الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supèrieur et de la Recherche Scientifique

Université d'Oran Es-Sénia
Faculté des Sciences
Département de Biologie
Laboratoire de Physiologie de la
Nutrition et Sécurité Alimentaire

جامعة وهران السانية
كلية العلوم
قسم البيولوجيا
مخبر فسيولوجيا التغذية والأمن الغذائي

Mémoire de MAGISTER

Option : **Physiologie de la Nutrition et de la Sécurité Alimentaire**

Thème

Effet de la consommation subchronique du colorant alimentaire tartrazine sur quelques paramètres biochimiques sériques et sur la fertilité masculine chez la souris Swiss

Présenté par : **M^me^Soraya AINAD TABET ép. HADDI**

Soutenu le : / / 2007

Devant les membres du jury :

Président :	Mr KHEROUA O	Professeur, Université d'Oran
Examinateurs :	Mr AOUES AEK	Professeur, Université d'Oran
	Mr SLIMANI M	Professeur, Université D'Oran
Rapporteur :	Mr SAIDI D	Professeur, Université d'Oran
Co-encadreur :	M^me^ MEHEDI N	Chargée de Cours, Université d'Oran

TH2441

لا يستعار

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supèrieur et de la Recherche Scientifique

Université d'Oran Es-Sénia
Faculté des Sciences
Département de Biologie
Laboratoire de Physiologie de la Nutrition et Sécurité Alimentaire

جامعة وهران السانية
كلية العلوم
قسم البيولوجيا
مخبر فسيولوجيا التغذية والأمن الغذائي

جامعة وهران
المكتبة الجامعية المركزية
جرد
رقم: 1.22.39
وهران في 19/05/2008

Mémoire de MAGISTER

Option : **Physiologie de la Nutrition et de la Sécurité Alimentaire**

Thème

Effet de la consommation subchronique du colorant alimentaire tartrazine sur quelques paramètres biochimiques sériques et sur la fertilité masculine chez la souris Swiss

Présenté par : **M^me^Soraya AINAD TABET ép. HADDI**

Soutenu le : / / 2007

Devant les membres du jury :

Président :	Mr KHEROUA O	Professeur, Université d'Oran
Examinateurs :	Mr AOUES AEK	Professeur, Université d'Oran
	Mr SLIMANI M	Professeur, Université D'Oran
Rapporteur :	Mr SAIDI D	Professeur, Université d'Oran
Co-encadreur :	M^me^ MEHEDI N	Chargée de Cours, Université d'Oran

Remerciements

Tout d'abord, je remercie DIEU le tout puissant de m'avoir donné le privilège et la chance d'étudier et de suivre le chemin de la Science comme je l'ai toujours souhaité.

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Physiologie de la Nutrition et de la Sécurité Alimentaire sous la direction de Monsieur Djamel SAIDI, Professeur de Physiologie au Département de Biologie (Université d'Oran).

Que Monsieur SAIDI et Monsieur KHEROUA veuillent bien accepter mes remerciements les plus sincères pour l'accueil qu'ils m'ont réservée durant la réalisation de mon travail dans leur laboratoire.

Mes vifs remerciements sont adressés à Monsieur Djamel SAIDI, Professeur à l'Université d'Oran, pour son encadrement efficace et rigoureux. Je le remercie pour m'avoir dirigée avec beaucoup de compétence, de dévouement, de disponibilité et pour ses judicieux conseils.

Qu'il veuille bien accepte l'expression de ma gratitude et de mon entière reconnaissance.

J'exprime mes plus vifs remerciements à Mr Omar KHEROUA, Professeur à l'Université d'Oran, qui a bien voulu accepter de présider ce jury.

Qu'il trouve ici l'expression de ma respectueuse gratitude et de mon profond respect.

Monsieur Abdelkader AOUES, Professeur à l'Université d'Oran, me fait l'honneur d'examiner ce travail et de siéger dans ce jury.

Qu'il trouve ici l'expression de mes sincères remerciements.

Je suis très sensible à l'honneur que me fait Monsieur Miloud SLIMANI, Professeur, à l'Université d'Oran, qui a bien voulu juger ce travail.

Qu'il trouve ici, le témoignage de mon profond remerciement.

Je remercie très vivement M^{me} Nabila MEHEDI, Chargée de Cours à l'Université d'Oran pour son coencadrement rigoureux et pour sa grande disponibilité.

Qu'elle trouve ici l'expression de ma respectueuse gratitude.

J'adresse des remerciements sincères à M^{elle} Nawel BOUTIBA, pour la part active qu'elle a entreprise dans la réalisation de ce travail et pour sa bonne humeur.

Un grand merci et tous mes encouragements à toute ma promotion (amies) de Magister : M^{me} Hanane BELARBI, M^{elle} Narimene YOUCEF, M^{elle} Ghalia BENT SIDI MAHMOUD, M^{elle} Wafaa DIB.

Mes remerciements s'adressent également à l'équipe du Laboratoire de Physiologie de la Nutrition et de la Sécurité Alimentaire, pour leurs aides précieuses qu'elles m'ont apportées durant la réalisation de mon travail : M^{elle} Hanane KADDOURI et M^{me} Nawel DIDDA ainsi que M^{me} Samia ADDOU.

En fin je remercie toute personne qui a de près ou de loin aidé à la réalisation de ce modeste travail.

ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

AESA : Autorité Européenne de Sécurité des Aliments

CG : Cysteinyl-glycine

CSAH : Comité Scientifique de l'Alimentation Humaine

CSHP : Conseil Supérieur d'hygiène Publique

CTA : Académie de Médecine

CYP : Cytochrome

DJA : Dose journalière admissible

DL_{50} : Dose létale 50

DSE : Dose sans effets

DT : Directive technique

FAO : Food and Agriculture Organisation

JECFA : Joint Expert Comite Food Additive

LDH : Lactate-déshydrogénase

p.c : Poids corporel

P450 : Cytochrome 450

PAL : Phosphatasesalcalines

TGO : Transamonase-glutamate-oxaloacetate-trans-aminase

TGP : Transamonase-glutamate-purivat-trans-aminase

Y-GT : Gamma-glutamyl-transpeptidase

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma du foie 04

Figure 2 : Schéma général de la biotransformation des xenobiotiques 08

Figure 3 : Schéma d'une coupe sagittale du rein 10

Figure 4 : Schéma d'un testicule de l'homme 13

Figure 5 : Schéma de la spermatogenèse 14

Figure 6 : Schéma de la paroi d'un tube séminifère de l'homme 15

Figure 7: Schéma d'une coupe histologique montrant la structure et l'organisation des tubes séminifères de l'homme 16

Figure 8: Structure moléculaire de la tartrazine 22

Figure 9: Structure chimique de la tartrazine 22

Figure 10: Schéma simplifié des principales biotransformations de dérivés azoïques de la tartrazine dans l'organisme 25

Figure 11 : Protocole de détermination de la dose létale 50 de la tartrazine chez la souris Swiss 34

Figure 12: Protocole de répartition de différents groupes expérimentaux de souris devant recevoir de tartrazine à 0,1 ; 1 et 2,5%. 35

Figure 13 : Cinétique de la consommation de tartrazine diluée dans l'eau de boisson aux doses de 0,1 ; 1 et 2,5% à des souris mâles 47

Figure 14 : Cinétique de la consommation de tartrazine diluée dans l'eau de boisson aux doses de 0,1 ; 1 et 2,5% à des souris femelles 48

Figure 15 : Croissance pondérale des souris mâles recevant pendant 90 jours de tartrazine aux doses de 0,1 ; 1 et 2,5% 51

Figure 16 : Croissance pondérale des souris femelles recevant pendant 90 jours de tartrazine aux doses de 0,1 ; 1 et 2,5% 52

Figure 17: Teneur en albumine sérique (g/l) chez les souris témoins et les souris expérimentales traitées aux doses de 0,1 ; 1 et 2,5% pendant 90 jours 57

Figure 18: Teneur en cholestérol sérique (mmol/l) chez les souris témoins et les souris expérimentales traitées aux doses de 0,1 ; 1 et 2,5% pendant 90 jours 58

Figure 19: Teneur en urée sérique (mmoll/l) chez les souris témoins et les souris expérimentales traitées aux doses de 0,1 ; 1 et 2,5% pendant 90 jours..... 59

Figure 20: Teneur en créatinine sérique (µmol/l) chez les souris témoins et les souris expérimentales traitées aux doses de 0,1 ; 1 et 2,5% pendant 90 jours..... 60

Figure 21 : Teneur en acide urique sérique (mg/l) chez les souris témoins et les souris expérimentales traitées aux doses de 0,1 ; 1 et 2,5% pendant 90 jours..... 62

Figure 22: Teneur en bilurubine totale (µmol/l) chez les souris témoins et les souris expérimentales traitées aux doses de 0,1 ; 1 et 2,5% pendant 90 jours..... 63

Figure 23 : Teneurs en TGO sérique (U/l) chez les souris témoins et les souris expérimentales traitées aux doses de 0,1 ; 1 et 2,5% pendant 90 jours..... 64

Figure 21 : Teneurs en TGP sérique (U/l) chez les souris témoins et les souris expérimentales traitées aux doses de 0,1 ; 1 et 2,5% pendant 90 jours..... 66

Figure 25 : Effet de la tartarzine sur la fertilité masculine chez les souris traitées à des doses de 0,1 ; 1 et 2,5% pendant 90 jours comparées aux témoins..... 67

Figure 26 : Observation au microscope optique d'une coupe histologique de testicule de souris témoin (Gx 10, coloration à l'hémalun-éosine) 70

Figure 27 : Observation au microscope optique d'une coupe histologique de testicule de souris à 0,1% de tartarzine (Gx 10, coloration à l'hémalun-éosine) 70

Figure 28 : Observation au microscope optique d'une coupe histologique de testicule de souris à 1% de tartarzine (Gx 10, coloration à l'hémalun-éosine) 70

Figure 29 : Observation au microscope optique d'une coupe histologique de testicule de souris à 2,5% de tartarzine (Gx 10, coloration à l'hémalun-éosine) 70

Figure 30 : Observation au microscope optique d'une coupe histologique de testicule de souris témoin (Gx 25 coloration à l'hémalun-éosine) 71

Figure 31 : Observation au microscope optique d'une coupe histologique de testicule de souris à 0,1% de tartarzine (Gx 25, coloration à l'hémalun-éosine) 71

Figure 32 : Observation au microscope optique d'une coupe histologique de testicule de souris à 1% de tartarzine (Gx 25, coloration à l'hémalun-éosine) 71

Figure 33 : Observation au microscope optique d'une coupe histologique de testicule de souris à 2,5% de tartarzine (Gx 25, coloration à l'hémalun-éosine) 71

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : La composition de l'aliment ONAB 31

Tableau 2 : Spécification de la tartrazine E102 selon le Codex Alimentaire (FCC1) 32

Tableau 3 : Composition du colorant à l'hématoxyline 44

Tableau 4 : Degré de toxicité aigu aiguë (DL50) de la tartrazine chez la souris Swiss ... 46

Tableau 5 : Représentation statistique ANOVA de la cinétique de consommation de la tartrawine chez les souris mâles 47

Tableau 6 : Représentation statistique ANOVA de la cinétique de consommation de la tartrawine chez les souris femelles 48

Tableau 7 : Consommtion quotidienne moyenne de tartrazine établie par unité de poids corporel pour chaque essai, sur 90 jours d'expérimentation 49

Tableau 8: Effet de la tartrazine sur le poids relatif des organes chez les souris mâles .. 54

Tableau 9: Effet de la tartrazine sur le poids relatif des organes chez les souris femelles 55

Tableau 10 : Effet de la tartrazine sur le nombre et la production journalière des spermatozoïdes 68

SUMMARY

Tartrazine is a colouring synthetic food used in a multitude of foodstuffs, cosmetics and in certain drugs. Used on a large scale as a saffron in the culinary preparations by the Algerian housewife, ather presenttive we ihnore it potential harmful effects on man's.health

This work aims are study of the consequences of a subchronic tartrazine ingestion (E-102) as well as the determination of its lethal amount 50 (DL50) and of its amount without effect (DSE) in the mouse swiss, used as an experimental model.

For the study of the subchronic ingestion of the food dye, 3 groups of mouse including/understanding each one 10 males and 10 females 4 weeks old and weighing on average 20g are used.The animals are feed using a standard diet and receive during 90 days consecutive water of breuvage supplemented withe tartrazine with the respective concentrations of 0,1%, 1% and 2,5%. Each test is compared with a control treatment (drink water without tartrazine) also including 10 males and 10 females. Daily, the body weight, the volume of the hold of water as well as the clinical signs and the behavioral modifications of the animals are determinated. After 90 days of experiment, the mice are sacrificed, the blood is collected for the biochemical proportionings, the kidneys, the liver, the heart, the spleen, the lungs, the salivary glands, the brain, the suprarenals glands in the animals of the two sexes, but also the testicles and the seminal blisters in the males as well as the uterus and the ovaries in the females are taken for the determination of the relative weight of the organs. Lastly, the testiculaire function of the male mouses is evaluated by the counting of the spermatozoïdes and the histological study.

For the DL50, 25 female mice 6 weeks old and weighing between 25 and 28g are used. The animals, devided in 5 groups of 5 mice, are force-feed using a gastric probe with respectively a uniqueamount of 200, 250, 300, 355 and 357 mg tartrazine.

The results obtained show that:

- the amount without effects observed is de1836,30 mg/kg/j in the males and of 2317,11 mg/kg/j in the female, which corresponds to the amount of tartrazine 1%.
- the degree of acute toxicity (LD50) is probably a superior with 1284,72 mg/kg/b.w
-the mice treated with the high amount of tartrazine 2,5% have a hyperalbuminemy, a hypercholesterolemy, a hyperuremy associated with a hypercreatinimy and a rate raised in uric acid, a hyperbilirubinemy as well as a high rate of transaminases.
- In the males, one notes a significant reduction in the number of the spermatozoïdes ($p<0,001$) accompanied by a reduction in the day labourer production by the spermatozoïdes ($p<0,05$).
- the histological study shows an atrophy of the seminiferous tubes, a significant intercellular space, the absence of certain stages of the spermatogenèse as well as a reduction in the number of spermatozoïdes in the light of the seminiferous tubes. These results suggest a toxic action on the structure and the function testiculaire.

In conclusion:

Our results show that the subchronic tartrazine ingestion with amount of 2,5% seems to cause deteriorations of certain serum biochemical parameters, a hepatic deterioration, a renal dysfunction as well as a deterioration of the male fertility in the Swiss mouse. The tartrazine consumption with 1% seems to be a harmful amount without effect.
This shows how much it is significant to better take into account, effects of low dose of poisons in the evaluation of the risk of the food additives in food.

***Key words*:**
Tartrazine, subchronic toxicity, mouse, food dye.

ملخـــــــــص

الترترازين ملون غائي اصطناعي، يستعمل في العديد من المنتوجات الغذائية، التجميلية وبعض الأدوية.عوضا عن الزعفران، الترترازين يستعمل بكثرة في المطابخ الجزائرية، ونجهل في الوقت الحاضر عوارضه على صحة الإنسان.

هذه الدراسة تناولت تأثير استهلاك الترترازين E102 لمدة 3 أشهر، وتحديد الكمية التي تقتل 50% بالإضافة إلى تحديد الكمية بدون تأثير عند الفئران Swiss .

لهذه الدراسة، استعملنا 3 أفواج من الفئران وكل فوج يحتوي على 10 فئران ذكور و10 إناث يبلغون 4 أسابيع ويزنون 20 غ.الحيوانات تتناول غذاء مطلق وتشرب ماء شرب + ترترازين لمدة 90 يوم بتراكيز 0,1%، 1%، و 2,5% على التوالي. كل تجربة تقارب بعلاج شاهر (ماء بدون ترترازين)، يحتوي على 10 فئران ذكور و10 فئران إناث. كل يوم يتم تحديد الوزن الذاتي، حجم الماء المشروب، العلامات الكلينيكية والتغير في التصرفات. بعد 90 يوم نستخلص الدم لغرض التحاليل البيوكيميائية المصلية، بالإضافة إلى نزع الأعضاء: الكبد، الكليتان، القلب، الطحال، الرئتان، الغدد اللعابية، المخ، الغدد فوق الكليوية عند جميع الفئران، وعند الذكور ثم نزع الخصيتين والحويصلات المنوية والمبيض والرحم عند الإناث، لغرض تحديد الوزن النسبي للأعضاء. أخيرا، لغرض تحديد آلية الخصيتين تم تقدير عدد الحيوانات المنوية وتقدير الدراسة النسيجية.

لتحديد الكمية القاتلة. تستعمل 25 فئرة، تبلغ 6 أسابيع وتزن ما بين 25 و28غ موزعة على 5 أفواج يحتوي كل فوج على 5 فئرات، يعطى لها بواسطة أنبوب مَعِدي في مرة واحدة التراكيز 200–250–300–355–357 على الترتيب+ الترترازين.

النتائج المحصل عليها تظهر كالآتي:

-الكمية بدون تأثير عند الذكور 1836,30 مع/كلغ/يوم وعند الإناث 2317,11 مع/كلغ/يوم ما يناسب التركيز 1% من الترترازين.

- الكمية القاتلة 50 % من المحتمل ان تكون أكبر من 12841،72 ملغ//كلغ/ وزن الذاتي.

-الفئران بتأثير 2,5% من الترترازين يظهرون ارتفاع في الألبومين، الكليسترول اليوري، الكرياتينين، حمض اليوري، والبيليروبين بإضافة إلى ارتفاع في الأنزيمات TGO-TGP .

-عند الذكور، سجلنا انخفاض ملحوظا في عدد الحيوانات المنوية ($P< 0,001$) مع إنخفاظ في الإنتاج اليومي للحيوانات المنوية ($P<0.05$).

-الدراسة النسيجية أظهرت صغر حجم الأنابيب المنوية، المساحة ما بين الأنابيب كبيرة زائد غياب بعض مستويات تكاثر الحيوانات المنوية وانخفاض في عدد الحيوانات المنوية داخل الأنابيب المنوية.

هذه النتائج تقترح فِعل تسممي على مستوى عمل وبُنْيَة الخصيتين.

الخلاصة:

نتائجنا أظهرت بأن تناول الترترازين لمدة 3 أشهر بتركيز 2,5% يمكن أن يتسبب في إتلاف في بعض المقاييس البيوكيميائية المصلية وخلل كليوي وكبدي بإضافة إلى خلل في الخصوبة الذكرية عند الفئران Swiss .

في حين تناول الترترازين بنسبة 1% يُقترح أنها نسبة غير مؤثرة. هذا يظهر أنه من الضروري أخذ بعين الاعتبار، تأثير التراكيز المنخفضة المتسمِمَة في تقييم الخطر عند المضاف الغذائي في الأغذية.

كلمات مفتاح: ترترازين، التسمم 3 أشهر، فئران، ملون غذائي.

Sommaire

Page

INTRODUCTION 01

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES 03

Chapitre I : Physiologie

1- Le foie organe de la détoxification 03

1.1- **Généralités** 03

1.1.1- Principales enzymes hépatiques 03

1.1.1.1- Les transaminases 03
1.1.1.2- Les phosphatases alcalines (PAL) 05
1.1.1.3- La gamma-glutamyl-transpeptidases (γ-GT) 05
1.1.1.4- La lactate-déhydrogénase (LDH) 06
1.1.1.5- Le cytochrome P-450 06

1.2.2-Détoxification hépatique 06

2.2.3- L'équilibre du système de la détoxification 07

2-Détoxification rénale des xénobiotiques (Biotransformation) 06

2.1- Elimination rénale des toxines 07

2.1.1- La filtration glomérulaire 09
2.2.2- Le transport tubulaire passif 09
2.2.3- Le transport tibulaire actif 11

2.2- Biotransformation rénale des toxines 11

2.2.1- Conjugaison au gluthation 11

3-Testicules et xénobiotiques 12

3.1-Généralité 12
3.2- Déroulement de la spermatogenèse 12

Chapitre II : Aspect toxicologique du colorant

1- Méthodes de toxicologie alimentaire 17

1.1- Etudes toxicocinétiques 17
1.2-Toxicité aiguë 17
1.3- Toxicité à court terme 18
1.4- Toxicité à long terme 18
1.5- Etudes de cancérogenèse et de mutagenèse 19
1.6- Etudes de l'allergénicité 19
1.7- Etudes de l'activité sexuelle et fertilité 19
1.8- Etude tératogénique 19
1.9- Sécurité alimentaire, évaluation du risque et réglementation 20
1.9.1- Dose journalière admissible (DJA) 20

2-Les colorants alimentaires 21

3- Caractérisation du colorant alimentaire la tartrazine 21

3.1- Propriétés physico-chimiques 21
3.2- Pharmacocinétique et métabolisme du colorant E102 23
3.3- Absorption intestinale 23
3.4- Catabolismes hépatiques 23
3.5- Propriétés toxicologiques et principales formes de toxicité de la tartrazine 24
3.5.1- Evaluation du risque de la tartrazine 24
3.5.2- Réaction d'intolérance à la tartrazine 24
3.5.2.1- Tartrazine et médicaments 27
3.5.3- Effet de la tartrazine sur le système neurophysiologique 27
3.5.4- Effet de la tartrazine sur le système immunitaire 28
3.5.5- Effet cancérigène et mutagène de la tartrazine 28

Matériels & Méthodes

1- Animaux et conditions d'élevage 30

2- Produits et réactifs 30

3- Tests de toxicité à la tartrazine 30

3.1 – Testes de toxicité aiguë (dose létale 50 LD50) 30
3.2 - Toxicité subchronique de la tartrazine 33

4- Protocoles expérimentaux 33

4.1 - Détermination de la DL50 33
4.2 - Toxicité subchronique de la tartrazine 33

5- Suivi des animaux du protocole 36

5.1- Détermination de la consommation effective journalière de la tartrazine par les souris 36
5.2- Mesure de la croissance pondérale 36
5.3- Etude des effets sublétaux de la tartrazine chez les souris 36

5.3.1- Prélèvement sanguin et d'organes 36
5.3.2- Analyses biochimiques sériques 37

5.3.2.1- Dosage de l'albumine 37
5.3.2.2- Dosage du cholestérol total 37
5.3.2.3- Dosage de l'urée 37
5.3.2.4- Dosage de la créatinine 38
5.3.2.5- Dosage de l'acide urique 38
5.3.2.6- Dosage de la Bilirubine totale 39
5.3.2.7- Analyses enzymatiques 39

5.3.1-***Dosage de glutamate-oxaloacetate-transaminenase (TGO)*** 39
5.3.2-***Dosage de glutamate-pyruvate-transaminase (TGP)*** 40

6- Comptage des spermatozoïdes 40

6.1- Comptage des spermatozoïdes dans le testicule 40

7- Etude histologique 41

7.1- traitement des échantillons 41

7.1.1- La fixation 41
7.1.2- La déshydratation 41
7.1.3- La clarification 41
7.1.4-*L'inclusion* 41

7.2-Traitement des lames 41

7.2.1-*Etalement sur lames* 42
7.2.2-Déparaffinage 42
7.2.3-*Réhydratation* 42
7.2.4-*Coloration* 42

8- Analyses tatistique 43

Résultats

1- Détermination de la dose létale 50 (D L50) 45

2- Cinétique de la consommation de la tartrazine par les souris 45

3- Consommation moyenne de la tartrazine par les souris 45

4- Effet de la tartrazine sur la croissance pondérale 50

5- Effet de la tartrazine sur le taux de mortalité et les mouvements comportementaux 50

6- Effet de la tartrazine sur le poids relatif des différents organes 53

7- Effet de la tartrazine sur les paramètres biochimiques sériques 56

5.1- Teneur en albumine 56
5.2- teneur en cholestérol total 56
5.3- Teneur en urée 56
5.4- teneur en créatinine 56
5.5- Teneur en acide urique 61
5.6- Teneur en bilirubine totale 61
5.7- Teneur en TGO 61
5.8- Teneur en TGP 65

8-Effet de la tartrazine sur le nombre et la production journalière des spermatozoïdes 65

9-Etude histologique 69

9.1- Effet de la tartrazine sur la structure des testicules 69

Discussion

Discussion 72

Conclusion

Conclusion 78

Références bibliographie 80


Introduction

1- Introduction

Divers types de produits chimiques peuvent se retrouver dans les denrées alimentaires. Certains s'y retrouvent de manière intentionnelle, il s'agit des colorants alimentaires.

Les colorants alimentaires sont présents actuellement dans la quasi totalité des produits alimentaires. Ils sont utilisés pour la conservation et l'obtention d'une meilleure sapidité mais également pour la rentabilité du produit.

A l'origine, les colorants étaient d'abord des produits naturels, puis petit à petit, l'homme a appris à produire des colorants de synthèse dont l'ingestion n'est pas toujours sans conséquences pour notre santé. En effet, il est établi que certains additifs sont responsables d'intolérance et d'allergies, d'autres sont mutagènes et génotoxiques et même potentiellement cancérigènes (Sasaki et al., 2002).

La biosécurité alimentaire en toxicologie est un sujet de préoccupation dont l'individu en est responsable. Elle résulte d'une convergence d'efforts de tous les acteurs de la filière alimentaire : professionnels, consommateurs, pouvoirs publics et scientifiques.

Certains colorants alimentaires, en raison de leur innocuité bien connue, sont utilisables en quantité libre, d'autres sont soumis à des conditions d'usage réglementées, mais certains peuvent être considérés comme dangereux.

Ce fait permet d'exiger une nécessité de sécurité toxicologique, et donc les colorants alimentaires doivent répondre à des évaluations scientifiques approfondies et rigoureuses de leur sécurité avant d'être approuvés par le Comité Scientifique de l'Alimentation Humaine (CSAH) et par le comité mixte FAO/OMS (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture/ Organisation Mondiale de la Santé).

A la lumière de ces données, nous nous sommes intéressés à l'étude de la tartrazine, un colorant alimentaire synthétique dont l'utilisation s'est accentuée ces derniers temps dans nos cuisines et dans l'industrie agroalimentaire.

A notre connaissance, aucune étude n'a été faite à l'échelle régionale sur les conséquences sur l'organisme et les fonctions dues à l'utilisation de la tartrazine par le consommateur.

Quelques rares données ont montré que la tartrazine est impliquée dans des réactions allergiques, en particulier chez des personnes souffrant d'urticaire et d'asthme (Juhlin, 1981 ; Dutau et al., 1996). La prévalence est de 1% chez des malades présentant des urticaires/angiooedèmes (Nettis et al., 2003).

Par ailleurs, la tartrazine présente une sensibilité dite croisée avec certains médicaments (Bhatia, 2000 ; Lannoye et Denil, 2001). D'autre part, il a été reporté également que la tartrazine pouvait induir des dommages au niveau de l'ADN des organes gastrointestinaux (Das et Mukherjee, 2004).

L'objectif principal de notre travail est donc d'évaluer le risque toxicologique de la tartrazine à court terme chez des souris de souche Swiss, utilisées comme modèle toxicologique. Nous étudierons en particulier les aspects suivants :

- La détermination de la dose sans effets observés (DSE) et de la dose létale 50 (DL50) de la tartrazine.
- L'évaluation des conséquences de la consommation subchronique de ce colorant sur certains paramètres biochimiques sériques, sur le poids relatif des organes et sur la fertilité masculine chez la souris.

Rappels biliographiques

Chapitre I

L'étude toxicologique d'un produit est souvent initialisée par une phase descriptive qui porte sur le devenir métabolique de cette substance. De ce fait, les sites majeurs de fixation des molécules toxiques sont le foie et le rein, particularité à mettre en rapport avec leurs capacités de transformation et d'élimination de ces molécules. Les testicules sont également un site important de stockage des substances toxiques (Lu, 1992). Pour toutes ces raisons, il nous parait important de passer en revue les principales fonctions de ces organes.

1- Le foie organe de la détoxification

1.1-Généralités

Le foie est l'organe le plus volumineux de l'organisme : 1,5 kg en moyenne chez l'adulte, ce qui représente 1/50ème du poids total du corps humain. Il est composé de 70% de cellules parenchymateuses ou hépatocytes et de 30% de cellules diverses telles les cellules de Ito, les cellules composant les canalicules biliaires, et les cellules de Kupffer.
Il est doué de fonctions métaboliques complexes. L'une des fonctions fondamentales du foie est d'assurer la détoxification et la sécrétion et l'évacuation de la bile par les canalicules biliaires. D'autre part, la vascularisation du foie, sa situation privilégiée de relation entre l'appareil digestif et l'appareil circulatoire, permet de réguler la distribution de nombreux métabolites issus de la nutrition et de maintenir l'homéostasie. L'organisation zonulaire de la fonctionnalité hépatique est particulièrement bien adaptée aux flux de substrats et de toxiques (Castaing et Smail, 1999) (figure1).

1.1.1- Principales enzymes hépatiques

Les principales enzymes hépatiques ont pour fonction la catalyse biologique, elles augmentent la vitesse de certaines réactions chimiques. Leur taux sérique reflète l'état des tissus : l'augmentation dans le sérum de l'activité d'une enzyme est signe d'une altération ou d'une souffrance cellulaire (Feldmane, 2001). Les enzymes de l'exploration biologique du foie sont les suivantes.

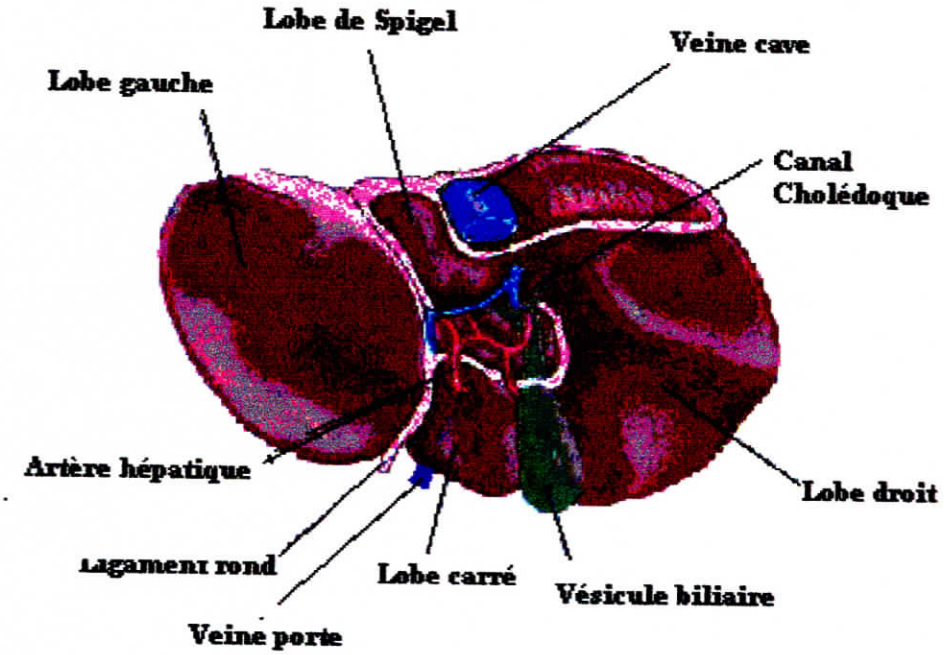


Figure 1 : Schéma du foie (d'après Castaing et Smail, 1999).

1.1.1.1- Les transaminases

Les transaminases permettent le transport du groupement aminé d'un acide aminé sur un acide α- cétonine. Les deux principales réactions de transamination sont catalysées par les enzymes intracellulaires, la glutamo-oxaloacétique (TGO) et la glutamo-pyruvate (TGP) sont des enzymes intracellulaires (Ward et Cockayne, 1993). Elles sont essentiellement présentes dans le foie, mais aussi dans le cœur, le rein, le cerveau, le muscle et le squelette. En cas de nécrose cellulaire ou d'altération de la perméabilité de la membrane cellulaire, leurs taux sériques s'élèvent (Henderson et Moss, 2001).

Le rapport TGO/TGP permet d'aller plus loin dans le diagnostic biologique. En cas d'atteinte virale, médicamenteuse, toxique ou biliaire du foie, ce rapport est supérieur à 1. Dans les atteintes alcooliques du foie, ce rapport est inférieur à 1 (Vassault et al., 1999).

1.1.1.2- Les phosphatases alcalines (PAL)

Les phosphatases alcalines sont des phosphonoestérases qui coupent la liaison ester-phosphorique par hydrolyse en libérant de l'acide phosphorique. Les phosphates alcalines sont également, en dehors du foie, présentes aussi dans l'os, l'intestin et le rein. Toutefois, on dispose de moyens biochimiques permettant de les distinguer selon leur origine. Celles du foie se trouvent surtout dans les petits vaisseaux et les canalicules biliaires. L'élévation de leur taux sérique signe surtout des cholestases et des infiltrations malignes ou bénignes de l'organe. Leur élimination se fait par la bile (De la Farge, 1990).

1.1.1.3- La gamma-glutamyl-transpeptidase (γ-GT)

La gamma glutamyl-transpeptidase exerce son activité catalytique sur des réactions de transfert et d'hydrolyse, ainsi que le transport membranaire des aminoacides. Cette enzyme est présente dans les canaux biliaires et pancréatiques. L'augmentation du taux sérique de γ-GT est un signe d'affection biliaire, hépatique (cholestase) et intoxications médicamenteuses mais d'autres situations telles que l'alcoolisme, les atteintes pancréatiques et même celles de certains autres organes donnent la même anomalie biologique. Elle représente donc un test très sensible mais peu spécifique (Ristoff et Larsson, 2003).

1.1.1.4- La lactate-déshydrogénase (LDH)

Un taux augmenté de lactate déshydrogénase résulte d'une nécrose cellulaire mais n'est pas spécifique du foie. D'autres organes en contiennent, notamment le cœur. Les LDH augmentent également dans les intoxications aiguë et les ictères préhépatiques (Valdiguié, 1993).

1.1.1.5- Le cytochrome P-450

Les cytochromes P450 (CYP) forment une superfamille multigénique d'enzymes impliquées dans le métabolisme oxydatif de molécules très diverses, comprenant aussi bien des xénobiotiques (toxiques, pesticides, médicaments..) que des substances endogènes (hormones stéroïdiennes, acides gras, vitamines). Les CYPs sont sans conteste les enzymes clés de détoxication, ils catalysent les xénobiotiques en évitant l'accumulation de substances potentiellement toxiques dans l'organisme (Belpaire et Bogaet., 1996). Les cytochromes P450 ne sont pas spécifiques d'un substrat : au contraire, ils peuvent catalyser la transformation de milliers de composés différents, même des composés nouvellement synthétisés, comme des médicaments. Ceci est évidemment important pour la pharmacologie (Fontaine et Rahmani, 1998). Les P450 ont une spécificité de substrats très faible cependant, elles sont souvent très spécifiques en ce qui concerne la réaction catalysée. La plupart des formes de cytochromes P450 (à l'exception de celles participant dans la biosynthèse d'hormones) peuvent être induites ou réprimées par différents xénobiotiques. Ceci est souvent la cause d'effets secondaires des médicaments (Lin, 2000).

1.2.2- Détoxification hépatique (Biotransformation)

C'est le processus d'élimination par le foie des xénobiotiques (substances pouvant être toxiques pour l'organisme) (Despopoulos et Silbernacl, 1992). Ces substances, souvent liposolubles sont difficilement excrétables sous leur forme native. Le foie dispose cependant des mécanismes actifs permettant par biotransformation d'inactiver et d'éliminer ces substances étrangères (Beaune et Loriot, 2000). Il permet en effet la conversion de la molécule mère en métabolites et en dérivés qui sont généralement moins toxiques, plus hydrosolubles et plus polaires, et donc facilement excrétables (Sinaiko, 2000).

Ces réactions peuvent être classées d'après Williams (1959) en deux phases principales de réactions effectuées par le système enzymatique microsomal (SEM) pour métaboliser les xénobiotiques comprenant des enzymes de biotransformation (phase I et II) et une 3ème phase s'ajoute, celle des transporteurs (phase III) (Moulé et Décloitre, 1993) (figure 2).

Phase I :

Les réactions de phase I, dites de fonctionnalisation, permettent l'introduction d'une fonction chimique nouvelle (-OH, NH_2, COOH) rendant la molécule plus polaire. Le plus souvent ces réactions sont des réactions d'oxydation, catalysées par les cytochromes P450 qui oxydent ou réduisent les toxines pour les rendre plus sensibles à la phase II (Pinau et al., 1995 ; Lepoittevin, 2005).

Phase II :

Les réactions de phase II, dites de conjugaison, permettent l'ajout d'un radical hydrophile et sont réalisées soit directement sur le xénobiotique inchangé, soit sur les métabolites fonctionnalisés générés par la phase I.

Ces réactions de conjugaison augmentent l'hydrophilie de la molécule, facilitent son transport et activent son élimination par voie rénale et biliaire (Morimitsu et al., 2000).

Les principales enzymes réalisant ces transformations appartiennent à la famille des transférases.

Phase III :

Les enzymes de phase III permettent l'élimination des conjugués hydrophiles. Ce sont essentiellement des glycoprotéines membranaires permettant le transport actif des xénobiotiques et des conjugués de la phase II hors de la cellule. Elles participent à l'excrétion hors de ces molécules par la voie biliaire (Raisonnier, 2004).

2.2.3- L'équilibre du système de la détoxification

L'équilibre du système de détoxification est primordial, il dépend de la nature et de l'expression des enzymes du métabolisme des xénobiotiques et en particulier, des cytochromes P450. Cette expression peut varier en fonction de facteurs génétiques, environnementaux ou physiologiques (Beaure, 1998).

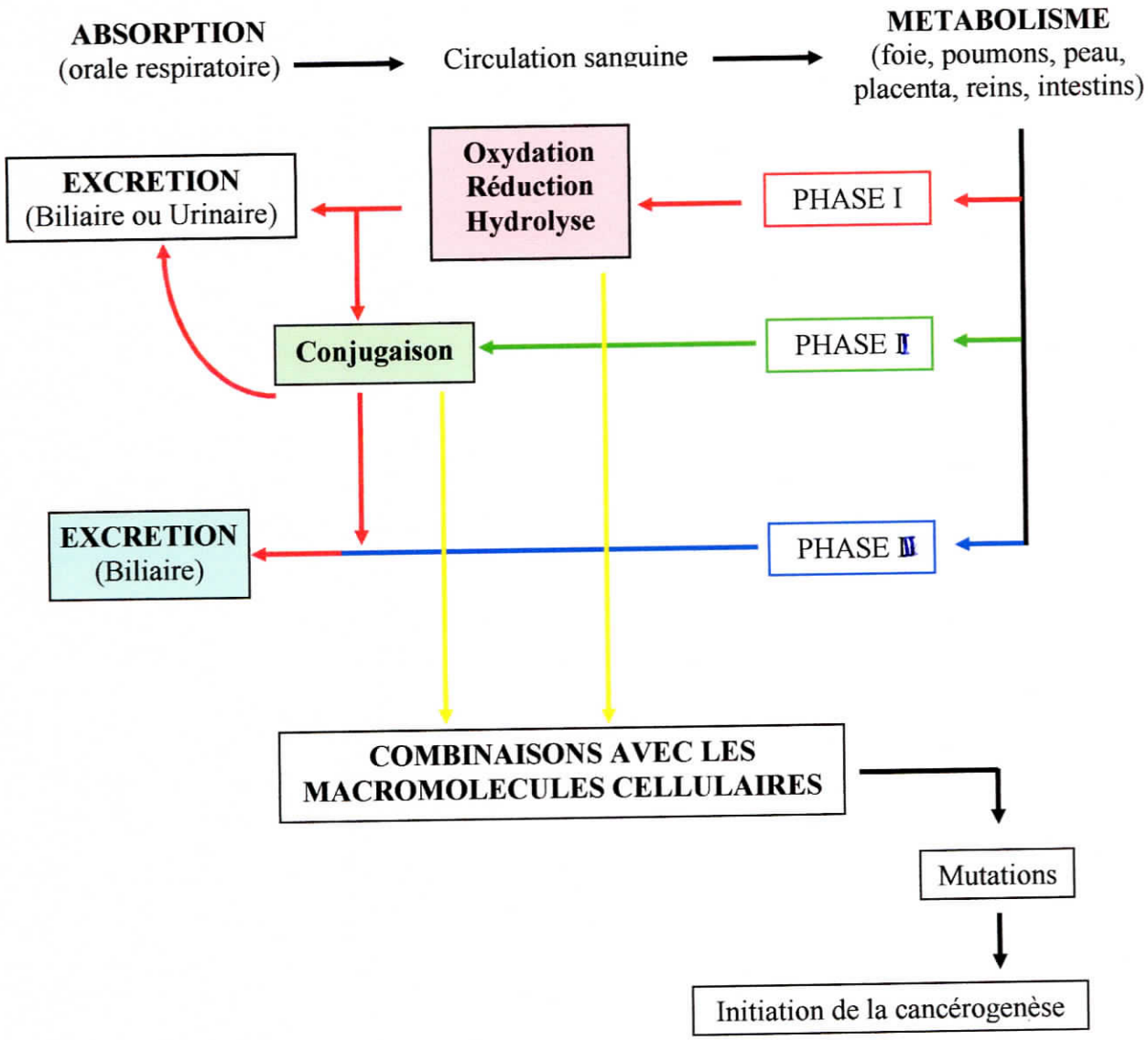


Figure 2: Schéma général de la biotransformation des xénobiotiques (D'après Lepoittevin, 2005).

L'inhibition de ces enzymes peut avoir pour résultat une augmentation de la concentration de toxines dans le corps alors que l'induction du cytochrome P450 augmente le rythme des biotransformations, diminuant les concentrations des toxines ou des produits pharmaceutiques. Les enzymes de la phase II peuvent agir directement sur certaines toxines mais doivent être activées par la phase I dans d'autres cas. La détoxification dans la phase II forme des liens pour neutraliser les toxines ou les rendre hydrosolubles. Les enzymes de métabolisation des xénobiotiques jouent un rôle majeur dans la régulation des effets toxiques, mutagéniques, ou créateurs de lésions oxydatives de produits chimiques carcinogènes. De nombreuses données indiquent que l'induction d'enzymes de détoxification de la phase II apporte une protection contre la carcinogenèse chimique, particulièrement au moment de la phase d'initiation.

Toutefois, le métabolisme des xénobiotiques ne conduit pas toujours à la détoxication de ces composés. Dans certains cas, le produit oxydé ou réduit peut manifester une très forte réactivité (Lepoittevin, 2005).

2- Détoxification rénale des xénobiotiques

2.1- Elimination rénale des toxines

Le rein est responsable de multiples fonctions de régulation, synthèse endogène et métabolisme. Son rôle est crucial dans la détoxification et l'élimination de certains xénobiotiques (Palmer, 1995 ; Stengel et coll, 1996) (figure 3). Les substances étrangères et leurs métabolites sont drainés vers le rein par les artérioles rénales au niveau interstitiel ou dans le tube rénal où ils sont éliminés par trois processus distincts :

2.1.1- La filtration glomérulaire

La filtration glomérulaire se fait essentiellement par voie passive à travers le filtre glomérulaire et concerne uniquement les substances non liées à des protéines porteuses plasmatiques (Robert, 1999).

2.1.2- Le transport tubulaire passif

Après la filtration glomérulaire, les toxines se retrouvent dans l'urine primitive en contact avec le tube rénal. Les toxines passent dans les cellules épithéliales du tube rénal qui se comporte comme une membrane lipidique, par simple diffusion.

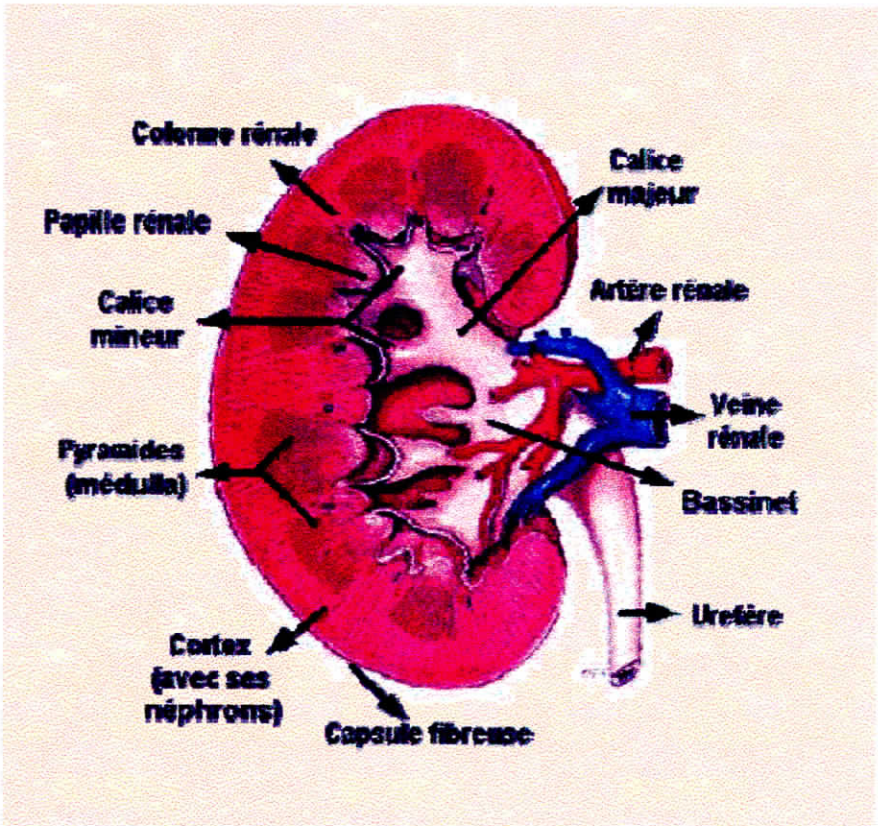


Figure 3: Schéma d'une coupe sagittale du rein

(D'après Hannedouche, 2001).

Ce passage à travers les cellules épithéliales se fait selon le gradient de concentration en favorisant le passage des substances liposolubles non polaires (Rose et Rennke, 1995).

2.1.3- Le transport tubulaire actif

Le transport tubulaire actif concerne aussi bien les substances toxiques libres que les substances liées à des protéines porteuses. Le transport actif se charge d'excréter les toxines lipophobes contre leur gradient de concentration, il dépend essentiellement de l'affinité du toxique. Les toxines qui empruntent le même système de transport peuvent entrer en compétition entre eux. Les toxines polaires lipophobes sont moins facilement réabsorbées par simple diffusion et plus facilement sécrétées par les mécanismes de transport actif que les corps chimiques non polaires liposolubles. De ce fait, les toxines d'origine liposolubles et non biotransformées ne sont quasiment pas excrétées et presque complètement réabsorbées. Ceci est le cas de nombreuses substances toxiques qui peuvent s'accumuler dans les cellules tubulaires, causant une toxicité rénale importante (Rose, 1994).

2.2- Biotransformation rénale des toxines

Le rein peut établir certaines biotransformations avant d'excréter certains xénobiotiques dans le but principal de produire, à la fin, des substances hydrosolubles. Ces biotransformations sont favorisées par des enzymes pouvant générer des intermédiaires donnant naissance soit à des produits inactifs par détoxification soit à des produits plus toxiques que les substances d'origines par activation (Robet, 1999 ; Robert, 1999).

Les reins sont capables d'exécuter des réactions de réduction, d'hydrolyse et de conjugaison. Le cortex possède une forte activation du cytochrome P450, toutefois cette voie d'activité reste moins importante en comparaison avec celle du foie (Lash, 2000).

2.2.1- Conjugaison au glutathion

Plusieurs toxiques subissent cette voie de conjugaison au glutathion qui représente la principale voie de détoxification du tissu rénal. In vivo, la réaction est catalysée par un groupe d'enzymes clés appelés glutation-s-transférases présentes dans le cytosol ou dans le réticulum endoplasmique. Le glutathion conjugué sort de la cellule pour subir l'action de deux enzymes qui se trouvent à la surface des cellules épithéliales : la gamma glutamyl transférase (γ-GT) et la cysteinyl-glycine (CG).

Le produit qui en résulte est réabsorbé par d'autres cellules pour être enfin largué dans les urines (Lash, 2000).

3- Testicules et xénobiotiques

3.1- Généralité

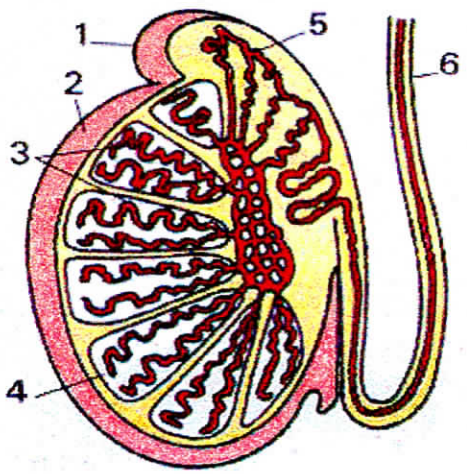
Parmi les trois grandes lignées cellulaires qui constituent le testicule (cellules germinales, cellules de Sertoli et cellules de Leydig), c'est la lignée des cellules germinales qui constitue la cible principale des toxines. La spermatogenèse chez l'homme est un processus d'une durée approximative de 72 jours et qui comprend différentes étapes bien différenciées, elles mêmes subdivisées en différentes phases. C'est au niveau d'une de ces étapes « la méiose » et au niveau des cellules germinales spermatocytes que les effets des toxines sont exercés de manière sélective (Le Moigne et Foucrier, 2004) (figure 4).

3.2- Déroulement de la spermatogenèse

Elle a lieu au niveau des tubes séminifères dans les testicules. Les spermatozoïdes formés sont ensuite conduits vers l'extérieur par un système de canaux (figure 5) et à travers de multiples mitoses, à partir d'une spermatogonie, on en obtient un stock de spermatozoïdes. Puis la spermatogonie grandit et devient spermatocyte I (Collenot et Signoret, 2000). A ce stade les cellules souches sont à 2n chromosomes.

La méiose des spermatocytes I produit des spermatocytes II qui n'ont plus que n chromosomes. La suite de la méiose conduit à des spermatides qui migrent vers la lumière du tube. La différenciation de ceux-ci donne finalement le spermatozoïde, au centre du tube. Ce processus est continu, c'est-à-dire que les cellules se transforment successivement et sont remplacées par de nouvelles spermatogonies obtenues par mitose (Darribère, 2002).

Les tubes séminifères, sont constitués aussi de grandes cellules, les cellules de Sertoli, qui soutiennent et nourrissent les spermatogonies et qui sont donc indispensables à la spermatogenèse (figure 6). Les tubes séminifères conduisent, par un système de drainage, au canal épididymaire qui devient canal déférent en sortant des testicules (figure 7). Les cellules sont propulsées dans ce canal, et mélangées avec le liquide séminal dans la prostate, pour former le sperme lors de l'éjaculation (Franquinet et Foucrier, 2003).



1- épididyme
2- testicule
3- tubes séminifères
4- lobule testiculaire
5- canal de l'épididyme
6- canal déférent

Figure 4 : Schéma d'un testicule de l'homme

(D'après Le Moigne et Froucrier, 2004).

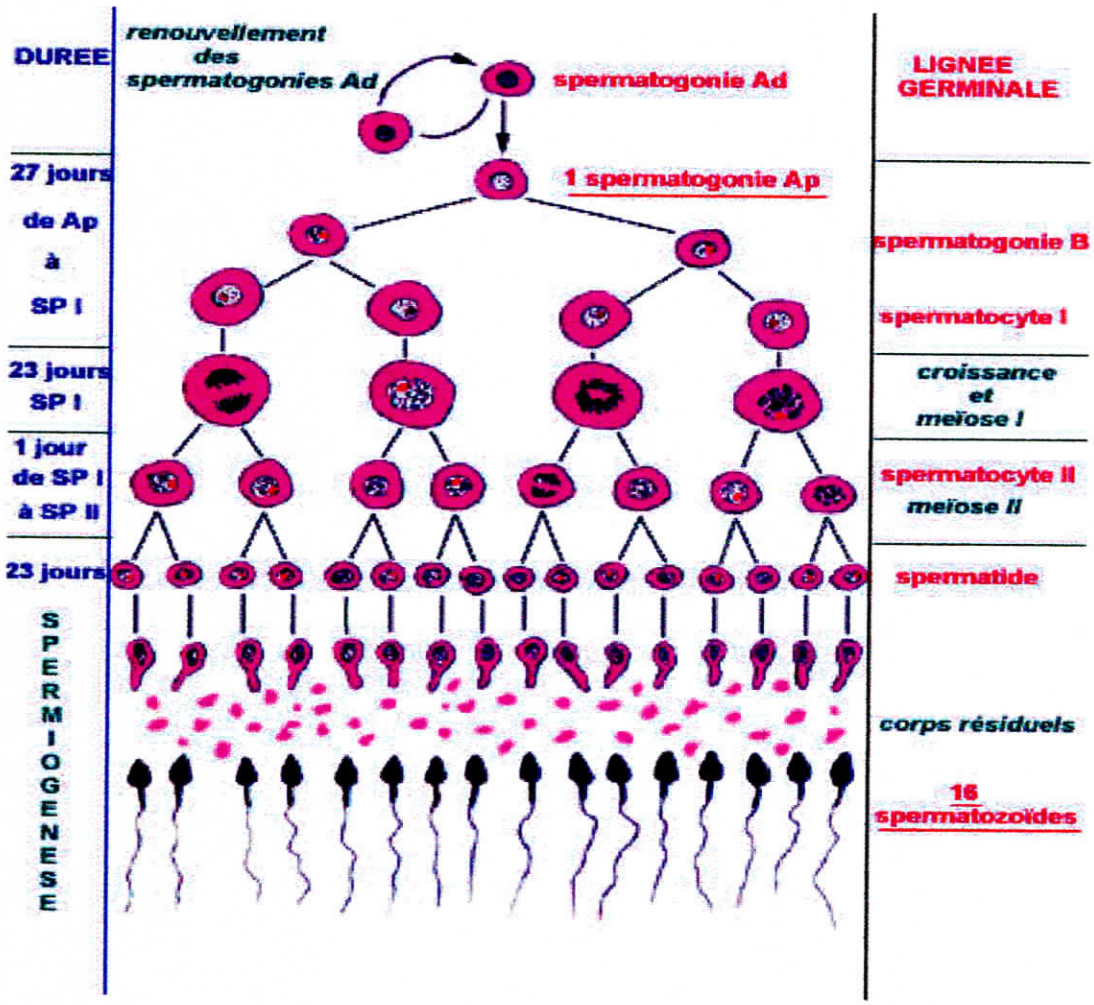


Figure 5 : Schéma de la spermatogenèse

(D'après Holstein et Roosen-Runger, 1981).

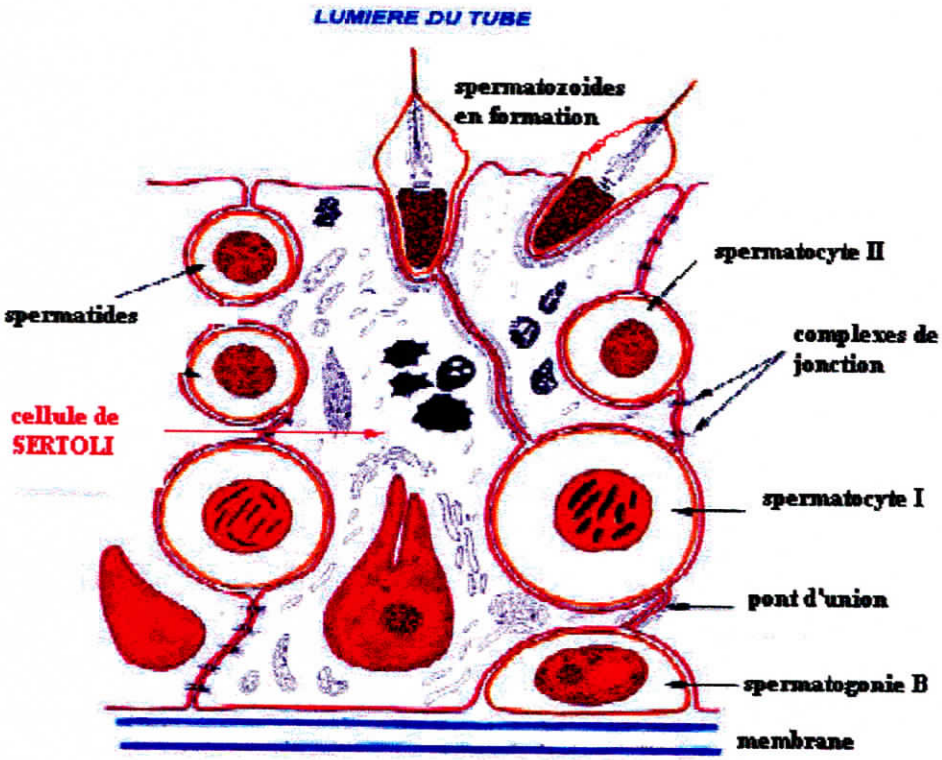
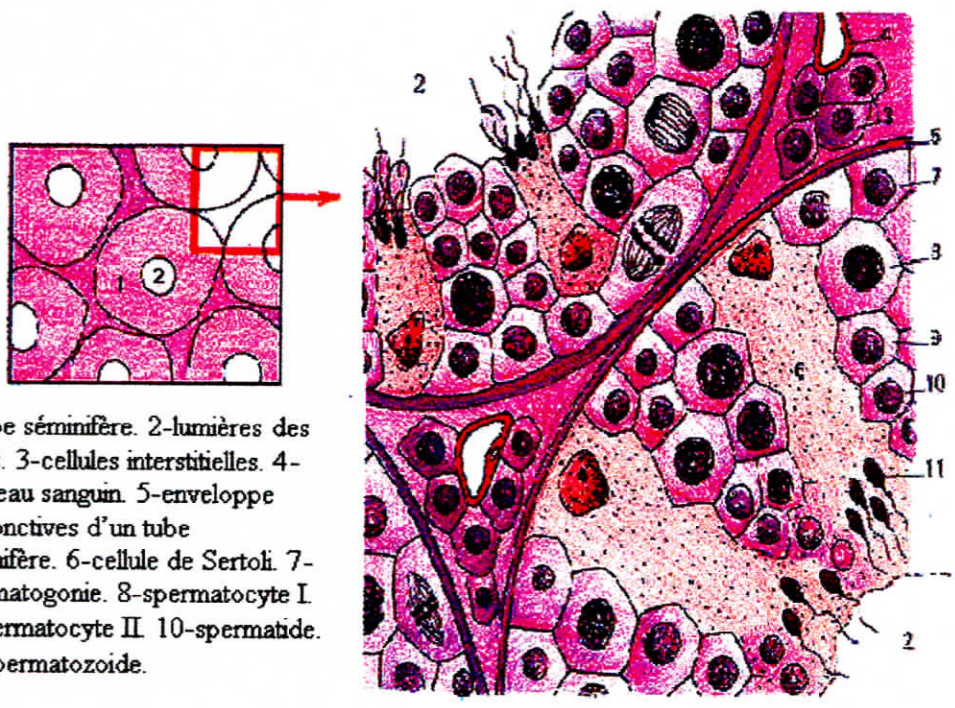


Figure 6 : Schéma de la paroi d'un tube séminifère de l'homme (D'après Le Moigne et Froucrier, 2004).



1-tube séminifère. 2-lumières des tubes. 3-cellules interstitielles. 4-vaisseau sanguin. 5-enveloppe conjonctives d'un tube séminifère. 6-cellule de Sertoli. 7-spermatogonie. 8-spermatocyte I. 9-spermatocyte II. 10-spermatide. 11-spermatozoide.

Figure 7 : Schéma d'une coupe histologique montrant la structure et l'organisation des tubes séminifères de l'homme

(D'après Le Moigne et Froucrier, 2004).

Chapitre II

1-Methodes de toxicologie alimentaire

Les effets toxiques d'une substance ne résultent pas uniquement de l'absorption, en un court espace de temps, ou de doses relativement fortes, mais également de l'absorption de doses mêmes minimes, pour entraîner les effets aigus, mais dont la répétition finit par provoquer des troubles.

L'évaluation étendue de la toxicité d'une molécule fait appel à différentes études (Lu, 1992 ; James, 1993 ; Fan et al., 1995) dont les modalités ont été réglementées par la Food and Drug Administration (FDA) américaine en 1987 puis par l'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE) en 1989 dans « les bonnes pratiques de laboratoires », afin d'améliorer la validité des données recueillies.

1.1- Etudes toxicocinétiques

Ces études visent à explorer le métabolisme de la molécule toxique. Elles reposent souvent sur l'utilisation de molécules marquées par des isotopes radioactifs, et sont effectuées en général sur plusieurs espèces animales.

Même si les résultats concluent à un risque négligeable chez l'animal, une série d'études doit tout de même être effectuée chez l'homme.

Les mécanismes possibles de toxicité sont triples. II peut s'agir d'une toxicité directe (du colorant ou de ses métabolites) sur les protéines de l'organisme.

La toxicité indirecte peut être le fait soit d'une destruction de principes alimentaires essentiels (inactivation de la vitamine B1) en particulier dans les vins blancs), soit de la formation de produits toxiques à partir de certains composants de l'aliment.

Enfin, le plus souvent, il s'agit d'une toxicité immuno-allergique, l'exemple le plus frappant étant celui de la tartrazine (E102) (Gausserès et Fricker, 1997).

1.2-Toxicité aiguë

L'intérêt de l'épreuve de toxicité aiguë est d'écarter les substances trop toxiques et de servir ensuite de guide aux expériences ultérieures en fournissant des indications sur les principaux signes d'intoxication et sur les éventuelles différences relatives aux espèces. Sur le plan expérimental, elle s'effectue en administrant la substance toxique en une seule fois, ou en plusieurs fois très rapprochées, à deux, mieux à trois espèces animales.

L'intérêt de ces tests est d'orienter la préparation des protocoles de toxicité animale en administration réitérée et de fournir des données utiles à l'usage chimique.

Les études de toxicité aiguë aboutissent classiquement à la détermination de la dose létale$_{50}$ (DL50) qui est généralement déterminée ou à la dose létale$_{100}$ (DL100) (Adrian et al., 1995).

1.3- Toxicité à court terme

L'objectif des études de toxicité à court terme est d'évaluer la nature biologique et le site des effets toxiques.

Ces études permettent également de déterminer la dose à laquelle se produisent ces effets et d'en déduire la dose sans effet observé (DSE), exprimée en milligrammes par kilogramme de poids et par jour (mg/kg de poids/j) chez l'animal en expérience (Chambolle, 2002).

1.4- Toxicité à long terme

Les études à long terme mesurent les effets cumulatifs du toxique en répétant son administration pendant une période s'étendant sur la plus grande partie de la vie de l'animal et sur au moins deux générations.

En pratique, cette toxicité à long terme est le fait, essentiellement, des additifs dont l'intérêt est le plus discutable. Lorsque le produit est destiné à un usage pédiatrique, une expérimentation complémentaire sur animaux jeunes, peut être utile pour déceler une éventuelle toxicité particulière chez l'enfant (Potus et al., 1996).

Les signes cliniques de toxicité sont recherchés :

- Sur le plan clinique : l'aspect, le poids, la prise de nourriture, la prise de boisson, la croissance, l'aptitude à la reproduction et le taux de mortalité.
- Sur le plan biologique : les paramètres hématologiques, biochimiques, urinaires et anatomopathologiques par les examens histopathologiques des différents organes (foie, reins, centres nerveux, moelle osseuse, glandes endocrines).

1.5- Etudes de cancérogenèse et de mutagenèse

L'attention portée à la recherche d'éventuels effets cancérogènes des substances véhiculées par les aliments ne cesse de croître, en particulier pour tenter de mieux comprendre l'origine des cancers humains (Strickland et Groopman, 1995).

La relation étroite qui existe entre mutagenèse et cancérogenèse implique également l'étude du pouvoir mutagène des molécules.

Des testes simples et rapides sont disponibles. Ils utilisent des systèmes enzymatiques, des micro-organismes, des cellules de mammifères, ou une batterie de paramètres comme les mutations génétiques, les effets chromosomiques et la réparation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) (Pinau, 1998).

1.6- Etudes d'allergénicité

Même si les manifestations allergiques consécutives à l'ingestion de substances xénobiotiques ne concernent qu'une fraction très réduite de la population (Ebo et Stevens, 2002), ce risque doit tout de même être évalué.

1.7- Etudes de l'activité sexuelle et fertilité

Après administration du produit testé sur le mâle et/ou sur la femelle, les modifications de l'activité sexuelle peuvent être décelées en étudiant le déroulement et la fréquence des accouplements et la modification de la fertilité en comptant la fréquence des gestations. Une étude des spermatozoïdes peut également être entreprise (Allain, 2005).

1.8- Etude tératogènique

Une substance peut avoir des effets toxiques sur la descendance quelque soit le moment de la gestation où elle est administrée à la mère mais plus particulièrement durant la phase d'embryogenèse.

L'activité tératogène d'un produit est mise en évidence par l'apparition d'anomalies morphologiques ou fonctionnelles dans la descendance de femelles traitées pendant la gestation. L'expérimentation de chaque produit étudié se fait sur deux ou trois espèces animales (Chavéron, 1999).

1.9- Sécurité alimentaire, évaluation du risque et réglementation

Avant qu'un additif ne puisse être utilisé dans l'alimentation, il doit faire l'objet d'études extrêmement rigoureuses, et dont les résultats doivent être évalués par des experts. Seuls les additifs qui ont fait la preuve de leur innocuité aux niveaux d'utilisation proposés sont autorisés en alimentation.

La réglementation touchant les colorants alimentaires est régie sur trois niveaux :

-Au niveau international par la FAO (Food and Agriculture Organization), ou encore la WHO (World Health Organization), notamment de la part du Joint Expert Comite Food Additive (JECFA).
-Au niveau européen par CSAH selon un protocole strict : Codex alimentaire qui regroupe une multitude d'établissements.
-En France par le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique (CSHP), la Commission de Technologie Alimentaire (CTA) et l'Académie de Médecine.

Le but ultime des études de toxicologie est de pouvoir déterminer le rapport sécurité/risque des molécules pour l'homme. Qu'il s'agisse de substances présentes naturellement dans les denrées alimentaires, de contaminants ou d'additifs, l'étude toxicologique doit finalement conduire à un choix à partir de critères fiables (Pariza, 1996).

1.9.1- Dose journalière admissible (DJA)

La DJA est la dose d'un produit qui peut être ingéré quotidiennement par l'individu pendant sa vie entière sans risques perceptibles prévisibles pour sa santé. Elle est exprimée en mg/kg de poids corporel (Directive du 21/11/2005 EU).

La valeur de la DJA est obtenue à partir de la DSE, c'est-à-dire la dose maximale n'induisant aucun signe de toxicité dans l'espèce animale la plus sensible et la plus appropriée et en utilisant l'indicateur de toxicité le plus sensible. L'extrapolation de la DSE chez l'animal à la DJA chez l'homme nécessite l'emploi d'un facteur de sécurité dont la valeur le plus couramment employée est 100. Ce facteur prend en compte la différence de sensibilité entre les animaux et l'homme, les spécificités toxicologiques et physiologiques de la substance ainsi que les variations individuelles (Meyers et al., 1996).

2- Les colorants alimentaires

Les colorants alimentaires font partie d'une famille de substances appelées additifs alimentaires, ces derniers représentent « toutes substances dont l'utilisation prévue résulte, ou dont on peut raisonnablement s'attendre à ce qu'elle résulte, directement ou indirectement, en son incorporation en tant qu'élément ou en son effet sur les caractérisations de tout aliment » d'après Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition (FDACFSAN, 2001). La codification des additifs est normalisée, chaque substance utilisée ayant l'approbation du Comité Scientifique de l'Alimentation Humaine CSAH est répertoriée par la lettre E suivie de 3 chiffres (Taylor et Dormedy, 1998).

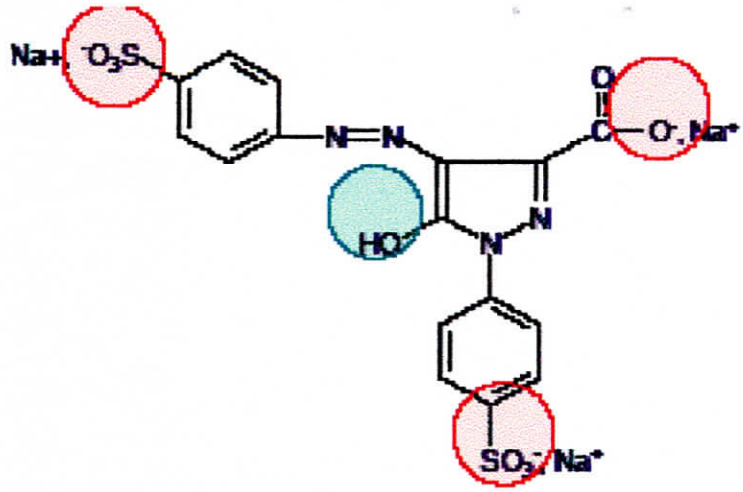
Cependant la liste des colorants alimentaires utilisable a été récemment réduite, certains d'entre eux peuvent être dangereux pour la santé (Deschenes et al., 2001).

La tartrazine a été souvent rattachée à plusieurs réactions défavorables. Elle est autorisée par l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (AESA), par CSAH et par la Directive Technique 94/36/EC (1994). Elle a fini par disparaître en 1991 de la liste des colorants alimentaires autorisés en Suisse, et de nombreux pays limitent sévèrement son emploi.

3- Caractérisations du colorant alimentaire la tartrazine

3.1- Propriétés physico-chimiques

La tartrazine est un sel trisodique de l'acide (sulfo-4-phénylazo-1)-4-(sulfo-4 phényl)-1hydroxy-5 pyrazolecarboxylique-3 également connue sous le nom de FD&C N° 5 ou E-102 en Europe. Sa formule moléculaire chimique est : $C_{16}H_9Na_3O_9S_2$ (figure 8). Ce colorant alimentaire appartient à la classe des colorants mono azoïques, il est de couleur jaune orange, dérivé du goudron et il est employé pour colorer certains aliments ou pour envelopper des produits de charcuteries, des glaces, de la confiserie, des croûtes de fromage, des produits de beauté, des médicaments, ainsi que d'autres produits (Moll et Moll, 1995 ; CONSLEG directive, 2004).



Sel trisodique de l'acide (sulfo-4' phénylazo-1')-4 (sulfo-4 phényl)-1 hydroxy-5 pyrazolecarboxylique-3

Entourés en orange les sites polaires (ioniques) et en vert les groupes éthyles et hydroxyles.

Figure 8 : Structure moléculaire de la tartrazine

(D'après Kapor et al., 2001).

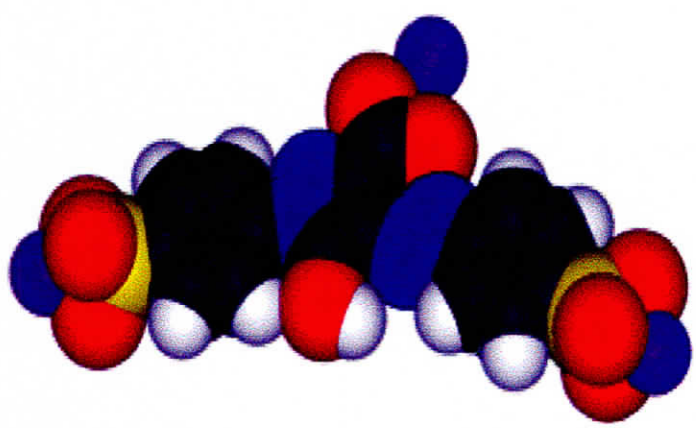


Figure 9 : Structure chimique de la tartrazine

(D'après Kapor et al., 2001).

3.2- Pharmacocinétique et métabolisme du colorant E102

La tartrazine se retrouve dans le tractus gastro-intestinal où elle va subir l'action des sucs digestifs et de la flore intestinale, car la flore bactérienne possédant une activité azo-réductasique est responsable d'une transformation fondamentale : la liaison - N=N est rompue, faisant apparaître des amines cycliques qui peuvent alors avoir des cinétiques d'absorption différentes et à différents niveaux (Christie et al., 2003).

La réduction de la molécule azoïque de la tartrazine peut avoir lieu également au niveau hépatique, par voie enzymatique.

La vitesse de dégradation est assez rapide, puisque 41% de tartrazine sera dégradée en 4 heures dans la lumière digestive. Cette étape est donc primordiale et a justifier la poursuite de recherches sur le risque toxicologique induit (Edwards et Combes, 1984).

3.3- Absorption intestinale

Quelques travaux expérimentaux ont confirmé que les molécules de colorants ne sont en général que très peu absorbées mais il n'en est pas de même pour les métabolites produits au cours de l'azo-réduction microbienne ; ainsi 95% de la dose orale de tartrazine seraient absorbés par cette voie chez le rat et l'on retrouve dans l'urine de 48 heures, 1% de tartrazine, 22% d'acide P-acétomidobenzéne-sulfonique et 75% d'acide sulfanilique (Combes et Haveland-Smith, 1982).

3.4- Catabolisme hépatique

La molécule du colorant alimentaire azoïque est absorbée par la muqueuse intestinale, elle est ensuite transportée par voie sanguine et atteindra très rapidement le foie. Là, elle peut subir des dégradations qui auront lieu essentiellement au niveau des microsomes par le biais des enzymes ; ces réactions seront surtout des réductions, des N-désalkylations, des hydroxylations ou des conjugaisons faisant intervenir le cytochrome P450 (Smith et Hotchkiss, 2001; Lepoittevin , 2005).

-Par azo-réduction, on obtiendra deux amines, l'une primaire, l'autre substituée ; cette réaction se fait avec un système enzymatique microsomal et le FAD comme cœnzyme.
-Par désalkylation, on obtiendra des composés déméthylés.
-L'hydroxylation peut devenir une voie importante si la réduction n'a pas eu lieu.
-La conjugaison avec l'action glycuronique favorise l'hydrosolubilité et l'excrétion.

La bile peut représenter une voie d'excrétion pour environ 5% de la dose ingérée. Le composé d'origine et les dérivés conjugués qui seront hydrolysés par une glucuronidase sont retrouvés dans la bile. Les produits d'hydrolyse peuvent être réabsorbés, si bien qu'une circulation entéro-hépatique s'établit, s'éliminant ainsi rapidement dans les urines (Horie et al., 1999 ; Pan et al., 1999) (figure 9).

3.5- Propriétés toxicologiques et principales formes de toxicité de la tartrazine

3.5.1- Evaluation du risque de la tartrazine

Le Comité Scientifique de l'Alimentation Humaine (CSAH) a confirmé la dose journalière admissible DJA de 7,5 mg/kg de poids corporel initialement attribuée à la tartrazine par le Comité mixte (FAO/OMS, 2000) d'experts des additifs alimentaires (CMEAA), sur la base d'une dose sans effet indésirable de 750 mg/kg de poids corporel/jour.

L'estimation au niveau européen de la consommation théorique maximale de tartrazine par l'enfant provenant des autorisations existantes reste inférieure à la DJA établie pour la tartrazine (52% de la DJA), et chez l'adulte ; en moyenne à 0,4 mg/kg de poids corporel/jour soit 5,3% de la DJA d'après l'AFSSA (2004) et la Commission sur la consommation des additifs alimentaires dans l'union Européenne (CCAAUE, 2001).

3.5.2- Réactions d'intolérance à la tartrazine

De nombreuses études et observations cliniques faites à grande échelle aux Etats-Unis et en Suède entre 1979 et 1984 ont incriminé l'incidence de sensibilité à la tartrazine (Bourrier, 2005).

Moneret-Vautrin et al., (1978) ; Hesser, (1984) montrent que ce colorant semble le plus souvent impliqué depuis la première observation signalée par Lockey en 1959 et 1977 (cité par Hesser, 1984), chez certains individus. Ce colorant alimentaire azoïque développe un certain nombre de réactions adverses de type allergique comme du prurit, de l'œdème, de l'urticaire, de l'asthme et de la rhinite.

- 4 personnes sur 506 malades prédisposés à des réactions allergiques ont réagi positivement à la tartrazine par voie orale (Green, 1974).

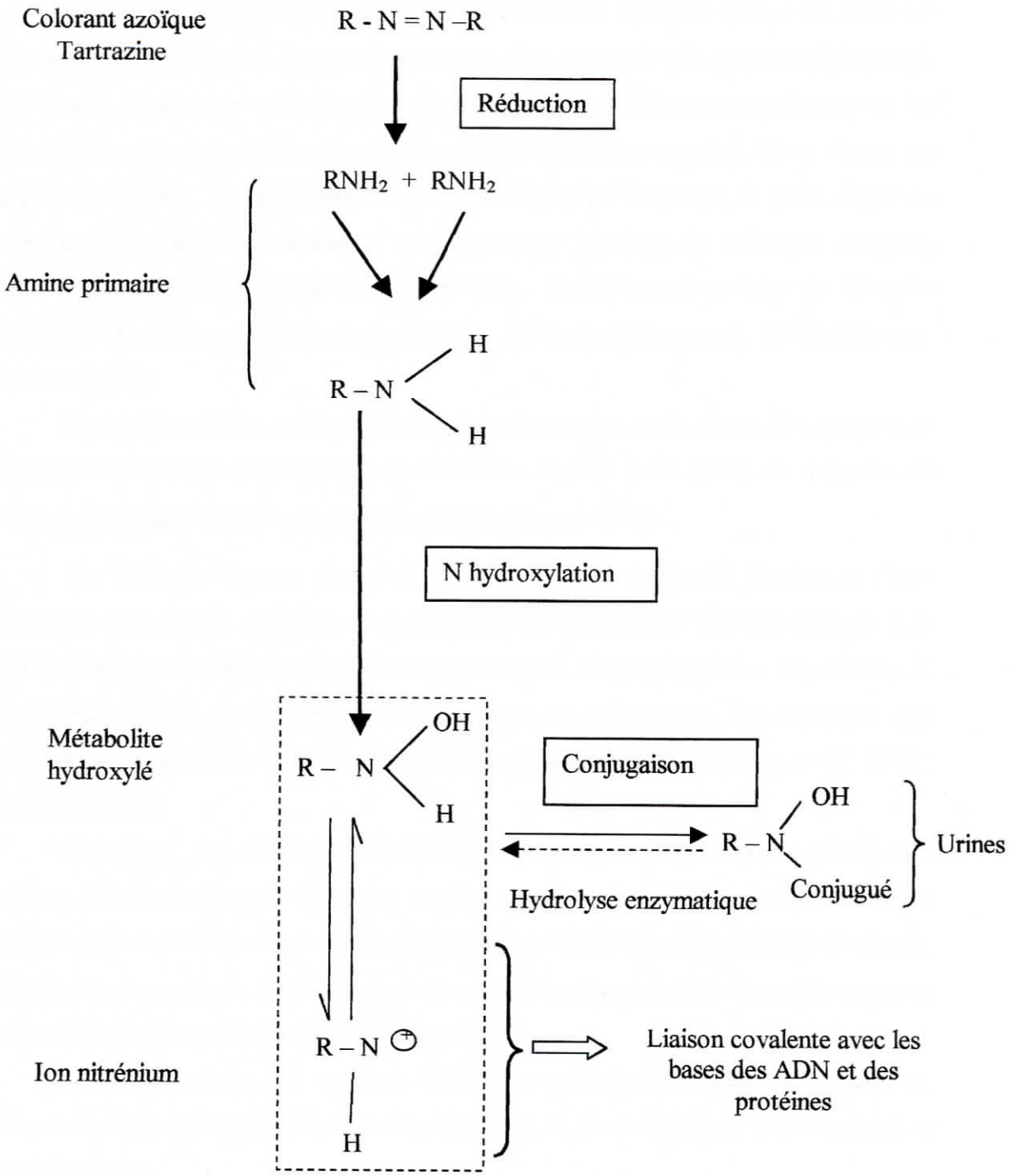


Figure 10 : Schéma simplifié des principales biotransformations de dérivés azoïques de la tartrazine dans l'organisme (D'après Belegaud, 1987).

Par ailleurs sur 110 malades prédisposés à l'allergie ; aucun n'a réagi à une solution de tartrazine à 5% par contact sur la peau (De Saint blanquat, 1984).

Diverses expériences analogues ont été réalisées dans les années 70, mais les réactions ont été très rares lorsque la tartrazine était appliquée par simple badigeonnage. Par contre, lorsqu'une méthode plus agressive est employée (test intradermique), les réactions apparaissent et quelques observations aléatoires ont été faites. Parmi les tableaux cliniques, les accidents cutanés sont les plus fréquents, il peut s'agir de dermites de contact (réactivées et entretenus par injection de colorants azoïques, d'eczémas généralisés, d'éruptions pigmentées, d'urticaire et œdème de Quincke chronique ou récidivant (Michaelsson et Juhlin, 1973 ; Letourmy et al., 1977 ; Moneret-Vautrin, 2003).

Parmi 13 malades souffrant d'urticaires chroniques, trois ont eu des symptômes allergiques exacerbés par 0,22mg de tartrazine ingérée sous forme de capsules de gélatine, alors qu'aucun n'a réagi au placebo (Settipane, 1976).

Par ailleurs, d'autres études cliniques soulignent également l'existence d'une sensibilité croisée à la tartrazine et à l'aspirine. 50 malades sur 664 soit prés de 8 % manifestent une intolérance à la tartrazine et souvent aussi à l'aspirine. La réaction se caractérise par des symptômes rhino-bronchiques ou pulmonaires, des céphalées, des œdèmes et de l'eczéma (Juhlin, 1981 ; Collins-Williams, 1985 ; Dutau et al., 1996 ; Brigand, 1998).

De même, des réactions indésirables à la tartrazine s'ajoutent au précédentes comme, l'exacerbation de dermatite atopique et des troubles gastro-intestinaux de l'adulte qui ont été rapportées dans certains travaux de Morales et al., (1985) ; Fuglsang, (1993) ; Fuglsang et al., (1994), ce qui n'a pas été confirmé dans la dermatite atopique de l'enfant (Devlin et David, 1992 ; Thillay, 2003).

Chez les enfants, les accidents allergiques peuvent aller jusqu'au purpura de Hénoch (hémorragie capillaire) dans l'épaisseur de la peau (Dipalma, 1990; Kalinke et Withrich, 1999).

L'étude de Ardern et Ram, (2001) a montré qu'il n' y a pas une évidence possible qui confirme l'effet de la tartrazine et l'asthme. De même la dernière étude qui a été faite par Nettis et al (2003) appuie ce résultat dont la prévalence est de 1% chez des malades présentant des urticaires/angiocœdèmes.

De plus, la banque française de données récentes du Cercle d'Investigations Cliniques et Biologiques en Allergologie Alimentaire (CICBAA) relève une seule observation d'intolérance à la tartrazine, rejoignant les prévalences d'intolérance de 1 à 0,12% estimées dans la littérature scientifique (Young et al., 1987) et qu'aucun cas d'accident allergique grave lié à la tartrazine n'a été déclaré à ce réseau en France au cours des années 2002 et 2003.

3.5.2.1- Tartrazine et médicaments

Entre 1990 et 1998, douze médicaments ont été retirés de la vente, parmi ces produits, la vitamine C Vitascorbol, désormais commercialisée avec une nouvelle formule sans tartrazine. En effet, plusieurs publications établissent un lien entre la prise d'antidépresseurs et analgésiques contenant de la tartrazine et des manifestations allergiques ou intolérance chez des patients (Lockey, 1977; Rosenhall, 1982; Volonakis et al., 1992; Bhatia, 1996 ; 2000). La tartrazine cause souvent des réactions indésirables aux personnes allergiques aux anti-inflammatoires telles que l'aspirine (Hong et al., 1989; Corder et al., 1995).

3.5.3- Effet de la tartrazine sur le système neurophysiologique

Dans les années 70, quelques chercheurs ont suggéré que les changements des habitudes alimentaires ont coïncidé avec une hausse du nombre d'enfants présentant des troubles du comportement (Feingold, 1973). L'idée selon laquelle la tartrazine pourrait être liée à l'hyperactivité a suscité beaucoup d'intérêt et une controverse considérable (Rowe, 1988).

Des recherches ont démontré le lien entre la consommation de colorants synthétiques (tartrazine) et les changements comportementaux de 24 enfants atopiques (allergiques). Lorsqu'ils réagissent aux colorants, les enfants les plus petits pleuraient toujours, avaient des crises et des troubles sévères du sommeil. Ils étaient également très irritables, agités, et décrits comme "impossibles à contrôler, distraits et agités et montraient des changements d'humeur très rapides (Rowe et Rowe, 1994).

En effet, la littérature scientifique actuelle ne soutient pas les régimes d'exclusion dans la thérapie primaire des troubles du comportement d'après International Life Science International (ILSI, 1999).

5.5.4- Effet de la tartrazine sur le système immunitaire

Les mécanismes pathogéniques de la réaction de la tartrazine sur le système immunitaire restent mal connus (Moneret-Vautrin et Andre, 1983). Par ailleurs, des explications le plus souvent proposées suggèrent d'après l'AFSSA (2004) qu'il pourrait s'agir d'une action inhibitrice de la tartrazine sur l'enzyme cyclo-oxygenase, et que dans ce cas il ne s'agit pas de réactions allergiques faisant intervenir la production des immunoglobulines IgE, mais plutôt des réactions d'intolérance à la tartrazine, comme cela a été signalé chez 16 à 25% des sujets porteurs d'intolérance à l'aspirine (Weber et al., 1979).

Dans certains nombres de cas, il semble qu'il y ait une dégranulation des mastocytes et libération de médiateurs chimiques tels que l'histamine. Toutefois de telles réactions peuvent être développées indépendamment des facteurs immunologiques, c'est-à-dire sans liaison d'antigène à des anticorps spécifiques IgE sur la paroi mastocytaire.

En effet, aucune étude n'a pu affirmer à l'heure actuelle, l'existence d'une immunoglobuline IgE antitartrazine spécifique (Sampson, 1999).

5.5.5- Effet cancérigène et mutagène de la tartrazine

Les colorants azoïques dérivés de benzidine, dont la tartrazine, peuvent révéler des potentialités cancérigènes (Belegaud, 1987; Prival et al., 2002).

Parmi les produits de biotransformation de la tartrazine, la benzidine a été l'une des premières substances cancérigène classées par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) (Pascuito et Michel, 2004). De même, le Centre de Science de l'Interet Publique (CSIP, 2001) propose un niveau de benzidine en tartrazine soit de 1/un milliards.

Cependant, la tartrazine n'a jamais fait l'objet d'observations cancérigènes in vivo, mais il faut souligner que la cancérisation dépend également de multiples facteurs apparemment non liés, comme l'état nutritionnel. Des travaux scientifiques démontrent que la carcinogenèse azoïque est le fait de dérivés liposolubles, mais dont l'action cancérigène par les colorants azoïques hydrosolubles n'a pas été mise en évidence à l'heure actuelle (Nogaki et al., 1998).

Les effets mutagéniques des colorants alimentaires ont été recherchés sur Escherichia Coli et aucun effet mutagène n'a été noté, pour les produits autorisés, et cela sur une gamme de doses (Yoshimoto et al., 1984).

Matériels & Méthodes

1- Animaux et conditions d'élevage

Dans ce travail, toutes nos expériences sont menées sur la souris Swiss, une souche largement utilisée en toxicologie expérimentale. Ces animaux constitués des deux sexes ont été acquis auprès de l'Institut Pasteur d'Alger (IPA). Ils sont mis en reproduction et sont élevés dans l'animalerie du Laboratoire de Physiologie de la Nutrition et de la Sécurité Alimentaire (LPNSA). Les souris vivent dans des cages conventionnelles, munies d'une mangeoire et d'un biberon. Elles ont libre accès à une nourriture standard, correspondant à un aliment pour rongeurs commercialisé par l'ONAB (tableau 1).

2- Produits et réactifs

Le colorant alimentaire (tartrazine) provient de chez Courtex International (France). Le fournisseur indique un degré de pureté à 86,6% du produit. La substance se présente sous un aspect de poudre très fine de couleur orange, inodore et de saveur acre (tableau 2).

-Les dosages sériques de l'albumine, de cholestérol total, de la TGO et de la TGP ont été effectués à l'aide de Kits ELITECH-CE diagnostics.

-Les dosages sériques de l'urée, de la créatinine, de l'acide urique et de la bilirubine totale ont été réalisés à l'aide de Kits Biomaghreb.

3- Tests de toxicité à la tartrazine

2 tests de toxicité de la tartrazine sont réalisés :

3.1- Test de toxicité aiguë (Dose létale50 ou DL50)

Il s'agit de la toxicité induite par l'administration d'une dose unique de tartrazine. Cette DL représente la dose de toxique conduisant à la mort de 50% des individus. La DL50 rend compte de la toxicité intrinsèque de la tartrazine.
Ce test constitue une base nécessaire pour évaluer la toxicité de la tartrazine.

Tableau 1 : Composition de l'aliment pour rongeurs ONAB.

Composition	%
Protéines	14.5
Lipides	7.5
Glucides	55.8
Vitamines hydrosolubles :	
$A,D_3,E,K_3,B_1,B_2,B_6,B_{12}$	
Mais	
Soja	
Orge	
Phosphate mono calcique	
Carbonate du Calcium	
Pantothenate de calcium	
Acide folique	
Biotine	
Acide nicotinique	
Cuivre	
Cobalt	
Manganèse	
Zinc	
Sélènium	
Fer	
Iode	
Magnésium	
Méthionine	

Tableau 2 : Spécifications de la tartrazine E102, selon le Codex Alimentaire et de la Directive 96/77/CE de la Commission Européenne.

Spécifications	Spécifications COURTEX Tartrazine
Nom du produit	Colorant synthétique alimentaire.
Nom scientifique	sel trisodique de l'acide (sulfo-4-phénylazo-1)-4-(sulfo-4 phényl)-1hydroxy-5 pyrazolecarboxylique-3
Code de référence UE	E102
Code international	19140
Concentration	86,6%
Perte matière sèche	3,5%
Stabilité à la chaleur	100°C
Stabilité à la lumière	4
Solubilité dans l'eau	99,96%
Insolubilité dans l'eau (standard 0.2%max)	0,04%
Substances Iso-propyl Ether (standard 0.3% max)	0,2%
Humidité max	5%
Chlorure (Cl) + sulfate (SO4) (standard 5% max)	1%
Cadmium	0,0001%
Métaux lourds (Pb)	0,001%
Mercure (Mr)	0,0001%
Arsenic (As)	0,0001%

3.2- Toxicité subchronique de la tartrazine

Cette étude permet d'évaluer la toxicité à long terme de faibles doses de tartrazine ingérées de façon répétée. Les essais doivent être effectués avec des concentrations de colorant comparables au niveau d'utilisation de ce produit dans les industries agroalimentaires et dans la préparation de certains plats cuisinés par les ménagères.

4. Protocoles expérimentaux

4.1. Détermination de la DL50

Pour l'étude, nous utilisons 25 souris femelles âgées de 6 semaines et pesant entre 25 et 28g (25 ± 1,90). Les essais sont effectués à différentes doses : 200 ; 250 ; 300 ; 355 et 357 mg correspondant respectivement à 7194,24 ; 8991,80 ; 10791,36 ; 12750 et 12841,72 mg/kg de poids corporel des animaux (fig 11).

Chaque modalité de traitement est constituée de 5 souris. La tartrazine dissoute dans 300µl d'eau est administrée aux souris par voie orale, en une seule dose, directement dans la cavité buccale, à l'aide d'une sonde gastrique.

La mortalité des souris est suivie quotidiennement pendant 10 jours.

4.2. Toxicité subchronique de la tartrazine

Dans cette étude, 80 souris des deux sexes, âgées de 4 semaines et pesant en moyenne 20g (20 ± 2,01) sont réparties en 3 groupes expérimentaux et un groupe témoin comprenant chacun 10 souris mâles et 10 souris femelles (fig 12).

Les animaux des 3 groupes expérimentaux sont abreuvés au moyen de leurs biberons pendant 90 jours consécutifs avec de l'eau supplémentée de tartrazine aux concentrations respectives de 0,1%, 1% et 2,5% (Maekawa et al., 1987).

Dans les mêmes conditions expérimentales, les souris du groupe témoin reçoivent, quant à elles, de l'eau sans colorant.

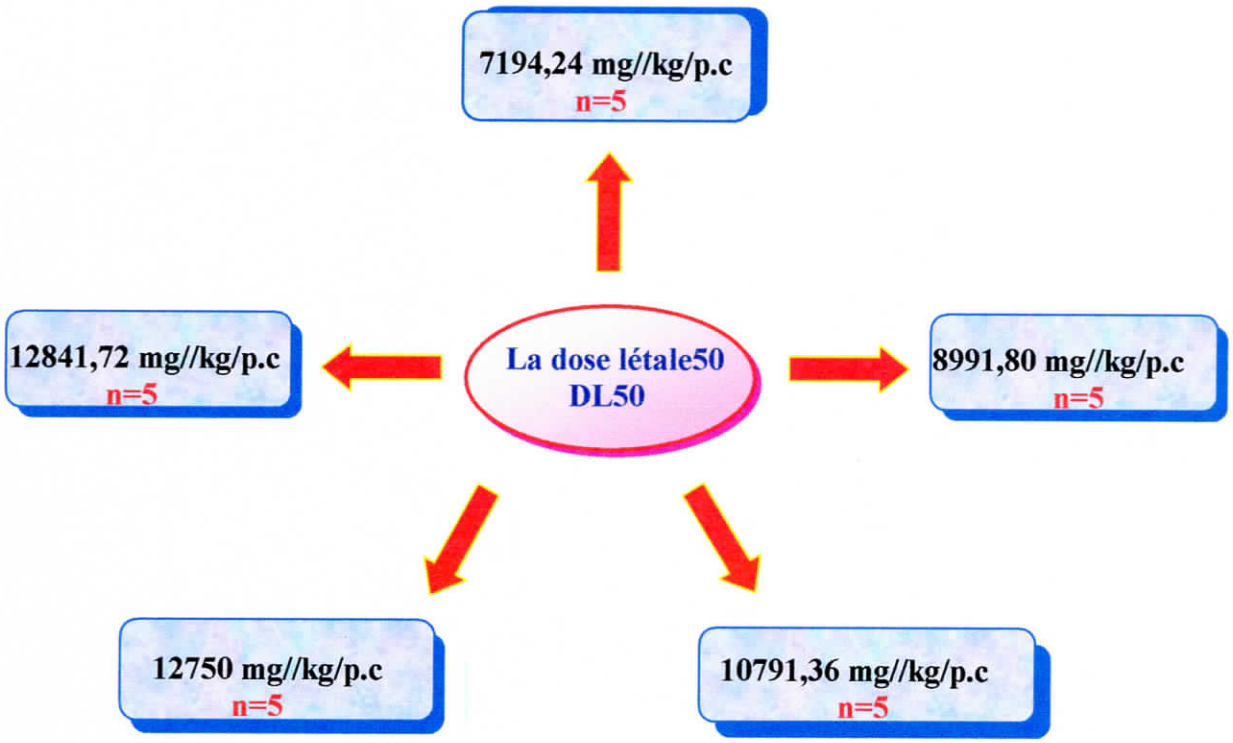


Figure 11 : Protocole de détermination de la dose létale 50 (DL50) à la tartrazine chez la souris Swiss.

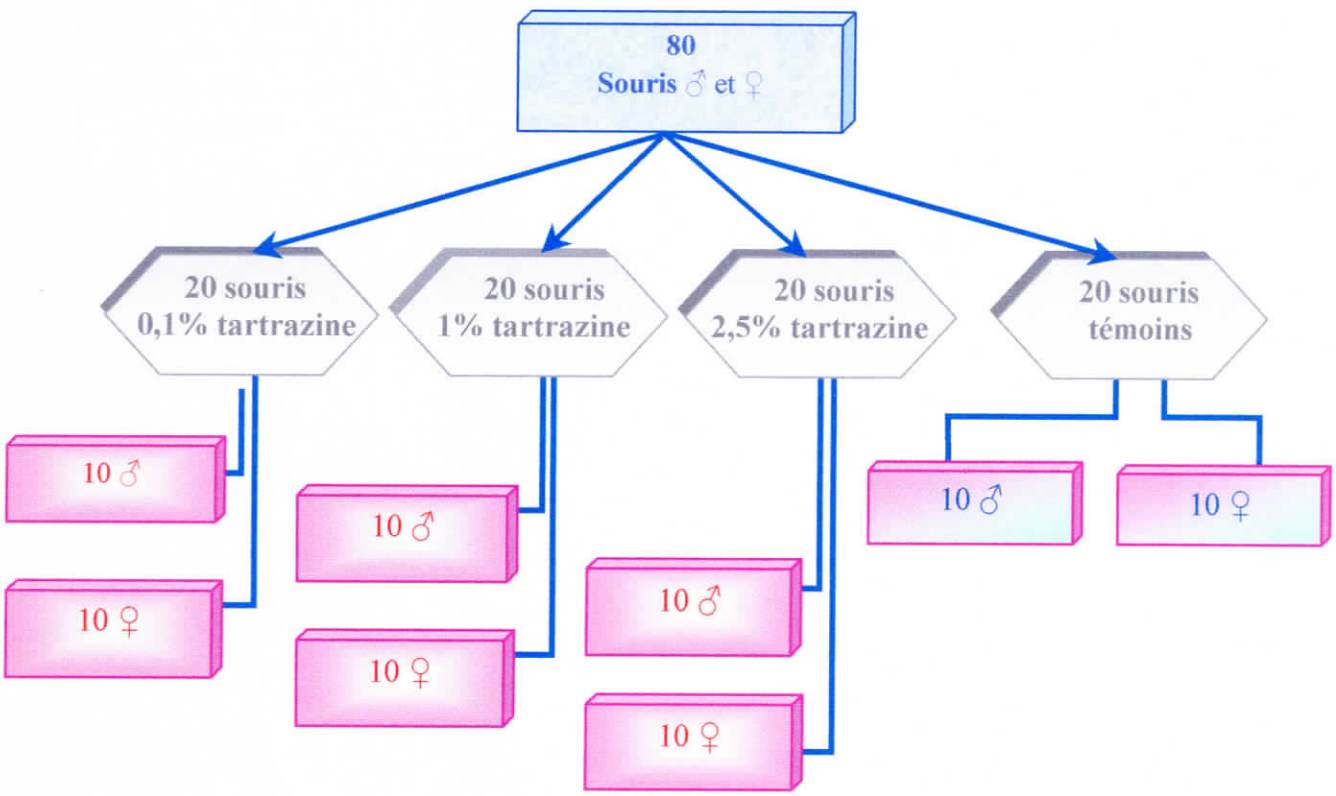


Figure 12 : Protocole de répartition des différents groupes expérimentaux de souris recevant la tartrazine à 0,1%,1% et 2,5% dans l'eau de boisson et du groupe témoin.

5. Suivi des animaux du protocole de toxicité subchronique

5.1. Détermination de la consommation journalière effective de tartrazine par les Souris

Durant les 90 jours que dure l'expérience, nous mesurons pour chaque groupe expérimental la prise quotidienne de la solution de tartrazine. Nous déterminons ainsi le volume moyen exprimé en ml consommé par chaque souris. Rapporté à l'unité de poids corporel, ce volume est ensuite exprimé en mg/kg/jour.

5.2. Mesure de la croissance pondérale

La croissance pondérale des animaux de tous les groupes est mesurée à la fin de chaque semaine pendant toute la durée de l'expérimentation.

5.3. Etude des effets sublétaux de la tartrazine

Les modifications au niveau comportemental, morphologique, physiologique et biochimique sont pris en considération dans notre travail ainsi que le taux de mortalité.
Les modifications comportementales des animaux (agitation, anorexie) sont déterminées tout le long de l'expérience, pendant 90 jours.

5.3.1. Prélèvement sanguins et d'organes des souris

Au terme des 90 jours de consommation subchronique de tartrazine, les animaux sont maintenus à jeun la veille en vue de leur sacrifice.
Sur l'animal vigile et avant le sacrifice, le sang est prélevé à partir du sinus rétroorbitaire par capillarité à l'aide d'une pipette Pasteur. Le volume moyen de sang total ainsi prélevé est de 1ml. Le sang recueilli dans des tubes secs est centrifugé à 3500 tr/mn à 4°C pendant 15mn. Le sérum obtenu est aliquoté puis congelé à -80°C pour les dosages ultérieurs.

Les animaux sont sacrifiés par décapitation, puis rapidement et dans l'ordre, pour déterminer le poids relatif des organes, les reins, le foie, le cœur, la rate, les poumons, les glandes salivaires le cerveau et les glandes surrénales sont prélevés chez les animaux des deux sexes. De plus, les testicules et les vésicules séminales chez les mâles ainsi que l'utérus et les ovaires chez les femelles sont également prélevés et pesés pour la détermination du poids relatif des organes.

Le testicule droit est fixé dans une solution de formol tamponnée à 10%, ensuite coloré à l'hémalun-éosine. Cet échantillon est destiné à l'étude histologique. En revanche, le testicule gauche est conservé à -80C° pour le comptage des spermatozoïdes.

5.3.2- Analyses biochimiques sériques

5.3.2.1- Dosage de l'albumine

Le dosage de l'albumine est effectué par une méthode colorimétrique enzymatique (Kit- ELITECH- CE).

Le vert de bromocrésol (BCG) se fixe sélectivement sur l'albumine en donnant une coloration bleue. L'absorption de ce complexe est proportionnelle à la concentration de l'albumine de l'échantillon.

La lecture de la densité optique (DO) se fait à une longueur d'onde $\lambda = 628$ nm.

La concentration de l'albumine dans le sérum est déduite par la formule suivante :

$$Albumine = 50 \times \frac{DO\ échantillon}{DO\ étalon} \quad (g/l)$$

5.3.2.2- Dosage du cholestérol total

Le dosage du cholestérol total est effectué par une méthode colorimétrique enzymatique (Kit – ELITECH- CE).

La lecture de la DO se fait à une longueur d'onde $\lambda = 500$ nm.

La concentration du cholestérol total dans le sérum est déduite par la formule suivante :

$$Cholestérol = 5{,}17 \times \frac{DO\ échantillon}{DO\ étalon} \quad (mmol/l)$$

5.3.2.3- Dosage de l'urée

Le dosage de l'urée est effectué par la méthode de Berthol enzymatique colorimétrique modifiée (Kit – Biomaghreb).

Les ions ammonium, en présence de salicylate et d'hypochlorite de sodium réagissent en formant un composé de couleur verte (Dicarboxylindophenol) dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en urée.

La lecture de la DO se fait à une longueur d'onde $\lambda = 590$ nm.

La concentration de l'urée dans le sérum est déduite par la formule suivante :

$$Urée = 0{,}50 \times \frac{DO\ échantillon}{DO\ étalon} \quad (gl/l)$$

5.3.2.4- Dosage de la créatinine

Le dosage de la créatinine est effectué par une méthode cinétique colorimétrique enzymatique sans déprotéinisation (Kit – Biomaghreb).

La créatinine forme en milieu alcalin un complexe coloré avec l'acide picrique. La vitesse de formation de ce complexe est proportionnelle à la concentration de créatinine.

La lecture de la DO se fait à une longueur d'onde $\lambda = 492$ nm.

La concentration de la créatinine dans le sérum est déduite par la formule suivante :

$$Créatinine = 176{,}8 \times \frac{\Delta\ DO\ échantillon}{\Delta\ DO\ étalon} \quad (\mu mol/l)$$

5.3.2.5- Dosage de l'acide urique

Le dosage de l'acide urique est effectué par une méthode colorimétrique enzymatique Uricase-PAP (Kit – Biomaghreb).

L'acide urique est converti par l'uricase en allantoine et périxyde d'hydrogène qui oxyde l'acide 3,5-dichloro-2-hydrobenzénesulfonique et la 4-aminophénazone sous l'action catalytique de la péroxydase, pour former un composé rouge-violacé de la quinonéimine.

La lecture de la densité optique (DO) se fait à une longueur d'onde $\lambda = 520$ nm.

La concentration de l'acide urique dans le sérum est déduite par la formule suivante :

$$\textit{Acide urique} = 357 \times \frac{\textit{DO échantillon}}{\textit{DO étalon}} \quad (\mu mol/l)$$

5.3.2.6- Dosage de la bilirubine totale

Le dosage de la bilirubine totale est effectué par une méthode colorimétrique enzymatique (Kit – Biomaghreb).

L'acide sulfanilique réagit avec le nitrite de sodium pour donner de l'acide sulfanilique diazoté. En présence de diméthyl sulfoxyde (DMSO), la bilirubine totale se couple avec l'acide sulfanique diazoté pour donner l'azobilirubine. Le dosage de la bilirubine directe se fait en l'absence de DMSO.

La lecture de la DO se fait à une longueur d'onde $\lambda = 555$ nm.

La concentration de la bilirubine totale dans le sérum est déduite par la formule suivante :

$$\textit{Bilirubine} = 83 \times \frac{\textit{DO échantillon}}{\textit{DO étalon}} \quad (\mu mol/l)$$

5.3.2.7- Dosages enzymatiques

5.3.2.7.1-Dosage de la glutamate-oxaloacetate-transaminenase (TGO)

Le dosage de la TGO est effectué par une méthode de Kit (ELITECH-CE Diagnostics) basée sur le principe suivant :

Détermination de l'activité de l'aspartate aminotransférase (AST) :

$$\text{L-Aspartate} + \alpha - \text{Cétoglutarate} \xrightarrow{AST} \text{Oxaloacétate} + \text{L-Glutamate}$$

$$\text{Oxaloacétate} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{MDH} \text{L- Malate} + NAD^+$$

MDH : Malate déshydrogénase

La lecture de la DO se fait à une longueur d'onde $\lambda = 340$ nm.

La concentration de la TGO dans le sérum est déduite par la formule suivante :

$$TGO = 1746 \times \frac{\Delta\ DO\ échantillon}{minute} \quad (U/L)$$

5.3.2.7.2-Dosage de la glutamate-pyruvate-transaminase (TGP)

Le dosage de la TGP est également effectué par une méthode de Kit (ELITEOCH-CE Diagnostics) selon le principe suivant.

Détermination de l'activité de l'alanine aminotransférase (ALT):

L-Alanine + α – Cétoglutarate $\xrightarrow{ALT}$ Pyruvate + L-Glutamate

Pyruvate + NADH + H^+ $\xrightarrow{LDH}$ L-Lactate + NAD^+

LDH : Lactate déshydrogénase

La lecture de la densité optique (DO) se fait à une longueur d'onde $\lambda = 340$ nm.

La concentration de la TGP dans le sérum est déduite par la formule suivante :

$$TGP = 1746 \times \frac{\Delta\ DO\ échantillon}{minute} \quad (U/L)$$

6- Numération des spermatozoïdes

Pour vérifier l'effet de la tartrazine sur la fertilité masculine, le comptage des spermatozoïdes est effectué sur les souris mâles.

6.1- Comptage des spermatozoïdes dans le testicule

Le testicule est décongelé, pesé, finement coupé avec un ciseau, puis homogénéisé pendant 1 minute dans 10ml de Nacl 9‰ contenant 0,05% de triton X-100 selon la méthode de Oishi (2001). Le comptage des spermatozoïdes est effectué à l'aide d'une cellule de Malaassez, observé au microscope optique à un grossissement 40.

7- Etude histologique

Cette étude a pour but de vérifier s'il existe des modifications des structures testiculaires des souris après ingestion subchronique de tartrazine pendant 90 jours.

L'étude histologique est effectuée sur des testicules de souris intoxiquées à la tartrazine aux teneurs 0,1%,1% et 2,5% et comparées aux témoins.

7.1- Traitement des échantillons

7.1.1- Fixation

Les tissus sont fixés dans du formol à 10% tamponné pendant 24 h. Les solutions de formaldéhyde sont les fixateurs les plus répandus. On les utilise fréquemment à des concentrations variant de 10% à 20%.

7.1.2- Déshydratation

Après fixation, les tissus ont été déshydratés dans 4 bains successifs d'acétone à l'étuve et à 56°C. Chaque bain dure 30 minutes.

7.1.3- Clarification

Cette opération s'effectue après la déshydratation. Les pièces sont placées dans un bain de toluène à l'étuve et à 56°C pendant 50 minutes.

7.1.4- *Inclusion*

L'inclusion est effectuée avec de la paraffine, qui est un mélange d'hydrocarbure solide à poids moléculaire élevé et de faible affinité. Ces substances sont caractérisées par leur indifférence aux agents chimiques.

Les échantillons sont placés dans des bains successifs de paraffine pendant une heure chacun puis coulés dans des moules en plastique à température ambiante.

7.2-Traitement des lames

Après inclusion à la paraffine, les blocs contenant le fragment sont coupés à l'aide de microtome à une épaisseur de 4 µm.

7.2.1-*Etalement sur lames*

Une fois les coupes terminées, elles sont mises sur des lames de verre recouvert de colle (2 g d'albumine + 50 ml de glycérine dans 1000 ml d'eau distillée) puis placées sur une plaque chauffante réglée à une température convenable, inférieure à celle du point de fusion de la paraffine. A l'aide d'une pince, les plis de la paraffine sont tirés légèrement de chaque coté. Ensuite, l'ensemble coupe-lame est retiré de la plaque et égoutté, essoré au papier Joseph et avant de procéder à la coloration des lames, il faut les déparaffiner et les réhydrater.

7.2.2-Déparaffinage

Pour déparaffiner les lames, il suffit de les placer dans deux bains successifs de toluène. Chaque bain dure 2 minutes.

7.2.3-*Réhydratation*

L'hydratation se fait dans 3 bains successifs d'alcool éthylique de degrés décroissants (100°, 95°, 90°, 70°). Chaque bain dure 2 minutes. Le dernier est suivi d'un rinçage à l'eau courante.

7.2.4-*Coloration*

Nos lames ont été colorées à l'hémalun-éosine, qui représente la plus simple des colorations combinées. On a fait agir successivement un colorant nucléaire « basique », et un colorant cytoplasmique « acide », l'éosine. La coloration du noyau est bleu-noir et le cytoplasme rose à rouge. La préparation du colorant hématoxyline de Harris est démontrée dans le (tableau 3) (Hould, 1984).

La coloration des lames a été effectuée comme suit :

*Mettre les lames dans l'hématoxyline de Harris durant 2 à 3 minutes.

*Laver les lames à l'eau ordinaire.

*En cas de surcoloration, les lames sont trempées légèrement dans de l'alcool chlorhydrique pendant quelques secondes (100ml d'alcool à 95° + 5 gouttes de Hcl à 1%).

*Bleuir dans une solution aqueuse saturée de carbonate de lithium (rinçage).

*Laver les lames à l'eau ordinaire.

*Mettre les lames dans un bain d'alcool éthylique 1 à 2 minutes.

*Colorer les lames à l'éosine alcoolisée (2g d'éosine dans 100 ml d'alcool éthylique) pendant 5 minutes.

*Rincer les lames dans deux bains successifs d'alcool éthylique à 70° puis à 95°.

*Mettre les lames dans du toluène pendant 1 minute.

*Mettre entre lame et lamelle une goutte de baume de Canada ou d'eukitt.

*Laisser sécher puis observer au microscope.

8- Analyse statistique

Les résultats sont exprimés sous forme des moyennes et leur erreur standard (X ± ES).

L'analyse statistique des données est conduite en utilisant STATISTICA (version 5,1 Statsoft, Tulsa. OK) après analyse de variance (ANOVA) (2006).

Les moyennes portant des lettres différentes (a,b,c,d) sont significativement différentes.

* : Témoins vs les groupes expérimentaux

L'analyse statistique des données des deux sexes est réalisée par le test de student « t »

Ce test statistique paramétrique était adapté à une analyse comparative entre deux groupes.

: Mâles vs Femelles

Le risque α choisi est de 5%.

Tableau 3: Composition du colorant à l'hématoxyline de Harris (Hould, 1984).

Hématoxyline	5g
Ethanol	50ml
Alun de potassium	100g
Eau distillée	1000ml
Faire bouillir le mélange	
Oxyde mercurique	2,5g
Chauffer la solution et filtrer avant usage.	

Résultats

Résultats

1- Détermination de la dose létale 50 (DL50)

Les résultats du test de la dose létale 50 de la tartrazine sont représentés dans le tableau 4. Nos données indiquent clairement qu'aucun effet mortel de la tartrazine n'est observé chez les souris utilisées aux doses testées.

Ces résultats suggèrent que dans nos conditions expérimentales, la DL50 serait supérieure à 12841,72 mg/kg/ de poids corporel.

2- Cinétique de la consommation de la tartrazine par les souris

La tartrazine est administrée aux différents groupes expérimentaux diluée dans l'eau de boisson. La cinétique de consommation, exprimée en volume d'eau en fonction du temps, est indiquée dans les figures 13 et 14.

Nos résultats indiquent que la consommation du xénobiotique par les mâles se fait de manière très irrégulière en fonction du temps et ce durant toute la durée du traitement. En revanche, chez les témoins, la cinétique n'est irrégulière que jusqu'à la $4^{ème}$ semaine, puis elle croît régulièrement jusqu'à la fin de l'expérience.

Nos résultats montrent également une diminution significative du volume de tartrazine consommé par les souris à 1 et 2,5% dès la $9^{ème}$ semaine et ce jusqu'à la fin de l'expérience ($p< 0,001$).

De la même façon chez les femelles, un profil de cinétique comparable est observé (fig 11). Cependant, la diminution de la consommation de la tartrazine ne devient significative qu'à partir de la $10^{ème}$ semaine d'expérimentation ($p<0,01$).

3- Consommation moyenne de la tartrazine par les souris

La quantité moyenne de tartrazine consommée quotidiennement par les souris durant toute la période d'expérimentation (90 jours), exprimée en mg/jour et en mg/kg/jour, est indiquée dans le tableau 7.

Nos résultats indiquent que le taux de tartrazine consommé par unité de poids corporel des souris est proportionnel aux doses utilisées dans les essais aussi bien chez les souris mâles que chez les souris femelles. Par ailleurs, on note qu'il n'existe aucune

Tableau 4 : Degré de toxicité aiguë (DL50) de la tartrazine chez la souris Swiss

Dose de tartrazine (mg/kg/p.c)	Taux de mortalité
	Souris (n=5)
7194,24	0%
8992,80	0%
10791,36	0%
12750	0%
12841,72	0%

On note que jusqu'à la dose de 12841,72 mg/kg/ de poids corporel, le taux de mortalité observé est nul.

p.c : poids corporel

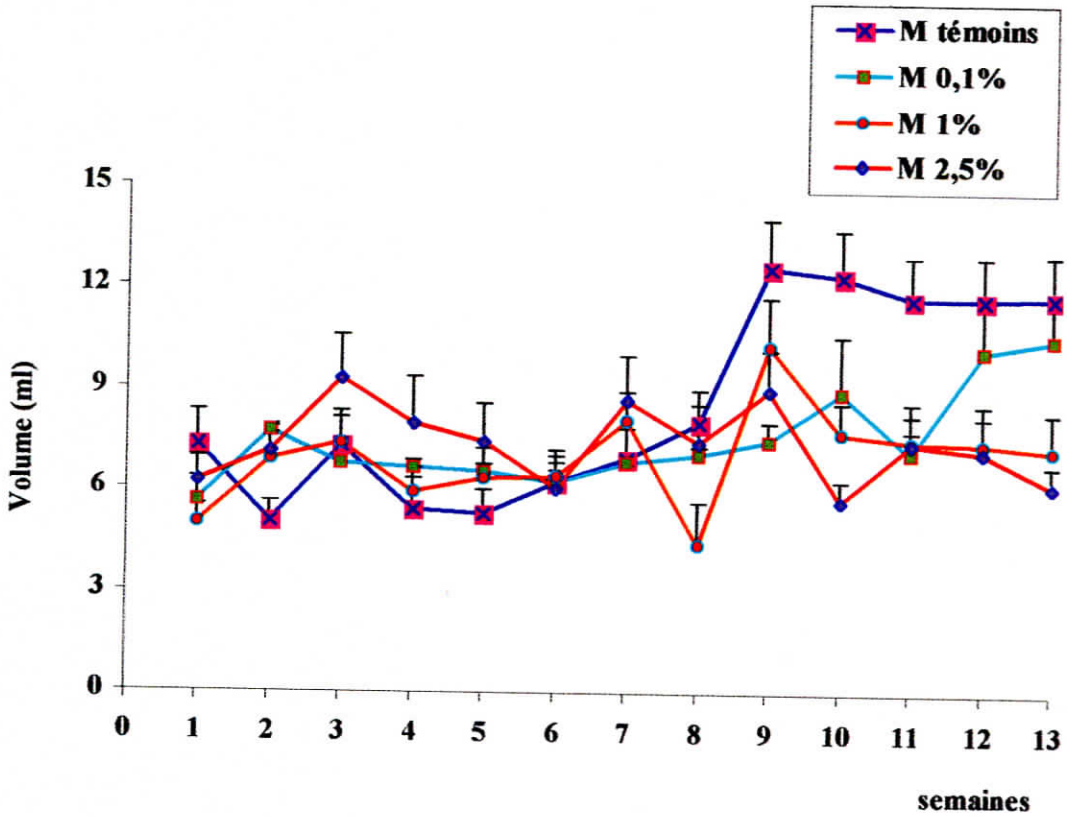


Figure 13: Cinétique de la consommation de tartrazine diluée dans l'eau de boisson aux doses de 0,1, 1 et 2,5% par des souris mâles. Les témoins sont abreuvés avec de l'eau sans tartrazine.

Les valeurs reportées représentent des moyennes et leurs erreurs standards (X ± ES) établies sur un groupe de 10 souris mâles.

Tableau 5 : Représentation statistique ANOVA de la cinétique de consommation de la tartrazine chez les souris mâles

	Semaines						
Groupes	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**
témoins	a	a	a	a	a	a	a
0,1%	a	a	* b	b	b	a	a
1%	a	b	a	b	b	b	** b
2,5%	a	a	a	***b	b	* b	*** b

Les moyennes portant des lettres différentes (a,b,c,d) sont différentes.

* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

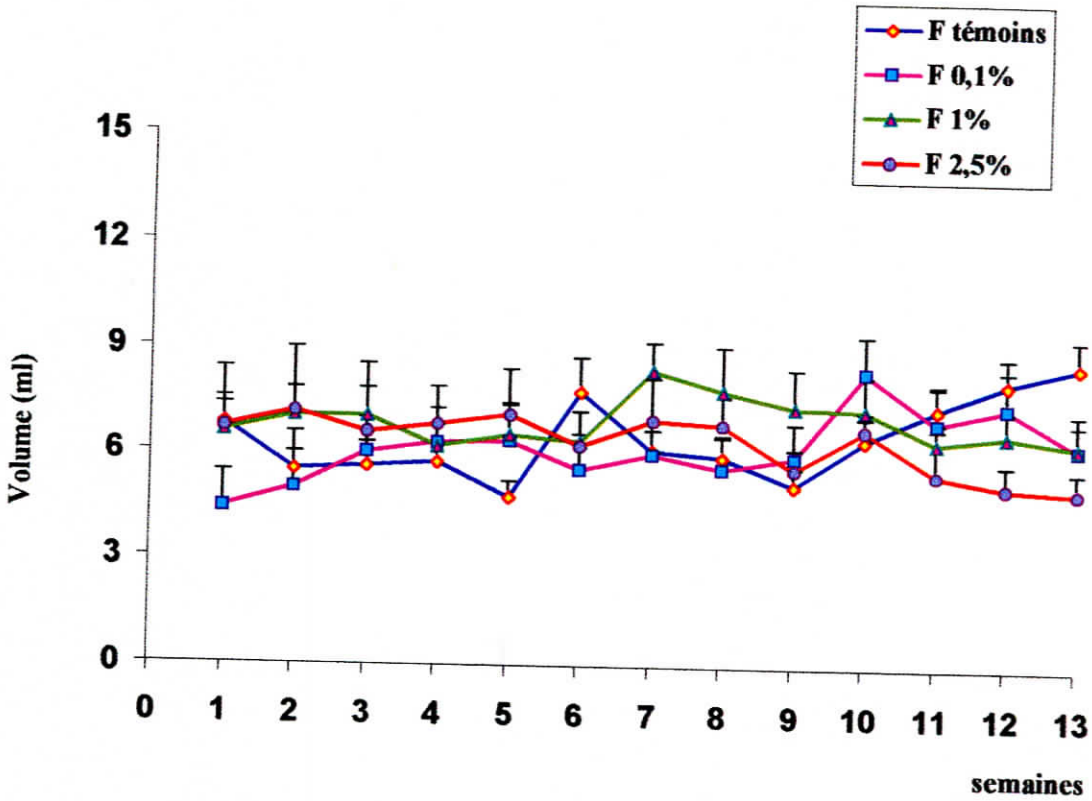


Figure 14: Cinétique de la consommation de tartrazine diluée dans l'eau de boisson aux doses de 0,1, 1 et 2,5% par des souris femelles. Les témoins sont abreuvés avec de l'eau sans tartrazine.

Les valeurs reportées représentent des moyennes et leurs erreurs standards (X ± ES) établies sur un groupe de 10 souris femelles.

Tableau 6 : Représentation statistique ANOVA de la cinétique de la consommation de la tartrazine chez les souris femelles

	Semaines						
Groupes	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**
témoins	a	a	a	a	a	a	a
0,1%	a	a	a	a	a	a	a
1%	a	a	b	a	a	*b	** b
2,5%	a	b	a	a	a	** b	*** b

Les moyennes portant des lettres différentes (a,b,c,d) sont différentes.

* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

Tableau 7 : Consommation quotidienne moyenne de tartrazine établie par unité de poids corporel pour chaque essai, sur 90 jours d'expérimentation.

Dose de tartrazine	Mâles	Femelle
0,1%	177,56 mg/kg/jour	161,05mg/kg/jour
1%	1833 mg/kg/jour	2317,11 mg/kg/jour
2,5%	4803,94 mg/kg/jour	4683,84 g/kg/jour

0,1% : groupe de souris traitées à 0,1% de tartrazine (n= 10)

1% : groupe de souris traitées à 1% de tartrazine (n= 10)

2,5% : groupe de souris traitées à 2,5% de tartrazine (n= 10)

Les valeurs exprimées sont des moyennes établies à partir des données recueillies quotidiennement pour chaque groupe expérimental (n=10) pendant 90 jours.

-Aucune différence significative n'est observée entre les groupes de souris mâles et femelles.

différence significative des niveaux de consommation de colorant entre les souris mâles et les souris femelles et ceci pour les trois doses testées.

4- Effet de la tartrazine sur la croissance pondérale

Dans cette partie du travail, nous avons évalué les conséquences sur l'évolution du poids corporel des souris consommant la tartrazine aux doses de 0,1, 1 et 2,5% (fig 15 et 16).

Aussi bien chez les mâles que chez les femelles, le poids corporel augmente progressivement en fonction du temps. Nos résultats montrent que la croissance pondérale des souris expérimentales est significativement plus élevée que celle des souris témoins ($p<0,001$).

On observe une évolution régulière du poids corporel des groupes à 0,1 et 1% de tartrazine, en revanche cette évolution est irrégulière chez le groupe à 2,5% de tartrazine, comparés aux témoins.

D'autre part, dès la 10ème semaine et jusqu'à la 12ème semaine, on note une décroissance du poids des animaux traités à 1 et 2,5% de tartrazine aussi bien chez les mâles que chez les femelles ($p<0,001$).

5- Effet de la tartrazine sur le taux de mortalité et sur les mouvements comportementaux

Au cours de l'expérimentation, nous avons observé à la 10ème et 13ème semaine des taux de mortalité de 20 et de 10% respectivement chez les mâles et les femelles traités à 2,5% de tartrazine. De même, un taux de 10% de mortalité est observé à la 10ème semaine chez les mâles traités à 1% de tartrazine.

Une agitation a été remarquée chez les animaux traités avec 2,5% de tartrazine au cours du 1er et 2ème mois de l'expérimentation.

La consommation de la solution (tartrazine + eau) est irrégulière et importante chez les groupes traités à 1 et 2,5% par rapport aux témoins et par rapport au groupe traité à 0,1% de tartrazine. De plus, la prise alimentaire est nettement diminuée à partir de la 10ème semaine chez les mâles et les femelles traités à 1 et 2,5% de tartrazine.

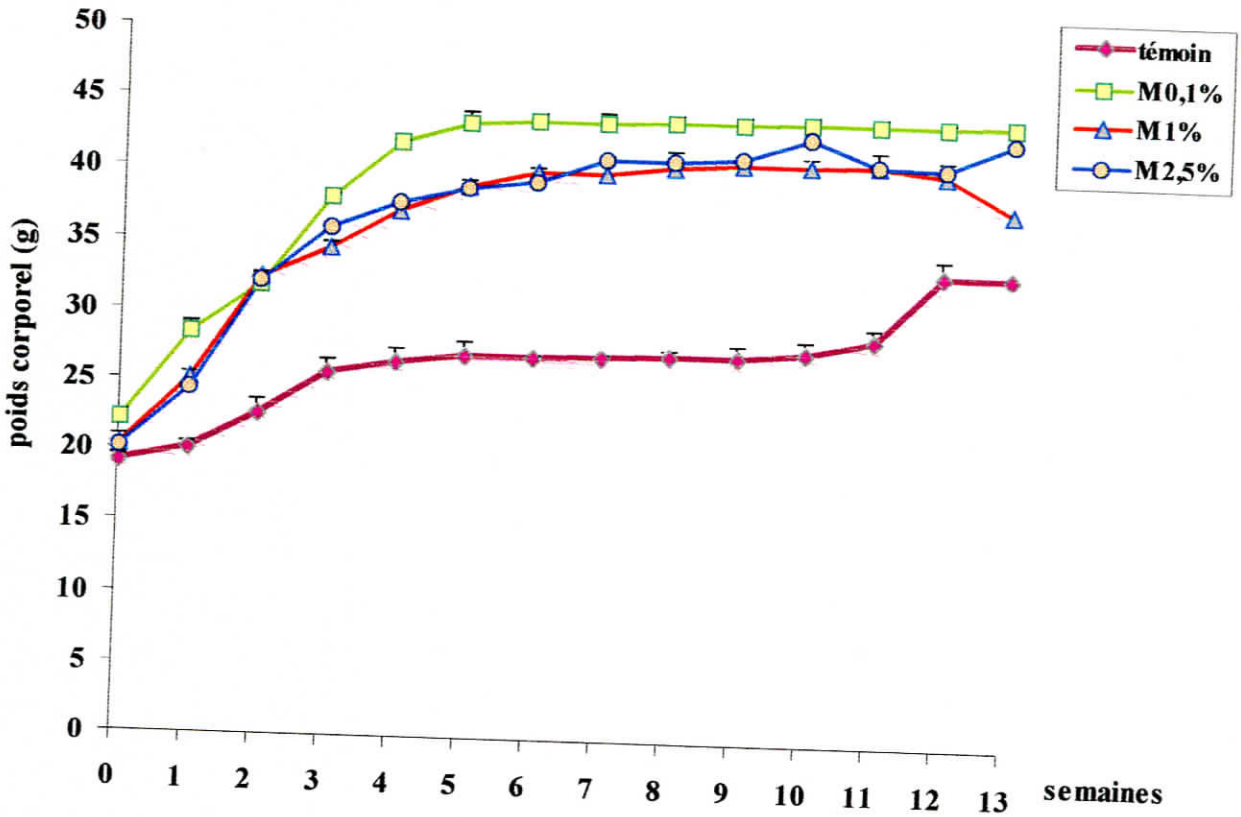


Figure 15: Croissance pondérale des souris mâles recevant pendant 90 jours de la tartrazine aux doses de 0,1, 1 et 2,5%. Le groupe témoin reçoit de l'eau sans tartrazine.

Les valeurs reportées représentent des moyennes et leurs erreurs standards (X ± ES), établies sur 10 souris dans chaque groupe expérimental et pour le groupe témoin.

-On note une croissance irrégulière chez les groupes traités à 2,5% de tartrazine et une décroissance à la 10ème, 11ème et 12ème semaine chez les groupes traités à 1 et 2,5% de tartrazine.

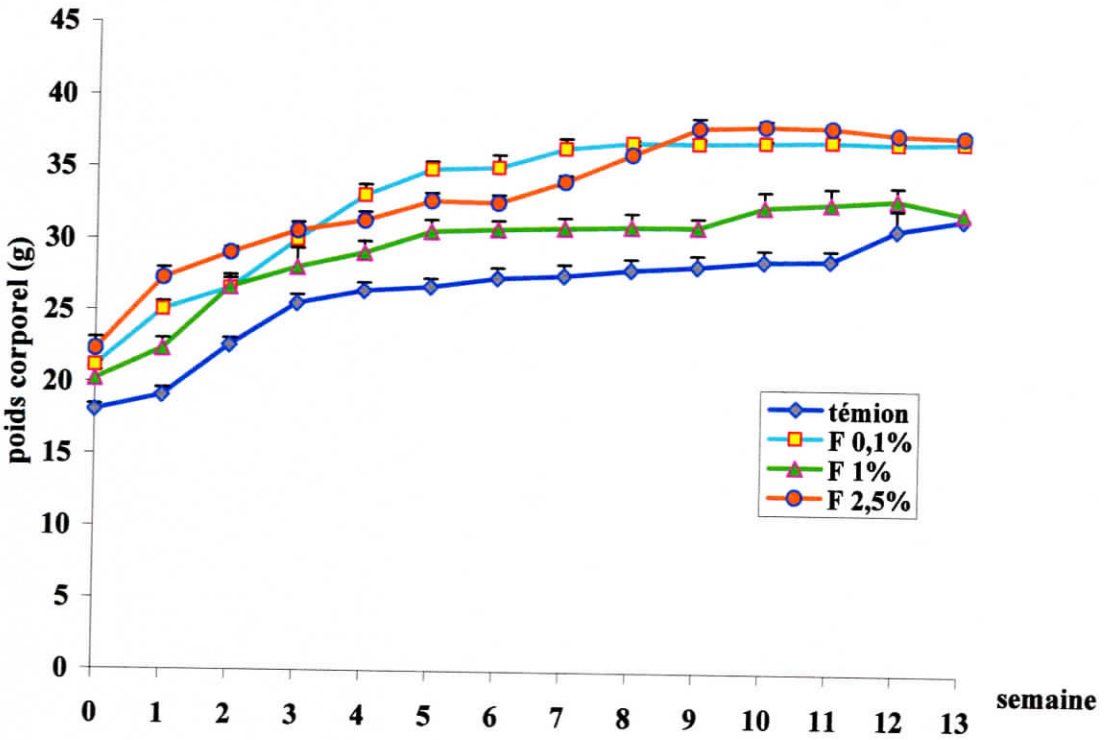


Figure 16 : Croissance pondérale des souris femelles recevant pendant 90 jours de la tartrazine aux doses de 0,1, 1 et 2,5%. Le groupe témoin reçoit de l'eau sans tartrazine.

Les valeurs reportées représentent des moyennes et leurs erreurs standards (X ± ES), établies sur 10 souris dans chaque groupe expérimental et pour le groupe témoin.

-On note une croissance irrégulière chez les groupes traités à 2,5% de tartrazine et une décroissance à la $10^{ème}$ et $12^{ème}$ semaine chez les groupes traités à 1 et 2,5% de tartrazine.

6- Effet de la tartrazine sur le poids relatif des différents organes

Le poids relatif des organes [(poids de l'organe/poids de souris) x 100] renseigne sur l'évolution de l'organe par rapport à celle de l'organisme entier.

Au terme de 90 jours d'expérience, le poids relatif du cœur, de la rate, des poumons, des vésicules séminales et des glandes surrénales chez les mâles est identique chez tous les groupes expérimentaux, comparés aux témoins (tableau 8).

En revanche, le poids relatif des glandes salivaires des mâles traités à 2,5% de tartrazine est significativement plus élevé que celui des témoins ($p<0,01$).

Au niveau des testicules, le poids relatif de ces organes est significativement augmenté chez tous les groupes expérimentaux comparés aux témoins. Cette augmentation est beaucoup plus importante chez le groupe traité à forte dose de 2,5% de tartrazine ($p<0,01$). En effet les valeurs sont ($0,55 \pm 0,03$) vs ($0,37 \pm 0,04$) (tableau 8).

Par ailleurs, chez les femelles, on ne note aucune différence significative du poids relatif de la rate, des poumons, des ovaires, de l'utérus, du cerveau et des glandes salivaires entre les différents groupes. En revanche, le poids relatif du cœur est significativement diminué chez le groupe traité à 0,1% de tartrazine comparé au groupe témoin et aux autres groupes expérimentaux ($p<0,05$) (tableau 9).

De même, le poids relatif des glandes salivaires du groupe traité à 2,5% est significativement plus élevé que celui des témoins et des autres groupes expérimentaux ($p<0,05$). Les valeurs sont ($0,85 \pm 0,02$) vs ($0,49 \pm 0,02$) (tableau 9).

En outre, on note une augmentation du poids relatif des ovaires chez les femelles traitées à 2,5% de tartrazine comparées aux témoins ($p<0,05$). Les valeurs sont ($0,53 \pm 0,04$) vs ($0,35 \pm 0,04$) (tableau 9).

De plus, on note une augmentation non significative du poids relatif du foie et du rein chez les souris mâles et femelles traitées à 2,5% de tartrazine par rapport aux témoins.

Tableau 8: Effet de la tartrazine sur le poids relatif des organes chez les souris mâles

	Cœur	Rate	Poumons	Glandes salivaires	Foie	Reins	Testicules	Vésicules séminales	Cerveau	Glandes surrénales
Témoins	0,48± 0,01	0,43 ± 0,04	0,68 ± 0,05	0,62 ± 0,01 a	4,50± 0,23 a	1,13 ± 0,04 a	0,37 ± 0,04 a	0,40 ± 0,04	1,05 ± 0,01	0,02 ± 0,008
0,1%	0,48 ± 0,02	0,43 ± 0,05	0,69 ± 0,03	0,61± 0,03 a	4,52 ±0,17 a	1,22 ± 0,02 a	0,47 ± 0,02 b *	0,62 ± 0,19	0,92 ± 0,08	0,02 ± 0,005
1%	0,51 ± 0,01	0,44 ± 0,02	0,73 ± 0,03	0,65 ± 0,07 a	4,72 ±0,21 a	1,22 ± 0,02 a	0,54 ± 0,02 b **	0,60 ± 0,04	1,07 ± 0,03	0,04 ± 0,001
2,5%	0,49± 0,03	0,34 ± 0,03	0,63 ± 0,02	0,92 ± 0,07 b **	4,86 ±0,48 b	1,31 ± 0,14 b	0,55 ± 0,03 b **	0,75 ± 0,09	0,94 ± 0,04	0,04 ± 0,01

Les valeurs reportées représentent des moyennes et leurs erreurs standards (X ± ES).

Nombre d'animaux dans chaque groupe (n=6) et durée d'expérimentation 90 jours.

Les moyennes portant des lettres différentes (a,b,c,d) sont significativement différentes.

* $p<0,05$, ** $p<0,01$.

* :Témoins vs les groupes expérimentaux

On note une différence très significative du poids relatif des glandes salivaires chez le groupe traité à 2,5% de tartrazine comparé aux témoins.

Le poids relatif des testicules est significativement augmenté chez tous les groupes expérimentaux par rapport au témoin.

Tableau 9 Effet de la tartrazine sur le poids relatif des organes chez les souris femelles

	Cœur	rate	Poumons	Glandes salivaires	Foie	Reins	Ovaires	Utérus	Cerveau	Glandes surrénales
Témoins	0,37±0,02 a	0,46± 0,08	0,58 ± 0,02	0,49 ± 0,02 a	3,50 ± 0,06 a	0,95 ± 0,05 a	0,35 ± 0,04 a	0,54 ± 0,02	1,03±0,004	0,04 ± 0,02
0,1%	0,29±0,02 b *	0,38 ± 0,02	0,58 ± 0,05	0,53 ± 0,08 a	3,51 ± 0,54 a	0,95± 0,03 a	0,40 ± 0,06 a	0,50 ± 0,07	1,04 ± 0,05	0,06 ± 0,01
1%	0,43±0,03 a	0,46 ± 0,05	0,57 ± 0,02	0,63 ± 0,06 a	4,36 ± 0,23 b	0,98 ± 0,05 a	0,51 ± 0,04 b	0,61 ± 0,07	1,05 ± 0,01	0,04±0,008
2,5%	0,42±0,03 a	0,44 ± 0,04	0,66 ± 0,04	0,85 ± 0,02 b *	4,52 ± 0,12 b	1,03± 0,05 b	0,53 ± 0,04 b*	0,60 ± 0,09	1,08 ± 0,06	0,07±0,008

Les valeurs reportées représentent des moyennes et leurs erreurs standards (X ± ES).

Nombre d'animaux dans chaque groupe (n=6) et durée d'expérimentation 90 jours.

Les moyennes portant des lettres différentes (a,b,c,d) sont significativement différentes.

*p<0,05.

* :Témoins vs les groupes expérimentaux.

On note une différence très significative du poids relatif des glandes salivaires chez le groupe traité à 2,5% de tartrazine comparé aux témoins et aux autres groupes expérimentaux.

7- Effet de la tartrazine sur les paramètres biochimiques sériques

7.1-Teneur en albumine

Les concentrations en albumine sont présentées dans la figure 17. Les résultats montrent que les teneurs en albumine sont très significativement augmentées de 34%, 60% et 72% chez les mâles traités à 0,1, 1 et 2,5% respectivement, comparés aux témoins ($p<0,01$). Nos résultats montrent que cette augmentation est plus nettement significative chez les femelles traitées à 0,1, 1 et 2,5% de tartrazine par rapport aux témoins ($p<0,001$).

7.2- Teneur en cholestérol total

Les teneurs en cholestérol total sont représentées dans la figure 18. Les concentrations en cholestérol total sont similaires chez les groupes traités à 0,1 et 1% de tartrazine comparés aux témoins.

En revanche, celles des mâles traités à 2,5% de tartrazine sont significativement élevées par rapport aux témoins et par rapport aux autres groupes expérimentaux mâles traités à 0,1 et 1% ($p<0,05$). Les valeurs sont respectivement ($3,44 \pm 0,17$), ($4,03 \pm 0,2$) et ($5,35 \pm 0,53$) vs ($4,24 \pm 0,37$ mmol/l) chez les groupes 0,1, 1 et 2,5% comparés aux témoins. Aucune différence significative n'est notée chez les femelles.

7.3- Teneur en urée

Les teneurs en urée sont représentées dans la figure 19. Les concentrations en urée sont significativement augmentées chez les mâles et chez les femelles traitées à 2,5% de tartrazine par rapport aux témoins ($p<0,001$). Les valeurs de l'urée chez les mâles sont respectivement ($11,77 \pm 1,13$) vs ($4,71 \pm 0,64$ mmol/l) et chez les femelles, elles sont respectivement ($12,09 \pm 0,91$) vs ($1,26 \pm 0,65$mmol/l).

De plus, on note une augmentation significative ($p<0,05$) chez les femelles traitées à 1% de tartrazine comparées aux mâles du même groupe.

7.4 - Teneur en créatinine

Les teneurs en créatinine sont représentées dans la figure 20. Nos résultats indiquent une augmentation significative des valeurs en créatinine chez les mâles traités à 1 et à 2,5% de tartrazine comparés aux témoins. Les valeurs sont ($19,54 \pm 3,45$) et ($15,88 \pm 2,1$) vs ($6,75 \pm 1,04$ µmol/l) respectivement.

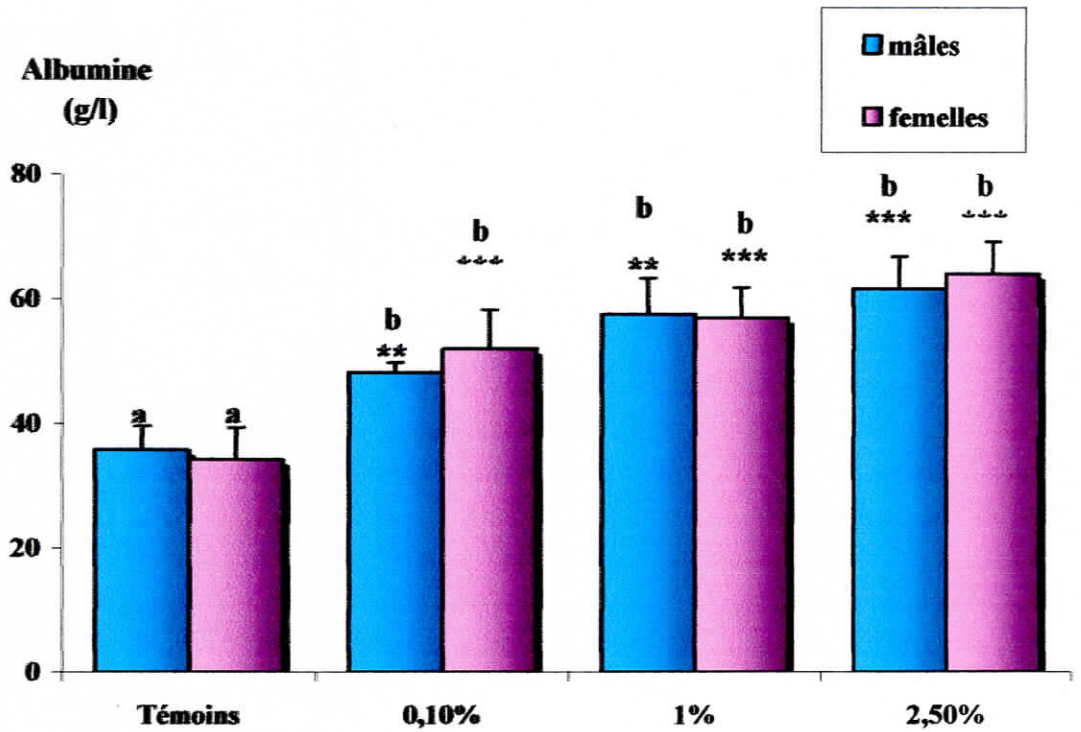


Figure 17 : Teneur en albumine (g/l) chez les souris témoins et les souris expérimentales traitées à la tartrazine aux doses 0,1, 1 et 2,5% pendant 90 jours (n=6).

Les valeurs représentées sont des moyennes et leurs erreurs standards (X± ES).

Les moyennes portant des lettres différentes (a,b,c,d) sont significativement différentes.

* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

* : Témoins vs les groupes expérimentaux

On note une augmentation très significative chez tous les groupes expérimentaux comparés aux témoins. Notablement chez le groupe traité à 2,5% de tartrazine ($p<0,001$).

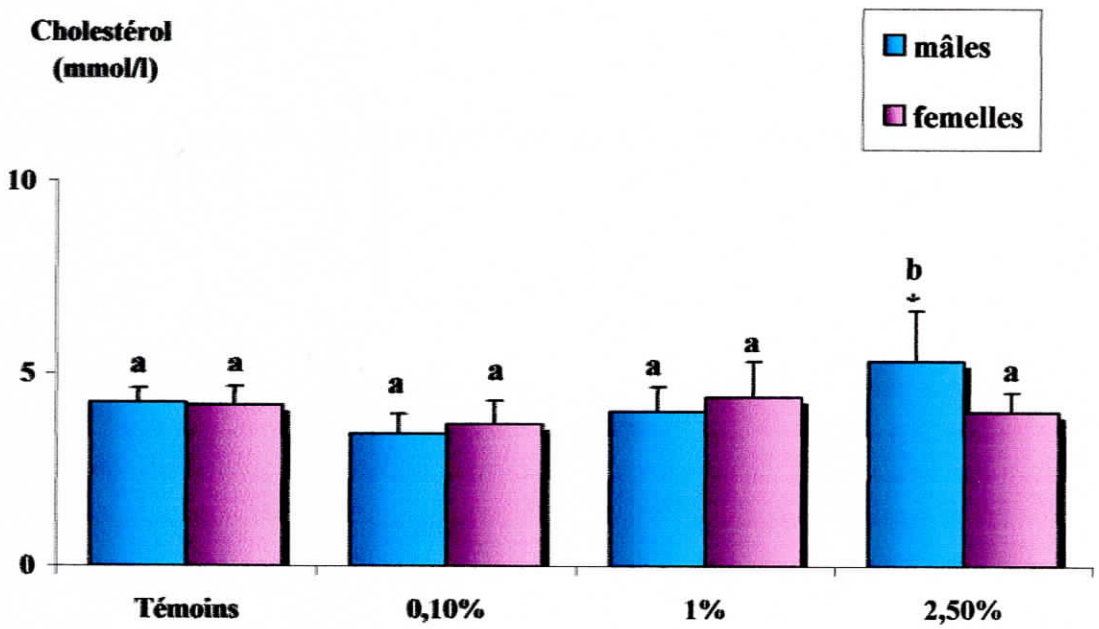


Figure 18: Teneur en cholestérol (mmol/l) chez les souris témoins et les souris expérimentales traitées à la tartrazine aux doses de 0,1, 1 et 2,5% pendant 90 jours (n=9).

Les valeurs représentées sont des moyennes et leurs erreurs standards (X± ES).

Les moyennes portant des lettres différentes (a,b,c,d) sont significativement différentes

* $p<0,05$.

* : Témoins vs les groupes expérimentaux

On note une augmentation significative chez le groupe mâle traité à 2,5% de tartrazine comparé aux témoins ($p<0,05$).

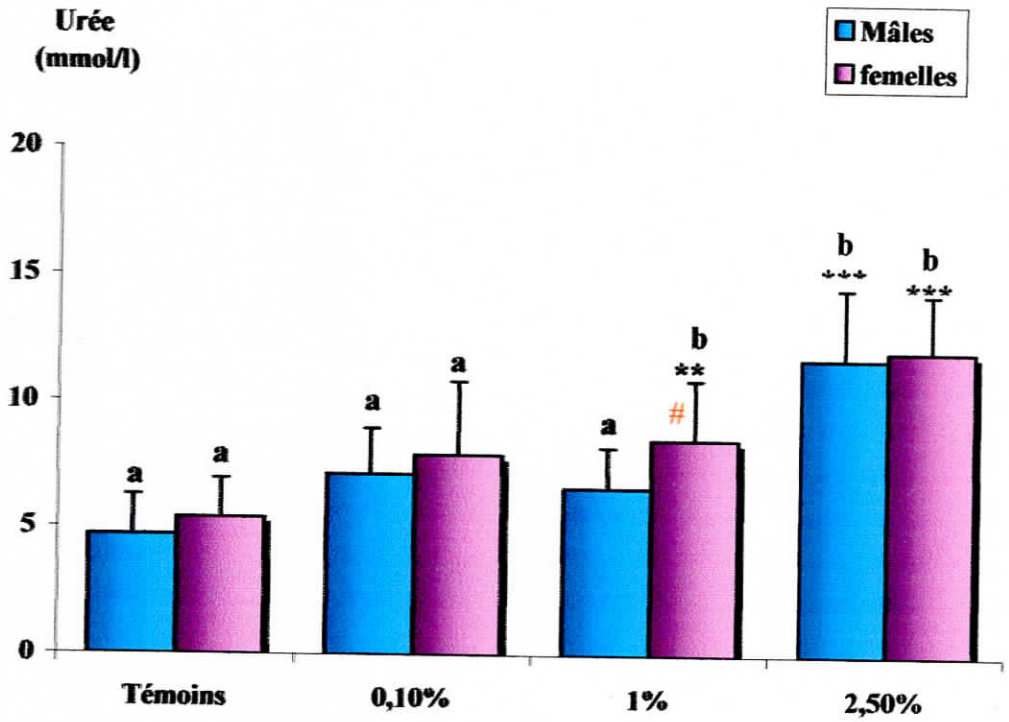


Figure 19: Teneur en urée sérique (mmol/l) chez les souris témoins et les souris expérimentales traitées à la tartrazine aux doses de 0,1, 1 et 2,5% pendant 90 jours. Les valeurs représentées sont des moyennes et leurs erreurs standards (X ± ES). Les moyennes portant des lettres différentes (a,b,c,d) sont significativement différentes.

** p<0,01, *** p<0,001. # p<0,05

* : Témoins vs les groupes expérimentaux

: Mâles vs femelles

On note une augmentation très significative chez les groupes traités à 2,5% de tartrazine comparés aux témoins. Cependant, une augmentation significative est notée chez les femelles traitées à 1%de tartrazine comparées aux témoins et aux mâles du même groupe.

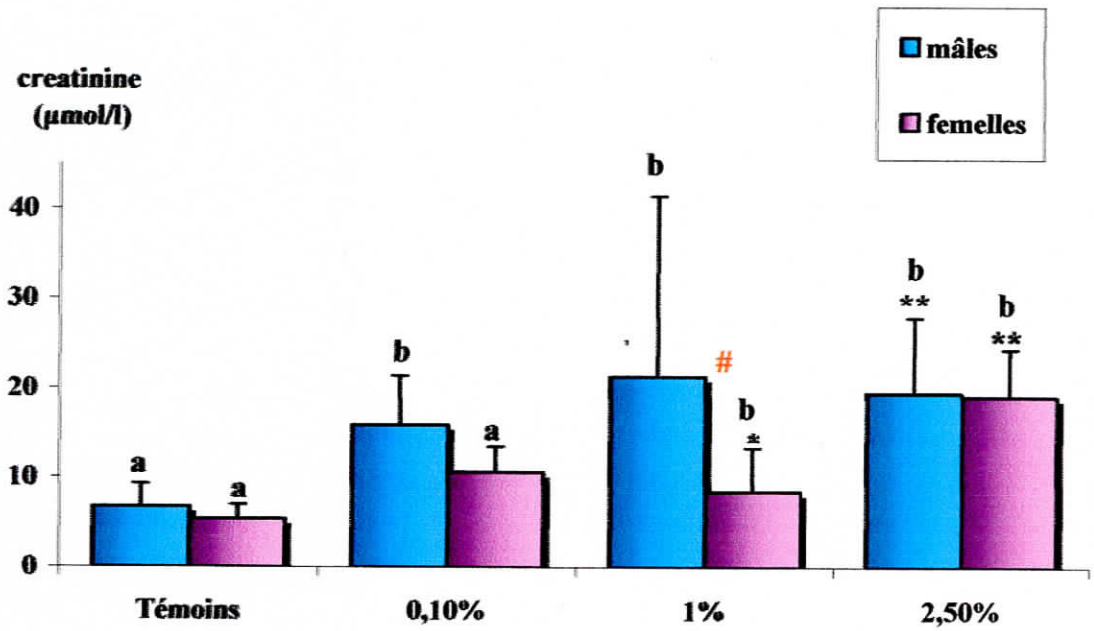


Figure 20: Teneur en créatinine (µmol/l) chez les souris témoins et les souris expérimentales traitées à la tartrazine aux doses de 0,1, 1 et 2,5% pendant 90 jours (n=9).

Les valeurs représentées sont des moyennes et leurs erreurs standards (X ± ES).

Il existe une différence significative entre les témoins mâles et le groupe male 2,5%.

Les moyennes portant des lettres différentes (a,b,c,d) sont significativement différentes.

* $p<0,05$, ** $p<0,01$, # $p<0,05$.

* : Témoins vs les groupes expérimentaux

: Mâles vs femelles

On note une augmentation significative chez les mâles traités à 2,5% de tartrazine ($p<0,01$). Cependant, la teneur en créatinine est augmentée significativement chez les mâles traité à 1% de tartrazine comparés aux femelles du même groupe ($p<0,05$).

De même, les femelles traitées à 2,5% de tartrazine présentent une augmentation significative en créatinine par rapport aux témoins femelles ($p<0,01$).

En revanche, la teneur en créatinine est diminuée significativement chez les femelles traitées à 1% de tartrazine comparées aux mâles du même groupe ($p<0,05$).

7.5- Teneur en acide urique

Les teneurs en acide urique sont représentées dans la figure 21. Les concentrations en acide urique sont augmentées chez tous les groupes expérimentaux mâles et femelles comparés aux témoins. A forte dose de tartrazine (2,5%), cette augmentation est très marquée, elle représente 8% chez les mâles traités à 2,5% de tartrazine comparée aux témoins mâles ($p<0,05$) ($49,01 \pm 1,59$) vs ($45,15 \pm 1,34$ mg/l) respectivement.

Cependant, la teneur en acide urique chez les mâles traités à 1% de tartrazine est significativement élevée par rapport à celle des femelles du même groupe ($p<0,05$).

7.6-Teneur en bilirubine totale

Les teneurs en bilirubine totale sont représentées dans la figure 22. Aucune différence significative n'est notée dans les valeurs en bilirubine totale chez les groupes expérimentaux traités à 0,1 et 1% de tartrazine comparés aux témoins chez les deux sexes.

Cependant, les teneurs en bilirubine totale sont très significativement élevées chez les souris traitées à 2,5% de tartrazine comparées aux témoins chez les mâles et les femelles respectivement ($42,97 \pm 2,93$) vs ($34,64 \pm 0,45$ µmol/l) ($p<0,05$), ($55,58 \pm 3,83$) vs ($32,33 \pm 0,59$ µmol/l) ($p<0,001$).

7.7- Teneur en TGO

Les teneurs en TGO sont représentées dans la figure 23. Les mâles traités à 0,1 et 1% de tartrazine présentent des valeurs faibles en TGO par rapport aux témoins ($p<0,05$).

En revanche, les teneurs en TGO sont très significativement élevées chez les groupes mâles et femelles traités à forte dose de tartrazine (2,5%) par rapport aux témoins et aux autres groupes expérimentaux.

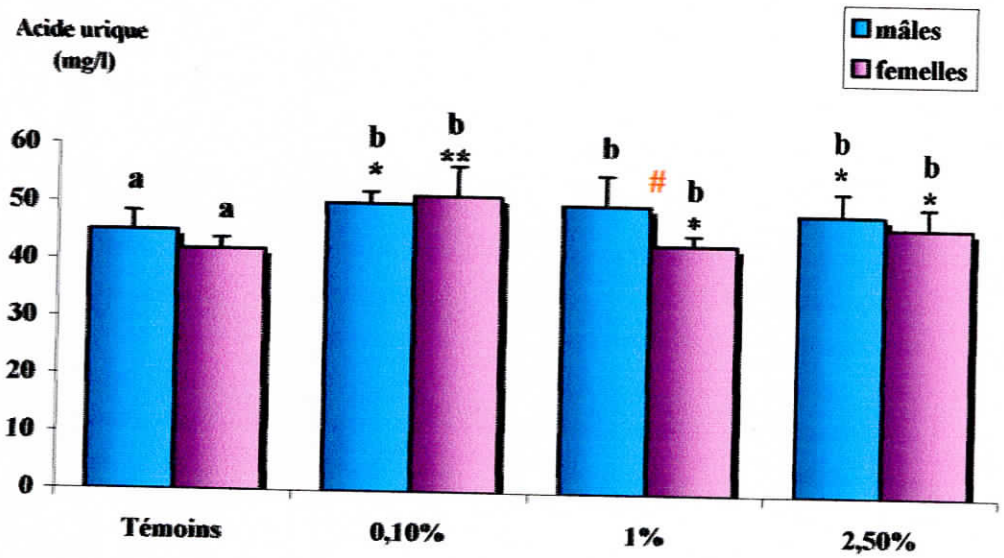


Figure 21: Teneur en acide urique (mg/l) chez les souris témoins et les souris expérimentales traitées à la tartrazine aux doses de 0,1, 1 et 2,5% pendant 90 jours (n=6).

Les valeurs représentées sont des moyennes et leurs erreurs standards (X± ES).

Les moyennes portant des lettres différentes (a,b,c,d) sont significativement différentes.

* $p<0,05$, ** $p<0,01$, # $p<0,05$.

* : Témoins vs les groupes expérimentaux

: Mâles vs femelles.

On note une augmentation chez tous les groupes expérimentaux comparés aux témoins.

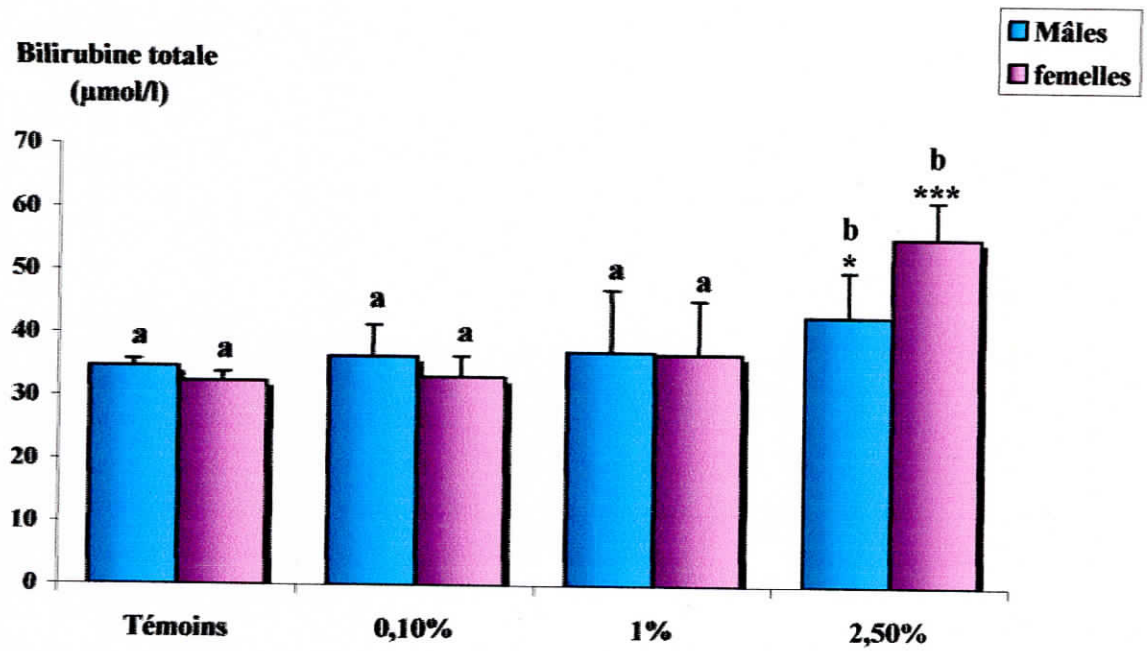


Figure 22: Teneur en bilirubine totale (µmol/l) chez les souris témoins et les souris expérimentales traitées à la tartrazine aux doses de 0,1, 1 et 2,5% pendant 90 jours (n=6).

Les valeurs représentées sont des moyennes et leurs erreurs standards (X ± ES).

Les moyennes portant des lettres différentes (a,b,c,d) sont significativement différentes.

* $p<0,05$, *** $p<0,001$.

* : Témoins vs les groupes expérimentaux.

On note une augmentation significative chez le groupe traité à forte dose de 2,5% de tartrazine comparé aux témoins, notamment chez les femelles ($p<0,001$).

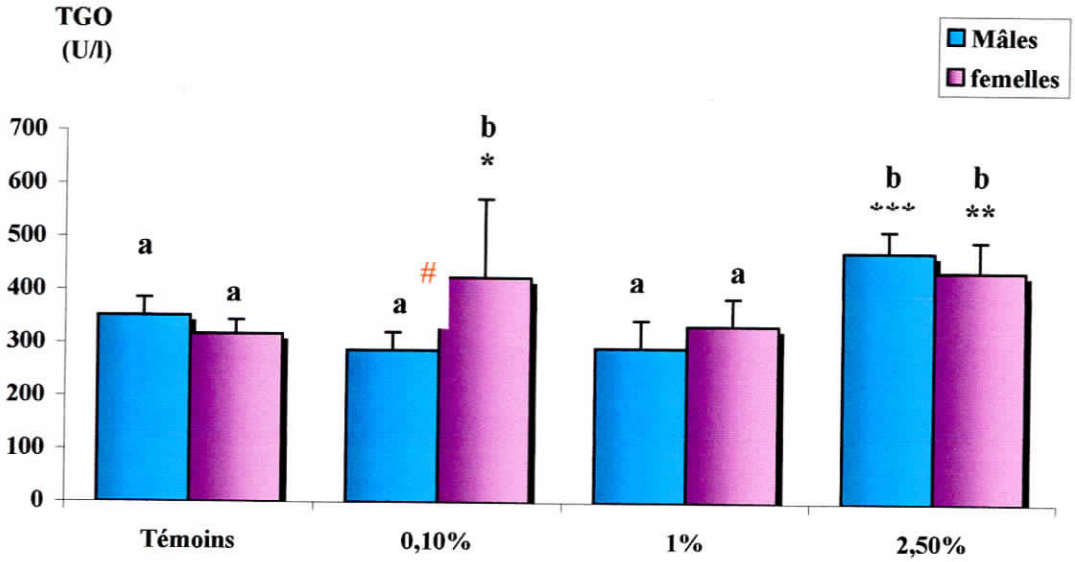


Figure 23: Teneur en TGO (U/l) chez les souris témoins et les souris expérimentales traitées à la tartrazine aux doses de 0,1, 1 et 2,5% pendant 90 jours (n=6).

Les valeurs représentées sont des moyennes et leurs erreurs standards (X ± ES).

Les moyennes portant des lettres différentes (a,b,c,d) sont significativement différentes.

* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, # $p<0,05$

* : Témoins vs les groupes expérimentaux

: Mâles vs femelles

On note une augmentation significative chez les groupes mâles et femelles traités à forte dose de tartrazine (2,5%). Cette augmentation est plus marquée chez les femelles du groupe traité à 0,1% de tartrazine comparées aux mâles du même groupe.

Les valeurs en TGO chez les mâles et chez les femelles sont respectivement (474,82 ± 16,72) vs (351,05 ± 14,19 U/l) respectivement (439,01 ± 23,37) vs (316,35 ± 10,93 U/l).

Cependant, les teneurs en TGO sont augmentées chez les souris femelles traitées à 0,1% tartrazine comparées aux mâles du même groupe ($p<0,05$).

7.8 - Teneur en TGP

Les teneurs en TGP sont représentées dans la figure 24. Elles présentent des valeurs très significativement augmentées chez les groupes expérimentaux traités à 2,5% de tartrazine chez les mâles et les femelles comparés aux témoins ($p<0,001$). Cette augmentation est plus marquée chez les femelles que chez les mâles du même groupe. Les valeurs représentent respectivement chez les mâles et les femelles traités à 2,5% de tartrazine (513,40 ± 10,52) vs (316,18 ± 20,46 U/l) et (571,18 ± 16,08) vs (332,18 ± 12,13 U/l).

Cependant, aucune différence significative n'est notée pour les autres groupes expérimentaux que se soit chez les mâles ou les femelles, comparés aux témoins.

8- Effet de la tartrazine sur le nombre et la production journalière des spermatozoïdes.

L'objectif de cette partie de travail est d'évaluer l'effet de la consommation subchronique de la tartrazine aux teneurs de 0,1, 1 et 2,5% sur le nombre et la production journalière des spermatozoïdes chez la souris.

La production journalière des spermatozoïdes = nombre de spermatozoïdes/poids de testicule/4,8x 10^3 (selon Theobald et Pelerson, 1997).

Les résultats sont représentés dans la figure 25 et le tableau 10.

Le nombre moyen de spermatozoïdes par testicule est très significativement diminué de –2,64 fois chez le groupe traité à 2,5% de tartrazine comparé aux témoins et aux autres groupes expérimentaux traités à 0,1% et 1% (1,50 ± 0,18)x10^3 vs (3,91 ± 0,38)x10^3 et (3,96 ± 0,48)x10^3 ($p<0,001$).

D'autre part, on a noté une diminution dans la production journalière des spermatozoïdes chez le groupe traité à 0,1%, 1% et 2,5% de tartrazine comparés aux témoins ($p<0,05$) (8,52 ± 1,04)x10^3, (8,45 ± 1,08)x10^3 et (7,22 ± 3,13)x10^3 vs (15,92 ± 1,16)x10^3.

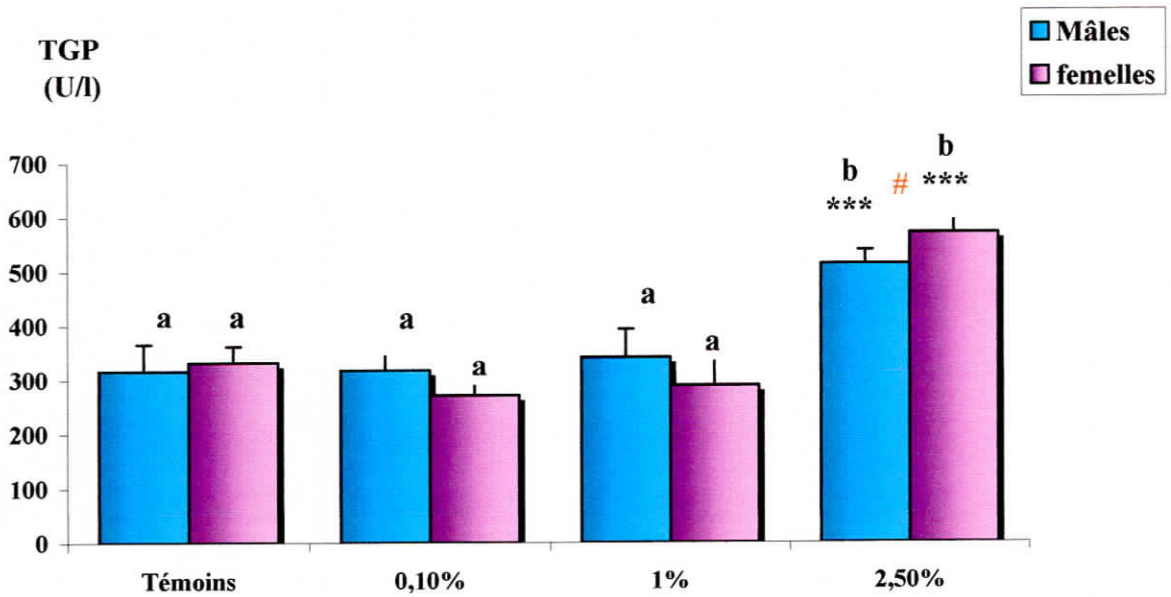


Figure 24: Teneur en TGP (U/l) chez les souris témoins et les souris expérimentales traitées la tartrazine aux doses de 0,1, 1 et 2,5% pendant 90 jours (n=6).

Les valeurs représentées sont des moyennes et leurs erreurs standards (X ± ES).

Les moyennes portant des lettres différentes (a,b,c,d) sont significativement différentes.

*** $p<0,001$, # $p<0,05$.

* : Témoins vs les groupes expérimentaux

: Mâles vs femelles

On note une augmentation très significative chez les groupes mâles et femelles traités à 2,5% de tartrazine par rapport aux témoins et au autres groupes expérimentaux ($p<0,001$). Cette augmentation est plus importante chez les femelles que chez les mâles du même groupe.

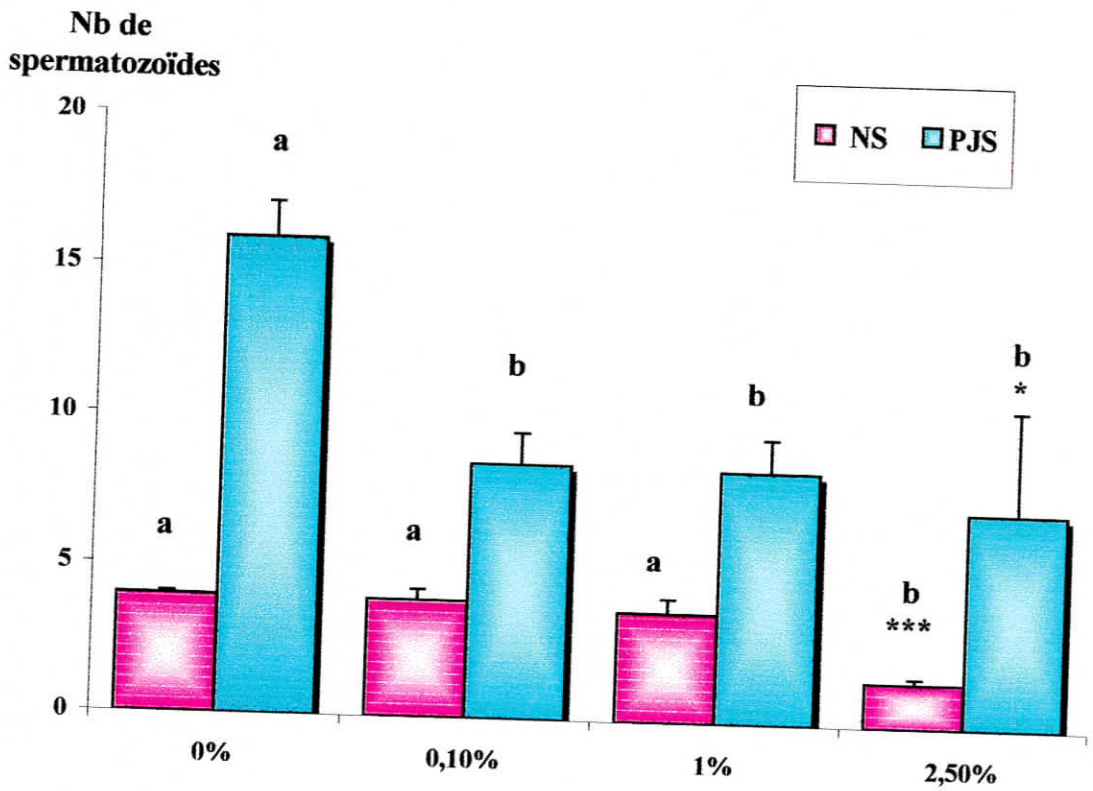


Figure 25: Effet de la tartrazine sur la fertilité masculine de souris traitées aux doses de 0,1, 1 et 2,5% pendant 90 jours, comparées aux témoins (n=5).

Nombre moyen de spermatozoïdes : (NS) $x10^3$.

Production journalière de spermatozoïdes par testicule : (PJS) $x10^3$.

Nombre de spermatozoïdes : NB

Les valeurs représentées sont des moyennes et leurs erreurs standards ($X \pm ES$).

Les moyennes portant des lettres différentes (a,b,c,d) sont significativement différentes.

*$p<0,05$, ***$p<0,001$.

* : Témoins vs les groupes expérimentaux.

On note une diminution très significative dans le nombre des spermatozoïdes chez le groupe traité à 2,5% de tartrazine comparé aux témoins ($p<0,001$). De même, on note une diminution dans la production journalière des spermatozoïdes chez tous les groupes expérimentaux, notablement chez le groupe traité à 2,5% ($p<0,05$).

Tableau 10: Effet de la tartrazine sur le nombre et la production journalière des spermatozoïdes de la souris

Dose de tartrazine	Nbre de souris	Nbre de spermatozoïde x10^3	PJS x10^3
0%	5	3,96 ± 0,10	15,92 ± 1,16
0,1%	5	3,91 ± 0,38	8,52 ± 1,04
1%	5	3,96 ± 0,48	8,45 ± 1,08
2,5%	5	1,50 ± 0,10	7,22 ± 0,10

Les valeurs reportées représentent des moyennes et leurs erreurs standards (X± ES).

0% : souris témoins (n=5).

0,1% : souris traitées à 0,1% de tartrazine (n=5)

1% : souris traitées à 1% de tartrazine (n=5).

2,5% : souris traitées à 2,5% de tartrazine (n=5).

Durée des traitement pour chaque essai : 90 jours.

PJS : production journalière de spermatozoïdes.

9- Etude histologique

Dans le but de voir si l'atteinte pondérale s'accompagne ou non d'une altération de l'architecture tissulaire, nous avons réalisé des coupes histologiques au niveau des testicules chez les souris témoins et traitées à la tartrazine aux teneurs de 0,1, 1 et 2,5%.

9.1- Effet de la tartrazine sur la structure des testicules

L'observation microscopique des coupes histologiques réalisées au niveau du testicule relève une architecture normale chez les souris témoins avec une lumière des tubes séminifères pleine de spermatozoïdes ainsi qu'une succession cellulaire représentant une évolution normale de la spermatogenèse et de la spermatogenèse (fig 26 et 38).

Alors que l'analyse des coupes histologiques des testicules des souris traitées à 2,5% de tatrazine montre une diminution des spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères et un espace interstitiel ou tissu conjonctif important. De plus, on observe une atrophie des tubes séminifères et une absence de certains stades de la spermatogenèse (fig 29 et 33).

En revanche, on distingue moins d'espace interstitiel chez les souris traitées à 1% de tartrazine (fig 28 et 32) cet espace est absent chez les souris traitées à 0,1% de tartrazine (fig 27 et 31).



Figure 26: Observation au microscope optique d'une coupe histologique de testicule de souris témoin (Gx 10, coloration à l'hémalun-éosine).

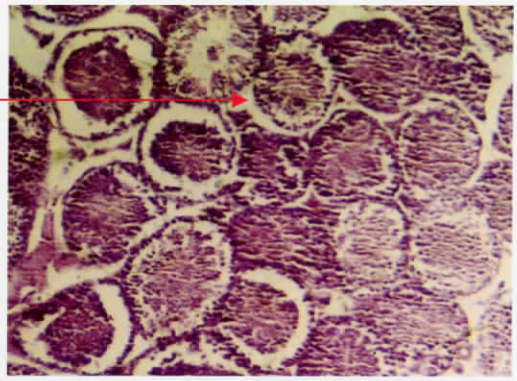


figure 27: Observation au microscope optique d'une coupe histologique de testicule de souris à 0,1% de tartrazine (Gx 10, coloration à l'hémalun-éosine).

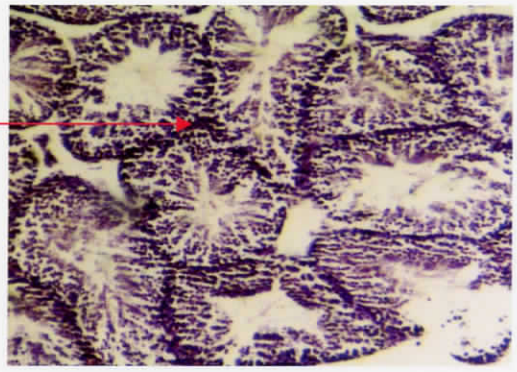


Figure 28: Observation au microscope optique d'une coupe histologique de testicule de souris à 1% de tartrazine (Gx 10, coloration à l'hémalun-éosine).

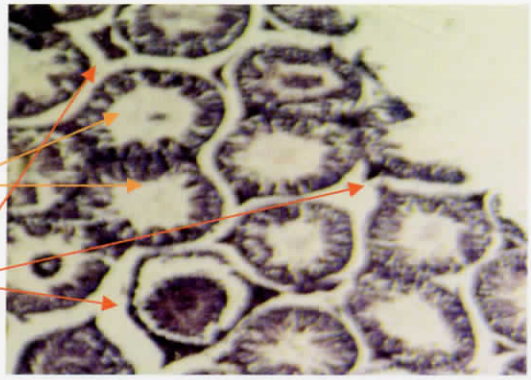


Figure 29: Observation au microscope optique d'une coupe histologique de testicule de souris à 2,5% de tartrazine (Gx 10, coloration à l'hémalun-éosine).
On note une un espace interstitiel important par rapport aux témoins et aux autres groupes expérimentaux

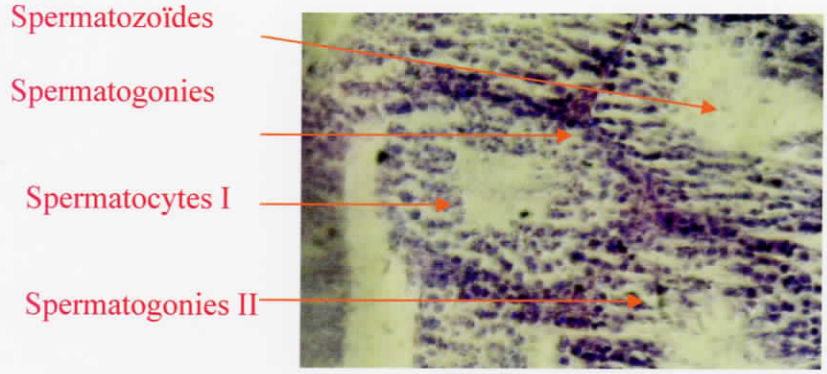


Figure 30: Observation au microscope optique d'une coupe histologique de testicule de souris témoin (Gx 25, coloration à l'hémalun-éosine).

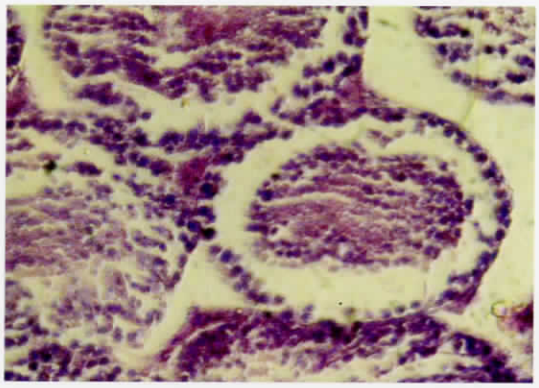


Figure 31: Observation au microscope optique d'une coupe histologique de testicule de souris à 0,1% de tartrazine (Gx 25coloration à l'hémalun-éosine).

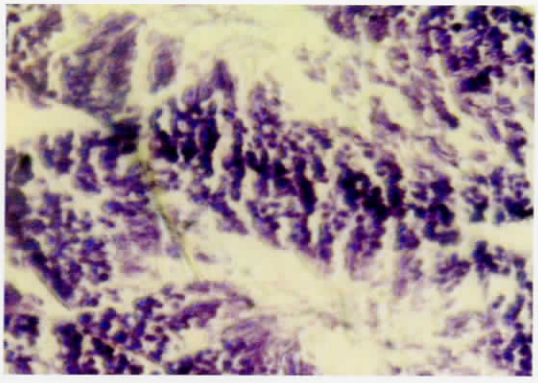


Figure 32: Observation au microscope optique d'une coupe histologique de testicule de souris à 1% de tartrazine (Gx 25, coloration à l'hémalun-éosine)

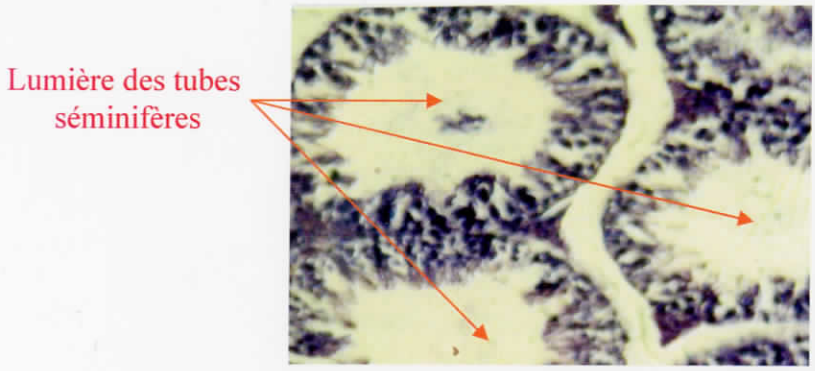
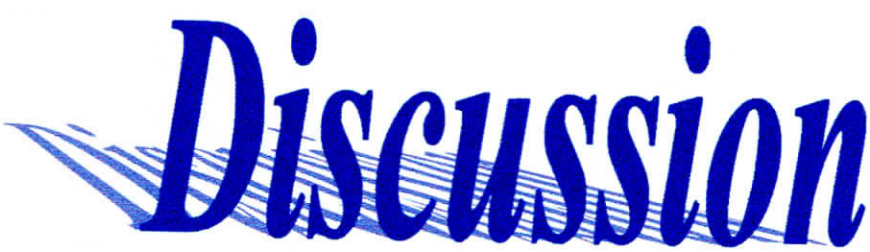


Figure 33: Observation au microscope optique d'une coupe histologique de testicule de souris à 2,5% de tartrazine (Gx 25, coloration à l'hémalun-éosine).

On note une atrophie des tubes semainières.


Discussion

DISCUSSION

Dans ce travail, sont étudiés les effets de la consommation subchronique de tartrazine aux doses de 0,1, 1 et 2,5% sur certains paramètres biochimiques sériques ainsi que sur la fertilité masculine chez la souris Swiss. Nous avons également essayé de déterminer la dose létale 50 (LD50) ainsi que la dose sans effet (DES).

Il existe peu de travaux effectués sur les effets toxiques des colorants alimentaires synthétiques, et encore moins sur la tartrazine.

La DJA ou la dose journalière admissible est la dose d'un produit qui peut être ingéré journellement par un individu pendant sa vie entière sans inconvénients prévisibles pour sa santé. Elle est exprimée en mg/kg de poids corporel (Gausserés et Fricker, 1997).

La DJA de la tartrazine est fixée à 7,5 mg/kg de poids corporel par l'AFSSA (2004) selon le Comité Scientifique de l'Alimentation Humaine (CSAH) et par le Comité Mixte (FAO/OMS, 2000) d'experts des additifs alimentaires (CMEAA), sur la base d'une dose sans effet indésirable de 750 mg/kg de poids corporel/jour.

Dans notre travail, le test de la DL50 est resté infructueux. En effet, malgré les teneurs relevées qui ont été testées, allant jusqu'à 12841,72 mg/kg/ de poids corporel, aucun décès n'a été enregistré dans les 10 jours qui ont suivi les essais. Ces résultats ne concordent pas avec les données établies par la directive 2001/58/CE du Comité Européen qui informe une DL50 de 12750 mg/kg/ de poids corporel pour la tartrazine.

L'effet de la tartrazine sur la prise alimentaire et la prise de solution (tartrazine/eau) se traduit par une augmentation dans le poids corporel, puis une régression vers les dernières semaines chez les groupes intoxiqués par la tartrazine aux doses de 1 et 2,5%. Dans cette étude, il est possible que la diminution du gain corporel soit directement associée à l'effet anorexigène induit par l'irrégularité de la consommation de solution de (tartrazine/eau) observée chez les souris traitées à 1et 2,5% de tartrazine. Ceci peut expliquer la diminution de la consommation de la nourriture.

Ces observations laissent supposer que la consommation de la tartrazine à 1 et 2,5% pourrait intervenir sur le métabolisme d'une manière générale.

D'autre part, certains auteurs pensent que la limite physiologique de déplétion des réserves est atteinte lorsque tous les lipides et 50 % environ des réserves protéiques sont utilisés, à ce stade le catabolisme protéique est très augmenté (Minnema, 1994). Il est possible que ce phénomène puisse expliquer, au moins pour une partie, la chute pondérale observée chez les souris traitées à 1% et 2,5% de tartrazine. Lors du métabolisme, l'organisme de l'animal fait appel selon la qualité de l'aliment impliqué soit à des glucides, soit à des lipides pour couvrir ses besoins énergétiques. Donc, on peut suggérer que les souris intoxiquées par la tartrazine ont utilisé leurs réserves lipidiques et glucidiques pour compenser leur perte de poids.

Tanaka, (1993), rapporte que le colorant alimentaire synthétique l'amaranth (E123) augmente le poids corporel des animaux.

Par ailleurs, les travaux entrepris par Aboel-Zahab et al., (1997) ; Imazawa et al., (1996) ont montré une réduction dans le poids corporel des animaux en utilisant les colorants alimentaires synthétiques (gardenia bleu et indigocarmine E132).

En revanche, comparé aux régimes avec les colorants alimentaires naturels, le poids corporel des animaux soumis pendant 13 semaines est normal (Kitamura et al., 2003).

L'effet de la consommation subchronique de tartrazine sur le comportement physique des souris est montré dans cette étude. En effet, au 2ème mois de l'expérimentation les souris traitées à forte dose de 2,5% de tartrazine deviennent très agitées comparées aux témoins. Ce comportement semble du à l'ingestion de colorant alimentaire synthétique, la tartrazine.

Ce pendant, d'autres chercheurs ont souligné des effets nuisibles sur la base de paramètres neurocomportementaux chez la souris, en utilisant différents colorants alimentaires synthétiques comme sunset yellow FCF ou orangé S (E110) (Tanaka, 1996).

En revanche, Tanaka (2005), n'a montré aucun changement comportemental chez les souris consommant 0,45% de tartrazine pendant 13 semaines.

Par contre, les études comparatives menées chez l'homme, montrent des réactions importantes de comportement qui ont été observées à chaque étapes de l'administration de doses différentes de tartrazine Rowe, (1988).

Swanson et Kinsbourne, (1998) ont décrit l'existence d'une hyperactivité observée chez des enfants consommant des produits additionnés de tartrazine.

Ils estiment à 17% la population d'enfant touchés par ces signes. De même, il a été observé par Rowe et al., (1994) l'existence d'une irritabilité accrue en même temps qu'une agitation sévère et une hyperactivité chez des enfants consommant également des aliments contenant ce colorant.

Ces modifications de comportement de ces enfants qui présentent donc une susceptibilité accrue à la tartrazine seraient en rapport avec une diminution de zinc au niveau sanguin mais aussi avec une importante diurèse rénale (Wold-Neil, 1990 ; 1997 ; Erika, 2000).

De plus, Rowe et al., (1994) ont observé, chez les enfants consommant un régime avec la tartrazine, une irritabilité accompagnée d'une agitation sévère et une hyperactivité.

En revanche, Klauri (1981) et Saltmarsh (2000), rapportent qu'ils n'ont trouvé aucune association entre la tartrazine et les troubles du comportement ou l'hyperactivité.

Dans cette présente étude, l'augmentation du poids relatif des glandes salivaires que l'on observe chez les animaux traités à forte dose de 2,5% de tartrazine peut être attribué à l'irrégularité de l'absorption de solution (eau/tartrazine).

L'étude de l'effet de la tartrazine sur les paramètres biochimiques sériques porte sur l'albumine, le cholestérol, l'urée, la créatinine, l'acide urique, la bilirubine et les transaminases (TGO et TGP).

L'albumine représente 55 à 60% d l'ensemble des protéines du plasma, c'est le constituant majeur des protéines circulantes. Ses variations pathologiques apprécient les possibilités de biosynthèse hépatique, d'hémoconcentration et de désydratation (Scherwin, 2003).

Les données de notre expérimentation animale démontrent que la tartrazine administrée aux teneurs de 0,1, 1 et 2,5% entraîne une élévation de taux d'albumine chez tous les groupes expérimentaux comparés aux témoins. Cette hyperalbunemie peut être un signe biologique de désydratation ou d'altération du métabolisme.

Le cholestérol est à la fois apporté par l'alimentation et synthétisé par le corps humain, principalement dans les cellules hépatiques et intestinales.

Le cholestérol est un constituant fondamental de la membrane cellulaire, un précurseur métabolique des acides biliaires, de vitamines et des hormones stéroïdiennes. Le dosage du cholestérol total permet de dépister une hypercholestérolémie ou l'inverse (Rifai et al., 2003).

L'analyse du cholestérol sérique montre l'existence d'un profil d'hypercholestérolémie chez les mâles traités à 2,5% de tartrazine. Ce résultat peut s'expliquer par une synthèse hépatique plus importante ou peut être le résultat d'un enrichissement des remnants des chylomicrons en cholestérol, ce qui explique peut être l'élévation du poids relatif du foie.

De même, Miyauchi et al., (1999) et Osman et al., (2004) notent une hypercholestérolémie chez le rat nourri avec le colorant alimentaire synthétique l'orangé.

Par ailleurs, Kitamura, (2003) n'a observé chez le rat Wistar aucune différence significative en teneur de cholestérol total avec un régime de 5% de colorant alimentaire naturel.

L'urée est le terme ultime et principal du catabolisme protéique chez l'homme. Il se forme dans le foie et il diffuse librement à travers les membranes cellulaires. Son élimination se fait par le rein par filtration glomérulaire et sa réabsorption tubulaire partielle est passive. Le dosage de l'urée sanguin permet, avec celui de la créatinine et l'acide urique, de détecter l'insuffisance rénale (Metais et al., 1990).

De même, la créatinine plasmatique est le reflet de la masse musculaire globale de l'individu et son métabolisme propre dont toute variation renseigne directement sur l'état fonctionnel du rein, de plus la créatinine mesure directement la filtration glomérulaire (Siest et al., 1990).

Nos résultats indiquent une augmentation significative des taux de l'urée, de la créatinine et de l'acide urique chez le groupe expérimental traité à 2,5% de tartrazine. En effet, cette hyperurémie sanguine associée à une hypercréatinémie et à un taux élevé de l'acide urique témoignent et reflètent probablement une insuffisance rénale (De la Farge, 1993).

Nos résultats sont en accord avec les données relatives à l'hypercréatinémie et l'hyperurémie causées par le traitement de tartrazine à 2,5%, observées par Mekkawy et al., 1996 sur les colorants alimentaires synthétiques.

Par contre, d'autres chercheurs Aboel-Zahab et al., (1997) ne signalent aucune modification dans ces paramètres biochimiques sériques en utilisant le colorant alimentaire synthétique indigo carmine E132.

La bilirubine totale est le résultat de la dégradation du pigment de l'hémoglobine conduisant aux pigments biliaires présents dans le plasma en petite quantité, à l'état normal, sous forme de bilirubine. Son augmentation indique une hépatite induisant probablement à une cirrhose (Valdiguie 1993).

Nos résultats révèlent une hyperbilirubinémie qui porte exclusivement chez le groupe traité à forte dose de 2,5% de tartrazine et particulièrement chez les femelles. Ceci suggère une atteinte hépatique probable qui se traduit par une cirrhose.

Cette affection hépatique est justifiée par l'augmentation du taux des transaminases TGO et TGP. En cas d'hépatite ou nécrose des cellules hépatiques, une augmentation des taux des transaminases est observée (Henderson et Moss, 2001).

L'augmentation des transaminases chez le groupe traité à 2,5% de tartrazine peut être un signe d'hépatite induisant une nécrose cellulaire hépatique.

Ces résultats concordent avec ceux de Mekkawy et al., 1987 effectués sur les colorants alimentaires synthétiques et qui indique une altération des tissus du foie et une nécrose cellulaire hépatique.

De plus, Aboel-Zahab et al., (1997) ont montré que l'administration d'un mélange de colorants alimentaires synthétiques (la carmoisine E122, le brillant bleu E142, l'orangé S E110 et la tartrazine E102) augmente significativement les teneurs en cholestérol et les transaminases.

Cependant, nos résultats sur l'effet de la tartrazine sur la fertilité masculine chez la souris Swiss, montrent une diminution du nombre moyen des spermatozoïdes par testicule ainsi qu'une diminution dans la production journalière des spermatozoïdes chez le groupe traité à forte dose de 2,5% de tartrazine par rapport au témoin, ce qui explique peut être aussi l'élévation du poids relatif des testicules.

D'autres additifs alimentaires synthétiques, tel que l'érythrosine (E127) ont des retombés tissulaires semblables à ceux provoqués par la tartrazine. En effet, l'érythrosine a un effet toxique potentiel sur la spermatogenèse chez les souris et alternativement, peuvent affecter sa fonction testiculaire et exécution reproductrice d'après Abdel Aziz et Shouman, 1997.

L'examen microscopique des coupes histologiques réalisées au niveau des testicules des souris traitées pendant 13 semaines avec la tartrazine à raison de 0,1, 1 et 2,5% par jour, révèle l'action toxique due à la tartrazine qui est très sévère à dose de 2,5% au niveau des testicules ; car cette analyse histologique met en évidence l'atrophie des tubes séminifères et l'absence de certains stades de la spermatogenèse ainsi qu'une diminution des spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères. Ceci suggère l'existence d'une dégénérescence probable des cellules de sertoli et une atteinte de la spermatogenèse confirmée aussi par la baisse du nombre des spermatozoïdes, suggérant une atteinte de la fonction testiculaire après ingestion d'un traitement subchronique à 2,5% de tartarzine.

Au terme de notre étude, nos résultats obtenus montrent qu'à la dose de 0,1% de tartrazine représentant une ingestion de 177,56 mg/kg/j chez les mâles et une ingestion de 161,05 mg/kg/j chez les femelles, aucun effet sur les paramètres étudiés au cours de notre expérimentation n'a été observé.

Cependant à dose de 1% de tartrazine chez les mâles et les femelles correspondant à une ingestion de 1836,30 mg/kg/j et 2317,11 mg/kg/j respectivement, nos résultats révèlent des risques nuisibles mais sans effets sur la population.

En revanche, à dose de 2,5% de tartrazine qui correspond à 4803,94 mg/kg/j chez les mâles et de 4683,84 mg/kg/j chez les femelles, les résultats montrent des effets nuisibles plus sévères sur tous les plans biochimiques et enzymatiques ainsi qu'un effet histopathologique au niveau des testicules induisant à une altération sur la fertilité masculine des souris.

L'ensemble de ces résultats laisse supposer qu'un apport à 2,5% de tartrazine s'avère nuisible pour la santé des animaux. Cependant, la consommation de tartarzine à 1% s'avère être également une dose nuisible, mais sans effet.

Conclusion

CONCLUSION

La tartrazine est un colorant alimentaire synthétique, elle est employée dans une multitude de produits de l'agroalimentaire. La tartrazine ne présente aucun intérêt ou avantage connu sur le plan biologique, en revanche un excès de ce colorant alimentaire peut nuire à plusieurs systèmes dans l'organisme.

Ce travail a permis d'évaluer de façon expérimentale quelques effets toxiques de la consommation subchronique de la tartrazine administrée à des doses de 0,1, 1 et 2,5% par voie orale chez la souris Swiss. L'étude porte sur la croissance pondérale, sur le poids relatif de certains organes, sur les mouvements comportementaux et sur quelques paramètres biochimiques sériques, ainsi que sur la fertilité masculine et la structure testiculaire.

L'intérêt toxicologique de cette étude, nous a permis de déterminer la dose sans effets observés (DSE) mais pas la dose létale 50 du produit.

Nos résultats montrent que la dose létale de la tartrazine serait probablement supérieure à 12841,72 mg/kg/ de poids corporel. De plus, nos résultats montrent également que des doses de 1 et 2,5% de tartrazine, peuvent provoquer une perturbation dans la prise alimentaire et dans la prise de solution (tartrazine/eau). La conséquence est une croissance pondérale irrégulière, et qui conduit une décroissance à la fin de l'expérimentation. Donc il est possible que la tartrazine ingérée à dose de 2,5% induit un effet sur le métabolisme d'une manière générale entraînant un effet anorexigène.

D'autre part, nous avons démontré que la masse de certains organes tel que les glandes salivaires, le foie et les reins chez la souris soumis au régime à 2,5% de tartrazine est augmentée par rapport aux témoins. Cette augmentation est dû peut être à l'irrégularité de l'absorption de solution (eau/tartrazine).

Par ailleurs, les résultats apportés dans cette présente étude montrent que les souris traitées à forte dose de 2,5% de tartrazine présentent une hyperalbunemie, une hypercholestérolémie, une hyperurémie associée à une hypercréatinimie et un taux élevé

en acide urique, une hyperbilirubinemie ainsi qu'un taux élevé des transaminases, suggérant une atteinte de la fonction hépatique et rénale.

Nos résultats montrent également un effet de la tartrazine à dose de 2,5% sur la fertilité masculine chez la souris Swiss. Il se traduit par une diminution du nombre des spermatozoïdes, accompagné d'une diminution dans la production journalière des spermatozoïdes.

L'étude microscopique des coupes histologiques réalisées au niveau des testicules des souris traitées à la tartrazine a la teneur de 2,5%, révèle l'action toxique sur la structure au niveau des cellules. Cette toxicité se traduit par l'atrophie des tubes séminifères ainsi qu' un espace intercellulaire important et l'absence de certains stades de la spermatogenèse. On observe également une diminution des spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères, une dégénérescence des cellules de sertoli et une atteinte de la spermatogenèse, confirmée également par la baisse du nombre des spermatozoïdes, suggérant une atteinte de la fonction testiculaire.

Au terme de notre étude, et en fonction des résultats obtenus, on a pu déterminer que la dose sans effets observés est de1836,30 mg/kg/j chez les mâles et de 2317,11 mg/kg/j chez les femelles. Ceci correspond à la dose de 1% de tartrazine.

L'ensemble de ces résultats laisse supposer qu'un apport à 2,5% de tartrazine s'avère nuisible pour la santé des animaux. Cependant, la consommation de tartrazine à 1% s'avère être également une dose nuisible, mais sans effet.

Ce travail ouvre plusieurs perspectives de recherche. Il faut en particulier élucider et éclaircir les effets ambigus de la toxicité subchronique de la tartrazine. De même, il serait souhaitable d'étudier d'autres effets toxiques de la tartrazine, notamment sur :

- Le système nerveux chez le fœtus.
- Les enzymes clés de la détoxication.
- La génotoxicité et la descendance.
- La fertilité féminine.

Enfin, il serait également très intéressent de rechercher plus patiemment la dose létale 50 de la tartarzine au delà des valeurs que nous avons obtenues.

Références bibiographiques

Références bibliographiques

Abdel Aziz A.H, Shouman S.A. (1997). A study on the reproductive toxicity of erythrosine in male mice. Pharmacol Res, 35: 457-62.

Aboel-Zahab H., El-khyat Z., Sidhom G., Awadallah R.R., Abdel-Allah W., mahdy K. (1997). Physiological effects of some synthetic food colouring additives on rats. J Biol Chem; 136: 615-642.

Adrian J., Potus J., Frangne R. (1995). Evaluation toxicologique et nutritionnelle des alginates. Sci Aliments; 6 : 473-544.

AFSSA. (2004). Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.

Allain P. (2005). Etude chez l'animal ou étude préclinique. In les médicaments 3ème édition..Pharmacorama. http://www.pharmacorama-etude chez l'animal ou étude pré clinique.

Ardern K.D., Ram F.S. (2001). tartrazine exclusion for allergic astma. J Allergy Clin Immunol; 14:81-86.

Beaune P.H , Loriot M.A. (2000). Bases moléculaires de la susceptibilité aux xénobiotiques : aspects métaboliques. médecine/sciences ; 16 : 1051-1056.

Beaure P. (1998).Cytochromes P450 humains : applications en toxicologie. Ed Elsevier,4 :493 - 494.

Belegaud J.(1987). Les colorants industriels.Encycl Méd Chir; 16082 :7-5.

Belpaire F.M., Bogaert M.G. (1996). Cytochrome P450 : genetic polymorphism and drug interaction. Acta Clinica Belgica ;51 : 154-260.

Bhatia M.S. (1996). Allergy to tartarzine in alprazolam. Indian J Med Sci ; 50 :285-291.

Bhatia M.S. (2000). Allergy to tartrazine in psychotropic drugs. J Clin Psychiatry; 61:473-480.

Bourrier T. (2005). Intolérances et allergies aux colorants et additifs. J Allergie et Immunologie clinique ; 46 :68-79.

Brigland G. (1998). Les additifs. Institut Français pour la nutrition. paris :hyy-fr.fseepedia. L'additif alimentaire org.html

Castaing D.,t Smail A. (1999).Anatomie du foie et des voies biliaires. Encycl Méd Chir, Hepatologie; 7-001-A-10.p12.

CCAAAUE. (2001). Commission sur la Consommation des Additifs Alimentaires dans l'Union Européenne.

Chambolle M. (2002). Estimation des consommations d'additifs et auxiliaires et fabrication dans les industries agroalimentaires : Multon. J-L. Edition TEC et DOC Londres-Paris-New York, 2ème édition; 2 :106-109.

Chaveron H. (1999). La toxicologie nutritionnelle édition TEC et DOC Londres New York, Paris ; 214p.

Christie R.M., Metcalfe D.D., Sampson A., Ronald Simon A. (2003). Elimination of tartrazine.Health & Fitness; 591:36.

Collenot A., Signoret J. (2000). L'organisation en développement. La construction de L'adulte. Hermann, Paris; 4 :32.

Collins-Williams C. (1985). Clinical spectrum of adverse reactions to tartrazine. J Asthma;22:139-43.

Combes R.D., Haveland-Smith R.B. (1982). A review of genotoxicity of food, drug and cosmetic colours and other azo, triphenylmethane and xanthene dyes. Mutation Res ; 98 : 101.

CONSLEG. (2004). Directive 2004/18/CE Parlement Européen et du Conseil. Office des publications Officielles des Communautés Européennes. 1995L0045-10/02/2004 :48.

Corder C., Elizabeth H., Edward-Buckley C. (1975). Aspirine salicylate, sulfite and tartrazine induced bronconstriction. Safe doses and cose difinition in epidemiological studies. J Clin Epidemiology; 48:1269-1274.

CSIP. (2001). Center for science in the public interest diet.

Darribère T. (2002). Introduction à la Biologie du Développement. Collection Sup, Belin, Paris; 45-48.

Das A., Mukherjee A. (2004). Genotoxicyty testing of the food colours Amaranth and tartarzine. J Fd Chem Toxicol; 4:277-280.

De Saint Blanquat G. (1984). Effet nutritionnel des agents émulsifiants utilisés en alimentation humaine. Med Nut ; 20 :379-395.

De Lafarge F. (1993). Exploration fonctionnelle rénale. In Biochimie clinique. Ed Médicale international-Technique et documentation- Lavoisier, France ; 358-371.

Deschenes S., Dufour Blais K., Gagnon G., Pelletier I. (2001). Etude de la coloration et les impacts de celle-ci sur l'homme. http://www. cfsan-fda.gov/mow/fooddadd.html.

Despopoulos A., Silbernacl S. (1992).Atlas de poche de physiologie.Ed Med Science Flammarion ;294-306.

Devlin J., David T.J. (1992). Tartrazine in atopic eczema. Arch Dis child; 67:709.

Dipalma J.R. (1990).Tartrazine sensitivity. Am Fam Physician;42:1347-1352.

Directive. 2001/58/CE.

Directive. (1994). 94/36/EU. European Parliament and Council.

Directive technique. (1994). 94/36/EC.

Directive technique. (2005). Réglementation publiée le 21/11/2005 UE.

Directive technique. (1997). 77/97/CE.

Dutau G., Rancé f., Fejji S., Juchet A., Brémont F., Nouilhan P. (1996). Intolérance aux additifs alimentaires chez l'enfant : mythe ou réalité ? Rev Fr Allergol ; 36 : 129-142.

Dutau G. (2002). Additifs. In Dutau G. Editor le dictionnaire des allergènes 3ème ed.12-15.

Ebo D.G., Stevens W.J. (2002). IgE-mediated food allergy: extensive review of the literature. Acta Clin Belg; 56:234-47.

Edwards C.N., Combes R.D.(1984). Mutagenicity studies of urine and faecal samples from rats treated orally with the food colourings brown FK and red 2G. Fd Chem Toxicol;22: 593-597.

Erika M. (2000). The burden of foodhood asthma. Archives of disease in childhood. J of Nut Med; 82: 2-5.

Fan A., Howd R., Davis B. (1995). Risk assessment of environmental chemicals. Annu Rev Pharmacol Toxicol ; 35 : 341-368.

FAO . (2000). Food and Agriculture Organization),

FDA. (1987).Good laboratory practice regulations.

FDACFSAN. (2001). Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition.

Feldman C.(2001). Bilan de la fonction hépatique. Ed Med . Paris ; 35 :225-243.

Fontaine F., Rahmani R. (1998).Rôle des cytochromes P450 hépatiques dans le métabolisme et la toxicité des médicaments antipaludiques: implications pharmaco-toxicologiques. J Fd Chem Toxicol ; 217 : 35-62.

Franquinet R., Foucrier J. (2003). Atlas d'embryologie descriptive (2e édition). Collection Science Sup , Dunod, Paris; 22-29.

Fuglsang G., Madsen G., Halken S., Jongensen S., Ostergaard P.A., Osterballe O. (1994). Adverse reactions to food additives in childen, withe atopic symptoms. Allergy Immunol; 49: 31-38.

Fuglsang G. (1993). Prevalence of intolerance to food additives among Danish scool children-pediatr. Allergy Immunol; 4:123-132.

Gausseres N., Fricker J. (1997). Toxicologie alimentaire. Encyc Med Chir (Elsevier, Paris), Toxicologie, 16-085-A-10, Endocrinologie-Nutrition, 10-303-A-10.

Gilbert S. F. (2003). Developmental Biology. (7e édition). Sinauer Associates Publisher Sunderland ; 4 :111-117.

Green U., Simon R.A., Stevenson D.D. (1982). The indice of ingested metabisulfite sensitivity in a asthematic population. J Allergy Clin Immunol; 42:69-118.

Hannedouche T. (2001). Néphrologie: Vulnérabilité du rein au lésions toxicologiques. Présentation clinique de la toxicité rénale des médicaments.www.Nephrologie.gov

Henderson A.R., Moss D.W. (2001). Enzymes, Fundamen-tals of Clinical Chemistry, 5ème Ed., Burtis, C.A. & Ashwood, E.R. Saunders W.B eds. Philadelphia USA, 352-359.

Hesser L. (1984). Tartarzine on trial. J Fd Chem Toxicol; 22:1019-1026.

Holstein A.F., Roosen-Runge E.C. (1981). Atlas of spermatogenesis. Springer Verlag, Berlin.62-110.

Hong S.P., Park H.S., Lee M.K. Hong C.S. (1989). Oral provocation tests with aspirin and food additives in asthmatic patients. J Yonsei Med;30:339-45.

Horie T., Grosh W., Lindey M.G .(1999). Food additives, Toxicology; 3:250-256.

Hould R. (1984). Technique d'histopatologie et de cytologie. Montréal : Décarie ; 47 :156.

Imazawa T., Nishikawa A., Furukawa F., Tanakamaru Z., Lee I.S. (1996). A 13 week subchronic toxicity study of gardenia bleue in F344 rats. J Fd Chem Toxicol; 114:27-32.

ILSI . (1999). International Life Sciences Institut, Europe Workshop on the significance of excursions of intak above the Accepted Daily Intake (ADI). Editors: Barlow S., Pascal G., Larsen J.C., Richold M. Regulatory Toxocology and Pharmacology, 30 (N°2, Part 2).

James R.W.(1993). The relevance of clinical pathlogy to toxicology studies. John Libbey Eurotext, Paris; 3: 29-40.

Juhlin L. (1981). Recurrent urticaria : Clinical investigation of 330 patients. Britich Journal of Dermatology; 104:369-381.

Kalinke D.U., Wuthrich B. (1999). Purpura pigmentosa progressiva in type III cryoglobulinemia and tartrazine intolerance. A follow-up over 20 years. Hautarzt;50:47-51.

Kapor M.A., Yamanaka H., Carneiro P.A., Zanoni M.V.B. (2001). Eletroanálise de colorantes alimentícios: Determinação de índigo carmim e tartrazina. São Paulo ; Scielo Brazil ; 26 :100-195.

Kitamura Y., Nishikawa A., Furukawa F., Nakamura H., Okazaki K., Umemura T., Imazawa T., Hirose M. (2003). A subchronic toxicity study of schea nut color in Wistar rats. J Fd Chem Toxicol; 41: 1537-1542.

Klauri K. (1981). Some aspects of colour in man. In Criteria of Food Acceptance: how man chooses what he eat. Editors: Solms J., Hall R.L. Forster Verlag AG Publishing. Zurich; 30:82-95.

Lannoye P., Denil M. (2001). Guide des additifs alimentaires. Les précautions à prendre. Lavoisier. Paris.

Lash L.H. (2000). Role of renal metabolism in risk toxic chemicals, J Fd Chem Toxicol;32: 336-340.

Le Moigne A., Foucrier J. (2004).Biologie du développement (6ème édition), Paris. Dunod ; 21-25.

Lepoittenin J.P .(2005). Métabolisme cutané : Diagnostic de l'allergie aux médicaments. Paris. Ed Eurotext ; 7 :29-40.

Letourmy P., Grounelle De Pontanel H., Vignet J. (1977). Enquête auprés des dermatologues français sur des allergies, notamment par colorants alimentaires. J Allergie ; 13 :107-110./

Lin J.H. (2000). Sense and mon sense in the prediction of drug interaction, Curr Drug. Metab;1:305-31.

Lockey S.D. (1977). Hypersensitivity to tartrazine (FD&C Yellow No. 5) and other dyes and additives present in foods and pharmaceutical products. Ann Allergy;38:206-10.

Lockey S.D. (1959). Allergic reactions due to FD and C yellow N°5 tartrazine, an aniline dye used as a coloring agent in various steroids. Ann Allergy; 17:719-725.

Lu F.C. (1992). Toxicologie : données générales, procédures d'évaluation. Organes cibles, évaluation du risque. Paris, Masson; 191-353.

Maekawa A., Matsuoka C., Onodera H., Tanigawa H., Furuta K., Kanno J., Jang J.J., Hayashi Y., Ogiu T. (1987). Lack of carcinogenicity of tartrazine (FD & C yellow n°5) in the F344 rat. Division of pathology, National Institute of Hygienic Sciences, Tokyo, Japan. Food Chem Toxicol; 25:891-6.

Mekkawy H.A., Ali M.O., El-Zawahry A.M. (1996). Toxic effect of synthetic and natural food dyes on renal and hepatic functions in the rats. J Food and Natural Products; 18:155.

Metais P et al. (1990). Biochimie clinique, tome1, 2ème edition. Paris. Simep ; 364.

Meyers D.G., Maloney P.A., Weeks D. (1996). Safety of antioxydant vitamins. Arch Intern Med ; 156 : 925-935.

Michaelson G., Jahlin L. (1973). Urticaria and asthma inducted by preservatives and additives in food and drugs. J Brit Dermatol; 88:525-532.

Minnema D. (1994). Effect of lead exposure on patterns of Food intake inweanling rats. Neurotoxicol; 16:623-639.

Miyauchi M., Furukawa F., Nishikawa A., Nakamura H. Imazawa T., Hirose M. (1999). A 13 week subchronic toxicity study of orange color in F344 rats. J Fd Chem Toxicol; 117: 123-8.

Moll M., Moll N. (1995). Sécurité alimentaire du consommateur, Tec & Doc, éds Lavoisier, Paris, 30-55.

Moneret-Vautrin D.A. (1978). Le risque de sensibilisation aux colorants alimentaires et pharmaceutiques, Paris. Masson ; 195.

Moneret-Vautrin D.A., Andre C. (1983). Allergie et intolerance aux additifs. In Monret-Vautrin D.A., Andre C. (1983). Editors. Immunopathologie de l'allergie alimentaire et fausses allergies alimentaires. 1ère Ed. Paris. Masson; 202.

Moneret-Vautrin D.A. (2003). Urticaires chroniques et origine alimentaire. Ann Dermatol Venerol ; 130 : 42-55.

Morales M.C., Basomba A., Pelaez A., Garcia Villalmanzo I., Campos A. (1985). Challenge tests with tartrazine in patients with asthma associated with intolerance to analgesics. A comparative study with placebol. Clin Allergy; 15:55-9.

Morimitsu Y. et al. (2000). A sulforaphane analgue that potently activates the Nrf2-dependent detoxification pathway. J Biol Chem; 5: 3456-3463.

Moulé Y., Decloitre F. (1993). Mécanismes de biotransformation des cancérogènes.Paris. Ed Association toxicologie CNAM ; 340-344.

Naito H.K. (2003). Coronary Artery Diesease and Disorders of lipid metabolism. Clinical Chemistry : Treory, Analysis, Correlation. J Clin/Chem; 33:603.

Nettis E., Colanardi C., Ferrannini A., Tursi A. (2003). Suspected tartrazine-inducted acute urticaria/angioedema is only rarely reproducible by oral rechallenge. Clin Exp Allergy; 33:1725-1729.

Nogaki A., Satoh K., Iwazaka K et al. (1998). Radical intencity and cytotoxic activity of curcumin and gallic acid. Anticancer Res; 18:487-491.

OCDE .(1989).Good laboratory practice in the testing of chemicals.Organization of economic cooperation and developmeny.

Oishi S. (2004). Lack of spermatotoxic effects of methyl and ethyl esters of p-hydroxybenzoic acid in rats. J Fd Chem Toxicol; 42:1845-18490.

OMS. (2000) Organisation Mondiale de la santé.

Osman M.Y., Sharaf A.I., Osman H.A., El-Khouzy Z.A., Ahmed E.I. (2004). Synthetic organic food colouring agents and their degrated products : effect on human and rat cholinesterases. British Journal. Biomedical/Science; 61:128-132.

Palmer B.F., Levi M. (1995). Effect of aging on renal function and disease. The kidney. Philadelphia : XB Saunders;27:2274-2296.

Pan M.H., Huang T.M., Lin J.K. (1999). Biotransformation of curcumin through reduction and glucoronisation in mice. Drug Metab Dipo; 27:486-494.

Pariza M.W. (1996). Toxic substances in foods. In : Ziegler EE, Filer LJ eds. Present Knowledge in nutrition. Washington : ILSI ; 563-573.

Pascuito B., Michel A. (2004). Un colorant allergique dans des potions. LeFigaro ; 27 :29-31.

Pinau T., Fernandez-Salguero P., Lee S.S.T., Mcphail T., Ward J.M., Gonzalez F. (1995). Neonatal lethality associated with respiratory distress in mice lackin cytochrome P450 1 A2. Pro-Natl. Acad. Sci; 92 : 5134-5138.

Pinau T. (1998). Developpement actuel des techniques de pharmacologie et toxicologie à l'INRA ; 11 :95-100.

Potus J., Adrian J., Frangne R. (1995). La science alimentaire de A à Z. 2ème edition. Lavoisier, Paris ; 100-350.

Prival M.J., Feiperd M.D., Bell S.J.(2002). Détermination of combined benzidine in FD & C yellow N°5 (tartrazine), using a highly sensitive analytical method. J Fd Chem Toxicol; 31:751-758.

Raisonnier A. (2004). Digestion et détoxification, cours DCEM 1UPMC. Faculté de médecine –Pierre et Marie Curie- Université Paris.France.

Rifai N et al. (2003). Lipids, lipoproteins and apolipoproteins. Fundamentals of Clinical chemisty, 5ème Ed; Burtis, C.A. & Ashwood. Saunders eds. Philadelphia USA; 463.

Ristoff E., Larsson A. (2003). Gamma-glutamyl-transpeptidase deficiency. Orphanet encyclopedia. Scientific editor Orphanet. http ://www.orpa.net/data/patho/GB/UK-Glutamyl.

Robet LR. (1999). Toxicologie industrielle et intoxication professionnelle. Paris. Masson ;60-62.

Robert L. (1999). Toxicologie industrielle et intoxication professionnelle. Paris. Masson ; 12-69.

Rose B., Rennke H. (1995). Physiopathologie des affections rénales et des désordres hydroélectriques. Pradel ; 2 :240-251.

Rose B.D. (1994). Clinical physiology of acid-base and electrolyte disorders. New York : Mcgraw Hill; 916.

Rosenhall L. (1982). Evaluation of intolerance to analgesics, preservatives and food colorants with challenge tests. J Eur Respir Dis; 22:63410-9.

Rowe K.S., Rowe K.J. (1994).Synthetic food coloring and behavior: A dose response effect in a double-blind, placebo-controlled, repeated measures study. J Pediatrics; 125: 691-698.

Rowe K.S. (1988). Synthetic food colourings and 'hyperactivity': a double-blind crossover study. J Aust Paediatr; 24:143-7.

Saltmarsh M. (2000). Essential Guide of Food Additives. Leatherhead Food RA Publishing;1:322.

Sasaki Yu F., Kawaguchi S., Kamaya K., Ohsita M., Kabasawa K., Iwama K., Taniguchi K., Tsuda S. (2002). The comet assay with 8 mouse organs :results with 39 currently used food additives. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis;519:103-119.

Sampson H.A. (1999). Food allergy. Part2: Diagnostic and management. J Allergy Clin Immunol; 103:981-990.

Scherwin J.E. (2003). Liver function. Clinical Chemistry : Treory, Analysis, Eds St Louis USA;492.

Settipane G.A., Chafee F.H., Postman I.M. (1975). Significane of tartrazine sensitivity in intractable urticaria. J Allergy Clin Immunol; 55:106.

Siest G et al. (1990). Réferences en biologie clinique. Paris. Elsevier;360-372.

Sinaiko R.J. (2000). Détoxication et troubles autistiques. J Pediatrics ; 161 :26-28.

Smith C.K, Hotchkiss S.A.M. (2001). Allergic contact dermatitis: chemical and metabolic mechanisms.J Biol Chem;31: 300-310.

Stengel B., Coll. (1996). Maladies rénales d'origine toxique professionnelle. Encyclopédie médicale chirurgicale. Néphrologie-Urologie. Paris: Elsevier ; 18-67.

Strickland P.T, Groopman J.D. (1995). Biomarkers for assessing environmental exposure to carconogens in the diet. Ann J Clin Nutr; 61: 710-720.

Swanson J.M., Kinsbourne M. (1998). Food dyes impair performance of hyperactive children on a laboratory learning-test. J of pediaterics;207:1485-1491.

Tanaka T. (1993). Reproductive and neurobehavioral effects of Amaranth administered to mice in driking water. J Fd Chem Toxicol; 9: 1027-35.

Tanaka T. (1996). Reproductive and neurobehavioral effects of Sunser yellow FCF administered to mice in the diet. J Fd Chem Toxicol; 12: 69-79.

Tanaka T. (2005). Reproductive and neurobehavioral study of tartrazine administered to mice in the diet. J Fd Chem Toxicol; 169:73-74.

Taylor S.L., Dormedy F.S. (1995). Flavorings and colorings. Albergy; 80:2.

Theobald H..M., Pelerson R.E. (1997). In utero and lactational exposur to 2,3 ;7 ;8-tertracholoro-dioxine: effects on development of the male and femelle reproductive system of the mouse. Toxicology and Applied, Pharmacology; 145:124-135.

Thillay A. (2003). Allergy of food colors. Clin Exp Allergy ;33 :1725-1729.

Valdiguie P.V. (1993). Biochimie clinique. Ed Medicale Internationale. Paris ; 391.

Vassault A., et al. (1999). Analyses de biologie médicale : spécification et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation des techniques. Ann Biol Clin ; 57 :685.

Volonaskis M., Katsarou-Kalsari A., Stratigos J. (1992). Etiologic factors in childhood withe chronicurticaria. Ann Allergy; 69:61-65.

Ward M.K., Cockayne S. (1993). Enzymology. Clinical Chemistry. In Concepts and Appliction, Anderson S.C., Cockayne S. Saunders eds. Philadelphia USA; 92-107.

Ward-Niel I. (1990). The influence of the chemical additive tartrazine on the zinc studys of hyperactive children. Adouble-blind placebo-contrelled study. J of Nutritional Medicine; 1:51-54.

Ward-Niel I. (1997). Assessement of chemical factors in relation to child hyperactivity. J of Nutritional Environmental Medicine;7:333-375.

Weber R.W; Hoffman M., Raine D.A., Nelson H.S. (1979). Incidence of bronchoconstriction due to aspirin. Azodyes, Monozodyes and preservatives in a population of pernial asthonatics. J Allergy Clin Immunol;4:32.

Williams R.T. (1958). Détoxication Mechanisme, 2nd ed. London, Chapman & Hall.

Yoshimoto M., Uamaguchi M., Hatano S., Watanabe T. (1984). Configuration changes in rat liver nuclear chromatin caused by azodyes. Fd Chem Toxicol; 22:337-344.

Young F., Patel S., Stancham M., Roma R., Wilkinson J.D. (1987). The prevalence of reaction to food additives in asurveg population. J Coll Physicians London; 21:241-248.

SUMMARY

Tartrazine is a colouring synthetic food used in a multitude of foodstuffs, cosmetics and in certain drugs. Used on a large scale as a saffron in the culinary preparations by the Algerian housewife, ather presenttive we ihnore it potential harmful effects on man's.health

This work aims are study of the consequences of a subchronic tartrazine ingestion (E-102) as well as the determination of its lethal amount 50 (DL50) and of its amount without effect (DSE) in the mouse swiss, used as an experimental model.

For the study of the subchronic ingestion of the food dye, 3 groups of mouse including/understanding each one 10 males and 10 females 4 weeks old and weighing on average 20g are used.The animals are feed using a standard diet and receive during 90 days consecutive water of breuvage supplemented withe tartrazine with the respective concentrations of 0,1%, 1% and 2,5%. Each test is compared with a control treatment (drink water without tartrazine) also including 10 males and 10 females. Daily, the body weight, the volume of the hold of water as well as the clinical signs and the behavioral modifications of the animals are determinated. After 90 days of experiment, the mice are sacrificed, the blood is collected for the biochemical proportionings, the kidneys, the liver, the heart, the spleen, the lungs, the salivary glands, the brain, the suprarenals glands in the animals of the two sexes, but also the testicles and the seminal blisters in the males as well as the uterus and the ovaries in the females are taken for the determination of the relative weight of the organs. Lastly, the testiculaire function of the male mouses is evaluated by the counting of the spermatozoïdes and the histological study.

For the DL50, 25 female mice 6 weeks old and weighing between 25 and 28g are used. The animals, devided in 5 groups of 5 mice, are force-feed using a gastric probe with respectively a uniqueamount of 200, 250, 300, 355 and 357 mg tartrazine.

The results obtained show that:

- the amount without effects observed is de1836,30 mg/kg/j in the males and of 2317,11 mg/kg/j in the female, which corresponds to the amount of tartrazine 1%.
- the degree of acute toxicity (LD50) is probably a superior with 1284,72 mg/kg/b.w
-the mice treated with the high amount of tartrazine 2,5% have a hyperalbuminemy, a hypercholesterolemy, a hyperuremy associated with a hypercreatinimy and a rate raised in uric acid, a hyperbilirubinemy as well as a high rate of transaminases.
- In the males, one notes a significant reduction in the number of the spermatozoïdes ($p<0,001$) accompanied by a reduction in the day labourer production by the spermatozoïdes ($p<0,05$).
- the histological study shows an atrophy of the seminiferous tubes, a significant intercellular space, the absence of certain stages of the spermatogenèse as well as a reduction in the number of spermatozoïdes in the light of the seminiferous tubes. These results suggest a toxic action on the structure and the function testiculaire.

In conclusion:

Our results show that the subchronic tartrazine ingestion with amount of 2,5% seems to cause deteriorations of certain serum biochemical parameters, a hepatic deterioration, a renal dysfunction as well as a deterioration of the male fertility in the Swiss mouse. The tartrazine consumption with 1% seems to be a harmful amount without effect.
This shows how much it is significant to better take into account, effects of low dose of poisons in the evaluation of the risk of the food additives in food.

***Key words*:**
Tartrazine, subchronic toxicity, mouse, food dye.

RESUME

La tartrazine est un colorant alimentaire synthétique utilisé dans une multitude de produits alimentaires, de cosmétiques et dans certains médicaments. Utilisée à grande échelle en guise de safran dans les préparations culinaires par la ménagère algérienne, on ignore à l'heure actuelle ses effets nocifs potentiels sur la santé de l'homme.

Ce travail a pour objectifs l'étude des conséquences d'une ingestion subchronique de tartrazine (E-102) ainsi que la détermination de sa dose létale 50 (DL50) et de sa dose sans effet (DSE) chez la souris swiss, utilisée comme modèle expérimental.

Pour l'étude de l'ingestion subchronique du colorant alimentaire, 3 groupes de souris comprenant chacun 10 mâles et 10 femelles âgées de 4 semaines et pesant en moyenne 20g sont utilisés. Les animaux sont nourris à l'aide d'un régime standard et reçoivent pendant 90 jours consécutifs de l'eau de breuvage supplémentée de tartrazine aux concentrations respectives de 0,1%, 1% et 2,5%. Chaque essai est comparé à un traitement contrôle (eau de boisson sans tartrazine) comprenant également 10 mâles et 10 femelles. Quotidiennement, sont déterminés le poids corporel, le volume de prise d'eau, ainsi que les signes cliniques et les modifications comportementales des animaux. Après 90 jours d'expérience, les souris sont sacrifiées, le sang est recueilli pour des dosages biochimiques, les reins, le foie, le cœur, la rate, les poumons, les glandes salivaires, le cerveau, les glandes surrénales chez les animaux des deux sexes, mais aussi les testicules et les vésicules séminales chez les mâles ainsi que l'utérus et les ovaires chez les femelles sont prélevés pour la détermination du poids relatif des organes. Enfin, la fonction testiculaire des souris mâles est évaluée par le comptage des spermatozoïdes et par l'étude histologique.

Pour la DL50, 25 souris femelles âgées de 6 semaines et pesant entre 25 et 27g sont utilisées. Les animaux, repartis en 5 groupes de 5 souris, sont gavés à l'aide d'une sonde gastrique avec respectivement une dose unique de 200, 250, 300, 355 et 357 mg de tartrazine

Les résultats obtenus montrent que :

- La dose sans effets observés est de1836,30 mg/kg/j chez les mâles et de 2317,11 mg/kg/j chez les femelles, ce qui correspond à la dose de 1% de tartrazine.
- Le degré de toxicité aiguë (DL50) est probablement supérieur à 1284 ;72 mg /kg/p.c
- Les souris traitées à la dose élevée de 2,5% de tartrazine présentent une hyperalbuminémie, une hypercholestérolémie, une hyperurémie associée à une hypercréatinimie et un taux élevé en acide urique, une hyperbilirubinemie ainsi qu'un taux élevé des transaminases.
- Chez les mâles, on note une diminution significative du nombre des spermatozoïdes ($p<0,001$) accompagnée d'une diminution dans la production journalière des spermatozoïdes ($p<0,05$).
- L'étude histologique montre une atrophie des tubes séminifères, un espace intercellulaire important, l'absence de certains stades de la spermatogenèse ainsi qu'une diminution du nombre de spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères. Ces résultats suggèrent une action toxique sur la structure et la fonction testiculaire.

En conclusion :

Nos résultats montrent que l'ingestion subchronique de tartrazine à dose de 2,5% semble provoquer des altérations de certains paramètres biochimiques sériques, une altération hépatique, un dysfonctionnement rénal ainsi qu'une altération de la fertilité masculine chez la souris Swiss. la consommation de tartrazine à 1% semble être une dose nuisible sans effet.
Ceci montre combien il est important de mieux prendre en compte, les effets des faibles doses de toxiques dans l'évaluation du risque des additifs alimentaires dans les aliments.

Mots clés **:**
Tartrazine, toxicité subchronique, souris, colorant alimentaire.