminant*, no. 930. 2005.
- [9] J. (Joint F. E. C. on F. Additives), "Summary and Conclusion. Sixty-Fourth meeting, Rome, 8-17 February, 2005." JECFA/64/SC, <http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/en>, 2005.
- [10] C. D. U. C. S. U. R. LES ADDITIFS, "PROGRAMME MIXTE FAO/OMS SUR LES NORMES ALIMENTAIRES COMITÉ DU CODEX SUR LES ADDITIFS ALIMENTAIRES ET LES CONTAMINANTS Trente-septième session La Haye (Pays-Bas), 25–29 avril 2005," 2004.

- [11] T. Wenzl, M. B. De La Calle, and E. Anklaam, “Analytical methods for the determination of acrylamide in food products: a review,” *Food Addit. Contam.*, vol. 20, no. 10, pp. 885–902, 2003.
- [12] J. Park, L. M. Kamendulis, M. A. Friedman, and J. E. Klaunig, “Acrylamide-induced cellular transformation,” *Toxicol. Sci.*, vol. 65, no. 2, pp. 177–183, 2002.
- [13] B. Eman, M. Abd El-Mottaleb, and Y. M. Rashed, “Some Studies On Acrylamide Intoxication In Male Albino Rats,” *Path. Clin. Path*, vol. 21, no. 4, pp. 222–245, 2008.
- [14] S. Ménoret *et al.*, “Generation of Rag1 -knockout immunodeficient rats and mice using engineered meganucleases,” pp. 703–711.
- [15] W. K. B. Khalil, H. H. Ahmed, H. F. Aly, and M. G. Eshak, “Expression Profile in Rats,” vol. 24, no. 1, pp. 143–151, 2014.
- [16] S. Akram, F. Mahmood, K. Amin, H. S. Rahman, and H. H. Othman, “The Pathophysiological Effects of Acrylamide in Albino Wister Rats,” *Int. J. Med. Res. Heal. Sci.*, vol. 5, no. 7, pp. 42–48, 2016.
- [17] M. J. Miller, D. E. Carter, and I. G. Sipes, “Pharmacokinetics of acrylamide in Fisher-334 rats,” *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 63, no. 1, pp. 36–44, 1982.
- [18] F. J. Tessier, P. Jacolot, and C. Niquet-Léridon, “La réaction de Maillard: cent ans de découvertes scientifiques,” in *FFAS*, 2012, vol. Conférence, p. 12.
- [19] A. Besaratinia and G. P. Pfeifer, “A review of mechanisms of acrylamide carcinogenicity,” *Carcinogenesis*, vol. 28, no. 3, pp. 519–528, 2007.
- [20] M. Friedman, “Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, no. 16, pp. 4504–4526, 2003.
- [21] C. Klein, “L’acrylamide, contaminant alimentaire cancérigène méconnu?,” Thèse, université HENRI POINCARÉ, Nancy, 132 ; p 3-6, 2007.
- [22] B. I. Ghanayem *et al.*, “Role of CYP2E1 in the epoxidation of acrylamide to glycidamide and formation of DNA and hemoglobin adducts,” *Toxicol. Sci.*, vol. 88, no. 2, pp. 311–318, 2005.
- [23] INRS, France. *Institut national de recherche et de sécurité, Fiche toxicologique no*

- 119 : *Acrylamide. Cahiers de notes documentaires. Paris : INRS. (2007). [RE-005509].*
2007, pp. 1–10.
- [24] R. WEISSHAAR and B. Gutsche, “Formation of acrylamide in heated potato products-model experiments pointing to asparagine as precursor,” *Dtsch. Leb.*, vol. 98, no. 11, pp. 397–400, 2002.
- [25] E. A. Smith, S. L. Prues, and F. W. Oehme, “Environmental degradation of polyacrylamides. 1. Effects of artificial environmental conditions: temperature, light, and pH,” *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 35, no. 2, pp. 121–135, 1996.
- [26] O. de coopération et de développement économiques (OCDE), *Les biotechnologies au service de la durabilité industrielle*, 2001st ed. 2001.
- [27] A. D. McNaught and A. Wilkinson, “International Union of Pure and Applied Chemistry,” *Compend. Chem. Terminol. IUPAC Recomm.*, vol. 2, 1997.
- [28] M. Kobayashi, T. Nagasawa, and H. Yamada, “Enzymatic synthesis of acrylamide: a success story not yet over,” *Trends Biotechnol.*, vol. 10, pp. 402–408, 1992.
- [29] O. B. Astaurova, T. E. Leonova, I. N. Poliakova, I. V Sineokaia, V. K. Gordeev, and A. S. Ianenko, “Adaptation of acrylamide producer *Rhodococcus rhodochrous* M8 to change in ammonium concentration in medium,” *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, vol. 36, no. 1, pp. 21–25, 2000.
- [30] S. Ōtles and S. Otles, “Acrylamide in food: chemical structure of acrylamide,” *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.*, vol. 3, no. 5, pp. 1–8, 2004.
- [31] I. Blank *et al.*, “Mechanisms of acrylamide formation,” in *Chemistry and safety of acrylamide in food*, Springer, 2005, pp. 171–189.
- [32] L. C. Maillard, “Action des acides aminés sur les sucres; formation des mélanoidines par voie methodique.,” *Comptes R. Acad. Sci.(Paris)*, vol. 154, pp. 66–68, 1912.
- [33] J. E. Hodge, “Dehydrated foods, chemistry of browning reactions in model systems,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 1, no. 15, pp. 928–943, 1953.
- [34] K. Skog and J. Alexander, *Acrylamide and other hazardous compounds in heat-treated foods*. Woodhead Publishing, 2006.

- [35] I. Birlouez-Aragon, “La réaction de Maillard dans les aliments: quels enjeux pour la santé humaine?,” *Cah. Nutr. Diet.*, vol. 43, no. 6, pp. 289–295, 2008.
- [36] K. Cheng, F. Chen, and M. Wang, “Heterocyclic amines: chemistry and health,” *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 50, no. 12, pp. 1150–1170, 2006.
- [37] I. Birlouez-Aragon, F. Morales, V. Fogliano, and J.-P. Pain, “The health and technological implications of a better control of neoformed contaminants by the food industry,” *Pathol. Biol.*, vol. 58, no. 3, pp. 232–238, 2010.
- [38] M.-X. Fu, J. R. Requena, A. J. Jenkins, T. J. Lyons, J. W. Baynes, and S. R. Thorpe, “The advanced glycation end product, N-(carboxymethyl) lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions,” *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 17, pp. 9982–9986, 1996.
- [39] A. Charissou, L. Ait-Ameur, and I. Birlouez-Aragon, “Evaluation of a gas chromatography/mass spectrometry method for the quantification of carboxymethyllysine in food samples,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1140, no. 1–2, pp. 189–194, 2007.
- [40] K. J. Knecht *et al.*, “Effect of diabetes and aging on carboxymethyllysine levels in human urine,” *Diabetes*, vol. 40, no. 2, pp. 190–196, 1991.
- [41] T. Kislinger *et al.*, “N ϵ -(carboxymethyl) lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression,” *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 44, pp. 31740–31749, 1999.
- [42] R.-Y. Lin *et al.*, “Dietary glycotoxins promote diabetic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice,” *Atherosclerosis*, vol. 168, no. 2, pp. 213–220, 2003.
- [43] O. A. Sandu *et al.*, “Insulin Resistance (ir) and Type 2 Diabetes (t2d) in High Fat-fed Mice Are Linked to High Glycotoxin, Rather Than High Fat Intake,” *Diabetes*, vol. 53, pp. A20–A21, 2004.
- [44] H. F. Erbersdobler and V. Faist, “Metabolic transit of Amadori products,” *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 45, no. 3, pp. 177–181, 2001.
- [45] M. Negrean *et al.*, “Effects of low-and high-advanced glycation endproduct meals on macro-and microvascular endothelial function and oxidative stress in patients with type

- 2 diabetes mellitus-,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 85, no. 5, pp. 1236–1243, 2007.
- [46] G. Saavedra *et al.*, “Les produits de Maillard issus de la cuisson ont-ils des effets biologiques?,” *Sci. Aliments*, vol. 28, no. 3, pp. 223–230, 2008.
- [47] P. Pouillart *et al.*, “Strategy for the study of the health impact of dietary Maillard products in clinical studies,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1126, no. 1, pp. 173–176, 2008.
- [48] D. V Zyzak *et al.*, “Acrylamide formation mechanism in heated foods,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, no. 16, pp. 4782–4787, 2003.
- [49] V. A. Yaylayan, A. Wnorowski, and C. Perez Locas, “Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, no. 6, pp. 1753–1757, 2003.
- [50] R. H. Stadler *et al.*, “In-depth mechanistic study on the formation of acrylamide and other vinylogous compounds by the Maillard reaction,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 17, pp. 5550–5558, 2004.
- [51] M. Anese, B. Quarta, L. Peloux, and S. Calligaris, “Effect of formulation on the capacity of l-asparaginase to minimize acrylamide formation in short dough biscuits,” *Food Res. Int.*, vol. 44, no. 9, pp. 2837–2842, 2011.
- [52] A. Yasuhara, Y. Tanaka, M. Hengel, and T. Shibamoto, “Gas chromatographic investigation of acrylamide formation in browning model systems,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, no. 14, pp. 3999–4003, 2003.
- [53] W. H. O. F. S. Programme, *Health Implications of Acrylamide in Food: Report of a Joint FAO/WHO Consultation, WHO Headquarters, Geneva, Switzerland, 25-27 June 2002*. World Health Organization, 2002.
- [54] D. Sharp, “Acrylamide in food,” *Lancet*, vol. 361, no. 9355, pp. 361–362, 2003.
- [55] F. A. O. Joint and W. H. O. E. C. on F. Additives, “Sixty-Fourth meeting, Rome, 8–17 February 2005,” JECFA/64/SC, summary and conclusion. <http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/en>, 2005.
- [56] K. S. Leung, A. Lin, C. K. Tsang, and S. T. K. Yeung, “Acrylamide in asian foods in Hong Kong,” *Food Addit. Contam.*, vol. 20, no. 12, pp. 1105–1113, 2003.

- [57] D. Taeymans *et al.*, “A review of acrylamide: an industry perspective on research, analysis, formation, and control,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 44, no. 5, pp. 323–347, 2004.
- [58] L. Castle and S. Eriksson, “Analytical methods used to measure acrylamide concentrations in foods,” *J. AOAC Int.*, vol. 88, no. 1, pp. 274–284, 2005.
- [59] C. D. U. C. S. U. R. LES ADDITIFS and A. E. T. LES CONTAMINANTS, “DOCUMENT DE TRAVAIL SUR L’ACRYLAMIDE,” 2011-03-27, 2006. [Online]. Available: ftp://ftp.fao.org/codex/ccfac38/fa38_35f.pdf. [Accessed: 27-Mar-2011].
- [60] M. I. Boettcher, T. Schettgen, B. Kütting, M. Pischetsrieder, and J. Angerer, “Mercapturic acids of acrylamide and glycidamide as biomarkers of the internal exposure to acrylamide in the general population,” *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 580, no. 1, pp. 167–176, 2005.
- [61] M. I. Boettcher, H. M. Bolt, H. Drexler, and J. Angerer, “Excretion of mercapturic acids of acrylamide and glycidamide in human urine after single oral administration of deuterium-labelled acrylamide,” *Arch. Toxicol.*, vol. 80, no. 2, pp. 55–61, 2006.
- [62] S. B. Stølevik, “Immunotoxic effects of dietary toxicants: focus on prenatal exposure to acrylamide, polychlorinated biphenyls and dioxins,” 2012.
- [63] T. R. Fennell *et al.*, “Metabolism and hemoglobin adduct formation of acrylamide in humans,” *Toxicol. Sci.*, vol. 85, no. 1, pp. 447–459, 2004.
- [64] S. C. J. Sumner, J. P. MacNeela, and T. R. Fennell, “Characterization and quantitation of urinary metabolites of [1, 2, 3-¹³C] acrylamide in rats and mice using carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy,” *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 5, no. 1, pp. 81–89, 1992.
- [65] P. A. Louise Normandin, Michèle Bouchard, “Importance de l’exposition à l’acrylamide par l’alimentation chez une population potentiellement vulnérable,” 2014.
- [66] U. S. EPA, “Toxicological review of acrylamide in support of summary information on the integrated risk information systems (IRIS),” *US Environ. Prot. Agency*, 2010.
- [67] T. R. Fennell, S. C. J. Sumner, R. W. Snyder, J. Burgess, and M. A. Friedman, “Kinetics of elimination of urinary metabolites of acrylamide in humans,” *Toxicol. Sci.*, vol. 93,

- no. 2, pp. 256–267, 2006.
- [68] B. Brisson *et al.*, “Relation between dietary acrylamide exposure and biomarkers of internal dose in Canadian teenagers,” *J Expo. Sci Env. Epidemiol*, vol. 24, no. 2, pp. 215–221, 2014.
- [69] I. Manière, “Identification et caractérisation du danger d’un contaminant alimentaire, l’acrylamide, par l’étude de la génotoxicité, de l’hépatocarcérogénicité et de la biodisponibilité orale chez le rat et le porc.” Rennes 1, 2006.
- [70] M. Törnqvist, L. Ehrenberg, and L. Hagmar, “Leakage of acrylamides from a tunnel construction work: exposure monitoring and health effects to humans and animals,” in *MS for European ALARA Network workshop, Antwerp, Belgium*, 2000, pp. 1–8.
- [71] J. J. Collins, G. M. H. Swaen, G. M. Marsh, H. M. Utidjian, J. C. Caporossi, and L. J. Lucas, “Mortality patterns among workers exposed to acrylamide.,” *J. Occup. Med. Off. Publ. Ind. Med. Assoc.*, vol. 31, no. 7, pp. 614–617, 1989.
- [72] E. Bergmark, “Hemoglobin adducts of acrylamide and acrylonitrile in laboratory workers, smokers and nonsmokers,” *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 10, no. 1, pp. 78–84, 1997.
- [73] C. J. Smith, T. A. Perfetti, M. A. Rumble, A. Rodgman, and D. J. Doolittle, “IARC group 2A Carcinogens’ reported in cigarette mainstream smoke,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 38, no. 4, pp. 371–383, 2000.
- [74] T. Schettgen, T. Weiss, H. Drexler, and J. Angerer, “A first approach to estimate the internal exposure to acrylamide in smoking and non-smoking adults from Germany,” *Int. J. Hyg. Environ. Health*, vol. 206, no. 1, pp. 9–14, 2003.
- [75] L. Hagmar *et al.*, “Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose,” *Scand. J. Work. Environ. Health*, pp. 219–226, 2001.
- [76] EFSA, “Réévaluation de l’ingestion d’acrylamide par la population belge,” Réévaluation de l’ingestion d’acrylamide par la population belge, 2014.
- [77] FAO/OMS, “DOCUMENT DE TRAVAIL SUR L’ACRYLAMIDE,” vol. CX/FAC 06/, 2006.

- [78] E. Dybing *et al.*, “Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 43, no. 3, pp. 365–410, 2005.
- [79] Santé Canada, “Acrylamide et aliments,” *S.C ©Tous droits réservés. Acrylamide et aliments. Santé Canada 2017. Adapté et reproduit avec la permission du Ministre de la santé*, 2018. .
- [80] K. Svensson *et al.*, “Dietary intake of acrylamide in Sweden,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 41, no. 11, pp. 1581–1586, 2003.
- [81] G. Gamboa da Costa *et al.*, “DNA adduct formation from acrylamide via conversion to glycidamide in adult and neonatal mice,” *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 16, no. 10, pp. 1328–1337, 2003.
- [82] J. Manson *et al.*, “NTP-CERHR Expert Panel report on the reproductive and developmental toxicity of acrylamide,” *Birth Defects Res. Part B Dev. Reprod. Toxicol.*, vol. 74, no. 1, pp. 17–113, 2005.
- [83] A. Sharma and J. Jain, “Effects of oral exposure of acrylamide on plasma levels of thyroid hormones and haematological parameters in the Swiss albino mice,” *Asian J. Exp. Sci*, vol. 22, no. 3, pp. 317–324, 2008.
- [84] ECB, *European Union Risk Assessment Report: Acrylamide*. 2002.
- [85] H.-J. Yang, S.-H. Lee, Y. Jin, J.-H. Choi, C.-H. Han, and M.-H. Lee, “Genotoxicity and toxicological effects of acrylamide on reproductive system in male rats,” *J. Vet. Sci.*, vol. 6, no. 2, pp. 103–109, 2005.
- [86] F. Lyon, “IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans,” *Some Ind. Chem.*, vol. 60, pp. 389–433, 1994.
- [87] T. NICNAS, “Priority existing chemical assessment report no. 23,” *Natl. Ind. Chem. Notif. Assess. Scheme, Dep. Heal. Ageing, Aust. Gov. Sydney, Aust.*, 2002.
- [88] K. Aalto-Korte, R. Jolanki, K. Suuronen, and T. Estlander, “Biochemist’s occupational allergic contact dermatitis from iodoacetamide and acrylamide,” *Contact Dermatitis*, vol. 47, no. 6, pp. 361–364, 2002.
- [89] M. Weideborg, T. Källqvist, K. E. Ødegård, L. E. Sverdrup, and E. A. Vik,

- “Environmental risk assessment of acrylamide and methylolacrylamide from a grouting agent used in the tunnel construction of Romeriksporten, Norway,” *Water Res.*, vol. 35, no. 11, pp. 2645–2652, 2001.
- [90] H. Kjuus *et al.*, “Effects on the peripheral nervous system of tunnel workers exposed to acrylamide and N-methylolacrylamide,” *Scand. J. Work. Environ. Health*, pp. 21–29, 2004.
- [91] R. M. LoPachin, “The changing view of acrylamide neurotoxicity,” *Neurotoxicology*, vol. 25, no. 4, pp. 617–630, 2004.
- [92] H. A. Waxman, E. J. Markey, and D. DeGette, “PRODUITS CHIMIQUES UTILISEES DANS LA FRACTURATION HYDRAULIQUE,” 2011.
- [93] W. H. Organization, “Acrylamide in food (update),” *Wkly. Epidemiol. Rec. Relev. épidémiologique Hebd.*, vol. 77, no. 30, pp. 253–254, 2002.
- [94] W. Parzefall, “Minireview on the toxicity of dietary acrylamide,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 46, no. 4, pp. 1360–1364, 2008.
- [95] R. G. Tardiff, M. L. Gargas, C. R. Kirman, M. L. Carson, and L. M. Sweeney, “Estimation of safe dietary intake levels of acrylamide for humans,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 48, no. 2, pp. 658–667, 2010.
- [96] M. Mesías and F. J. Morales, “Acrylamide in coffee: Estimation of exposure from vending machines,” *J. Food Compos. Anal.*, vol. 48, pp. 8–12, 2016.
- [97] S. Canada, “Évaluation de l’exposition à l’acrylamide dans les aliments révisée par Santé Canada,” pp. 1–17, 2012.
- [98] B. Foxn, “Research models,” *Rodent Res. Model. Assoc. Serv.*, p. 2013, 2013.
- [99] C. Massé, C. Bergeron, and M.-E. Beauregard, “Formation pratique en image à la contention, sexage, identification, administration et prélèvements des animaux de laboratoires,” pp. 1–43, 2008.
- [100] J. A. Obernier and R. L. Baldwin, “Establishing an appropriate period of acclimatization following transportation of laboratory animals,” *ILAR J.*, vol. 47, no. 4, pp. 364–369, 2006.

- [101] B. Amar., “Effets du lycopène sur certains paramètres structuraux et fonctionnels chez le rat en croissance,” Ecole Nationale Supérieure Agronomique El Harrach Alger, 2009.
- [102] D. Caron, S., Catudal, A.M., Veilleux-Lemieux, “Prélèvements sanguins chez le rat. Procédure normalisée de fonctionnement. Direction des services vétérinaires, université Laval. Version 1, 1er février 2013,” 2013.
- [103] Q. Valli and D. Poy, “Manuel de prélèvements - LABM du Quai Vallière - Docteur POY à Na... <http://www.laboratoire-duquaivalliere.fr/manuelprelevements.php>,” pp. 1–90, 2016.
- [104] L. M. 001, “Manuel de prélèvement du laboratoire Centre Hospitalier Mémorial France Etats-Unis de Saint Lô,” pp. 1–78, 2013.
- [105] Pr D. Raoult, “Manuel De Prelevement,” *Méditerranée Infect.*, vol. 3, pp. 1–27, 2013.
- [106] ONS, “ENQUÊTE SUR LES DÉPENSES DE CONSOMMATION ET LE NIVEAU DE VIE DES MÉNAGES 2011 Dépenses des ménages en alimentation et boissons 2011,” 2015.
- [107] N. Fedala, L. Mekimene, M. Mokhtari, A. E. M. Haddam, and N. S. Fedala, “Consommation du pain en Algérie: état des lieux,” in *Annales d’Endocrinologie*, 2015, vol. 76, no. 4, p. 570.
- [108] S. K. El Hassani, “La Dépendance Alimentaire en Algérie: Importation de Lait en Poudre versus Production Locale, Quelle Evolution?,” *Mediterr. J. Soc. Sci.*, vol. 4, no. 11, p. 152, 2013.
- [109] B. Mahmoud and R. S. A. Zoheir³¹, “LA CONSOMMATION ALIMENTAIRE DES CÉRÉALES ET DÉRIVÉES SELON LES CATÉGORIES SOCIO-PROFESSIONNELLES EN ALGÉRIE.”
- [110] O. Bouazouni, *Etude d’impact des prix des produits alimentaires de base sur les ménages pauvres algériens*. Une étude pour le compte du programme alimentaire mondial, disponible on-line : <http://home.wfp.org/stellent/groups/public/documents/ena/wfp194575.pdf> (29/06/2013), 2008.
- [111] M. Sadoud, “Place de l’activité bouchère dans la filière viande rouge algérienne,” *Arch. Zootec.*, vol. 60, no. 230, pp. 309–312, 2011.

- [112] M. Makhlouf, E. Montaigne, and A. Tessa, “La politique laitière algérienne: entre sécurité alimentaire et soutien différentiel de la consommation,” *New Medit*, vol. 14, no. 1, pp. 12–23, 2015.
- [113] L. Normandin *et al.*, “Dietary exposure to acrylamide in adolescents from a Canadian urban center,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 57, pp. 75–83, 2013.
- [114] A. Becalski, B. P.-Y. Lau, D. Lewis, and S. W. Seaman, “Acrylamide in foods: occurrence, sources, and modeling,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, no. 3, pp. 802–808, 2003.
- [115] B. Brisson-Gauthier, “Relation entre l’exposition à l’acrylamide par l’alimentation, les marqueurs de dose interne et les cassures à l’ADN lymphocytaire chez des adolescents montréalais,” 2012.
- [116] M. Cladière and V. Camel, “Réaction de Maillard et sécurité des aliments: focus sur l’acrylamide,” *Environnement, Risques & Santé*, vol. 16, no. 1, pp. 31–43, 2017.
- [117] M. Visse-Mansiaux, “Gérer l’après récolte,” *Potato Planet*, vol. 60, pp. 44–49, 2016.
- [118] M. Biedermann, A. Noti, S. Biedermann-Brem, V. Mozzetti, and K. GROB, “Experiments on acrylamide formation and possibilities to decrease the potential of acrylamide formation in potatoes,” *Mitteilungen aus Leb. und Hyg.*, vol. 93, no. 6, pp. 668–687, 2002.
- [119] European Commission, “Information on ways to lower the levels of acrylamide formed in food,” *Acrylamide Work.*, 2003.
- [120] F. A. O. Joint, W. H. O. E. C. on F. Additives, and W. H. Organization, “Evaluation of certain food contaminants: sixty-fourth report of the Joint FA,” 2006.
- [121] C. D. U. C. S. U. R. LES CONTAMINANTS, “AVANT-PROJET DE CODE D’USAGES POUR LA RÉDUCTION DE L’ACRYLAMIDE DANS LES ALIMENTS (N06-2006),” 2008.
- [122] C. Douny, J. Widart, G. Maghuin-Rogister, E. De Pauw, and M.-L. Scippo, “Quantification of acrylamide in various Belgian potato products using solid phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry detection,” *Food Public Heal.*, vol. 2, no. 5, pp. 137–141, 2012.

- [123] V. A. Yaylayan, C. P. Locas, A. Wnorowski, and J. O'Brien, "The role of creatine in the generation of N-methylacrylamide: a new toxicant in cooked meat," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 17, pp. 5559–5565, 2004.
- [124] S. Takatsuki, S. Nemoto, K. Sasaki, and T. Maitani, "Production of acrylamide in agricultural products by cooking," *Shokuhin Eiseigaku Zasshi.*, vol. 45, no. 1, pp. 44–48, 2004.
- [125] F. Edition, "Guidelines for drinking-water quality," *WHO Chron.*, vol. 38, no. 4, pp. 104–108, 2011.
- [126] 高附巧, 根本了, 佐々木久美子, and 米谷民雄, "Determination of acrylamide in processed foods by LC/MS using column switching," *食品衛生学雑誌*, vol. 44, no. 2, pp. 89–95, 2003.
- [127] D. Andrzejewski, J. A. G. Roach, M. L. Gay, and S. M. Musser, "Analysis of coffee for the presence of acrylamide by LC-MS/MS," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 7, pp. 1996–2002, 2004.
- [128] V. Gökmen and H. Z. Şenyuva, "Study of colour and acrylamide formation in coffee, wheat flour and potato chips during heating," *Food Chem.*, vol. 99, no. 2, pp. 238–243, 2006.
- [129] C. H. D. E. S. Représentants, D. E. B. Elgique, and M. Y. Mayeur, "relative à l' acrylamide (déposée par Mme Colette Burgeon et met betrekking tot acrylamide (ingediend door mevrouw Colette Burgeon en," pp. 1–6, 2003.
- [130] J. RODIER, B. LEGUBE, and N. MERLET, "L'Analyse de l'eau," ISBN 978-2-10-054179-9, 2009.
- [131] A. Bensalem, A. Agli, and H. Oulamara, "P028: Fréquences de consommation alimentaire chez les ménages algériens," *Nutr. Clin. Métabolisme*, vol. 28, pp. S82–S83, 2011.
- [132] D. S. Barber, J. R. Hunt, M. F. Ehrich, E. J. Lehning, and R. M. LoPachin, "Metabolism, toxicokinetics and hemoglobin adduct formation in rats following subacute and subchronic acrylamide dosing," *Neurotoxicology*, vol. 22, no. 3, pp. 341–353, 2001.

- [133] K. M. El-Bohi, G. G. Moustafa, N. I. El Sharkawi, and L. M. E. Sabik, *Genotoxic effects of acrylamide in adult male albino rats liver*, vol. 7. 2011.
- [134] P. K. Shukla, V. K. Khanna, M. M. Ali, R. R. Maurya, S. S. Handa, and R. C. Srimal, "Protective effect of *Acorus calamus* against acrylamide induced neurotoxicity," *Phyther. Res.*, vol. 16, no. 3, pp. 256–260, 2002.
- [135] C. Sharp, M. La Regina, M. A. Suckow, and M. C. Regina, "The laboratory rat. 1998," *CRC Press Boca Ratt. Google Sch.*
- [136] S. I. A. Zaidi *et al.*, "Acrylamtoe induced immunosuppression in rats and its modulan by 6-MFA, an interferon inducer," *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, vol. 16, no. 2, pp. 247–260, 1994.
- [137] P. E. Sharp and M. C. La Regina, "The Laboratory Animal Pocket Reference Series: The Laboratory Rat." CRC Press. Boca Raton, Florida, 1998.
- [138] S. A. F. Mahmood, K. A. M. Amin, and S. F. M. Salih, "Effect of acrylamide on liver and kidneys in albino wistar rats," *Int J Curr Microbiol App Sci*, vol. 4, no. 5, pp. 434–444, 2015.
- [139] A. Passeron, S. Dupeux, and A. Blanchard, "Hyponatrémie: De la physiopathologie à la pratique," *Rev. Med. Interne*, vol. 31, no. 4, pp. 277–286, 2010.
- [140] C. Émile, "Que faire devant une hyponatrémie chez la personne âgée ?," *Option/Bio*, vol. 21, no. 432, p. 14, 2010.
- [141] O. Marais, "Hyponatrémie chez les patients en attente de transplantation hépatique," *Option/Bio*, vol. 19, no. 407, p. 6, 2008.
- [142] W. Saka, R. Akhigbe, O. Popoola, and O. Oyekunle, "Changes in Serum Electrolytes, Urea, and Creatinine in Aloe Vera-treated Rats.," *J. Young Pharm.*, vol. 4, no. 2, pp. 78–81, 2012.
- [143] H. Elouazzani, B. Janbon, P. Malvezzi, and P. Zaoui, "Corrélation entre la recherche des Decoys cells urinaires et la PCR BK virus dans le sang à trois mois d'une greffe rénale," *Néphrologie & Thérapeutique*, vol. 8, no. 5, p. 384, 2012.
- [144] P. Vert and S. Grojean, "La toxicité de la bilirubine sur le système nerveux central,"

- Arch. Pédiatrie*, vol. 9, no. 10, pp. 1074–1077, 2002.
- [145] S. B. Pharmacien, “Le bilan hépatique est un bilan sanguin couramment prescrit , utilisé pour évaluer les,” *Actual. Pharm.*, vol. 54, no. 544, pp. 59–61, 2015.
- [146] S. A. F. Mahmood, K. Amin, H. S. Rahman, and H. H. Othman, “The Pathophysiological Effects of Acrylamide in Albino Wister Rats,” *Heal. Sci.*, vol. 5, no. 7, pp. 42–48, 2016.
- [147] J. C. Monteiro, S. L. da Matta, F. de Souza Predes, and T. T. de Oliveira, “Liver morphology and morphometry and plasma biochemical parameters of wistar rats that received leaf infusion of *Rudgea viburnoides* Benth. (Rubiaceae),” *Brazilian Arch. Biol. Technol.*, vol. 52, no. 2, pp. 407–412, 2009.
- [148] A. Y. Hammad, M. E. Osman, and W. S. Abdelgadir, “Effects of acrylamide toxicity on growth performance and serobiochemistry of Wistar rats,” *Br. J. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 4, no. 4, pp. 163–168, 2013.
- [149] M. M. Tarskikh, “Damage to erythrocyte membranes as the mechanism for acrylate toxicity,” *Bull. Exp. Biol. Med.*, vol. 142, no. 6, pp. 690–692, 2006.
- [150] W. K. B. Khalil, H. H. Ahmed, F. Hanan, H. F. Aly, and M. G. Eshak, “Toxicological effects of acrylamide on testicular function and immune genes expression profile in rats,” *J Pharm Sci Rev Res*, vol. 24, no. 1, pp. 143–151, 2014.
- [151] A. Szymanowicz, B. Cartier, C. Gibaud, G. Poulin, and D. Le Carrer, “abc Proposition de commentaires interprétatifs prêts à l ’ emploi pour l ’ électrophorèse,” vol. 64, no. 4, pp. 367–380, 2006.
- [152] D. LE CARRER and K. BACH-NGOHOU, “L ’ électrophorèse capillaire automatisée en biologie clinique,” *Spectra Biol.*, vol. 24, no. 146, pp. 47–52, 2005.
- [153] C. Blessum, J. O. Jeppsson, F. Aguzzi, H. Bernon, and J. Bienvenu, “L ’ électrophorèse capillaire: principe et applications au laboratoire de biologie clinique,” in *Annales de biologie Clinique*, 1999, vol. 57, no. 6, pp. 643–657.
- [154] G. Feldmann, “Rôle des cellules hépatiques dans la biosynthèse des protéines de la réaction inflammatoire aiguë et des protéines de la nutrition,” *Nutr. Clin. Métabolisme*, vol. 3, no. 4, pp. 213–218, 1989.

- [155] K. SADOUCHE, “Les immunoglobulinopathies monoclonales: Etude épidémiologique, biochimique et étiologique d’une cohorte de 214 cas.” 2009.
- [156] F. Lacaille, “Diagnostic d’une élévation des transaminases,” *Médecine thérapeutique/Pédiatrie*, vol. 3, no. 2, pp. 108–111, 2000.
- [157] A. Vernes, R. Tailliez, and F. F. H. J. Biguet, “Trichinose expérimentale—II. Variations quantitatives et qualitatives des globulines sériques chez la souris CBA et le rat Wistar,” *Int. J. Parasitol.*, vol. 5(1), pp. 71–75, 1975.
- [158] D. Stora, *Pharmacologie et thérapeutique 2e édition - Editions Lamarre*, Lamarre. 2013.
- [159] J. Raju *et al.*, “Toxicological effects of short-term dietary acrylamide exposure in male F344 rats,” *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 39, no. 1, pp. 85–92, 2015.
- [160] B. Descamps-Latscha and V. Witko-Sarsat, “Relations polynucléaires neutrophiles et monocytes-macrophages,” *Rev. française d’allergologie d’immunologie Clin.*, vol. 39, no. 4, pp. 241–247, 1999.
- [161] Y. Bertrand and F. Baleyrier, “Diagnostic d’un déficit immunitaire primitif de l’enfant,” *RFL Rev. Francoph. des Lab.*, vol. 2010, no. 424, pp. 53–58, 2010.
- [162] P.-L. Chu, L.-Y. Lin, P.-C. Chen, T.-C. Su, and C.-Y. Lin, “Negative association between acrylamide exposure and body composition in adults: NHANES, 2003–2004,” *Nutr. & Diabetes*, vol. 7, p. e246, Mar. 2017.
- [163] J. Garey and M. G. Paule, “Effects of chronic low-dose acrylamide exposure on progressive ratio performance in adolescent rats,” *Neurotoxicology*, vol. 28, no. 5, pp. 998–1002, 2007.
- [164] S.-Y. Wang *et al.*, “A urinary metabolomics study of rats after the exposure to acrylamide by ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry,” *Mol. Biosyst.*, vol. 11, no. 4, pp. 1146–1155, 2015.
- [165] E. Kalıpcı, Y. Yener, H. Yıldız, and H. Oztas, “Investigation of Possible Ecotoxic Effects of Acrylamide on Liver with the Azaserine-Rat Model,” *Polish J. Environ. Stud.*, vol. 21, no. 5, 2012.
- [166] M. A. Osman, R. M. Romeilah, M. H. Elgammal, E. S. Ramis, and R. S. Hasan, “Sub-

- chronic toxicity of acrylamide in fried rice and preventive effect of grape leaves,” *Asian J. Biochem.*, vol. 11, pp. 68–81, 2016.
- [167] L. Bouwens, A. Marinelli, P. J. K. Kuppen, A. M. M. Eggermont, C. J. H. van de Velde, and E. Wisse, “Electron microscopic observations on the accumulation of large granular lymphocytes (pit cells) and kupffer cells in the liver of rats treated with continuous infusion of interleukin-2,” *Hepatology*, vol. 12, no. 6, pp. 1365–1370, 1990.
- [168] L. J. Dixon, M. Barnes, H. Tang, M. T. Pritchard, and L. E. Nagy, “Kupffer cells in the liver,” *Compr. Physiol.*, 2013.
- [169] M. Zhao, F. S. L. Wang, X. Hu, F. Chen, and H. M. Chan, “Acrylamide-induced neurotoxicity in primary astrocytes and microglia: Roles of the Nrf2-ARE and NF- κ B pathways,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 106, pp. 25–35, 2017.
- [170] M. Friedman, “Acrylamide: inhibition of formation in processed food and mitigation of toxicity in cells, animals, and humans,” *Food Funct.*, vol. 6, no. 6, pp. 1752–1772, 2015.
- [171] S. Alexander *et al.*, “Dioxines dans l’environnement: quels risques pour la santé?,” INSERM, 2000.
- [172] B. Su *et al.*, “Calpeptin is neuroprotective against acrylamide-induced neuropathy in rats,” *Toxicology*, vol. 400, pp. 1–8, 2018.
- [173] Y. Lamri, S. Eriksson, A. Moreau, F. Gauthier, and G. Feldmann, “Cellular and subcellular distribution of alpha-1-antitrypsin in the normal rat liver and during acute inflammatory reaction. A light and electron microscopic study with peroxidase labelled antibodies,” *Cell. Mol. Biol.*, vol. 32, no. 6, pp. 691–699, 1986.

EUROPEAN STANDARD
NORME EUROPÉENNE
EUROPÄISCHE NORM

DRAFT
prEN 16618

June 2013

ICS 67.050; 67.060; 67.080.20; 67.140.20

English Version

Food analysis - Determination of acrylamide in food by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS-MS)

Analyse des produits alimentaires - Dosage de l'acrylamide dans les produits alimentaires par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (CL-ESI-SM-SM)

Lebensmittelanalytik - Bestimmung von Acrylamid in Lebensmitteln mit Flüssigkeitschromatographie und Tandem-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS/MS)

This draft European Standard is submitted to CEN members for enquiry. It has been drawn up by the Technical Committee CEN/TC 275.

If this draft becomes a European Standard, CEN members are bound to comply with the CEN/CENELEC Internal Regulations which stipulate the conditions for giving this European Standard the status of a national standard without any alteration.

This draft European Standard was established by CEN in three official versions (English, French, German). A version in any other language made by translation under the responsibility of a CEN member into its own language and notified to the CEN-CENELEC Management Centre has the same status as the official versions.

CEN members are the national standards bodies of Austria, Belgium, Bulgaria, Croatia, Cyprus, Czech Republic, Denmark, Estonia, Finland, Former Yugoslav Republic of Macedonia, France, Germany, Greece, Hungary, Iceland, Ireland, Italy, Latvia, Lithuania, Luxembourg, Malta, Netherlands, Norway, Poland, Portugal, Romania, Slovakia, Slovenia, Spain, Sweden, Switzerland, Turkey and United Kingdom.

Recipients of this draft are invited to submit, with their comments, notification of any relevant patent rights of which they are aware and to provide supporting documentation.

Warning : This document is not a European Standard. It is distributed for review and comments. It is subject to change without notice and shall not be referred to as a European Standard.



EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION
EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG

Management Centre: Avenue Marnix 17, B-1000 Brussels

| Contents | | Page |
|--|--|-----------|
| Foreword | | 3 |
| 1 | Scope | 4 |
| 2 | Normative references | 4 |
| 3 | Principle | 4 |
| 4 | Reagents | 5 |
| 5 | Apparatus | 7 |
| 6 | Sample preparation | 9 |
| 7 | Measurement | 11 |
| 8 | Determination of concentrations | 14 |
| 9 | Precision | 16 |
| 10 | Test report | 17 |
| Annex A (informative) Typical chromatograms | | 18 |
| Annex B (informative) Precision data | | 19 |
| Bibliography | | 23 |

Foreword

This document (prEN 16618:2013) has been prepared by Technical Committee CEN/TC 275 "Food analysis - Horizontal methods", the secretariat of which is held by DIN.

This document is currently submitted to the CEN Enquiry.

This document has been prepared under a mandate given to CEN by the European Commission and the European Free Trade Association.

Annexes A and B are informative.

WARNING — The use of this document can involve hazardous materials, operations and equipment. This document does not purport to address all the safety problems associated with its use. It is the responsibility of the user of this document to establish appropriate safety and health practices and determine the applicability of regulatory limitations prior to use.

1 Scope

This document specifies a method for the determination of acrylamide in bakery ware such as bread, toasted bread, crisp bread, butter cookies, and biscuits, as well as potato products such as potato chips, potato crisps, and potato pan cake and roasted coffee, by liquid chromatography in combination with electrospray ionisation and tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). This method has been validated in an interlaboratory study via the analysis of both naturally contaminated and spiked samples, ranging from 14,3 µg/kg tot 9 083 µg/kg. It was developed at the Swedish National Food Administration and validated in a study organized by the Directorate General Joint Research Centre (DG JRC), Swedish National Food Administration and the Nordic Committee on Food Analysis (NMKL), see [1] and [2].

The limit of quantification (LOQ) depends on the type of instrument used and on the actual performance of the instrument. The majority of the laboratories participating in the validation study was able to determine acrylamide in a butter cookie sample at a level of 14,3 µg/kg. The validation by interlaboratory study showed that it can be expected to be in the range below 15 µg/kg and 30 µg/kg.

2 Normative references

The following documents, in whole or in part, are normatively referenced in this document and are indispensable for its application. For dated references, only the edition cited applies. For undated references, the latest edition of the referenced document (including any amendments) applies.

EN ISO 3696:1995, *Water for analytical laboratory use – Specification and test methods (ISO 3696:1987)*

EN ISO 1042:1999, *Laboratory glassware – One-mark volumetric flasks (ISO 1042:1998)*

3 Principle

Acrylamide is extracted with water and isotopic labelled acrylamide is added. The extract is centrifuged and the supernatant is cleaned up with two solid phase extraction (SPE) columns. The first SPE column contains silica based C18 groups as well as anion and cation exchangers, and since acrylamide is not retained by the column, the extract is just passed and collected. The reason for using this column is to retain as many matrix components as possible (non-polar compounds as well as anions and cations) without retaining acrylamide, i.e. this first SPE column is used as a chemical filter.

The second SPE column, contains a polymer based phase with a relatively high capacity to bind acrylamide. The extract is loaded onto the column, the column washed with water and finally eluted with a mixture of 60 parts per volume of methanol and 40 parts per volume of water. The purpose of this step, apart from further cleaning of the extract, is to concentrate the extract and to obtain low limits of quantification.

After evaporation of the methanol, the extract is analyzed by LC-MS/MS. For this purpose an HPLC column with graphitized carbon as stationary phase is used, since the retention factor (k) is relatively high ($k = 4$ when no organic solvent is added in the mobile phase) compared to other commercially available columns.

4 Reagents

Use only reagents of recognized analytical grade and water complying with grade 1 of EN ISO 3696:1995, unless otherwise specified. Solvents shall be of quality for HPLC analysis.

4.1 Acrylamide (CAS 79-06-1), purity not less than 99,9 % mass fraction.

The chemical structure is:

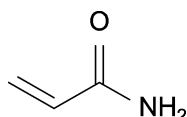


Figure 1

WARNING — Acrylamide has been classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as probably carcinogenic to humans. Protective equipment as laboratory coat, disposable gloves and safety glasses shall be used. All handlings of acrylamide and organic solvents shall be performed in a fume cupboard with adequate air flow.

4.2 Deuterium-labelled acrylamide – acrylamide-2,3,3-D₃ (CAS 122775-19-3).

The chemical structure is:

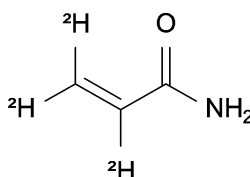


Figure 2

Alternatively, ¹³C-labelled acrylamide (acrylamide-¹³C₃, CAS 287399-26-2) may be used.

4.3 Methanol (CAS 67-56-1).

4.4 Glacial acetic acid (CAS 64-19-7).

4.5 *n*-Hexane (CAS 110-54-3).

Alternatively, cyclohexane (CAS 110-82-7) may be used.

4.6 Eluent for ENV+ SPE column.

Mix 60 parts per volume of methanol (4.3) with 40 parts per volume of water.

4.7 HPLC mobile phase.

Mix 1 part per volume of glacial acetic acid (4.4) with 1 000 parts per volume of water.

4.8 Stock standard solutions of acrylamide and acrylamide-2,2,3-D₃, substance concentration
 $c = 1\ 000\ \mu\text{g/ml}$.

Weigh, to the nearest 0,05 mg, approximately 100 mg of acrylamide and acrylamide-2,2,3-D₃ respectively into separate 100 ml volumetric flasks, dissolve in water and dilute to 100 ml. Solutions can be stored at 4 °C for at least 3 months.

4.9 Internal standard solution, $c = 10\ \mu\text{g/ml}$.

Transfer 1 000 μl of the stock solution of acrylamide-2,2,3-D₃ (4.8) to a 100 ml volumetric flask and dilute to the mark with water.

4.10 Internal standard solution, $c = 1\ 000\ \text{ng/ml}$.

Transfer 5 000 μl of the intermediate internal standard solution (4.9) to a 50 ml volumetric flask and dilute to the mark with water.

4.11 Acrylamide standard solution, $c = 100\ \mu\text{g/ml}$.

Transfer 5 000 μl of the stock solution of acrylamide (4.8) to a 50 ml volumetric flask and dilute to the mark with water.

4.12 Acrylamide standard solution, $c = 10\ \mu\text{g/ml}$.

Transfer 5 000 μl of the intermediate standard solution (4.11) to a 50 ml volumetric flask and dilute to the mark with water.

4.13 Acrylamide standard solution, $c = 100\ \text{ng/ml}$.

Transfer 1 000 μl of the intermediate standard solution (4.12) to a 100 ml volumetric flask and dilute to the mark with water.

4.14 LC-MS calibration solutions.

Dilute aliquots from standard solutions (4.9), (4.11), (4.12) and (4.13) with water to give calibration solutions of e.g. 0 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 1 000 ng/ml, 2 000 ng/ml, 5 000 ng/ml and 10 000 ng/ml respectively of acrylamide, all containing 400 ng/ml of acrylamide-2,2,3-D₃. Examples for the preparation of calibration solutions are given in Table 1. Table 2 indicates the relation between calibration solution concentrations and acrylamide contents of food samples. Calibration shall be performed on at least six concentration levels distributed properly over the working range. The analysis of an even higher number of calibration solutions should be analyzed if such a broad range of concentrations (0 $\mu\text{g/kg}$ to 10 000 $\mu\text{g/kg}$) shall be covered.

Table 1 — Preparation of LC-MS calibration solutions

| Calibration solution ng/ml | Volumetric flask ml | Internal standard solution (4.9) µl | Acrylamide standard solution µl |
|-------------------------------|------------------------|---|---------------------------------------|
| 0 | 100 | 4 000 | 0 |
| 5 | 100 | 4 000 | 5 000 of (4.13) |
| 10 | 100 | 4 000 | 10 000 of (4.13) |
| 20 | 100 | 4 000 | 200 of (4.12) |
| 50 | 100 | 4 000 | 500 of (4.12) |
| 100 | 100 | 4 000 | 1 000 of (4.12) |
| 250 | 100 | 4 000 | 2 500 of (4.12) |
| 500 | 100 | 4 000 | 5 000 of (4.12) |
| 1 000 | 100 | 4 000 | 1 000 of (4.11) |
| 2 000 | 100 | 4 000 | 2 000 of (4.11) |
| 5 000 | 100 | 4 000 | 5 000 of (4.11) |
| 10 000 | 50 | 4 000 | 5 000 of (4.11) |

Table 2 — Relation between acrylamide contents of calibration solutions and contents in food

| Calibration solution ng/ml | Bakery and potato products µg/kg | Roasted coffee µg/kg |
|-------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| 10 | 10 | 50 |

5 Apparatus

Usual laboratory glassware and equipment and, in particular, the following:

5.1 LC-MS/MS system.

5.1.1 HPLC apparatus, comprising the following:

5.1.1.1 Thermostated column compartment.

5.1.1.2 Injection system, capable of injecting 10 µl of sample.

5.1.1.3 Mobile phase pump, capable of maintaining a mobile phase flow of 0,4 ml/min.

5.1.2 HPLC column.

Hypercarb™ column ¹⁾ particle size 5 µm, 50 mm x 2,1 mm, with a guard column, particle size 5 µm, 10 mm x 2 mm (Thermo Hypersil-Keystone® ¹⁾). The stationary phase of this column is graphitized carbon.

5.1.3 Mass spectrometer.

Triple quadrupole mass spectrometer operating in positive electrospray and, selected reaction monitoring mode (SRM), set to obtain unit resolution.

5.1.4 Data acquisition and analysis system.

Suitable data collection and evaluation software.

5.1.5 Divert valve (optional).

HPLC valve installed between HPLC column and mass spectrometer in order to direct the HPLC effluent either to waste or to the mass spectrometer, see NOTE 2 under 7.1.1.

5.2 Solid phase extraction system.**5.2.1 Vacuum manifold for solid phase extraction.****5.2.2 SPE column 1.**

ISOLUTE Multimode SPE column from Biotage® ¹⁾, 1 000 mg/6 ml.

5.2.3 SPE column 2.

ISOLUTE ENV+ SPE column from Biotage® ¹⁾, 500 mg/6 ml.

5.3 Analytical balance, accuracy to the nearest 0,01 mg.

5.4 Laboratory balance, accuracy to the nearest 0,01 g.

5.5 Calibrated precision microliter pipettes, of 200 µl to 1 000 µl, and of 1 000 µl to 5 000 µl capacity.

5.6 Centrifuge tubes, volume of 50 ml, polypropylene, disposable.

5.7 Mechanical shaker, e.g. wrist arm shaker, allowing well mixing of different phases, capable of holding 50 ml centrifuge tubes.

5.8 Vortex mixer.

5.9 Cooled centrifuge, capable of a centrifugal force of 3 600 x g for 50 ml centrifuge tubes.

5.10 Volumetric flasks, volume of 50 ml, 100 ml, etc. according to EN ISO 1042:1999.

1) Hypercarb™ column, Thermo Hypersil-Keystone® column, ISOLUTE Multimode SPE column and ISOLUTE ENV+ SPE column from Biotage® are examples of suitable products available commercially. This information is given for the convenience of the users of this European Standard and does not constitute an endorsement by CEN of these products. Equivalent products may be used if they can be shown to lead to the same results.

5.11 Glass vials, volume of at least 4 ml, suitable for the evaporation equipment.

5.12 Amber glass autosampler vials, suitable for the HPLC autosampler.

5.13 Evaporation equipment, based on vacuum or a stream of inert gas.

The evaporation temperature shall not exceed 40 °C.

6 Sample preparation

6.1 General

Each test sample shall be analyzed at least in duplicate.

Residues of acrylamide have sometimes been found in laboratory ware as e.g. filters. Make sure the laboratory ware does not contain any measureable amounts of acrylamide, and include procedural blank samples as controls in each series of samples.

Acrylamide has been found to be formed as an artefact in some analytical procedures for acrylamide, e.g. during extraction or in the injection port of GC instruments. Even if this is not a problem for HPLC analysis, make sure to never exceed 40 °C during extraction or the work-up process.

It has been proven that acrylamide is efficiently extracted from various types of food by shaking with water if the particles of the samples are small enough. Make sure that the particles are < 1 mm before extraction and use, if necessary, a mechanical device for preparation of homogenous slurry, e.g. Ultra Turrax®²⁾ or Waring blender®²⁾.

Sample extracts can sometimes cause problems by e.g. clogging the SPE columns. The amount of extract loaded on the SPE columns can be reduced provided that the abundances of the peaks of both acrylamide and internal standard are large enough to comply with quantification criteria.

NOTE Complementary information regarding sample preparation and chromatographic separation of acrylamide is given by Petersson et al. [3] and Rosén et al. [1].

6.2 Extraction

6.2.1 Extraction procedure for bakery ware and potato product samples

Weigh, to the nearest 0,01 g, a 2,0 g test portion into a 50 ml centrifuge tube (5.6). Add 40 ml of water. Add 400 µl of internal standard solution, $c = 1\ 000\ \text{ng/ml}$ (4.10). Shake intensively for 15 s to 30 s by hand and 10 s to 15 s with a vortex mixer (5.8), and then for 60 min on a mechanical shaker (5.7) adjusted to maximum sample-extractant agitation. Centrifuge in a cooled centrifuge (5.9) at 10 °C, 3 600 x g for 20 min and take off 10 ml of the aqueous phase to a clean test tube. Avoid to transfer parts of the fat layer that will be formed and found on the top, depending of the fat content of the sample.

Take care that a homogenous slurry is formed and that the whole sample is in contact with the extractant. If the described procedure is for any reason not sufficient to produce a homogenous slurry, additional mechanical forces shall be applied by e.g. application of an Ultra Turrax®.

2) Ultra Turrax® and Waring blender® are examples of suitable products available commercially. This information is given for the convenience of the users of this European Standard and does not constitute an endorsement by CEN of these products. Equivalent products may be used if they can be shown to lead to the same results.

6.2.2 Extraction procedure for coffee samples

Weigh, to the nearest 0,01 g, a 2,0 g test portion into a 50 ml centrifuge tube (5.6). Add 5 ml of *n*-hexane (alternatively cyclohexane). Add 40 ml of water. Add 400 µl of internal standard solution, $c = 1\,000\text{ ng/ml}$ (4.10). Shake intensively for 15 s to 30 s by hand and 10 s to 15 s with a vortex mixer (5.8), and then for 60 min on a mechanical shaker (5.7), adjusted to maximum sample-extractant agitation. Centrifuge in a cooled centrifuge (5.9) at 10 °C, 3 600 x *g* for 20 min. Check for proper phase separation of *n*-hexane (or cyclohexane), aqueous and solid phase. Remove and discard the organic solvent phase (*n*-hexane or cyclohexane), and transfer 10 ml of the aqueous phase to a clean test tube.

Take care that a homogenous slurry is formed and that the whole sample is in contact with the extractant. If the described procedure is for any reason not sufficient to produce a homogenous slurry, additional mechanical forces shall be applied by e.g. of an Ultra Turrax®.

6.3 Cleanup

6.3.1 Cleanup for bakery and potato product sample

For all steps adjust the flow of the SPE columns to let the liquid elute drop wise. Check the completeness of elution of acrylamide from the ENV+ SPE column by recording the elution profile, at least for each new batch of column.

Fit SPE column 1 (5.2.2) to the vacuum manifold (5.2.1). Condition the column with 3 ml of methanol and 2 times with 6 ml of water. Pass 10 ml of the aqueous extract (6.2.1) through the column and collect the eluate.

Fit SPE column 2 (5.2.3) to the vacuum manifold (5.2.1). Condition the column with 5 ml of methanol and 5 ml of water. Load the extract (approximately 10 ml) from the previous column and discard the eluate. Rinse the column once with 4 ml of water and discard the rinsing solvent. Assure that no eluate is left in the valves or flow channels of the vacuum manifold by e.g. placing the column on another (dry) position of the vacuum manifold. Rinsing solvent that is left in the valves could contain co-extracts that could interfere with the internal standard peak. After rinsing, elute acrylamide with 2 ml of 60 % methanol in water. Collect the elution solvent and the residual solvent in the column (by applying a slight vacuum or a slight pressure) in a glass vial of at least 4 ml, which is compatible with the evaporation equipment (5.11).

Evaporate the methanol from the extract, never exceeding 40 °C. This can be achieved by means of e.g. a vortex evaporator under vacuum for approximately 30 min at 40 °C, or by a gentle stream of inert gas, heating the glass vial to a maximum of 40 °C. Do not reduce the volume to less than approximately 500 µl. Transfer the sample to a suitable autosampler vial and perform LC-MS/MS analysis.

6.3.2 Cleanup for coffee samples

For all steps adjust the flow of the SPE columns to let the liquid elute drop wise. Check the completeness of elution of acrylamide from the ENV+ SPE column by recording the elution profile, at least for each new batch of columns.

Fit SPE column 1 (5.2.2) to the vacuum manifold (5.2.1). Condition the column with 3 ml of methanol and 2 times with 6 ml of water. Pass 2 ml of the aqueous phase through the column, followed by 3 ml of water, and collect the combined eluate, consequently approximately 5 ml in total.

Fit SPE column 2 (5.2.3) to the vacuum manifold (5.2.1). Condition the column with 5 ml of methanol and 5 ml of water. Load the extract (approximately 5 ml) from the previous column and discard the eluate. Rinse the column once with 4 ml of water and discard the rinsing solvent. Assure that no eluate is left in the valves or flow channels of the vacuum manifold by e.g. placing the column on another (dry) position of the vacuum manifold. Rinsing solvent that is left in the valves could contain co-extracts that could interfere with the internal standard peak. After rinsing, elute acrylamide with 2 ml of 60 % methanol in water. Collect the elution solvent and the residual solvent in the column (by applying a slight vacuum or a slight pressure) in a glass vial of at least 4 ml, which is compatible with the evaporation equipment (5.11).

Evaporate the methanol from the extract, never exceeding 40 °C. This can be achieved by means of e.g. a vortex evaporator under vacuum for approximately 30 min at 40 °C, or by a gentle stream of inert gas, heating the glass vial to a maximum of 40 °C. Do not reduce the volume to less than approximately 500 µl. Transfer the sample to a suitable autosampler vial and perform LC-MS/MS analysis.

7 Measurement

7.1 LC-MS/MS determination

7.1.1 LC-MS/MS conditions

For a successful analysis it is of paramount importance that the instrument is in good condition and that all instrumental parameters are optimized.

Use the HPLC column (5.1.2) and the mobile phase (4.7) at a flow rate of 400 µl/min. The column is held at room temperature. The injection volume is 10 µl. Other chromatography columns may be used, provided system suitability provisions (see 7.1.2) are fulfilled.

Use electrospray ionization, Selected Reaction Monitoring (SRM) and unit resolution. Optimize all parameters as different temperatures, gas flows, voltages and probe position for the detection of acrylamide at the flow rate of the mobile phase. Optimize collision energy individually for each of the following transitions: m/z 72>55, 72>54, 72>44 and 75>58. Use optimal settings of dwell time and inter-channel delay to obtain the best sensitivity, avoiding any crosstalk and to obtain chromatograms with at least 15 data points per channel over the peak. Detect acrylamide and the internal standard with the transitions m/z 72>55 and 75>58 for quantitative purposes, and m/z 72>55, 72>54 and 72>44 for confirmation of the identity of acrylamide. Depending on the type of LC-MS/MS instrument used, other transitions can be available for peak qualification too.

NOTE 1 Definition of selected reaction monitoring: data acquired from one or more specific product ions corresponding to m/z selected precursor ions recorded via two or more stages of mass spectrometry.

Using the instrument Quattro Ultima PT from Micromass ³⁾, the following parameter setting were successfully applied:

3) This is an example of a suitable product available commercially. This information is given for the convenience of the users of this European Standard and does not constitute an endorsement by CEN of these products. Equivalent products may be used if they can be shown to lead to the same results.

Table 3 — LC-MS/MS conditions

| HPLC parameters | |
|-------------------------|---|
| HPLC column | Hypercarb™ column (50 mm x 2,1 mm) equipped with a Hypercarb™ pre-column (10 mm x 2,1 mm) |
| Column temperature | Room temperature |
| Injection volume | 10 µl |
| Mobile phase | 0,1 % acetic acid in water |
| Mobile phase flow | 400 µl/min |
| Total run time | 8 min |
| MS parameters | |
| Desolvation gas | N ₂ , 600 l/h |
| Desolvation temperature | 400 °C |
| Nebulising gas | N ₂ , fully open |
| Cone gas | N ₂ , 200 l/h |
| Collision gas | Argon, 2,3 x 10 ⁻³ mbar |
| Ion source temperature | 125 °C |
| Capillary voltage | 2 kV |
| Cone voltage | 20 V |
| Hexapole voltage | 10 V |
| Collision energies: | |
| 72>55 and 75>58 | 9 eV |
| 72>44 | 20 eV |
| 72>54 | 16 eV |
| Dwell time | 0,15 s |
| Inter channel delay | 0,03 s |

Inject the sample extract of each sample at least twice, preferably three times. Use a run time of 8 min for samples to allow matrix components to elute from the column. If necessary, wash the column with 80 % of acetonitrile in water, as described in 7.1.3, in between the set of samples, or after the end of the batch.

NOTE 2 The application of a divert valve (optional) is recommended in order to increase instrument stability and times between maintenance interventions. By applying a divert valve, the effluent from the chromatographic column is directed to the mass spectrometer only between run time 1,25 min and 3,0 min and signals are recorded only between these two times.

7.1.2 System suitability

The response of the LC-MS can vary from day to day or over longer periods. Also the HPLC column can deteriorate after having been used several times, or just once, depending on the number of injections and type of samples analyzed. Therefore, the system should be checked prior to each series of analysis in the following way.

Equilibrate the column with mobile phase and the mass spectrometer for e.g. 30 min. Inject at least three times one of the standard solutions to check the response of the LC-MS equipment as well as retention time, peak shape and peak width of the acrylamide and internal standard peaks. The response should be similar as after the optimization. If not, the interface needs to be cleaned and/or the mass spectrometer needs to be re-optimized. The retention time of acrylamide should be on the Hypercarb™ column (5.1.2) above 1,7 min (at a flow of 0,4 ml/min), and the peak width at half height should be below 0,2 min. The retention factor (*k*) should be above 3,5. Tailing occurs even for fresh columns, but the distance from peak maximum to tailing edge of peak (measured at 10 % height) should not be more than twice the distance from peak maximum to the leading edge of the peak. For better illustration, a typical chromatogram for potato products is shown in Annex A.

Columns not fulfilling these requirements could be regenerated by washing (see 7.1.3). If regeneration was not successful, the column shall be exchanged.

Inject pure water to check for possible contamination of the system. No traces of acrylamide should be detected.

7.1.3 Regeneration of HPLC column

If the performance of the HPLC column (5.1.2) is significantly worse than expected or required (see 7.1.2) it may be restored by regeneration of the column. Regeneration of columns shall be performed according to the recommendations given by the column supplier.

For Hypercarb™ columns the following procedures are recommended.

The column can be flushed with 80 % acetonitrile in water at 0,4 ml/min for 30 min in line with the LC-MS. This may be done routinely after each day or even between each set of injections. Make sure to give time for equilibration with the mobile phase.

For more severe cases the following washing procedure, preferably performed off-line the LC-MS, can be used. Dispose off the guard column. Change the flow direction and flush the column at room temperature and 0,2 ml/min in a consecutive order for:

- a) two hours with a mixture of 50 % tetrahydrofuran (THF), 10 % ammonia and 40 % water. Consider that some polymers used for HPLC tubings are not resistant against THF;
- b) 30 min with pure methanol;
- c) 30 min with the mobile phase for equilibration.

7.2 Batch (sequence) composition

- Analyse at least six calibration standards starting from the lowest concentration at the beginning of each batch and the resulting average response factor is used to quantify that set of samples. Additional calibration standards may be included in the sequence whenever deemed necessary.
- Analyse extracts of the test samples in random order.
- Analyse at least one procedural blank sample with each batch of samples.
- Analyse a sample for the determination of recovery with each batch of samples (see 7.4).
- At the end of each batch, a mid-point standard should be analyzed to monitor instrument drift. Acceptable values are ± 5 % of original concentration.

Each test portion extract should be measured at least in duplicate. Pure methanol may be injected for monitoring of carry over whenever deemed necessary.

NOTE A procedural blank sample is a blank sample made up of all reagents foreseen for the preparation of a test portion and processed in all respects as a test portion. This kind of blank, tests the purity of the reagents, but also other possible sources of contamination, like the glassware and the analytical instrument. In this method, the procedural blank sample consists only of 40 ml of water, to which 400 µl of the internal standard solution is added. This sample is subjected to the whole extraction and cleanup procedure and serves to determine background levels of acrylamide.

7.3 Identification and calculation of results

The peak identity is confirmed by comparison of the peak area ratios for the transitions m/z 72>54 / 72>55, and 72>44 / 72>55 from sample extracts and standard solutions. The ratios should not differ more than $\pm 20\%$ from those obtained for standard solutions.

NOTE The transition 72>27 may be used for peak identification too. However, the presence, visibility and abundance of this transition depends on the type of mass spectrometer used.

7.4 Recovery

Determine the recovery in each batch of samples using certified reference materials or other methods approved by international guidelines, e.g. spiking, see [4] and [5]. Recovery is for information only. Recovery factors are not applied for correction of results.

NOTE The following certified reference materials are available: ERM® BD273, Acrylamide in toasted bread, available from the Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM), Geel, Belgium, (<http://irmm.jrc.ec.europa.eu/>) and ERM® BD272, Acrylamide in crispbread, available from Federal Institute for Materials Research and Testing (BAM), Berlin, Germany, (www.bam.de).

8 Determination of concentrations

Calibration by internal standardization is applied for the determination of acrylamide. This calibration requires the determination of response factors Rf defined using Formula (1):

$$Rf_i = \frac{A_{SAA} \times C_{[d3]AA}}{A_{[d3]AA} \times C_{SAA}} \quad (1)$$

where

Rf_i is the response factor of acrylamide and acrylamide-2,2,3-D₃ determined by the analysis of calibration standard i ;

A_{SAA} is the area of the unlabelled acrylamide peak as SRM mass trace m/z 72>55 in the calibration standard;

$A_{[d3]AA}$ is the area of labelled acrylamide-2,2,3-D₃ peak as SRM mass trace m/z 75>58;

$C_{[d3]AA}$ is the acrylamide-2,2,3-D₃ concentration of the internal standard solution;

C_{SAA} is the acrylamide concentration of the calibration standard solution.

$$\overline{Rf} = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} Rf_i}{n} \quad (2)$$

where

\overline{Rf} is the average of n response factors of acrylamide and acrylamide-2,2,3-D₃ determined from n calibration standards.

Attention shall be paid to the linearity of the instrument response, which could be different for different instruments. If the linear range of the instrument is exceeded, appropriate measures shall be taken, such as restriction of calibration to a smaller concentration range and consequently dilution of samples with high acrylamide levels.

Calculate for each sample the average of the amount of acrylamide that was extracted from the sample (X_{AA}) for the N replicate injections that were performed for the respective sample using Formula (3):

$$X_{AA} = \frac{1}{N} \times \sum_1^N \frac{A_{AA} \times X_{[d3]AA}}{A_{[d3]AA} \times \overline{Rf}} \quad (3)$$

where

X_{AA} is the amount of acrylamide (in nanogram) that was extracted from the sample;

A_{AA} is the area of unlabelled acrylamide peak for SRM mass trace 72>55 of the sample;

$A_{[d3]AA}$ is the area of the acrylamide-2,2,3-D₃ peak for SRM mass trace 75>58 of the sample;

$X_{[d3]AA}$ is the absolute amount (in nanogram) of internal standard (acrylamide-2,2,3-D₃) added to the sample;

\overline{Rf} is the average of n response factors of acrylamide and acrylamide-2,2,3-D₃ determined from n calibration standards.

Calculate the mass fraction of acrylamide, c_S , in micrograms per kilogram, in the sample using Formula (4):

$$c_S = \frac{X_{AA}}{W_S} \quad (4)$$

where:

X_{AA} is the absolute amount, in nanograms, of acrylamide extracted from the sample;

W_S is the sample mass, in grams.

Results shall be reported to three significant figures and reporting units are µg/kg.

9 Precision

9.1 General

Details of the interlaboratory test of the precision of the method are summarized in Annex B. The values derived from the interlaboratory test may not be applicable to analyte concentration ranges and/or matrices other than given in Annex B.

9.2 Repeatability

The absolute difference between two single test results found on identical test material by one operator using the same apparatus within the shortest feasible time interval will exceed the repeatability limit r in not more than 5 % of the cases.

The values for butter cookies are:

$$\begin{aligned}\bar{x} &= 14,3 \text{ } \mu\text{g/kg} & r &= 3,4 \text{ } \mu\text{g/kg} \\ \bar{x} &= 95,7 \text{ } \mu\text{g/kg} & r &= 20,9 \text{ } \mu\text{g/kg}\end{aligned}$$

The values for toasted bread are:

$$\bar{x} = 37,9 \text{ } \mu\text{g/kg} \quad r = 5,9 \text{ } \mu\text{g/kg}$$

The values for crisp bread are:

$$\bar{x} = 980 \text{ } \mu\text{g/kg} \quad r = 86 \text{ } \mu\text{g/kg}$$

The values for spiced biscuits are:

$$\bar{x} = 249 \text{ } \mu\text{g/kg} \quad r = 25,5 \text{ } \mu\text{g/kg}$$

The values for potato crisps are:

$$\begin{aligned}\bar{x} &= 324 \text{ } \mu\text{g/kg} & r &= 54,6 \text{ } \mu\text{g/kg} \\ \bar{x} &= 628 \text{ } \mu\text{g/kg} & r &= 157 \text{ } \mu\text{g/kg} \\ \bar{x} &= 2\,512 \text{ } \mu\text{g/kg} & r &= 418 \text{ } \mu\text{g/kg} \\ \bar{x} &= 4\,051 \text{ } \mu\text{g/kg} & r &= 485 \text{ } \mu\text{g/kg} \\ \bar{x} &= 9\,083 \text{ } \mu\text{g/kg} & r &= 1\,260 \text{ } \mu\text{g/kg}\end{aligned}$$

The values for mashed potato are:

$$\bar{x} = 500 \text{ } \mu\text{g/kg} \quad r = 76,0 \text{ } \mu\text{g/kg (fortified)}$$

The values for roasted coffee are:

$$\begin{aligned}\bar{x} &= 160 \text{ } \mu\text{g/kg} & r &= 15,4 \text{ } \mu\text{g/kg} \\ \bar{x} &= 263 \text{ } \mu\text{g/kg} & r &= 13,7 \text{ } \mu\text{g/kg} \\ \bar{x} &= 585 \text{ } \mu\text{g/kg} & r &= 15,7 \text{ } \mu\text{g/kg}\end{aligned}$$

9.3 Reproducibility

The absolute difference between two single test results found on identical test material reported by two laboratories will exceed the reproducibility limit R in not more than 5 % of the cases.

The values for butter cookies are:

$$\begin{aligned}\bar{x} &= 14,3 \text{ } \mu\text{g/kg} & R &= 5,6 \text{ } \mu\text{g/kg} \\ \bar{x} &= 95,7 \text{ } \mu\text{g/kg} & R &= 31,6 \text{ } \mu\text{g/kg}\end{aligned}$$

The values for toasted bread are:

$$\bar{x} = 37,9 \mu\text{g/kg} \quad R = 9,0 \mu\text{g/kg}$$

The values for crisp bread are:

$$\bar{x} = 980 \mu\text{g/kg} \quad R = 148 \mu\text{g/kg}$$

The values for spiced biscuits are:

$$\bar{x} = 249 \mu\text{g/kg} \quad R = 72,6 \mu\text{g/kg}$$

The values for potato crisps are:

$$\bar{x} = 324 \mu\text{g/kg} \quad R = 115 \mu\text{g/kg}$$

$$\bar{x} = 628 \mu\text{g/kg} \quad R = 232 \mu\text{g/kg}$$

$$\bar{x} = 2\,512 \mu\text{g/kg} \quad R = 826 \mu\text{g/kg}$$

$$\bar{x} = 4\,051 \mu\text{g/kg} \quad R = 1\,010 \mu\text{g/kg}$$

$$\bar{x} = 9\,083 \mu\text{g/kg} \quad R = 2\,312 \mu\text{g/kg}$$

The values for mashed potato are:

$$\bar{x} = 500 \mu\text{g/kg} \quad R = 123 \mu\text{g/kg (fortified)}$$

The values for roasted coffee are:

$$\bar{x} = 160 \mu\text{g/kg} \quad R = 51,5 \mu\text{g/kg}$$

$$\bar{x} = 263 \mu\text{g/kg} \quad R = 74,5 \mu\text{g/kg}$$

$$\bar{x} = 585 \mu\text{g/kg} \quad R = 157,6 \mu\text{g/kg}$$

The relationship between R and \bar{x} can be sufficiently approximated by the following formula:

$$R(\mu\text{g/kg}) = 0,258 \times \bar{x} (\mu\text{g/kg})$$

with coefficient of determination ($R^2 = 0,99$), meaning that the relative repeatability standard deviation is constant over the working range.

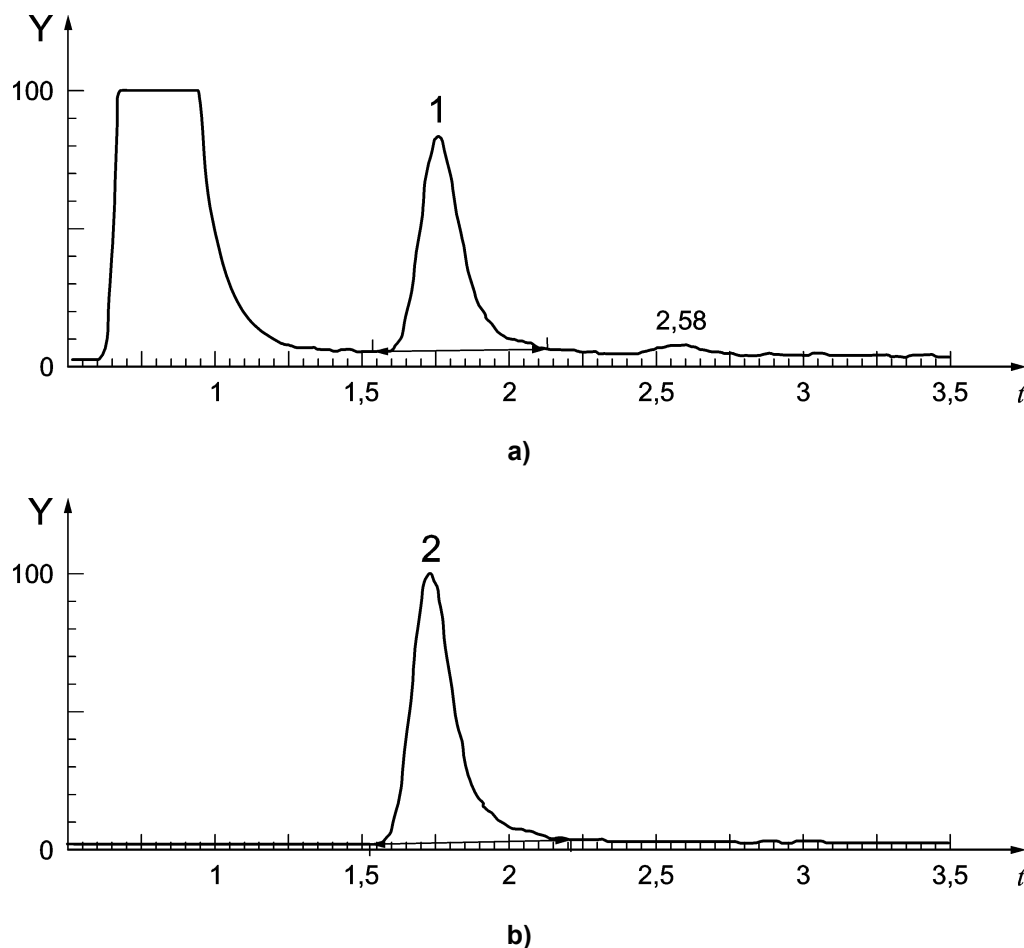
10 Test report

The test report shall contain the following data:

- a) all information necessary for the identification of the sample (kind of sample, origin and designation of the sample);
- b) a reference to this European Standard;
- c) the date and type of sampling procedure (if known);
- d) the date of receipt;
- e) the date of test;
- f) the test results and the units in which they have been expressed;
- g) any operations not specified in the method or regarded as optional, which might have effected the results.

Annex A (informative)

Typical chromatograms



Key

t = time, in min,

Y = A.U.

Figure A.1 — Typical chromatogram of a potato chips sample contaminated with acrylamide

Operating conditions:

Injection volume: 10 μ l

Column: Hypercarb™, 5 μ m, 50 mm x 2,1 mm, with a guard column 5 μ m, 10 mm x 2 mm (Thermo Hypersil-Keystone®)

Flow rate: 400 μ l/min

Mobile phase: Mixture of 1 part per volume of acetic acid and 1 000 parts per volume of water

Quantitation transition: Acrylamide: 72>55, acrylamide-2,2,3-D₃: 75>58

Annex B (informative)

Precision data

The following data were obtained in an interlaboratory test according to ISO 5725-2 [8] and the AOAC Guidelines [9] for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis.

Assigned values were calculated from the results of the participants after removal of outliers, with the exceptions of the spiked mashed potato powder and the candidate reference material for which the spiking level, respectively the preliminary certified value were used.

Table B.1 — Precision data for acrylamide in butter cookies, toasted bread and spiced biscuits

| Sample | Butter cookies | Toasted bread | Butter cookies | Spiced biscuits |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Source | RS ^a | RS ^a | RS ^a | RS ^a |
| Year of interlaboratory test | 2007 | 2007 | 2007 | 2007 |
| Number of laboratories | 16 | 16 | 16 | 16 |
| Number of non-compliant laboratories | 4 ^b | 1 | 1 | 1 |
| Number of laboratories retained after eliminating outliers | 10 | 12 | 13 | 12 |
| Number of outliers (laboratories) | 2 | 3 | 2 | 3 |
| Number of accepted results | 10 | 12 | 13 | 12 |
| Mean value, \bar{x} , µg/kg | 14,3 | 37,9 | 95,7 | 249 |
| Repeatability standard deviation s_r , µg/kg | 1,2 | 2,1 | 7,5 | 9,1 |
| Repeatability relative standard deviation, RSD_r , % | 8,4 | 5,5 | 7,8 | 3,7 |
| Repeatability limit r [$r = 2,8 \times s_r$], µg/kg | 3,4 | 5,9 | 20,9 | 25,5 |
| Reproducibility standard deviation s_R , µg/kg | 2,0 | 3,2 | 11,3 | 25,9 |
| Reproducibility relative standard deviation, RSD_R , % | 14,1 | 8,5 | 11,8 | 10,4 |
| Reproducibility limit R [$R = 2,8 \times s_R$], µg/kg | 5,6 | 9,0 | 31,6 | 72,6 |
| Recovery, % | - ^c | - ^c | - ^c | - ^c |
| HorRat value, according to [6] | 0,5 | 0,3 | 0,5 | 0,5 |
| HorRat value, according to [7] | 0,6 | 0,4 | 0,6 | 0,5 |
| a RS = from retail store | | | | |
| b Laboratories specified for at least one replicate measurement that the content was below the limit of quantification or limit of detection. | | | | |
| c not determined as recovery is corrected by isotopic labelled acrylamide | | | | |

Table B.2 — Precision data for acrylamide in potato crisps, mashed potato powder and crisp bread

| Sample | Potato crisps | Spiked mashed potato powder | Commercial potato crisps | Crisp bread |
|---|-----------------|-----------------------------|--------------------------|----------------|
| Source | SP ^a | RS ^a | RS ^a | ERM®-BD272 |
| Year of interlaboratory test | 2007 | 2007 | 2007 | 2007 |
| Number of laboratories | 16 | 16 | 16 | 16 |
| Number of non-compliant laboratories | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Number of laboratories retained after eliminating outliers | 14 | 16 | 14 | 13 |
| Number of outliers (laboratories) | 1 | 0 | 2 | 3 |
| Number of accepted results | 14 | 16 | 14 | 13 |
| Mean value, \bar{x} , µg/kg | 324 | 500 | 628 | 980 |
| Repeatability standard deviation s_r , µg/kg | 19,5 | 27,1 | 55,9 | 30,7 |
| Repeatability relative standard deviation, RSD_r , % | 6,0 | 5,4 | 8,9 | 3,1 |
| Repeatability limit r [$r = 2,8 \times s_r$], µg/kg | 54,6 | 76,0 | 157 | 86,0 |
| Reproducibility standard deviation s_R , µg/kg | 41,0 | 43,9 | 82,7 | 52,9 |
| Reproducibility relative standard deviation, RSD_R , % | 12,7 | 8,8 | 13,2 | 5,4 |
| Reproducibility limit R [$R = 2,8 \times s_R$], µg/kg | 115 | 123 | 232 | 148 |
| Recovery, % | _ ^b | _ ^b | _ ^b | _ ^b |
| HorRat value, according to [6] | 0,7 | 0,5 | 0,8 | 0,3 |
| HorRat value, according to [7] | 0,7 | 0,5 | 0,8 | 0,3 |
| a SP = specially prepared for the study, RS = from retail store | | | | |
| b not determined as recovery is corrected by isotopic labelled acrylamide | | | | |

Table B.3 — Precision data for acrylamide in potato crisps

| Sample | Potato crisps | Potato crisps | Potato crisps |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|
| Source | SP ^a | RS ^a | SP ^a |
| Year of interlaboratory test | 2007 | 2007 | 2007 |
| Number of laboratories | 16 | 16 | 16 |
| Number of non-compliant laboratories | 1 | 1 | 0 |
| Number of laboratories retained after eliminating outliers | 15 | 15 | 14 |
| Number of outliers (laboratories) | 0 | 0 | 2 |
| Number of accepted results | 15 | 15 | 14 |
| Mean value, \bar{x} , $\mu\text{g/kg}$ | 2 512 | 4 051 | 9 083 |
| Repeatability standard deviation s_r , $\mu\text{g/kg}$ | 149 | 173 | 450 |
| Repeatability relative standard deviation, RSD_r , % | 5,9 | 4,3 | 5,0 |
| Repeatability limit r [$r = 2,8 \times s_r$], $\mu\text{g/kg}$ | 418 | 485 | 1 260 |
| Reproducibility standard deviation s_R , $\mu\text{g/kg}$ | 295 | 361 | 826 |
| Reproducibility relative standard deviation, RSD_R , % | 11,7 | 8,9 | 9,1 |
| Reproducibility limit R [$R = 2,8 \times s_R$], $\mu\text{g/kg}$ | 826 | 1 010 | 2 312 |
| Recovery, % | - ^b | - ^b | - ^b |
| HorRat value, according to [6] | 0,8 | 0,7 | 0,8 |
| HorRat value, according to [7] | 0,8 | 0,7 | 0,8 |
| a SP = specially prepared for the study, RS = from retail store | | | |
| b not determined as recovery is corrected by isotopic labelled acrylamide | | | |

Table B.4 — Precision data for acrylamide in roasted coffee

| Sample | Roasted coffee | Roasted coffee | Roasted coffee |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|
| Source | RS ^a | SP ^a | SP ^a |
| Year of interlaboratory test | 2007 | 2007 | 2007 |
| Number of laboratories | 9 | 9 | 8 |
| Number of non-compliant laboratories | 1 | 1 | 1 |
| Number of laboratories retained after eliminating outliers | 7 | 7 | 7 |
| Number of outliers (laboratories) | 1 | 1 | 0 |
| Number of accepted results | 7 | 7 | 7 |
| Mean value, \bar{x} , µg/kg | 160 | 263 | 585 |
| Repeatability standard deviation s_r , µg/kg | 5,5 | 4,9 | 5,6 |
| Repeatability relative standard deviation, RSD_r , % | 3,5 | 1,9 | 1,0 |
| Repeatability limit r [$r = 2,8 \times s_r$], µg/kg | 15,4 | 13,7 | 15,7 |
| Reproducibility standard deviation s_R , µg/kg | 18,4 | 26,6 | 56,3 |
| Reproducibility relative standard deviation, RSD_R , % | 11,5 | 10,1 | 9,6 |
| Reproducibility limit R [$R = 2,8 \times s_R$], µg/kg | 51,5 | 74,5 | 157,6 |
| Recovery, % | - ^b | - ^b | - ^b |
| HorRat value, according to [6] | 0,5 | 0,5 | 0,6 |
| HorRat value, according to [7] | 0,5 | 0,5 | 0,6 |
| a SP = specially prepared for the study, RS = from retail store | | | |
| b not determined as recovery is corrected by isotopic labelled acrylamide | | | |

Bibliography

- [1] J. Rosén, A. Nyman, K.E. Hellenäs, *Retention studies of acrylamide for the design of a robust liquid chromatograph-tandem mass spectrometry method for food analysis*. J. Chromatogr. A, 1172 (2007), 19-24
- [2] T. Wenzl; S. Szilagyi; J. Rosén; L. Karasek, *Validation by collaborative trial of an isotope dilution liquid chromatographic tandem mass spectrometric method to determine the content of acrylamide in roasted coffee*, Food Add. Cont. 26 (2009) 1146-1152
- [3] E.V. Petersson, J. Rosén, Ch. Turner, R. Danielsson, K.E. Hellenäs. *Critical factors and pitfalls affecting the extraction of acrylamide from food: An optimisation study*, Anal. Chim. Acta, 557 (2006), 287-295
- [4] Eurachem Guide, (1998). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*
- [5] IUPAC/ISO/AOAC International/EURACHEM, (1998), Harmonised Guidelines for the Use of Recovery Information in Analytical Measurement
- [6] W. Horwitz and R. Albert: The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision, J. AOAC Int., 89 (2006), 1095-1109
- [7] M. Thompson: Recent Trends in Inter-Laboratory Precision at ppb and sub-ppb Concentrations in Relation to Fitness for Purpose Criteria in Proficiency Testing. Analyst, 125, 385-386
- [8] ISO 5725-2:1994, *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 2: Basic methods for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method*
- [9] AOAC International Guidelines for Collaborative Study Procedure to Validate Characteristics of a Method of Analysis (1995), J. AOAC Int., vol. 78, 143A-160A; also reprinted in Official Methods of Analysis of AOAC International (2000), 17th Ed. and (2005), 18th Ed. Original publication: Horwitz, W., (1995) "Protocol for the Design, Conduct, and Interpretation of Method Performance Studies", Pure Appl. Chem. vol. 67 (2), 331-343

Questionnaire d'enquête alimentaire

Sexe

L'âge :

Lieu de résidence :

Poids :

Fréquence de consommation habituelle des aliments

Préférez manger la nourriture : Semi cuit Cuit Bien cuit

Pour chacun des aliments que nous allons vous citer, indiquez votre fréquence de consommation.

| Groupe d'aliments | aliments | fréquence de consommation (fois) | | | L'estimation de la fois (g) |
|---------------------------------|---------------------------|----------------------------------|---------|------|-----------------------------|
| | | jour | semaine | mois | |
| Pommes de terre et dérivée | Chips (pomme de terre) | | | | |
| | Pommes de terre frites | | | | |
| | pommes de terre bouillies | | | | |
| | Purée de pomme de terre | | | | |
| Céréales et produits céréaliers | Chips de maïs | | | | |
| | Biscuits | | | | |
| | Pain traditionnel | | | | |
| | Pain industriel | | | | |
| | Pates alimentaires | | | | |
| | Couscous | | | | |
| Stimulants et analogues | Gaufrette | | | | |
| | Café | | | | |
| | Chocolat | | | | |
| Lait et boissons | Thé | | | | |
| | Boissons gazeuse | | | | |
| | Jus de boissons | | | | |
| Fruit et légumes | Lait UHT | | | | |
| | Fruit | | | | |
| | Légumes (y frits) | | | | |
| Poisson, viande, poulet et œufs | Tomate en conserve | | | | |
| | Thon | | | | |
| | Sardine | | | | |
| | Viande hachée | | | | |
| | Croute de poulet | | | | |
| | L'œuf cuit | | | | |

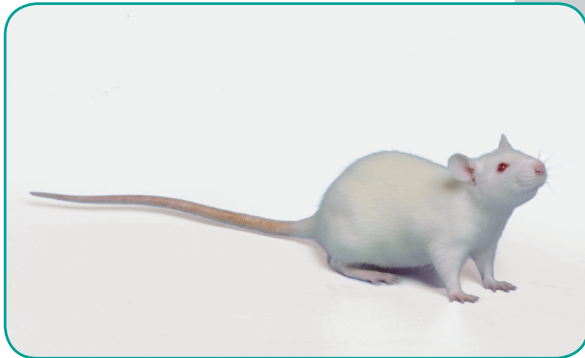


RESEARCH MODELS

Rats

Souris

Autres rongeurs



Rat WISTAR

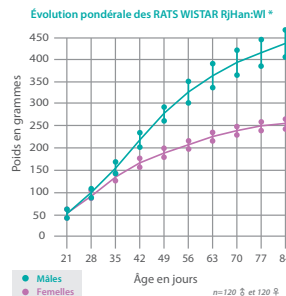
- **Dénomination** : RjHan:WI
- **Type** : Rat non consanguin
- **Provenance** : Zentralinstitut für Versuchstierzucht (Hannover) 1982 (issu du stock de l'Allington Farm - UK - 1964)
- **Couleur et génotype associé** : Rat albinos - *Tyr^c/Tyr^c*
- **Performances de reproduction** : Animal facile à élever

Présentation de notre modèle

Cette souche a été sélectionnée par DONALDSON au Wistar Institute (USA) en 1906 à partir d'un stock de l'université de Chicago (Russel-Lindsay, 1979).

Le **WISTAR** est une souche non consanguine polyvalente utilisée dans toutes les disciplines de la recherche médicale et biologique. Sa longévité ainsi que sa pathologie tumorale en font un modèle de choix pour les études à long terme, notamment pour les études de vieillissement.

Rat albinos de manipulation aisée, il présente une moins bonne performance d'apprentissage que le rat Long Evans.



www.janvier-labs.com

Principaux domaines de recherche et applications

- Maladie infectieuse
- Métabolisme, nutrition
- Oncologie
- Pharmacologie
- Physiologie
- Tératologie
- Toxicologie
- Vieillesse

Nos autres prestations



Laboratory services



Transgenic services

| Paramètres hématologiques* des rats WISTAR RjHan:WI 6-13 semaines | | |
|---|--------------|-------------|
| Paramètres | Mâle | Femelle |
| Globules rouges (10 ¹² /l) | 8,6 ± 0,4 | 8,5 ± 0,4 |
| Hématocrite (l/l) | 0,48 ± 0,02 | 0,46 ± 0,02 |
| Hémoglobine (g/dl) | 15,9 ± 0,7 | 15,7 ± 0,6 |
| VGM (fl) | 56 ± 2 | 54 ± 2 |
| TCMH (pg) | 18,5 ± 0,7 | 18,4 ± 0,6 |
| CCMH (g/dl) | 33 ± 1 | 34 ± 1 |
| Plaquettes (10 ⁹ /l) | 1225 ± 181 | 1306 ± 176 |
| Leucocytes (10 ⁹ /l) | 15,3 ± 3,7 | 10,7 ± 2,9 |
| Neutrophiles (10 ⁹ /l) | 2,60 ± 0,90 | 1,68 ± 0,75 |
| Lymphocytes (10 ⁹ /l) | 11,97 ± 3,14 | 8,44 ± 2,37 |
| Eosinophiles (10 ⁹ /l) | 0,21 ± 0,10 | 0,20 ± 0,10 |
| Monocytes (10 ⁹ /l) | 0,36 ± 0,13 | 0,27 ± 0,14 |
| Basophiles (10 ⁹ /l) | 0,08 ± 0,09 | 0,05 ± 0,07 |

| Données de reproduction ¹ | |
|--|--|
| Souche élevée en monogamie selon le système de Robertson | |
| Taille de la portée à la naissance | 12 |
| % de sevrage | 94 |
| Indice de productivité | 2,48 |
| % de stérilité | 2 |
| Durée de gestation | Entre 20 et 23 jours - J20 : 1 % - J21 : 42 % - J22 : 54 % - J23 : 3 % |

¹Données JANVIER LABS 2011, à titre indicatif

| Paramètres biochimiques sanguins* des rats WISTAR RjHan:WI 6-13 semaines | | |
|--|------------|------------|
| Paramètres | Mâle | Femelle |
| Glucose (g/l) | 6,0 ± 0,9 | 5,4 ± 0,8 |
| Urée (g/l) | 5,2 ± 0,7 | 5,5 ± 1,0 |
| ASAT (UI/l) | 93 ± 20 | 89 ± 17 |
| ALAT (UI/l) | 32 ± 5 | 30 ± 8 |
| Phosphatase alcaline (UI/l) | 135 ± 32 | 104 ± 32 |
| Cholestérol total (g/l) | 1,8 ± 0,3 | 1,9 ± 0,4 |
| Triglycérides (g/l) | 0,9 ± 0,3 | 0,5 ± 0,1 |
| Créatinine (mg/l) | 49,1 ± 3,7 | 47,6 ± 4,6 |

*Données BAYER CROPPSCIENCE 2012, à titre indicatif

Notre valeur ajoutée

- « **JANVIER LABS Genetic Policy** » : un programme d'élevage spécifique garantissant une augmentation du taux de consanguinité inférieur à 1% à chaque génération.
- Des animaux aux standards SPF et SOPF.
- Une politique de socialisation pour des animaux dociles et faciles à manipuler.
- Des conditions optimales de stabilité de nos modèles lors des livraisons, grâce à notre service transport interne spécialisé.
- Un support scientifique avec une équipe de Vétérinaires et PhD.

La bibliographie scientifique disponible :

De nombreux travaux de recherches ont été menés, à travers le monde, à partir de modèles élevés dans nos laboratoires. Découvrez la bibliographie actualisée des études disponibles sur notre site Internet, rubrique : Support Client.

Tableau 01: les fréquences de consommation habituelles et l'exposition en acrylamide pour les aliments selon le sexe.

Homme n=417; Moy Age =23,00±10,76 ans, poids =61,65±16,71 kg

Femme n=371; Moy Age 21, 34±8, 22 ans, poids =55, 02±13, 29 kg

| Groupes | Aliments | Homme n=417 | | femme n=371 | |
|---------------------------------|---------------------------|-------------|--------------|-------------|--------------|
| | | Fois /jour | Ex (µg/j/pc) | Fois /jour | Ex (µg/j/pc) |
| Pomme de terre et dérivée | Chips (pomme de terre) | 0,18±0,49 | 0,02±0,12 | 0,30±0,65 | 0,04±0,10 |
| | Pommes de terre frites | 0,46±0,41 | 0,66±1,57 | 0,44±0,37 | 0,63±2,21 |
| | pommes de terre bouillies | 0,31±0,43 | 0,00 | 0,31±0,42 | 0,00 |
| | purée de pomme de terre | 0,08±0,16 | 0,00 | 0,07±0,14 | 0,00 |
| Céréales et produits céréaliers | Chips de maïs | 0,15±0,50 | 0,00±0,01 | 0,16±0,35 | 0,00 |
| | biscuits | 0,75±2,83 | 0,20±0,42 | 0,64±0,65 | 0,27±0,61 |
| | Pain traditionnel | 0,91±0,78 | 0,08±0,09 | 0,92±0,88 | 0,06±0,09 |
| | Pain industriel | 0,96±2,18 | 0,12±0,19 | 1,02±0,95 | 0,12±0,17 |
| | Pates alimentaires | 0,31±0,42 | 0,00 | 0,23±0,26 | 0,00 |
| | Couscous | 0,20±0,16 | 0,00 | 0,17±0,14 | 0,00 |
| | Gaufrette | 0,28±0,41 | 0,06±0,16 | 0,28±0,44 | 0,07±0,22 |
| Stimulants et analogues | Café | 1,14±1,21 | 0,15±0,26 | 0,87±1,06 | 0,15±0,28 |
| | chocolat | 0,36±0,64 | 0,07±0,32 | 0,38±0,56 | 0,13±0,96 |
| | Thé | 0,56±2,87 | 0,00 | 0,18±0,40 | 0,00 |
| Lait et boissons | Boissons gazeuse | 0,83±0,83 | 0,00 | 0,63±2,25 | 0,00 |
| | Jus de boissons | 0,62±0,74 | 0,00 | 0,63±1,60 | 0,00 |
| | Lait UHT | 0,75±2,86 | 0,00 | 0,49±0,74 | 0,00 |
| Fruits et légumes | Fruit | 0,16±0,24 | 0,00 | 0,17±0,25 | 0,00 |
| | Légumes (y frits) | 0,48±0,57 | 0,00 | 0,80±3,01 | 0,00 |
| | Tomate en conserve | 0,80±2,84 | 0,00 | 0,82±0,72 | 0,00 |
| Poisson, viande, poulet et œufs | Thon | 0,23±1,39 | 0,00 | 0,15±0,25 | 0,00 |
| | Sardine | 0,12±0,24 | 0,00 | 0,09±0,14 | 0,00 |
| | Viande hachée | 0,20±0,59 | 0,00 | 0,15±0,21 | 0,00 |
| | croute de poulet | 0,30±0,29 | 0,00 | 0,32±0,43 | 0,00 |
| | L'œuf cuit | 0,69±1,32 | 0,00 | 0,51±0,99 | 0,00 |
| Total /jour | | 12,29 | 1,36 | 10,71 | 1,47 |
| Moyenne /jour | | 0,47±1,40 | 0,14 | 0,43±0,29 | 0,18 |

Tableau 01: La fréquence de consommation et l'exposition en acrylamide selon l'âge

[6-13] Nbr 104 moyenne âge 10,57±1,68 ans poids 33,82±8,36

[14-19] Nbr 262 moyenne âge 16,92±1,32ans, poids 54,77±9,03

[20-27] Nbr 273 moyenne âge 22,98 2,06 ans, poids 63,45±10,81

>27 Nbr 149 moyenne âge 38,26±8,96 ans, poids 73,38±12,52

| Groupes | Aliments | [6-13] n=104 | | [14-19] n=262 | | [20-27] n=273 | | >27 n=149 | |
|---------------------------------|----------------------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|------------|--------------|
| | | Fois /jour | Ex (µg/j/pc) | Fois /jour | Ex (µg/j/pc) | Fois /jour | Ex (µg/j/pc) | Fois /jour | Ex (µg/j/pc) |
| Pomme de terre et dérivée | Chips (pomme de terre) | 0,51±0,73 | 0,08±0,22 | 0,28±0,70 | 0,03±0,13 | 0,19±00,46 | 0,02±00,06 | 0,05±00,19 | 0,00 |
| | Pommes de terre frites | 0,35±0,28 | 0,47±1,05 | 0,48±0,41 | 0,77±1,61 | 0,49±00,40 | 0,78±02,65 | 0,38±00,39 | 0,33±00,81 |
| | pommes de terre bouillies | 0,20±0,31 | 0,00 | 0,33±0,48 | 0,00 | 0,29±00,40 | 0,00 | 0,39±00,43 | 0,00 |
| | purée de pomme de terre | 0,08±0,16 | 0,00 | 0,06±0,15 | 0,00 | 0,09±00,16 | 0,00 | 0,08±00,14 | 0,00 |
| Céréales et produits céréaliers | Chips (a base maïs) | 0,29±0,41 | 0,00 | 0,24±0,63 | 0,00 | 0,07±00,24 | 0,00 | 0,05±00,19 | 0,00 |
| | Biscuits | 0,62±0,68 | 0,22±0,31 | 0,83±3,54 | 0,32±0,74 | 0,69±00,66 | 0,22±00,44 | 0,54±00,56 | 0,12±00,21 |
| | Pain traditionnel | 0,82±0,71 | 0,07±0,08 | 1,06±0,86 | 0,09±0,10 | 0,83±00,84 | 0,06±00,10 | 0,86±00,76 | 0,05±00,06 |
| | Pain industriel | 0,72±0,61 | 0,13±0,16 | 0,89±2,68 | 0,10±0,18 | 1,27±00,98 | 0,17±00,21 | 0,84±00,87 | 0,08±00,11 |
| | Pâtes alimentaires | 0,23±0,31 | 0,00 | 0,24±0,33 | 0,00 | 0,34±00,42 | 0,00 | 0,23±00,27 | 0,00 |
| | Couscous | 0,19±0,16 | 0,00 | 0,18±0,16 | 0,00 | 0,17±00,11 | 0,00 | 0,21±00,19 | 0,00 |
| | Gaufrette | 0,33±0,51 | 0,09±0,20 | 0,38±0,46 | 0,10±0,28 | 0,20±00,33 | 0,03±0,09 | 0,22±00,40 | 0,03±00,11 |
| Stimulants et analogues | Café | 0,25±0,62 | 0,04±0,10 | 0,86±0,94 | 0,14±0,26 | 1,25±01,24 | 0,18±00,26 | 1,41±01,28 | 0,20±00,34 |
| | Chocolat | 0,38±0,49 | 0,06±0,16 | 0,49±0,76 | 0,20±1,19 | 0,31±00,49 | 0,05±00,16 | 0,26±00,50 | 0,04±00,16 |
| | Thé | 0,16±0,42 | 0,00 | 0,26±0,57 | 0,00 | 0,35±00,66 | 0,00 | 0,80±04,69 | 0,00 |
| Lait et boissons | Boissons gazeuse | 0,63±0,59 | 0,00 | 0,90±2,65 | 0,00 | 0,67±00,85 | 0,00 | 0,66±00,79 | 0,00 |
| | Jus de boissons | 0,49±0,51 | 0,00 | 0,44±0,52 | 0,00 | 0,85±01,91 | 0,00 | 0,62±00,66 | 0,00 |
| | Lait UHT | 0,94±0,76 | 0,00 | 0,72±3,56 | 0,00 | 0,46±00,79 | 0,00 | 0,57±00,72 | 0,00 |
| Fruit et légumes | Fruit | 0,12±0,18 | 0,00 | 0,16±0,22 | 0,00 | 0,20±00,30 | 0,00 | 0,14±00,19 | 0,00 |
| | Légumes (y compris frites) | 0,42±0,41 | 0,00 | 0,78±3,54 | 0,00 | 0,66±00,72 | 0,00 | 0,45±00,65 | 0,00 |
| | Tomate en conserve | 0,56±0,55 | 0,00 | 0,85±0,65 | 0,00 | 0,73±00,79 | 0,00 | 1,04±04,66 | 0,00 |
| Poisson, | Thon | 0,12±0,22 | 0,00 | 0,15±0,28 | 0,00 | 0,29±01,70 | 0,00 | 0,13±00,25 | 0,00 |
| | Sardine | 0,06±0,13 | 0,00 | 0,08±0,13 | 0,00 | 0,14±00,26 | 0,00 | 0,10±00,23 | 0,00 |
| | Viande hachée | 0,11±0,15 | 0,00 | 0,14±0,21 | 0,00 | 0,24±00,71 | 0,00 | 0,16±00,21 | 0,00 |

| | | | | | | | | | |
|------------------------------|---------------------|-----------|------|-----------|------|------------|------|------------|------|
| viande, poulet et œufs | croute de poulet | 0,36±0,33 | 0,00 | 0,30±0,34 | 0,00 | 0,31±00,42 | 0,00 | 0,28±00,31 | 0,00 |
| | L'œuf cuit | 0,55±1,69 | 0,00 | 0,54±0,57 | 0,00 | 0,69±01,52 | 0,00 | 0,59±0,76 | 0,00 |
| Total /jour | | 9,46 | 1,16 | 11,67 | 1,75 | 11,78 | 1,49 | 11,07 | 0,86 |
| Moyenne /jour | | 0,38±0,24 | 0,15 | 0,47±0,31 | 0,19 | 0,47±0,33 | 0,19 | 0,44±0,35 | 0,10 |

les fréquences de consommation habituelles et l'exposition en acrylamide pour les groupes d'aliments selon l'âge.

| Groupe d'aliments | [6-13] | | [14-19] | | [20-27] | | >27 | |
|---------------------------------|--------|---------------|---------|---------------|---------|---------------|------|---------------|
| | F/J | Ex µg/J/pc | F/J | Ex µg/J/pc | F/J | Ex µg/J/pc | F/J | Ex µg/J/pc |
| Pomme de terre et dérivée | 0,28 | 0,27 | 0,28 | 0,04 | 0,26 | 0,40 | 0,22 | 0,33 |
| Céréales et produits céréaliers | 0,45 | 0,12 | 0,54 | 0,15 | 0,51 | 0,12 | 0,42 | 0,04 |
| Poisson, viande, poulet et œufs | 0,24 | 0 | 0,24 | 0 | 0,33 | 0 | 0,25 | 0 |
| lait & Boissons | 0,68 | 0 | 0,69 | 0 | 0,66 | 0 | 0,67 | 0 |
| Stimulants et analogues | 0,26 | 0,05 | 0,53 | 0,17 | 0,63 | 0,11 | 0,82 | 0,12 |
| Fruits et légumes | 0,36 | 0 | 0,59 | 0 | 0,53 | 0 | 1,04 | 0 |

Valorisation des travaux de la thèse

1) Communication internationale affichée « Poster »

Teneur en acrylamide dans la nourriture algériennes et évaluation préliminaire déterministe de l'exposition à l'acrylamide dans les ménages algériens. *SAN 3eme congrès internationale CI SAN 2017 Constantine du 28 au 30 novembre 2017.*

2) Communication national « Poster »

Effect of oral exposure to acrylamide on the biochemical parameters and immune status of wistar rats. *2ème Séminaire National de Biologie et Santé (SNBS-2) Mardi 19 décembre 2017 SIDI BEL ABBES.*

3) Publication internationale

Belhadj Benziane Abdelhammid, Abdelkader Dilmi Bouras, Abdelkader Mezaini, Ahmed Belhadri, and Mohammed Benali. 2018. "Effect of Oral Exposure to Acrylamide on Biochemical and Hematologic Parameters in Wistar Rats." *Drug and Chemical Toxicology*, March. Taylor & Francis, 1–10. <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1450882>.