

NITRATES ET NITRITES

DANS LES DENREES ALIMENTAIRES

Texte élaboré par le

Dr L.J. Schuddeboom
Ancien fonctionnaire de la Santé Publique
Ministère de la protection sociale de la santé
et de la culture des Pays-Bas

pour le Comité d'Experts pour le contrôle sanitaire des denrées alimentaires

Editions du Conseil de l'Europe 1993

TABLE DES MATIERES

RESUME	5
--------------	---

PREMIÈRE PARTIE

PRESENCE DE NITRATES ET DE NITRITES DANS LES DENREES ALIMENTAIRES

I. INTRODUCTION	9
1. Activités du Conseil de l'Europe	9
2. Rappel historique	9
3. Méthodes analytiques	10
4. Collecte des données	11
II. LES NITRATES ET NITRITES PRESENTS DANS LES DENREES ALIMENTAIRES	11
1. Les nitrates/nitrites provenant de l'environnement	11
2. Emploi des nitrates et des nitrites comme additifs	12
3. Nitrates et nitrites présents dans les denrées alimentaires sans y avoir été ajoutés	13
III. L'EXPOSITION AUX NITRATES ET AUX NITRITES CHEZ L'HOMME	15
1. Introduction	15
2. Exposition aux nitrates	15
3. Exposition aux nitrites	24
IV. ACCUMULATION ET DEGRADATION DES NITRATES DANS LES LEGUMES	28
1. Introduction	28
2. Effet d'accumulation	28
3. Effets du traitement et de la conservation	30
V. FORMATION ENDOGENE DE NITRITE A PARTIR DU NITRATE	31
ANNEXE I Conversion des diverses formes d'expression des teneurs en nitrate et nitrite	35
ANNEXE II Limites réglementaires des nitrates et des nitrites dans les aliments	37
ANNEXE III Teneurs en nitrates des plantes dans quelques pays	39
ANNEXE IV Classification des légumes selon la teneur en nitrate du produit frais	43
ANNEXE V Données récentes relatives à l'absorption de nitrates dans certains Etats membres	45
BIBLIOGRAPHIE DE LA PREMIERE PARTIE	49

RÉSUMÉ

Introduction

Le Conseil de l'Europe étudie depuis 1972 les risques associés à la présence de nitrates dans les denrées alimentaires. En 1989, le Comité d'Experts pour le contrôle sanitaire des denrées alimentaires a été chargé d'élaborer un rapport sur les données existantes en tenant compte des aspects toxicologiques, afin de fournir une base pour des lignes directrices de santé publique relatives aux quantités de nitrates et de nitrites absorbées quotidiennement par l'intermédiaire des denrées alimentaires.

Le présent rapport comprend deux parties. La première est essentiellement consacrée à la présence de nitrates et de nitrites dans les denrées alimentaires et aux divers modes d'exposition de l'homme à ces substances. La seconde passe en revue les informations sur la toxicologie des nitrates et des nitrites.

Sauf indication contraire, les anions de nitrate et de nitrite sont représentés par les symboles chimiques NO_3 et NO_2 respectivement.

I^{ère} PARTIE : PRÉSENCE DE NITRATES ET DE NITRITES DANS LES DENRÉES ALIMENTAIRES

Les nitrates et les nitrites sont classés parmi les conservateurs officiellement acceptés dans la Directive correspondante de la CEE. Un tableau des doses et des usages autorisés dans les divers Etats membres du Conseil de l'Europe est présenté dans l'Annexe II de cette première partie du rapport.

L'exposition aux nitrites par cette voie est très faible.

Les nitrates et les nitrites peuvent également être présents dans certaines denrées alimentaires sans avoir pour autant été utilisés comme additifs. La plupart des denrées alimentaires ne contiennent ces substances qu'à des concentrations négligeables, à l'exception de certains types de légumes et, dans une certaine mesure, des pommes de terre.

Des études sur l'exposition humaine aux nitrates par le biais des denrées alimentaires révèlent que l'absorption quotidienne moyenne (exprimée en NO_3), peut, dans certains pays d'Europe, varier entre 56 et 140 mg, environ, par personne, et atteindre une valeur maximale de 254 mg de nitrate par personne dans des cas accidentels.

L'absorption quotidienne totale de nitrites (exprimée en NO_2) est généralement inférieure à 2 mg par personne. Le Chapitre V insiste cependant sur la formation endogène de nitrites à partir des nitrates ingérés, laquelle est susceptible d'être responsable d'une exposition à une dose de nitrites excédant la DJA.

Les nitrates présents dans l'eau potable entraînent une augmentation considérable de l'exposition humaine. Le présent rapport donne des exemples où l'exposition quotidienne totale due aux denrées alimentaires et à l'eau potable peut atteindre une valeur supérieure à 350 mg de NO_3 par personne.

II^{ème} PARTIE: TOXICOLOGIE DES NITRATES ET DES NITRITES

Cette partie du rapport résume essentiellement les données d'ordre toxicologique publiées avant 1987.

Il ressort de ces données et d'articles plus récents que le regain d'intérêt pour la toxicologie des nitrates et des nitrites est dû à deux raisons:

1. L'exposition humaine aux nitrates et aux nitrites peut atteindre des doses supérieures à ce que l'on pensait initialement;
2. Les DJA actuellement fixées reposent sur des études effectuées avant 1975 et ne répondent pas aux critères toxicologiques actuels.

Le Comité mixte FAO/OMS d'experts sur les additifs alimentaires maintenait les DJA suivantes en 1980 par manque de nouvelles données acceptables:

- Nitrate (nitrate de sodium) : 0 - 5 mg/kg de poids corporel
- Nitrite (nitrite de sodium) : 0 - 0,2 mg/kg de poids corporel (temporaire)

Calculées en NO₃ et NO₂, ces valeurs sont les suivantes:

- NO₃ : 0 - 3,65 mg/kg de poids corporel, soit environ 220 mg par personne (60 kg)
- NO₂ : 0 - 0,13 mg/kg de poids corporel, soit environ 8 mg par personne (60 kg)

Certaines études portant sur l'administration à des animaux par adjonction à leur nourriture fournissent des indications qui pourraient amener à reconsidérer la DJA dans un sens restrictif (voir Chapitre VIII, point 1).

Il faut néanmoins préciser dans ce contexte qu'à part les effets de la nitrosation - qui ne sont pas traités dans ce rapport en raison des nombreuses incertitudes à ce sujet¹ - aucune activité carcinogène n'a été décelée chez la souris ni chez le rat au cours de plusieurs études à long terme sur les nitrites et les nitrates per se (voir Chapitre VIII, point 2).

Des études portant sur la formation endogène de nitrites à partir de nitrates montrent que 5 pour cent de la quantité totale de nitrates ingérés sont convertis en nitrites, phénomène qui peut être responsable d'une exposition supplémentaire substantielle aux nitrites.

Le risque d'absorption de doses plus élevées de nitrates peut par conséquent se traduire par une augmentation considérable de l'exposition à ces nitrites issus d'une synthèse endogène (voir également Ière partie, chapitre V).

Étant donné l'ubiquité notoire et l'ampleur de l'exposition de certaines catégories de la population aux nitrites dans plusieurs États membres du Conseil de l'Europe, il semble justifié de procéder à une réévaluation de la toxicologie des nitrites. Il convient en particulier d'étudier de manière plus approfondie les mécanismes d'action des nitrites dans le corps humain avant de tirer des conclusions concernant leurs effets sur la santé humaine.

L'ingestion de 100 g de légumes crus dont la concentration en NO₃ est de 2500 mg par kg entraîne déjà, à elle seule, une absorption de 250 mg de NO₃, ce qui signifie un dépassement de la DJA actuellement fixée pour le NO₃ de 12% pour la consommation de ce seul produit. Calculée en NO₂ (en supposant que la conversion du nitrate est de 5%), cette valeur correspond à 12,5 mg de NO₂, soit un

¹Une étude approfondie des ouvrages spécialisés sur la nitrosation a paru dans Cancer surveys, vol. 8 numéro 2, 1989; Nitrates, Nitrite and Nitrosocompound in Human Cancer.

dépassement de 56% de la DJA actuellement fixée pour le NO₂.

Au vu de cette situation, il est suggéré au Chapitre VIII de la IIème partie du présent rapport, de procéder comme suit:

- a. Il faudrait encourager des améliorations de l'horticulture susceptibles de conduire à une diminution de la teneur en nitrate de certain types de légumes. A la suite de ces progrès les bonnes pratiques horticoles pourraient être définies en fonction des limites officielles fixées pour la teneur en nitrates de ces légumes.
- b. Les mesures visées au point a) pourraient être complétées par des recommandations au public concernant la consommation régulière de certains types de légumes. Des recommandations dans ce domaines pourraient se justifier notamment pour certains groupes à risque.

Compte tenu des multiples apports nutritionnels possibles des légumes, il faudrait toutefois éviter les recommandations strictes concernant leur consommation lorsque cela n'est pas nécessaire.

- c. Une réévaluation de la toxicologie du nitrite semble justifiée.

Ière PARTIE : PRÉSENCE DE NITRATES ET DE NITRITES DANS LES DENRÉES ALIMENTAIRES

I. INTRODUCTION

Le présent document dresse le bilan des principaux problèmes toxicologiques relevés par les experts du Conseil de l'Europe en liaison avec les nitrates et les nitrites des denrées alimentaires et donne un aperçu des directives de santé publique à envisager dans ce domaine. Sauf indication contraire, les anions des nitrates et des nitrites y sont représentés par les symboles NO_3 et NO_2 .

1. Activités du Conseil de l'Europe

La présence de nitrates et de nitrites dans les denrées alimentaires préoccupe depuis longtemps les autorités sanitaires. Ajoutés aux nitrates de l'eau potable, ils peuvent atteindre chez certains consommateurs des doses élevées.

Les différents risques encourus ont également été étudiés par le Conseil de l'Europe depuis 1972. En 1989, le Comité d'experts pour le contrôle sanitaire des denrées alimentaires a été chargé de préparer un rapport sur la base des données recueillies, en tenant compte des aspects toxicologiques.

2. Rappel historique

Les nitrates et les nitrites sont notoirement utilisés comme additifs alimentaires depuis des siècles, mais à l'instar de nombreux autres procédés de traitement empiriques, leur mode d'action chimique et microbiologique n'a été connu que plus récemment.

En 1957, le Conseil de l'Europe a été le premier à utiliser, pour les additifs alimentaires, la notion de Dose Journalière Acceptable (DJA), notion reprise par la suite par le Comité mixte FAO/OMS sur les additifs alimentaires (JECFA). Ce Comité a, sur cette base, procédé depuis 1961 à l'évaluation toxicologique du nitrate et du nitrite et fixé comme suit les DJA correspondantes:

Nitrate (nitrate de sodium): 0-5 mg/kg du poids corporel (1)

Nitrite (nitrite de sodium): 0-0,2 mg/kg du poids corporel (2)

La DJA de nitrite avait été fixée de manière "temporaire". Calculées en NO_3 et NO_2 , on obtient pour:

NO_3 : 3,65 mg/kg du poids corporel soit environ 220 mg par personne (60 kg).

NO_2 : 0,13 mg/kg du poids corporel soit environ 8 mg par personne (60 kg).

Depuis 1960, diverses sources ont indiqué la formation de N-nitrosamines suite à la réaction du nitrite avec des amines secondaires et tertiaires des aliments pour animaux et des denrées alimentaires (3). Bien que de nombreuses études sur les N-nitrosamines n'aient pas encore révélé leur rôle exact chez l'homme, on estime généralement souhaitable de limiter au minimum le contact avec elles.

Le nitrite a connu un regain d'intérêt lorsque l'on a découvert qu'il pouvait se former dans le corps humain par réduction du nitrate. On a ainsi été amené à reconsidérer l'importance de la consommation de nitrates par l'homme, étant donné que l'évaluation des risques y afférents ne tenait pas compte au départ de la contribution des nitrites.

Ces derniers sont devenus très préoccupants du fait que des denrées très prisées telles que les légumes à feuilles se sont révélées renfermer de très fortes quantités de nitrates.

La figure 1 donne un aperçu des multiples contacts possibles avec ces substances.

NITRATES	NITRITES	N-NITROSAMINES
NO₃	NO₂	R R' N-N = O
exogène	exogène	exogène
consommation de légumes	consommation de viandes fumées	consommation d'aliments
consommation d'eau potable	consommation d'aliments contaminés	utilisation de caoutchouc
consommation de viandes fumées		utilisation de cosmétiques
emploi dans l'industrie des engrais	consommation d'eau potable contaminée	utilisation de médicaments
		tabagisme inhalation de fumées
		ouvriers utilisant des huiles de coupe
endogène	endogène	endogène
formation à partir des nitrites	formation à partir des nitrates ingérés (salive, estomac)	formation à partir des nitrites (estomac)

Fig. 1 : Différents contacts possibles de l'homme avec les nitrates, les nitrites et les N-nitrosamines. R et R' sont des groupes alkyls.

Nous nous contenterons d'étudier les effets de la présence des nitrates et des nitrites dans les denrées alimentaires car ces dernières représentent la source de contact la plus importante pour l'homme. Nous avons aussi inclus certaines données concernant l'eau potable.

Les nitrates, les nitrites et les nitrosamines suscitent un vif intérêt comme en témoigne l'abondante littérature existant à leur sujet (3 - 6). Leur toxicologie semble encore toutefois insuffisamment connue.

3. Méthodes analytiques

Elles ne seront pas présentées ici car elles sont généralement bien connues et dotées, pour la plupart, d'une précision et d'une validité suffisantes. Les analystes peuvent vérifier leurs résultats à l'aide de substances de référence normalisées telles que celles du Bureau Communautaire de Références (BCR) de la CEE.

L'examen des mesures publiées laisse supposer qu'elles correspondent bien aux quantités présentes dans les différents substrats.

Il est recommandé d'exprimer les concentrations de nitrates et de nitrites en ions NO₃ et NO₂ et nous avons respecté cette règle dans toute la mesure du possible.

Nous donnons un tableau de conversion en Annexe I.

4. Collecte des données

Le Comité pour le contrôle sanitaire des denrées alimentaires a, ces dernières années, rassemblé des données sur les nitrates et nitrites présents dans les denrées alimentaires. Elles seront examinées au chapitre II.

Il a également passé en revue la législation des états membres de l'Accord Partiel dans ce domaine (voir Annexe II).

Le chapitre III présente les résultats des études chez l'homme.

II. LES NITRATES ET NITRITES PRESENTS DANS LES DENREES ALIMENTAIRES

1. Les nitrates / nitrites provenant de l'environnement

La quantité de nitrates/nitrites que l'on trouve dans les denrées alimentaires est notamment liée à l'azote et aux composés azotés présents dans l'environnement. L'azote intervenant dans les réactions biologiques est principalement d'origine atmosphérique (N_2). Le nitrate présent dans les eaux peut en partie provenir de l'azote des roches souterraines.

On peut considérer que N_2O et NO ont principalement une origine biologique, comme une partie de l'ammoniaque atmosphérique.

Les nitrates présents dans le sol, dans les eaux superficielles et souterraines résultent de la décomposition naturelle, par des microorganismes, de matière organique azotée telle que les protéines végétales, animales et les excréments animaux. L'ion ammonium formé est oxydé en nitrites et en nitrates. La présence de nitrates et de nitrites dans l'environnement est une conséquence naturelle du cycle de l'azote (voir fig. 2) mais les nitrites n'interviennent normalement qu'à de très faibles concentrations.

Les conséquences écologiques des composés azotés, notamment au niveau de la qualité de l'eau potable, ont été largement étudiées et font l'objet de nombreuses publications tant nationales qu'internationales (3 - 6, 9, 15).

Certains apports relèvent d'activités humaines: engrais, déchets animaux, ordures ménagères, déchets industriels, transports, adjonction délibérée de nitrates et de nitrites aux aliments. Seuls les premiers et les derniers seront étudiés ici.

Fig. 2. Le cycle de l'azote

2. Emploi des nitrates et des nitrites comme additifs

Les nitrates et les nitrites sont largement utilisés dans la production de viandes et dérivés fumés et pour la conservation du poisson dans certains pays. La fabrication du fromage fait aussi parfois appel à l'adjonction de nitrate.

Lors du fumage, le nitrate est partiellement réduit en nitrite par des bactéries. Vers 1900, on s'est aperçu que le nitrite était essentiel pour donner aux viandes fumées cuites leur couleur rosée et leur goût caractéristique de "fumé". Le nitrite y a dès lors remplacé de plus en plus le nitrate.

On a ensuite constaté que le nitrite contribuait grandement à augmenter la durée de conservation de ces produits et à protéger le consommateur contre les risques de détérioration bactérienne due au *Clostridium botulinum*. On a aussi noté une action similaire contre certaine contamination microbienne dans le fromage.

Dans la plupart des pays, l'adjonction de nitrates et/ou de nitrites à la viande, à ses dérivés et au fromage est régie par la loi. Certains pays l'autorisent aussi pour les poissons et leurs dérivés.

Les nitrates et les nitrites figurent parmi les conservateurs officiellement admis dans la Directive CEE correspondante. Les concentrations autorisées dans les différentes denrées alimentaires varient toutefois de pays à pays. Leur adjonction à la viande et au poisson fumés est également autorisée ailleurs, aux Etats-Unis notamment.

Pour le nitrate, les limites de concentration (généralement calculées en nitrate de potassium) varient de 50 mg/kg, pour le fromage, à 600 mg/kg, pour la viande, le poisson et leurs dérivés.

Pour le nitrite, (calculées en nitrite de sodium) elles vont généralement jusqu'à 200 mg/kg pour la viande et ses dérivés. Certains pays fixent la limite légale à 2 ou 5 mg/kg pour le fromage. On trouvera en Annexe II un tableau de synthèse des teneurs en nitrates et nitrites autorisées dans les états membres.

3. Nitrates et nitrites présents dans les denrées alimentaires sans y avoir été ajoutés.

On peut trouver des nitrates et des nitrites dans certaines denrées alimentaires sans qu'ils y aient été utilisés comme additifs. Dans la plupart des cas et à l'exception de certains types de légumes, les concentrations enregistrées sont faibles.

Viandes et dérivés frais

Ils ne doivent normalement pas contenir de nitrates ni de nitrites. Pour le bétail nourri avec des aliments à très forte teneur en nitrate, on peut noter une légère élévation à 11 mg/kg de nitrate. La moyenne pour le nitrite se situe à 1 mg/kg (5).

Lait et dérivés

Les estimations varient entre moins de 1 mg de nitrate/kg, selon une étude américaine (7), et 8 mg/kg selon une étude danoise (8). Aux Pays-Bas, les études de consommation s'appuient sur un chiffre de 0,5 mg de nitrate /kg, utilisé pour le lait (9).

Céréales

Les quantités de nitrates y sont soumises aux mêmes variations que pour les légumes (voir ci-dessous). L'accumulation est toutefois moins importante dans les céréales que dans les tiges et les feuilles (10). Dans l'étude américaine mentionnée ci-dessus (5), on relève une quantité moyenne de 12 mg de nitrate/kg pour les biscuits et les céréales. Le chiffre correspondant pour les Pays-Bas est 10 mg/kg. Pour le nitrite, l'étude américaine mentionne une concentration moyenne de 2,6 mg/kg.

Fruits

Selon les données disponibles, les fruits renferment de faibles quantités de nitrates (7). Il arrive que les fraises en contiennent plus de 100 mg/kg, le raisin atteint 17 mg/kg et pour les oranges, les pommes, les poires, les fraises, les cerises et le raisin, les quantités varient habituellement entre 0 et moins de 10 mg/kg (11).

Une étude française mentionne 34 mg de nitrate/kg pour les poires et 24 mg/kg pour les cerises et les pommes (12).

Les chiffres allemands indiquent un maximum de 108 mg/kg pour les pommes, 11 pour les poires, 31 pour les pêches et 34 pour le raisin (13).

Aux Etats-Unis et aux Pays-Bas, les études de consommation s'appuient sur une moyenne de nitrate de 20 mg/kg. Au Royaume Uni, une étude indique une concentration moyenne de 13,3 mg/kg (6). La quantité de nitrite contenue dans les fruits est généralement considérée comme négligeable.

Boissons alcoolisées

Les teneurs en nitrate y semblent très peu élevées, celles du nitrite, négligeables. Pour la bière, on observe des valeurs situées entre 0 et 54 mg/kg, avec une moyenne de 24 mg/kg (6, 13).

Dans les études de consommation, on utilise parfois une moyenne de 5 mg de nitrate/kg (9).

Pommes de terre

Les coutumes alimentaires de certains pays comme les Pays-Bas font de la pomme de terre un aliment de base et elle doit donc figurer dans une catégorie distincte. Les quantités de nitrate détectées

peuvent atteindre 190 mg/kg (13). Aux Pays-Bas, 60 mg/kg représentent une bonne moyenne. L'étude britannique mentionne 118 mg/kg (6).

Légumes

Ils constituent la principale source alimentaire de nitrates et de nitrites non ajoutés. La documentation existante révèle de très grandes variations dans les teneurs en nitrates de certains légumes que l'on retrouve d'ailleurs en partie dans différents échantillons d'un même légume.

Les quantités accrues de nitrate présentes dans les légumes s'expliquent notamment par l'accumulation de cette substance dans les plantes. Nous consacrerons donc un bref chapitre (IV) aux facteurs qui contribuent à la migration et à la transformation du nitrate dans les plantes.

Dans certains cas extrêmes, les concentrations de nitrates peuvent atteindre, pour des légumes donnés, jusqu'à 10.000 mg/kg (14). La dose journalière de nitrate peut donc varier considérablement suivant les habitudes alimentaires du consommateur.

On trouvera à l'Annexe III la liste des concentrations relevées au cours de programmes de surveillance en République fédérale d'Allemagne (15), aux Pays-Bas (16) et aux Etats-Unis (5) et à l'Annexe IV, une classification des légumes selon leurs teneurs en nitrates. Les concentrations autorisées dans divers états membres sont indiquées à l'Annexe II.

Les études de consommation présentées au chapitre suivant démontrent que l'exposition aux nitrates est avant tout le fait des légumes et de certains d'entre eux, en particulier. Les nitrates contenus dans l'eau potable jouent aussi un rôle, comme nous le verrons dans ce même chapitre III.

III. L'EXPOSITION AUX NITRATES ET AUX NITRITES CHEZ L'HOMME

1. Introduction

Nous nous limiterons ici aux principales sources de contact, à savoir l'eau et les aliments.

Les oxydes d'azote sont surtout présents dans l'air pollué (dans l'air ambiant, à l'intérieur des maisons et sur les lieux de travail) et dans la fumée de tabac. Il existe de nombreuses données à ce sujet (3-6, 9) mais il n'en sera pas tenu compte ici car il ne s'agit que d'une source mineure par rapport à l'exposition due aux aliments et à l'eau potable.

Les programmes de surveillance menés récemment dans divers pays fournissent des données sur le degré d'exposition chez l'homme et permettent ainsi une approche quantitative du problème. La formation endogène de nitrate tend cependant à le compliquer. Pour les nitrites, les calculs sont encore plus difficiles. En effet, environ 5% (6,3 mol%) du nitrate absorbé se transforment en nitrite (17).

Les études de la balance des nitrates chez l'homme n'ont pas totalement clarifié la question.

Dans un premier temps toutefois (paragraphe 2 et 3), nous calculerons les nitrates et les nitrites sans tenir compte de ces phénomènes supplémentaires de formation et de transformation.

L'exposition alimentaire est calculée à l'aide de différentes méthodes. On peut soit doser directement les nitrates et les nitrites dans des rations alimentaires types, soit utiliser les tableaux officiels de consommation moyenne et appliquer les teneurs en nitrate ou nitrite établies dans la littérature pour les divers composants alimentaires (18).

La méthode par dosage direct offre plusieurs avantages. La teneur des aliments est mesurée après leur préparation, ce qui donne une idée plus précise des quantités effectivement absorbées. La consommation d'aliments est par ailleurs mesurée directement, ce qui évite d'avoir à se reporter à des tableaux qui parfois sur- ou sous-estiment la réalité.

L'inconvénient est que la sélection des repas risque de fausser les données puisque les habitudes alimentaires de chacun peuvent varier selon les jours et selon les saisons. Stephany et Schuller (19) ont enregistré des différences d'un facteur 40 et d'un facteur 20 dans les quantités de nitrate et de nitrite absorbées aux Pays-Bas, selon la saison.

Nous présenterons ici les données recueillies dans la littérature en précisant, le cas échéant, les méthodes utilisées.

2. Exposition aux nitrates

Une étude de Corré et Breimer (20) rend compte des données très nombreuses rassemblées sur ce sujet entre 1965 et 1978.

Elle présente la dose moyenne de nitrate (en mg) absorbée par personne et par jour aux Etats-Unis et aux Pays-Bas (voir tableau 1).

Tableau 1	Nitrate absorbé	
Source	Pays-Bas	USA
Légumes	98	86,1
Pommes de terre	15	-
Fruits	-	1,4
Lait et dérivés	1 (fromage)	0,2
Pain	12 (céréales)	2,0
Eau	7	0,7
Viande et poisson	-	9,4
Autres	4	-
Total	137	99,8

Le degré d'exposition de 137 mg, relevé aux Pays-Bas, est comparable aux résultats obtenus par Stephany et Schuller avec la technique des rations alimentaires équivalentes (19):

dose moyenne de nitrate absorbée : 130 mg (été) ;
89 mg (hiver) : variation 9-706 mg.

Les paragraphes suivants sont consacrés aux résultats des études effectuées dans divers pays.

Pour le nitrate, nous examinerons brièvement le cas des Etats-Unis, du Royaume Uni, de l'Allemagne et des Pays-Bas.

Il existe aussi des données concernant la Suède (20a) et la Suisse (20b), ainsi qu'une étude en France effectuée en 1991 (43).

a. Etats-Unis d'Amérique

L'étude de la National Academy of Sciences de 1981 (5) fournit des données plus détaillées sur ce type d'exposition aux Etats-Unis ; elles sont calculées à partir de consommations estimées et de concentrations moyennes (voir tableau 2).

Tableau 2 ALIMENTS	Trois estimations de la dose journalière de nitrate alimentaire absorbé par habitant aux EUA					
	Dose en mg/personne et en pourcentage					
	White 1975,1976 (7) %		Food and Drug Administration 1979 (5)		Hartmann 1981 (23) %	
Viandes fumées	9.4	9.4	0	0.43	2.0	0.6
Légumes	86	86	37	1.2	91.7	
Fruits et jus	1.4	1.4	NR	2.0	1.8	
Pain	2.0	2.0	NR	0.2	2.8	
Lait et dérivés	0.2	0.2	NR	2.0	0.3	
Eau	0.7	0.7	2		2.8	
Total	100		39	70		

1) indique un apport alimentaire négligeable par rapport aux autres catégories énumérées

2) NR = donnée non fournie

Le Tableau 3 présente une estimation de la dose de nitrate absorbée par le consommateur américain moyen, par les gros consommateurs de viandes et de légumes et par les consommateurs d'eau potable riche en nitrate (5) :

Tableau 3	Estimation de la dose journalière de nitrate par habitant, dans la population moyenne et dans trois sous-groupes, 1981.							
SOURCE	Exposition en mg/personne et en pourcentages.							
	Moyenne E.U.		Gros consommateurs de viandes fumées		Végétariens		Eau riche en nitrate	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
Viandes fumées	1.2	1.6	4.8	6	0	0	1.2	0.5
Viandes fraîches	0.6	0.8	0.6	0.8	0	0	0.6	0.2
Légumes	65	87	65	83	260	97	65	28
Fruits et jus	4.3	6	4.3	6	4.3	1.6	4.3	1.8
Biscuits et céréales	1.2	1.6	1.2	1.5	1.2	0.4	1.2	
Lait et dérivés	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1
Eau	2	2.6	2	2	2	0.7	160	68
Total	75		78		268		233	

Les "gros consommateurs de viandes fumées" sont estimés consommer par jour 4 fois plus de viandes de ce type que le consommateur "moyen". On a, de la même façon, supposé que le végétarien consomme 4 fois plus de légumes que le consommateur "moyen".

Pour les consommateurs d'eau riche en nitrate, les données proviennent des habitants de la vallée de la Sangamon, au centre de l'Illinois, où l'on relevait en 1971 des concentrations moyennes de nitrate de l'ordre de 100 mg/litre (24).

b. Royaume-Uni

Les études du Steering Group on Food Surveillance (6) ont conduit à une estimation de la consommation moyenne calculée à partir de la consommation totale (25) (voir tableau 4).

Tableau 4. Estimation de la consommation totale de nitrate alimentaire (mg/personne et par jour) au Royaume-Uni			
Catégories d'aliments	Concentration moyenne mg/kg	Aliments consommés kg/pers/jour	Dose de nitrate mg/pers/jour
Viandes	3.6	0.15	0.5
Poissons	55	0.02	1.1
Légumes à tubercules	118	0.18	21.2
Autres légumes	219	0.11	24.1
Fruits et sucres	13.3	0.17	2.3
Boissons sans alcool	14	0.12	8.25
Huiles et graisses	5.6	0.08	0.5
Céréales	8.8	0.23	2.0
Lait	1.5	0.40	0.6
Total/Aliments			61.0
Estimation pour l'eau potable : consommation de 1 litre par jour, 10 - 19.99 mg/l			10 - 20
Total			71 - 81

Dans cette étude, on a supposé que les doses maximales de nitrate provenant des légumes ne dépasseraient pas 100 mg par personne et par jour (c.à.d. environ deux fois la dose moyenne estimée) et que les doses alimentaires totales n'excéderaient pas 110 à 120 mg par personne et par jour. On estime cependant que les doses peuvent être plus élevées en cas de forte consommation de certains légumes à très haute teneur en nitrates (supérieure à 1.000 mg/kg). Les plus gros "mangeurs" ne devraient pas absorber plus de 122 mg par personne et par jour (c.à.d. deux fois la moyenne estimée) mais selon le Steering Group il se pourrait que pour les végétariens, la dose moyenne atteigne 200 mg par personne et par jour.

Une étude récente (1987) portant sur les habitants de quatre régions du Royaume-Uni et basée sur des calculs intéressant 747 personnes (26) a estimé que l'exposition au nitrate alimentaire était de l'ordre de 95 mg par jour. Il faut y ajouter 13,5 mg dûs à l'eau potable, ce qui donne un total de 108,5 mg par personne et par jour.

c. Allemagne

L'étude pratique de la situation dans ce pays s'appuie sur une série d'analyses effectuées par le Landwirtschaftliche Untersuchungs-und Forschungsanstalt de Speyer (15) pour des légumes et autres aliments prêts à la consommation. Cette étude couvre également des produits provenant de jardins particuliers et les doses hebdomadaires sont mesurées pour six familles.

L'analyse de rations équivalentes donne les résultats suivants (tableau 5):

Tableau 5. Nitrates absorbés en mg par personne et par semaine (Allemagne)										
Catégories d'aliments	sans jardin particulier				avec jardin particulier				changements en %	
	moy	%	max	%	moy	%	max	%	moy.	max.
Produits d'origine animale	23	8	75	14	46	9	146	16	+ 100	+ 95
Produits à base de céréales	11	4	23	4	22	4	47	5	+ 100	+104
Fruits	18	6	81	15	18	4	74	8	0	- 9
Légumes	215	71	419	79	308	63	762	84	+ 43	+ 82
Pommes de terre	33	11	114	21	100	20	188	21	+ 203	+ 65
TOTAL	300		532		494		908		+ 65	+ 71
Périodes ¹ d'échantillonnage										
Automne	396		532		445		663		+ 12	+ 25
Winter	210		333		251		301		+ 60	- 10
Spring	343		452		707		908		+ 106	+ 101
Summer	250		328		572		795		+ 129	+ 142

¹ automne 08.10.1980 à 14.10.1980;
hiver 23.02.1981 à 01.03.1981;
printemps 09.06.1981 à 15.06.1981;
été 26.08.1981 à 01.09.1981.

L'exposition au nitrate contenu dans diverses boissons a été estimée séparément (voir tableau

6)

Boissons	Consommation l/pers/semaine		teneur en nitrate moyenne/mg/l	degré d'exposition mg/pers/semaine	
	moy.	max ¹		moy.	max (1)
Café	2.02	6.73	50	101.0	336.5
Thé	1.22	0.79	50	61.0	39.5
Eau minérale	1.09	3.51	10	10.9	35.1
Jus de Fruits	0.46	0	5	2.3	0
Boissons sans alcool	0.71	1.02	10	7.1	10.2
Lait	0.51	0.31	0.3	0.2	0.9
Cacao	0.21	0	0.3	0.1	0
Bière	0.98	0.8	15	14.7	5.7
Vin	0.30	0	3.1	0.9	0
Alcools	0.02	0	0	0	0
TOTAL	7.52	12.74	-	198.2	427.9

¹ famille dont la consommation de boissons est la plus élevée ; teneur en nitrate de l'eau potable 50 mg/l.

En résumé, on obtient les résultats suivants (tableau 7).

Consommation Totale	Dose de nitrate en mg/pers/semaine									
	sans jardin particulier				avec jardin particulier				changement en %	
	moyenne abs. rel.		maximum abs. rel.		moyenne abs. rel.		maximum abs. rel.		moyenne abs. rel. maxi. abs. rel.	
Aliments solides	300	60	532	61	494	71	907	68	+ 65	+ 70
Boissons	198	40	347	39	198	29	428	32	0	+ 23
Total	498	100	879	100	692	100	1335	100	39	52

Si l'on tient compte aussi du nitrate de l'eau potable, l'exposition alimentaire totale est donc en moyenne de 498 mg ou de 692 mg par personne et par semaine, selon qu'on utilise ou non les jardins particuliers. Les valeurs maximales correspondantes sont 879 et 1335 mg par personne et par semaine. On peut en déduire les degrés d'exposition journaliers suivants:

moyens, sans jardins particuliers	71mg
moyens, avec jardins particuliers	99mg
maximum, sans jardins particuliers	126mg
maximum, avec jardins particuliers	191mg

d. Pays-Bas

Les recherches sur les N-nitrosamines y ont, au début des années 70, suscité un nouvel intérêt pour les risques d'exposition aux nitrites et nitrates contenus dans les aliments et dans l'eau potable. Des études régulières ont alors été entreprises par les Food Inspection Services et le National Institute of Public Health and Environmental Protection, à l'initiative du State Supervisory Public Health Service, dans le cadre du Surveillance Programme Man and Nutrition. Une fois le degré d'exposition établi, ces études devaient servir à orienter la future réglementation en la matière.

Tableau 8		Ingestion de nitrates per capita			
Période d'échantillonnage		moyenne	médiane	variations	référence
1976	été	130	89	18 - 570	19
1978	hiver	89	52	9 - 706	19
1984	automne	54	33	2 - 500	28
1985	printemps	40	21	2 - 370	28

Les études de consommation ont permis de calculer les estimations suivantes : **Tableau 9.**

Catégories d'aliments	Concentr. moy. mg/kg	Consom. d'alim. kg/pers/jour	Dose nitrate mg/pers/jour
aliments à base de céréales	10	0.160	2
pommes de terre	60	0.160	10
légumes	voir Annexe III	0.154	120
fruits	20	0.154	3
noix, café, thé, cacao	-	0.034	-
sucre, huiles, graisses	-	0.155	-
lait et dérivés	1	0.420	-
fromages	8	0.025	-
viandes et dérivés	50 ¹	0.140	7 ¹
oeufs et dérivés	-	0.028	-
poissons et dérivés	3	0.014	-
boissons alcoolisées	5 ¹	0.275	1 ¹
Total			env. 143
eau potable : trois types de stations de pompage	Concentr. moy mg/kg	Consom. moy kg/pers/jour	Total nitrate mg/pers/jour
80 %	< 10	2 20	163
15 %	< 25	2 50	193
5 %	< 50	2 100	243

¹ selon les données publiées (voir 5,15 et 26).

On (27) a procédé à la fois par sélection de rations équivalentes (tableau 8) et par étude de la consommation totale (tableau 9).

Un rapport plus récent (28), publiée en 1988, donne une estimation détaillée des doses de nitrate absorbées par certaines catégories de population à risque: homme de 18 et 35 ans, hommes et femmes de 65 à 79 ans, propriétaires de jardins ouvriers et leurs familles. On prend au départ la consommation de ces groupes et on calcule les doses pour différents paramètres.

Les chiffres concernant la consommation de légumes des propriétaires de jardins ouvriers ont été obtenus séparément (29).

Pour les légumes, comme il est d'usage de retirer les feuilles fanées et pourries des laitues ou des épinards, la tige des choux et la peau des concombres - où se concentrent les nitrates -, on a estimé que l'on pouvait réduire les teneurs en conséquence. Il en va de même lorsqu'on lave, fait blanchir ou fait cuire ces aliments.

On a ainsi calculé les concentrations pour 144 sortes de légumes de saison, en rectifiant les teneurs en nitrate de 25 ou 40 %, selon le cas.

On a pu ainsi en conclure que la DJA était surtout dépassée chez les propriétaires de jardins ouvriers et chez les personnes âgées de 65 à 79 ans.

Si l'on exclut l'apport de l'eau potable, la dose moyenne des propriétaires de jardins ouvriers de 55 ans et plus dépasse déjà 220 mg de nitrate par jour, compte tenu de la correction de 25%.

Si l'on prend les conditions les plus défavorables (eau potable 50 mg/l, correction de 25%; automne), un pourcentage non négligeable des autres catégories de population dépasse aussi la DJA. Si la préparation des aliments abaisse la teneur en nitrate de 40%, ce pourcentage peut toutefois diminuer considérablement.

Nous présentons ci-dessous un aperçu des résultats pour les propriétaires de jardins ouvriers (tableau 10).

Tableau 10		Nitrates provenant des légumes et absorbés par les propriétaires de jardins ouvriers et leurs familles en mg/jour et en percentilles, printemps et été					
		1 - 12	13 - 19	20 - 54	20 - 54	55 - 77	55 - 77
âge		m et f	m et f	m	f	m	f
nombre		76	65	108	106	57	55
dose moyenne	A	90	149	194	181	234	224
	B	81	133	177	159	203	195
variations P50	A	65-80	125-155	165-200	155-190	195-240	190-235
	B	60-75	110-135	150-185	135-165	170-210	165-205
variations P90	A	150-185	205-250	265-325	250-305	330-405	295-360
	B	140-170	180-220	245-300	220-265	285-350	255-310

A = Diminution des nitrates de 25 % due à la préparation B = Diminution de 40 %

L'autre groupe à risque semble être celui des personnes de 65 à 79 ans.

Les doses faibles et élevées ont été calculées pour ce groupe et sont présentées aux tableaux 11 et 12, avec indication du pourcentage des personnes qui dépassent la DJA.

Tableau 11.

Tableau 11. Nitrates provenant des légumes, des pommes de terre, de l'eau, des boissons et des repas préparés avec ces ingrédients et absorbés par les personnes de 65 -79 ans								
en mg par jour et en percentiles								
dose saison	élevée ² automne		faible ² automne		élevée ¹ hiver		faible ² hiver	
	m	f	m	f	m	f	m	f
sexe								
nombre	178	171	178	171	91	98	91	98
dose moyenne	155	149	119	116	126	128	96	99
variations	38-653	29-415	25-479	22-340	31-352	38-468	16-320	23-421
variations P ₁₀	87	79	62	56	67	68	48	47
variations P ₅₀	133	136	99	104	115	109	83	84
variations P ₉₀	260	242	203	197	193	190	151	157
% >= DJA	12	11	8	5	3	6	1	5

¹ diminution des nitrates de 25% due à la préparation ;
teneur en nitrate de l'eau potable : 25 mg/l

² diminution des nitrates de 40% due à la préparation ;
teneur en nitrate de l'eau potable: 10 mg/l

Tableau 12. Nitrates provenant des légumes ¹, des pommes de terre ¹ et de l'eau ², absorbés par des personnes âgées de 18 et 65-79 ans (doses calculées avec les concentrations maximales autorisées, diminuées par la préparation)						
en mg par jour et en percentiles						
âge saison	18	18	65-79	65-79	65-79	65-79
	automne	hiver	automne	automne	hiver	hiver
sexe	m	m	m	f	m	f
nombre	92	93	178	171	91	98
dose moyenne	190	155	237	234	185	192
variations	42-587	51-337	62-805	36-743	47-463	56-731
variations P ₁₀	95	78	123	116	93	101
variations P ₅₀	190	140	212	213	166	172
variations P ₉₀	283	250	386	382	298	303
% > DJA	39	23	46	29	24	24

¹ diminution des nitrates de 25% due à la préparation

² teneur en nitrate de l'eau potable: 50 mg/l

3. Exposition aux nitrites

L'étude de Corré et Breimer (20) rend compte des recherches effectuées dans ce domaine entre 1965 et 1978.

On dispose d'études détaillées sur la consommation de nitrites aux Etats-Unis, au Royaume-Uni, en République fédérale d'Allemagne et aux Pays-Bas. Nous en présentons ici certains résultats.

a. Etats-Unis d'Amérique

Le tableau 13 reprend les données du rapport de la National Academy of Sciences de 1981 (5). Elles sont calculées selon des consommations estimées et pour des concentrations moyennes.

Tableau 13. Quatre estimations de la dose journalière de nitrite alimentaire absorbée par habitant aux E.U.A.							
Dose en mg/personne et en pourcentages							
ALIMENTS	White 1975, 1976 (7)		Food and Drug Administration 1979 (5)	Hartmann 1981 (23)		Birdsall 1981 (30)	
	%			%		%	
viandes fumées	2.4	92	0.22	0.37	68	0.35	61.5
légumes	0.2	7	0.12	0.16	29	0.2	35
fruits et jus	0. ¹	0	NR ²	0	0	0	0
pain	0.02	0	NR	<0.02	3	0.02	3.5
lait et dérivés	0	0	NR	0	0	0	0
eau		0	0	0	0	0	0
TOTAL	2.6		0.34	0.54		0.57	

¹0 indique un apport négligeable par rapport aux autres catégories d'aliments énumérées

²NR = donnée non fournie

Le tableau 14 donne une estimation de la dose de nitrite absorbée par le consommateur américain moyen, par les gros consommateurs de légumes ou de viandes et par les consommateurs d'eau potable riche en nitrate (5).

Il s'agit dans tous les cas de sources exogènes (ingestion) et non pas du nitrite formé *in vivo* à partir du nitrate ingéré. Les chiffres sont grossiers et ne doivent servir qu'à déterminer l'apport relatif des divers aliments.

Les gros consommateurs sont censés consommer chaque jour 4 fois plus de viandes fumées ou de légumes que le consommateur "moyen". Pour l'eau potable, les données proviennent des habitants de la vallée de la Sangamon, au centre de l'Illinois, riche en nitrates.

Tableau 14. Estimations de la dose journalière de nitrite par habitant dans la population moyenne et dans trois sous-groupes (1981)

Exposition en mg/pers et en pourcentages								
	Moyenne E.U.		Gros consommateurs de viandes fumées		Végétariens		Eau riche en nitrates	
ALIMENTS	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
viandes fumées	0.30	39	1.2	71	0	0	0.30	39
viandes fraîches	0.06	7.7	0.06	3.5	0	0	0.06	7.7
légumes	0.12	16	0.12	7	0.48	62	0.12	16
fruits et jus	0.01	1.3	0.01	0.6	0.01	1.3	0.01	1.3
biscuits et céréales	0.26	34	0.26	15	0.26	34	0.26	34
lait et dérivés	0.01	1.3	0.01	0.6	0.01	1.2	0.01	1.3
eau	0.01	1.3	0.01	0.6	0.01	1.2	0.01	1.3
Total	0.77		1.7		0.77		0.77	

b. Royaume-Uni

Les études du Steering Group on Food Surveillance (6) ont permis d'estimer la consommation moyenne calculée à partir de la consommation totale (25) (voir tableau 15).

Tableau 15. Estimations de la dose totale de nitrite alimentaire (mg/pers/jour) au Royaume Uni

Catégories d'aliments	concentration moyenne mg/kg		aliments consommés kg/pers/jour	dose de nitrite mg/pers/jour	
	(i)	(ii)		(i)	(ii)
viandes	0.43	0.13	0.15	0.07	0.02
poissons	0.40	0.05	0.02	0.008	0.001
légumes à tubercules	1.25	1.10	0.18	0.23	0.20
autres légumes	0.45	0.15	0.11	0.05	0.02
fruits et sirops	0.40	0	0.17	0.07	0
boissons sans alcool	0.40	0	0.12	0.24	0
huiles et graisses	0.40	0.05	0.08	0.03	0.004
céréales	0.45	0.30	0.23	0.10	0.07
lait	0.20	0.03	0.40	0.08	0.01
TOTAL / aliments				0.87	0.32

(i) à supposer que les résultats prétendus inférieurs à la limite de détection sont égaux à cette valeur (0,4 ou 0,2 mg/kg).

(ii) à supposer que les résultats prétendus inférieurs à la limite de détection sont nuls.

A la différence des résultats observés pour le nitrate, plusieurs des échantillons individuels ne font pas apparaître de nitrite. Seules 4 catégories d'aliments (céréales, viandes, légumes à tubercules et autres légumes) contiennent des taux de nitrite supérieurs à la limite de détection. Les deux méthodes de calcul appliquées sont précisées au tableau 15.

La dose totale de nitrite alimentaire est donc estimée en moyenne à 0,3-0,9 mg par personne et par jour. Les légumes à tubercules représentent un apport majeur.

Une étude récente portant sur les habitants de quatre régions du Royaume-Uni et basée sur des calculs intéressant 747 personnes (26) a estimé que le degré d'exposition au nitrite était de l'ordre de 1356 microgrammes par jour.

c. Allemagne

Comme dans le cas du nitrate (voir para. 2 du présent chapitre), on a, pour le nitrite, procédé à l'analyse d'échantillons équivalents de cinq groupes d'aliments prêts à la consommation (15).

On a aussi examiné les différences pouvant exister entre les produits provenant de jardins ouvriers et les autres. Le tableau 16 présente les résultats.

Tableau 16. Dose de nitrite en mg par personne et par semaine en Allemagne								
Groupes d'aliments	sans jardins ouvriers				avec jardins ouvriers			
	moyenne		maximum		moyenne		maximum	
	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%
produits d'origine animale	6	35	9	28	6	38	11	39
produits à base de céréales	5	29	19	59	4	25	6	21
fruits	1	6	3	9	1	13	6	21
légumes	2	12	7	22	3	19	9	32
pommes de terre	3	18	6	19	2	19	3	11
Total	17		32		16		28	
Périodes d'échantillonnage ¹								
automne	25	-	32	-	22	-	28	-
hiver	14	-	20	-	15	-	16	-
printemps	14	-	16	-	10	-	11	-
été	15	-	18	-	18	-	21	-

¹ automne 08.10.1980 à 14.10.1980;
 hiver 23.02.1981 à 01.03.1981;
 printemps 09.06.1981 à 15.06.1981;
 été 26.08.1981 à 01.09.1981.

A la différence du nitrate, aucune corrélation avec l'utilisation de jardins ouvriers n'a pu être établie pour le nitrite.

La dose moyenne de nitrite absorbée par personne et par semaine était dans un cas 17 mg, dans l'autre, 16 mg (2,4 et 2,3 mg par personne et par jour).

Les maxima se situaient à 32 et 28 mg de nitrite par personne et par semaine (par jour, 4, 6 et 4 mg), c'est à dire environ le double. Ces degrés d'exposition peuvent être considérés comme relativement mineurs.

d. Pays-Bas

Pour le nitrite, les chiffres sont essentiellement empruntés aux études de rations équivalentes effectuées par le National Institute of Public Health (28). Le tableau 17 récapitule les résultats pour les années 1976, 1978, 1984 et 1985.

Tableau 17. Ingestion de nitrite Per Capita aux Pays-Bas					
période d'échantillonnage		moyenne	mediane	variations	référence
1976	été	4.3	3.5	1.1 - 33	19
1978	hiver	0.4	0.3	< 0.1 - 2.1	19
1984	automne	< 0.1	< 0.1	< 0.1 - 0.7	28
1985	printemps	< 0.1	< 0.1	< 0.1 - 0.7	28

L'ingestion de nitrite est essentiellement liée à la consommation de viandes fumées et de légumes mal conservés, le nitrate pouvant alors se transformer en nitrite.

Dans 140 échantillons de viandes et dérivés, on a trouvé jusqu'à 140 mg de nitrite par kg, avec une valeur médiane de 7 mg par kg. Ceci pourrait entraîner, selon les habitudes alimentaires, une légère augmentation de la quantité de nitrites absorbés.

IV. ACCUMULATION ET DEGRADATION DES NITRATES DANS LES LEGUMES

1. Introduction

Les nitrates alimentaires absorbés quotidiennement proviennent essentiellement des légumes et une part importante de la population risque donc de dépasser la DJA correspondante. Cette observation justifie déjà que l'on cherche à réduire au minimum la teneur en nitrate des légumes et produits dérivés.

Il existe à ce sujet divers documents de référence: les Environmental Health Criteria de l'OMS publiés en 1978 (3), l'étude de Corré et Breimer (20) et la monographie CCRX sur l'azote et les produits azotés, publiée aux Pays-Bas en 1988 (16).

2. Effet d'accumulation

Pour synthétiser les protéines, les plantes absorbent de l'azote inorganique sous forme de nitrate ou d'ammoniaque, selon le schéma illustré à la fig. 3:

Fig. 3. Modes d'absorption, de transport et de réduction du nitrate dans une plante vivante (16).

Mais dans les légumes, les bactéries de la racine utilisent l'azote atmosphérique pour produire les nitrates. S'il existe un autre apport de nitrate, la plante peut l'absorber et même le stocker, faute de synthèse suffisante.

L'azote organique du sol est minéralisé par des processus biologiques au cours desquels se forment ammoniacque, nitrite et nitrate. L'azote est apporté au sol sous forme organique, résidus des cultures et fumiers, et sous forme synthétique, engrais (ammoniacque, nitrate et urée). L'eau de pluie et les microorganismes libres qui fixent l'azote enrichissent aussi le sol en azote.

Comme le montre la fig. 3, pour certaines espèces, la réduction du nitrate s'opère dans la racine mais dans les espèces végétales courantes, elle s'effectue principalement dans les feuilles. Les

plantes fortement alimentées en azote accumulent de grandes quantités de nitrates dans leurs feuilles.

Les très grandes variations observées dans la teneur en nitrate de certains légumes sont dues à une multiplicité de facteurs, notamment (5,16):

- a. des souches végétales apparentées n'ont absolument pas la même capacité d'accumulation du nitrate.
- b. les engrais azotés affectent différemment la teneur en nitrate, selon les doses, le mécanisme de fixation et l'époque. Ceci vaut aussi bien pour les engrais synthétiques que pour les engrais organiques.
- c. les quantités de nitrate augmentent lorsque les températures diurnes baissent en deçà d'une température optimale.
- d. l'intensité lumineuse et la durée d'exposition à la lumière exercent une influence évidente, comme le démontrent de nombreuses expériences.
- e. les plantes de serre accumulent généralement plus de nitrates que les plantes d'extérieur, probablement pour les raisons mentionnées sous 2 et 4.
- f. influence de l'eau: étant donné que le manque d'eau affecte davantage la réduction que l'absorption du nitrate, la sécheresse augmente généralement l'accumulation des nitrates.
- g. l'augmentation des concentrations de CO₂ dans l'air diminue l'accumulation des nitrates, ce qui est intéressant pour les cultures de serre.
- h. l'emploi de certains herbicides peut entraîner l'augmentation des teneurs en nitrate.
- i. le type de sol et la région où sont cultivés les légumes peuvent aussi influencer sur les teneurs en nitrate.

Il y a beaucoup de points d'interrogation mais il a toutefois été possible de sélectionner certains plants qui, génétiquement, accumulent moins de nitrate (31) :

Tableau 18. Variation génétique dans l'accumulation des nitrates par des plants de laitue		
Plants	Origine	mg nitrate / kg de produit frais
Roland	Allemagne	4500
Gruntowa	Pologne	4460
Grosse brune	France	2900
L. sativa	Espagne	2640
Romaine	France	2590

Les programmes de recherche actuellement en cours dans plusieurs pays devraient permettre d'améliorer les méthodes de production et les cultures aquatiques semblent, à cet égard, très prometteuses.

3. Effets du traitement et de la conservation

Certains traitements peuvent entraîner une diminution de la teneur en nitrate des légumes destinés à la consommation (20):

- a. la cueillette, première forme de traitement
- b. les traitements domestiques
- c. le blanchiment
- d. les traitements industriels
- e. la conservation des légumes frais
- f. la conservation des légumes traités

Chaque technique fait l'objet d'une abondante littérature. En général, la teneur en nitrate des légumes traités (conserves ou surgelés) et des légumes frais, cuits, est moins élevée, parce que le nitrate stocké dans les vacuoles passe dans le liquide d'ébullition et peut être réduit d'au moins 50% (5). Le degré de réduction dépend de la quantité d'eau utilisée.

Parmi les traitements industriels, c'est le blanchiment qui produit le plus d'effets: il abaisse généralement la teneur en nitrate. Il peut l'abaisser de 30% pour les épinards mais éliminer, du même coup, plus de 90 % des vitamines (ascorbate) (32).

D'autres traitements industriels peuvent encore accentuer ce phénomène. C'est le cas, semble-t-il, de la congélation. Lors du stockage, la teneur en nitrite des légumes est réputée augmenter, surtout lorsque la température croît, le nitrate étant réduit en nitrite par la réductase présente dans les tissus végétaux et dans les bactéries de contamination. Les problèmes posés par le nitrate ne sont pas pour autant résolus car une teneur plus élevée en nitrite ne vaut certainement pas mieux qu'une teneur élevée en nitrate. Il convient donc de fournir des instructions de conservation pour les légumes frais comme pour les légumes traités.

V. FORMATION ENDOGENE DE NITRITE A PARTIR DU NITRATE

Depuis dix ans, la présence de nitrates dans les aliments suscite un regain d'intérêt: des études ont en effet révélé que le passage de nitrates dans le corps humain pouvait s'accompagner de la formation endogène de nitrite dans la salive et devait être considéré comme un phénomène courant.

Il ne suffit pas de rapprocher l'actuelle DJA pour les nitrates (220 mg pour un individu de 60 kg) de la valeur correspondante pour les nitrites (8 mg), il faut aussi tenir compte d'autres effets résultant de la présence de nitrites dans le tube digestif, notamment la formation de N-nitrosamines qui sont souvent des cancérigènes puissants.

La présence de nitrite dans la salive est connue depuis 1907, grâce à des chercheurs français (33). Elle devait être connue antérieurement puisqu'ils se référaient aux recherches de Schœnbein en 1862. En 1975, différents auteurs publiaient presque en même temps des données plus détaillées sur les corrélations existant entre l'ingestion de nitrates (due surtout aux légumes) et les quantités de nitrites contenues dans la salive (17, 19, 34-37).

On estime généralement que 25% du nitrate ingéré passent dans la salive, après avoir été absorbés dans le sang au niveau de l'estomac ou de la partie supérieure de l'intestin grêle (38). Une partie de ce nitrate salivaire est alors réduite par la microflore de la bouche et pénètre ensuite dans l'estomac sous forme de nitrite. Elle est estimée à 20%, ce qui veut dire que 5% de tout le nitrate ingéré seraient transformés en nitrite (17, 19).

La figure 4 illustre les variations de la teneur salivaire en nitrite en fonction du temps, après des repas riches en légumes (pourpier notamment).

En 2 heures, la quantité de nitrite salivaire (exprimée en nitrite de sodium) augmente de 5mg/kg au départ, juste avant l'ingestion de pourpier, à environ 200 mg/kg. Au bout de 7-17 heures, le maximum de près de 300 mg/kg est atteint. Environ 20 heures après l'ingestion de 330 g de pourpier bouilli, la teneur salivaire revient à son point de départ (19).

Fig. 4.

Cette étude a également porté sur les variations de la teneur salivaire en nitrate. On administre environ 400 ml de jus de laitue au moyen d'une sonde gastrique. On observe ensuite les variations de la teneur salivaire en nitrate et en nitrite (exprimée en sels de potassium et de sodium) en fonction du temps (figure 5).

Fig. 5. Variations de la teneur salivaire en nitrate et en nitrite, en fonction du temps, après l'administration à un volontaire de 393 ml de jus de laitue au moyen d'une sonde gastrique

Les quantités de nitrate et de nitrite augmentent toutes deux fortement et atteignent un maximum de 233 mg de nitrate de potassium et 184 mg de nitrite de sodium par kg de salive, après 2,5 heures (19).

Ces expériences et les calculs présentés au Chapitre III démontrent bien que les légumes représentent la principale source de nitrite gastrique dans la plupart des pays occidentaux.

Le facteur de transformation de 5% n'est qu'une approximation. Les expériences mentionnées dans la littérature ou effectuées aux Pays-Bas font apparaître que la transformation de nitrate en nitrite peut varier considérablement d'un individu à l'autre et chez un même individu, selon les époques. Elle peut osciller entre environ 1,5 et > 30% (39).

Avec des taux de transformation plus élevés, les légumes - comme l'eau potable - représentent des sources de nitrite encore plus critiques. La reproductibilité de la transformation du nitrate salivaire et les grandes variations entre individus font encore l'objet de nombreuses recherches (40,41).

Cette transformation ne semble pas affecter de façon significative l'état dentaire et périodentaire. Les personnes présentant un grand nombre de CFU salivaires (unités formant colonie bactérienne) semblent mieux en mesure de désactiver le nitrate et le nitrite que celles qui en présentent moins.

Les premières évaluations toxicologiques du nitrite ne correspondent pas aux exigences actuelles.

Vu l'intérêt général que revêtent les nitrites, notamment l'exposition de certains groupes de population dans plusieurs pays membres du Conseil de l'Europe, il serait justifié d'entreprendre une

nouvelle évaluation toxicologique de cette substance.

Cette question sera abordée dans la Partie II du présent rapport.

PARTIE I
Annexe I

Conversion des diverses formes d'expression des teneurs en nitrate et nitrite *							
Substance Azotée	Formule chimique	Poids atomique ou moléculaire	Multiplicateurs pour convertir la substance azotée de la colonne 1 en				
			NO ₃ -N	NO ₃	NH ₄ NO ₃	NaNO ₃	KNO ₃ **
nitrate-azote	NO ₃ -N	14	1	4.43	5.70	6.07	7.21
nitrate	NO ₃	62	0.23	1	1.29	1.37	1.63
nitrate	NH ₄ NO ₃	80	0.18	0.78	1	1.06	1.26
nitrate de sodium	NaNO ₃	85	0.16	0.73	0.94	1	1.19
nitrate de potassium	KNO ₃	101	0.14	0.61	0.79	0.84	1
			Multiplicateurs pour convertir la substance azotée de la colonne 1 en				
			NO ₂ -N	NO ₂	NaNO ₂	KNO ₂	
nitrite-azote	NO ₂ -N	14	1	3.29	4.93	6.07	
nitrite	NO ₂	46	0.30	1	1.5	1.85	
nitrite de sodium	NaNO ₂	69	0.20	0.67	1	1.23	
nitrite de potassium	KNO ₂	85	0.16	0.54	0.81	1	
* Avec adjonctions, de Corré et Breimer (1979).							
** Expression des teneurs en nitrate et en nitrite: le nitrate peut être utilisé sous forme de différents composés, dans les expériences et comme additif alimentaire. Il peut s'agir de nitrate de sodium, de nitrate de potassium ou de nitrate d'ammonium. Le nitrite peut être employé sous forme de nitrite de sodium ou de potassium. Les teneurs en composés du nitrate peuvent s'exprimer en NO ₃ -N, NO ₃ ou NH ₄ ⁻ , Na ⁻ ou KNO ₃ . les composés du nitrite peuvent s'exprimer en NO ₂ -N, NO ₂ ou Na ⁻ ou KNO ₂ . Cela peut donner lieu à confusion en raison des différences de poids moléculaire. C'est pourquoi les facteurs de conversion d'un composé à l'autre ont été indiqués.							

DENREES ALIMENTAIRES	PAYS							
	B	CH	D	DK	F	I	NL	UK
Nitrate	4000						3500 ³	
Jus de betterave Nitrate		2500						
Endives Nitrate	3000						2500	
Endives d'hiver Nitrate	3500						3500	
Chou Nitrate		875						
Céleri Nitrate	5000							
Céleri blanchi Nitrate	4000							
EAU POTABLE Nitrate Nitrite		40 0.1		50 0.1			50 0.1	
FROMAGES Nitrate Nitrite	30.7	875		92			30.7 1.3	50 5
VIANDE FUMEE en emballage stérile Nitrate Nitrite							307 13	150 50
En emballage non-stérile Nitrate Nitrite							307 13	500 200
Bacon et Jambon crus, ou non- emballés dans récipient hermétique Nitrate Nitrite							307 13	250 150
Toute autre viande fumée Nitrate Nitrite								
VIANDE EN CONSERVE Nitrate Nitrite							250 150	

Notes

B Limites proposées ¹ basé sur le produit sec

CH Tolérance

D Teneurs indicatives ² du 1er avril au 1er juillet

DK Limite statutaire, quantité ajoutée ³ du 1er juillet au 1er avril

F Limites conseillées

I

NL Tolérance
UK

PARTIE I
Annexe III

1. Teneurs en nitrate des plantes étudiées en Allemagne, 1982 (15)				
mg de nitrates par kg				
Plantes	Nombre d'échantillons	Moyenne	Minimum	Maximum
Légumes à feuilles				
Chou vert	52	1060	10	3640
Chou blanc	58	1070	10	3230
Epinards	85	840	20	2720
Chou chinois	35	1120	20	2610
Endives	31	1060	70	2590
Mâche	27	1170	180	2980
Laitue	162	1560	230	3290
Légumes à tubercules				
Céleri	35	980	70	3640
Radis	106	1530	80	3383
Betterave	115	1950	180	5360
Radis noir	54	1680	300	3770
Carottes	39	500	90	110
Chou-rave	109	1330	360	2950

2. Teneurs en nitrates des plantes étudiées aux Pays Bas de 1972 à 1987 (16)				
Etudes				
Plantes	Nombre	Période	Nb d'échantillons	médianes sup. et inf. mg/kg
Navets	1	1986-1987	11	4850-8600
	1	1987	14	2000-10700
Pourpier	10	1972-1984	82	4500-7200
	1	1986-1987	2	1500-4480
Epinards	32	1972-1984	866	900-5400
	1	1981	15	1850-3440
	1	1986	2	800-1500
	1	1986-1987	13	4100-5400
	1	1987	18	1800-4800
Laitue	37	1972-1984	1607	750-5500
	1	1981	60	420-3590
	1	1986-1987	15	1650-4650
Mâche	2	1972-1984	16	3000-3600
	1	1986-1987	16	2300-4450
Chou chinois	1	1972-1984	15	3100
		1986-1987	13	550-2100
Laitue "Iceberg"	1	1986-1987	10	1250-4900
Endives	35	1972-1984	879	730-4000
	1	1981	30	60-2600
	1	1986-1987	30	60-2600
Betteraves	4	1972-1984	55	1400-3000
	1	1985	4	1300-4630
	1	1986-1987	4	1300-4630
Chou "Coeur de boeuf"	4	1972-1984	36	590-2600
Poireaux	10	1972-1984	130	270-2200
	1	1986	12	30-140
Carottes	4	1972-1984	80	60-900
Haricots verts	3	1972-1984	26	300-530
Concombre	3	1972-1984	30	60-400
Chou blanc	2	1972-1984	38	100-270
	1	1986	12	10-110
Melon	1	1972-1984	6	150
Pommes de terre	3	1972-1984	155	46-130
	1	1985	12	90-300
	1	1986	9	90-300
Tomates	3	1972-1984	18	6-160
Choux de Bruxelles	3	1972-1984	74	9-40

Etudes effectuées par les Food Inspection Services, le National Institute of Public Health and Environmental Hygiene, le RIKILT et le TNO-Zeist.

3. Teneurs en nitrate des plantes étudiées aux Etats Unis d'Amérique, 1972 (5)			
Plantes ¹	Concentration mg/kg	Plantes	Concentration mg/kg
Artichauds	12 ²	Poireaux	510
Asperges	44	Laitue	1700
Haricots verts	340	Melon	360
Haricots de Lima	54	Champignons	160
Haricots secs	13	Okra (gombo)	38 ²
Betteraves	2400	Oignons	170
Brocolis	740	Persil	1010
Choux de Bruxelles	120	Pois	28
Chou	520	Poivrons	120
Carottes	200	Pommes de terre (blanches)	110
Choux-Fleurs	480	Potiron et courge	400
Céleri	2300	Radis	1900
Maïs	45	Rhubarbe	2100
Concombre	110	Epinards	1800
Aubergine	270	Tomates	58
Endives	1300	Navets	390
Chou frisé	800	Fanes de navets	6600

¹Données se rapportant essentiellement aux légumes frais et représentant une moyenne des données de White (7) Corré et Breimer(20).

²Données empruntées à Siciliano et al, 1975 (42)

PARTIE I
Annexe IV

CLASSIFICATION DES LEGUMES SELON LA TENEUR EN NITRATE DU PRODUIT FRAIS
<p>1. Espèces contenant en moyenne moins de 200 mg/kg</p> <p>Asperges Chicorée Favelote Petits pois Champignons Pommes de terre Poivrons Patates douces Tomates</p>
<p>2. Espèces contenant en moyenne moins de 500 mg/kg</p> <p>Brocolis Choux-fleurs Concombre Aubergines Cornichons Melon Oignons Scorsonère Navet</p>
<p>3. Espèces contenant en moyennes moins de 1000 mg/kg</p> <p>Chou (blanc, rouge, de Savoie) Carottes Chou frisé Haricots verts Persil (racine) Potiron</p>
<p>4. Espèces contenant en moyenne moins de 2500 mg/kg</p> <p>Chou ("Coeur de Boeuf", Oxheart) Céleri-rave Endives Cresson cultivé Poireaux Persil (feuilles) Rhubarbe Chou-rave</p>
<p>5. Espèces contenant souvent plus de 2500 mg/kg</p> <p>Betterave Céleri Cerfeuil Mâche Laitue Pourpier Radis et radis noir Epinards Fanes de navet</p>

PARTIE I
ANNEXE V

DONNÉES RÉCENTES RELATIVES A L'ABSORPTION DE NITRATES DANS CERTAINS ÉTATS MEMBRES

La première partie d'un rapport sur les nitrites et les nitrates dans les denrées alimentaires, (document CD-P-SP/T (89) 59), qui présentait notamment des données sur la présence de ces substances dans les denrées alimentaires, a été présenté lors de la 13ème session du Comité d'Experts pour le contrôle sanitaire des denrées alimentaires en janvier 1990. Ce document donnait également des informations sur l'exposition humaine aux nitrates et aux nitrites.

Le Comité a décidé, au cours de sa session de 1991 de recueillir des données récentes sur l'absorption de nitrates dans les États membres. A cet effet, une fiche en vue de la présentation uniforme des informations a été jointe en annexe D au rapport de sa 14ème session.

Des données ont été communiquées par l'Allemagne (D), le Danemark (DK), les Pays-Bas (NL) et le Royaume-Uni (UK). Les résultats sont récapitulés dans l'annexe à la présente annexe.

La classification suggérée pour l'ingestion des nitrates a été adaptée en fonction des chiffres disponibles dans les divers États membres. Des annotations donnant des précisions relatives à ces chiffres figurent dans les notes.

Les chiffres concernant l'absorption de nitrates par le biais de l'eau potable de même que les estimations de l'ingestion globale de nitrates ne sont pas vraiment comparables essentiellement en raison des différences d'approche sur le premier point.

Il a en outre le plus souvent été tenu compte de moyennes et fait abstraction des variations de consommation - entre les consommateurs peu exposés et ceux qui le sont fortement - ce qui confère également un caractère arbitraire aux comparaisons. L'analyse des variations d'absorption pourrait mettre en lumière des risques pour certains groupes de consommateurs, dont des exemples sont présentés dans le chapitre III, point 2 de la première partie de ce rapport.

Il ressort cependant clairement du tableau présenté en annexe que les nitrates alimentaires absorbés proviennent essentiellement des légumes (L), et, à un degré moindre, des pommes de terres (P):

Pourcentage par rapport à la quantité totale de nitrates alimentaires absorbés

	L	P	L + P
D	56,4	11,3	67,7
DK	69,7	18,5	88,2
NL	85,7	6,6	92,3
UK	39,3	33,9	73,2

Les efforts visant à diminuer la consommation de nitrates alimentaires devraient par conséquent être concentrés sur les légumes et sur les pommes de terre.

Il ne faut néanmoins pas négliger le cas de l'eau potable dans cette optique.

ANNEXE A L'ANNEXE V

INGESTION DE NITRATES DANS QUELQUES ÉTATS MEMBRES PARTIES A L'ACCORD PARTIEL

Groupe d'aliments	Concentration moyenne mg/kg	Consommation d'aliments kg/pers/jour	Nitrate absorbé mg/pers/jour	En % de l'absorption totale de nitrates alimentaires
<u>Produits céréaliers</u>				
D				
DK 1)	20.3	0.2616	5.3	5.7
NL	env 10	0.277	2.3	3.2
UK 2)	10	0.180	1.8	1.3
	16	0.24	3.8	6.8
<u>Pommes de terre</u>				
D				
DK	93.3	0.1120	10.5	11.3
NL	80	0.166	13.3	18.5
UK	60	0.131	7.9	6.6
	120	0.16	19	33.9
<u>Légumes</u>				
D	720.6	0.0730	52.6	56.4
DK 3)	440	0.114	50.2 120	69.7
NL	800	0.150	11	85.7
UK 5)	a 210	0.050	9.8	
	b 140	0.070	1.2	39.3
	c 29	0.042		
<u>Fruits</u>				
D	70.1	0.1010	7.1	7.6
DK	30	0.120	3.6	5.0
NL	20	0.125	2.5	1.8
UK 6)	25	0.091	2.3	4.1
<u>Fromages 7)</u>				
D	16.9	0.0130	0.2	0.2
DK 8)	0 - 30.	0.050	0 - 1.5	2.1
NL	8	0.029	0.2	0.1
UK	1.2	0.12	0.14	0.25
<u>Lait et produits laitiers 9)</u>				
D	5.2	0.2221	1.2	1.3
DK 8)	0,5 - 2.5	0.426	0,2 - 1.1	1.5

Groupe d'aliments	Concentration moyenne mg/kg	Consommation d'aliments kg/pers/jour	Nitrate absorbé mg/pers/jour	En % de l'absorption totale de nitrates alimentaires
NL	1	0.370	0.4	0.3
UK	1.4	0.34	0.48	0.9
<u>Viandes et produits carnés</u>				
D	59.8	0.1751	10.5	11.3
DK 10)	-	-	-	-
NL	50	0.116	5.8	4.1
UK 11) a	8.2	0.059	0.48	0.9
b	68	0.048	3.3	5.9
<u>Boissons Alcoolisées</u>				
D	14.2	0.4213	5.9	6.3
DK	-	-	-	-
NL	5	0.173	0.9	0.6
UK 12)	16	0.26	4.2	7.5
<u>TOTAL ALIMENTS</u>				
D			93.3	
DK			69,4 - 72.0	
NL			140	
UK			56	
<u>EAU POTABLE</u>				
D	25.	0.5943	14.9	
DK	0 - 50.	2.0	0 - 100.	
NL	< 10 - 50.	2.0	< 20 - 100.	
UK	10 - 20.	1.0	10 - 20.	
<u>TOTAL ALIMENTS ET EAU POTABLE</u>				
D			108.2	
DK			69,4 - 172.	
NL			160 - 240.	
UK			66 - 76.	

1) sauf l'orge

2) classé dans la catégorie pain et céréales

3) la teneur la plus élevée en nitrate a été décelée dans la betterave, la laitue, les épinards et la rhubarbe

- 4) moyennes pour les personnes cultivant un jardin particulier et leurs familles: 177 - 234 mg/personne/jour ; voir tableau 10, chapitre III.
- 5) a = légumes verts
b = autres légumes
c = légumes en conserve
- 6) fruits frais et dérivés
- 7) au Royaume-Uni, classé dans la catégorie huiles, graisses, oeufs et produits laitiers
- 8) selon le produit
- 9) au Royaume-Uni, classé dans la catégorie lait
- 10) l'addition de nitrate n'est autorisée que pour un petit nombre de produits carnés destinés à l'exportation, l'absorption de nitrate par le biais de ces produits est donc négligeable au Danemark
- 11) a = carcasses, abats et volailles,
b = produits carnés
- 12) bière
- 13) d'après les données concernant l'ensemble de la population
- 14) 197 - 254 mg/personne/jour : voir note 4)
- 15) données fournies par le Ministère de l'Environnement pour 1985
- 16) consommation moyenne en litres/jour
- 17) voir la note 14; en fonction de la concentration dans l'eau potable : 217 - 354 mg/personne/jour.

Bibliographie de la Ière Partie

1. JECFA 18th report 1974, WHO Techn. Rep. Ser. 557 and JECFA 1973, WHO Food Add. Ser. 5, p. 92-109.
JECFA Report 1979, WHO Techn. Rep. Ser. 648, p.10.
2. JECFA 20th Report 1976, WHO Techn. Rep. Ser. 599 and JECFA 1976, WHO Food Add. Ser. 10, p. 86-99.
3. WHO Task group on environmental health criteria for nitrates, nitrites and N-nitroso compounds, Environmental Health Criteria 5, WHO, Geneva, 1978.
4. Health hazards from nitrates in drinking water, World Health Organisation Copenhagen, 1985.
5. The health effects of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. Part 1 of a 2 - part study by the Committee on Nitrite and Alternative Curing Agents in Foods. National Academy of Sciences, National Academy Press, Washington, 1981.
6. Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds in food. The working party on nitrate and nitrite compounds in food; Steering group on food surveillance. Food Surveillance Paper nr. 20, Min. of Agriculture, Fisheries and Food, London, 1987.
7. White J.W., Jr. Relative significance of dietary sources of nitrate and nitrite. J. Agric. Food Chem. 23 (1975) 886-891. Correction: J. Agric. Food Chem. 24 (1976) 202.
8. Nitrat og nitrit i Kodvarer. Report from the Statens Levnedsmiddelinstitut, Søborg, Denmark, 1981.
9. Integrated Criteria Document Nitrate, National Institute of Public Health and Environmental Hygiene, Bilthoven, The Netherlands, 1989.
10. Wu K.-Y. and C.E. MacDonald. Effect of nitrogen fertilizer on nitrogen fractions of wheat and flour. Cereal Chem. 53 (1976) 242-249.
11. Herrmann K. Ueber den Nitrat - und Nitritgehalt des Gemueses, Obstes und Wassers und deren Bedeutung fuer die Ernaehrung. Ernaehrung Umsch. 11 (1972) 398-402.
12. Huguet C., Bonafous M., and G. Ducailar. Etude sur la présence des nitrates dans les fruits à noyau. Ann. Nutr. Aliment. 30 (1976) 673-682.
13. Het Contaminantenboekje 1987, Netherlands surveillance data a.o. from Food Inspection Services.

14. Hansen H. The content of nitrate and protein in lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata* (Butterhead salad)) grown under different conditions. *Qualitas Plantarum* 28 (1978) 11-17.
15. Kampe W. Nitrat- und Nitritzufuhren mit Lebensmitteln und mit dem Gesamtverzehr fester und flüssiger Nahrung. *Ernaehrungsumschau* 31 (1984) 400-405.
16. Stikstof en stikstofverbindingen in milieu en voeding in Nederland (Engl.: Nitrogen and nitrogen compounds in environment and nutrition in The Netherlands). Coördinatie-Commissie voor de metingen van Radioactiviteit en Xenobiotische Stoffen (CCRX), Ministry of Housing, Physical Planning and Environment Control (VROM), 1988.
17. Stephany R. W. and Schuller P.L. 1975. De aanwezigheid van nitriet in menselijk speeksel en het N-nitrosamineprobleem (Engl.: The presence of nitrite in human saliva and the N-nitrosamine problem). *Verslagen, Adviezen, Rapporten van Volksgezondheid* 33/34: Berichten RIV 1974.
18. World Health Organisation. Guidelines for the study of dietary intakes of chemical contaminants, GEMS: Global Environmental Monitoring System, WHO Offset Publication No. WHO-EFP/83.53. WHO Geneva, 1983.
19. Stephany R.W. and Schuller P.J.. The intake of nitrate, nitrite and N-nitrosamines and the occurrence of volatile N-nitrosamines in human urine and veal calves, p. 443-460 in E.A. Walker et al., eds. *Environmental aspects of N-Nitroso Compounds*, IARC Scientific Publication No.19. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 1978.
20. Corré W.J. and Breimer T. Nitrate and nitrite in vegetables. Literature survey No. 39. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, the Netherlands, 1979.
21. Jaegerstad M., Nordén Å. and Nilsson R. Dietary intake of nitrate and nitrite using the duplicate-sampling portion technique, *Ambio* 6 (1976) 276-277.
22. Tremp E. Die Belastung der schweizerischen Bevoelkerung mit Nitraten in der Nahrung. *Mitteilungen Gebiete d. Lebensmittelhygiene* 71 (1980) 182.
23. Hartman P.E. Nitrates and nitrites : Ingestion, pharmacodynamics and toxicology, p. 211-294 in F.J. de Serres and A. Hollaender, eds, *Chemical Mutagens*, Vol. 7 Plenum Press, New York, 1981.
24. Kohl D.H., Shearer G.B., Commoner B. Fertilizer nitrogen: Contribution to nitrate in surface water in a corn belt watershed. *Science* 174 (1971) 1331-1334.
25. Buss D.H. and Lindsay D.G. Reorganisation of the UK total diet study for monitoring minor constituents of food. *Food Cosmet. Toxicol.* 16 (1978) 597-600.
26. Knight T.M., Forman D., Al-Dabbagh S.A., Doll, R. Estimation of dietary intake of nitrate and nitrite in Great Britain. *Food. Chem. Toxicol.* 25 (1987) 277-285.

27. Ellen G., Egmond E., Sahertian E. Th. Dagelijkse opneming van nitraat, nitriet en vluchtige N-nitrosaminen, bepaald na analyse van duplicaat 24-uursvoedingen, bemonsterd in 1984/1985. Report nr. 388474 009 National Inst. of Public Health and Environmental Hygiene, Bilthoven, the Netherlands, January 1988.
28. Hulshof K.F.A.M., Kistenmaker C., Westenbrink S. Schatting van de nitraatname bij enkele bevolkingsgroepen in Nederland (Engl.: Estimation of the nitrate intake of some population groups in the Netherlands). Report nr. V 88.059/280034 CIVO-Zeist (Febr. 1988).
29. Hulshof P.J.M. De groenteconsumptie van volkstuinters (Engl.: The vegetable consumption of allotment gardeners). Staatstoezicht op de Volksgezondheid, Rijswijk, 1988.
30. Birdsall J.J. Human dietary nitrite intake; and, results of animal feeding studies of nitrite. Paper presented at the Public Meeting of the Committee on Nitrite and Alternative Curing Agents in Food, January 22, 1981, National Research Council. National Academy of Sciences, Washington, D.C. (16) pp.
31. Bommeljé S. Nitraatgehalten in groentegewassen (Engl.: Nitrate contents in vegetable crops). Report Consulentenschap voor Bodemaangelegenheden in de Tuinbouw, Wageningen, 1981.
32. Schuphan W. The significance of nitrates in food and potable waters. *Qualitas Plantarum - Plant Foods for Human Nutrition* 24 (1974) 19-36.
33. Ville J. and Mestrezat W. *Compte Rendu Soc. Biol.* Origine des nitrites contenu dans la salive; leur formation par réduction microbienne des nitrates éliminés par ce liquide. 73 (1907) 231-233.
34. Harada M., Ishiwata H., Nakamura Y., Tanimura A., Ishidate M. Studies on *in vivo* formation of nitroso compounds (I). Changes of nitrite and nitrate concentrations in human saliva after ingestion of salted chinese cabbage. *J.Fd. Hyg. Soc., Jap.* 16 (1975) 11.
35. Ishiwata H., Boriboon P., Nakamura Y., Harada M., Tanimura A., Ishidate M. studies on *in vivo* formation of nitroso compounds (II). Changes of nitrate and nitrite concentrations in human saliva after ingestion of vegetables or sodium nitrate. *J. Fd. Hyg. Soc., Jap.* 16 (1975) 19.
36. Ishiwata H., Tanimura A., Ishidate M. Studies on *in vivo* formation of nitroso compounds (III). Nitrite and nitrate concentrations in human saliva collected from salivary ducts. *J. Hyg. Soc., Jap.* 16 (1975) 89.
37. Tannenbaum S.R., Weisman M., Fett D., The effect of nitrate intake on nitrite formation in human saliva. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 14 (1976) 549.
38. Bartholomew B., Hill M.J. The pharmacology of dietary nitrate and the origin of urinary nitrate. *Fd. Chem. Toxicol.* 22 (1984) 789.

39. Stephany R.W. and Schuller P.J. Daily dietary intake of nitrate, nitrite and volatile N-nitrosamines in the Netherlands using the duplicate portion sampling technique, *Oncology* 37 (1980) 203-210.
40. Bos P.M.J., Van den Brandt P.A., Wedel M., Ockhuizen Th. The reproducibility of the conversion of nitrate to nitrite in human saliva after a nitrate load. *Fd. Chem. Toxic.* 26 (1988) 93-97.
41. Groenen P.J., Pouw H.J., Huis in 't Veld J.H.J. Influence of oral microflora and dental status on intra-oral nitrate/nitrite conversion after nitrate ingestion. Report CIVO-TNO A 88.509, 1988.
42. Siciliano J., Krulick S., Heisler E.G., Schwartz J.H., White J.W. Nitrate and nitrite content of some fresh and processed market vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 23 (1975) 461-464.
43. Ministère des Affaires Sociales et de l'Intégration. La Diagonale des Nitrates, Etudes sur la teneur en nitrates de l'alimentation. Ed. ADHEB, 35650 Le Rheu, 1992.

IIème PARTIE : TOXICOLOGIE

VI. INTRODUCTION

La seconde partie du présent rapport contient des informations originales et actualisées sur la toxicologie des nitrates et des nitrites. Les DJA actuelles reposent sur des études effectuées sur le rat avant 1974. Ces études étaient assez limitées et ne répondent pas aux normes actuelles des essais de toxicité. Cette question est traitée dans la Ière partie, Chapitre I.2.

Le rapport présente une étude bibliographique relative à la toxicologie des nitrates et des nitrites, portant principalement sur des publications parues jusqu'en 1987. Il contient, en outre, un résumé de quelques rapports récents traitant sur des expériences effectuées sur des animaux par l'Institut National de Santé Publique et de Protection de l'Environnement (RIVM) et par l'Institut de Nutrition (CIVO/Zeist) aux Pays-Bas.

Compte tenu de la réduction partielle des nitrates en nitrites dans le corps humain et de la faible marge de sécurité qui en découle entre l'exposition totale au nitrite et la DJA actuelle pour cette substance, le rapport avance des arguments montrant qu'il serait justifié d'effectuer des études supplémentaires visant à clarifier les mécanismes d'action des nitrites et leurs effets sur la santé.

VII. RESUME DES ETUDES PARUES JUSQU'EN 1987 ²

Pour plus amples détails, voir annexes

1. Cinétique chimiobiologique et métabolisme (voir annexe I)

Chez l'homme comme chez le rat, le nitrate est essentiellement absorbé à partir de la partie supérieure de l'appareil digestif (Bartholomew and Hill, 1984; Witter et al. 1979a). L'absorption est rapide puisqu'entre une et trois heures après ingestion dans les denrées alimentaires et les boissons, divers chercheurs ont observé des taux maxima de nitrate dans le sérum humain, la salive et l'urine (Bartholomew and Hill, 1984; Ellen et al., 1982b; Spiegelhalder et al., 1976; Turek et al., 1980). De faibles niveaux de nitrate sont normalement présents dans les fluides et les tissus du corps (Witter and Balish, 1979; Fritsch et al., 1985).

Une partie du nitrate du sang passe dans les glandes salivaires puis est sécrété sous forme de salive chez l'être humain et la plupart des animaux de laboratoire, sauf le rat. Le passage du sang à la salive s'effectue probablement par l'intermédiaire de vecteurs actifs utilisés également surtout par les iodures et les thiocyanates (SCN-) (NAS, 1981), mais chez le rat ce système de transport actif fait défaut (Cohen and Myant (1959) cités par Mirvish (1983)).

Le nitrate peut passer dans le lait mais il ne s'agit pas d'un processus actif comme pour la sécrétion salivaire (Green and al., 1982) d

Comme décrit dans le chapitre V, dans la salive le nitrate est transformé partiellement en nitrite par les micro-organismes. On peut trouver dans la salive sous forme de nitrite 4 à 7 % du nitrate ingéré (Eisenbrand et al. 1980; StepHany and Schuller, 1980).

Avec un pH peu élevé la réduction bactérienne du nitrate ne se produit pas en raison du faible développement bactérien; on considère donc qu'elle ne se produit pas dans l'estomac de la plupart des animaux monogastriques y compris l'homme (Wright and Davison, 1964; Mirvish et al., 1975). Des valeurs élevées de pH gastrique accompagnées parfois de taux élevés de nitrite ont toutefois été observées chez des malades souffrant d'un cancer de l'estomac ou d'un ulcère gastrique, chez les malades souffrant de gastrite atrophique ou traités par la cimétidine et d'autres antiacides (Correa et al., 1975); Ruddell et al., 1976; Schlag et al., 1982; Bartsch et al., 1984). Les nourrissons de moins de trois mois sont également très exposés à la réduction bactérienne du nitrate gastrique parce qu'ils produisent très peu d'acide gastrique (cité dans une analyse d'Ellen et Schuller, 1983). Les infections gastro-intestinales, fréquentes chez eux, peuvent entraîner une augmentation de la réduction du nitrate en nitrite.

La réduction du nitrate salivaire est presque inexistante chez le rat (Witter et al., 1979a; Til, 1986), probablement parce que la sécrétion de nitrate salivaire est peu abondante chez cette espèce.

On a constaté que la demi-vie du nitrate dans le corps humain après l'ingestion était approximativement de 5 heures (Wagner et al., 1983b). On a observé que des doses orales uniques de 25 - 170 mg de nitrate de potassium se traduisaient chez l'être humain par une excrétion de nitrate urinaire de 65 - 70% quelle que soit la dose. L'excrétion était maximale 5 heures après l'ingestion et retrouvait les niveaux de base au bout de 18 heures (Bartholomew and Hill, 1984). Des doses orales uniques plus importantes (7 - 10,5 g) de nitrate d'ammonium entraînaient une excrétion de nitrate urinaire moyenne de 75% au bout de 24 heures tandis que de faibles quantités de nitrite étaient décelées dans 26% des échantillons (Ellen et al., 1982). Dans une étude portant sur des enfants en bas âge, on signale une

²Tiré de l'annexe au rapport n° 758473012 : integrated criteria document nitrate, Effects ; RIVM, Mars 1989.

excrétion de nitrate urinaire se situant entre 80 et 100% de l'absorption moyenne, sans toutefois mentionner aucune donnée spécifique (Turek et al., 1980), mais dans une autre étude sur des enfants en bas âge il est montré que l'excrétion de nitrate pour de faibles niveaux d'absorption peut comprendre du nitrate synthétisé de façon endogène (Hegesh and Shiloah, 1982).

Divers auteurs signalent l'excrétion d'un excès de nitrate (0,3 - 1,9 mmol/jour d'excrétion urinaire) pour de faibles absorptions de nitrate (moins de 0,25 mmol/jour) chez l'homme (Bartholomew and Hill, 1984; Green et al. 1981b; Lee et al., 1986; Tannenbaum and Green, 1981; Wagner et al., 1983b). Chez les sujets ayant ingéré de grandes quantités (jusqu'à 3,5 mmol) de nitrate marqué ^{15}N , l'excrétion urinaire de nitrate non marqué était encore considérable (0,7-1,3 mmol contre 0,2 mmol pour 0,2 mmol d'ingestion - Green et al., 1981b). Ellen et Schuller (1983) ont calculé que jusqu'à 20% de cet excès pouvaient avoir pour origine l'inhalation de NO_2^- et NO_3^- contenus dans l'air intérieur et extérieur et la fumée de cigarettes. L'excès restant de nitrate urinaire, inférieur ou égal à 1 mmol/jour provient très probablement d'une synthèse endogène. La preuve de l'existence d'une biosynthèse du nitrate a été apportée par Dull et Hotchkiss (1984) pour le furet et par Saul et Archer (1984) et Wagner et al. (1983a) pour le rat. Ils ont observé que l'ingestion de sels d'ammonium marqués ^{15}N était invariablement suivie de l'excrétion urinaire de faibles quantités de nitrate marqué ^{15}N . Bien que l'activité bactérienne ne soit pas indispensable pour que cette synthèse se produise chez l'animal, elle peut accroître la biosynthèse du nitrate. Ainsi, la présence d'infections gastro-intestinales peut l'augmenter considérablement cette biosynthèse du nitrate (Wagner et al., 1983a; Hegesh et Shiloah, 1982; Stuerer et Marletta, 1985).

Une partie importante du nitrite pénétrant dans l'appareil gastro-intestinal disparaît avant d'avoir pu être absorbé, par suite d'une réaction avec le contenu gastrique (par exemple nitrosation - OMS 1985) ou d'une réduction par la flore gastro-intestinale.

Une absorption gastrique de nitrite a été observée dans les études de marquage et dans des études de lavages gastriques portant sur des rats et des souris (Witter et al., 1979b; Mirvish et al., 1975). Aucune donnée relative à l'absorption de nitrite chez l'homme n'a été trouvée. Toutefois, comme une partie du nitrate ingéré est transformée en nitrite dans la cavité buccale et l'estomac, et puisque des niveaux élevés de metHb ont été observés sur des enfants en bas âge ayant ingéré de fortes doses de nitrate (Shuval et Gruener, 1972), il peut évidemment y avoir absorption de nitrite à partir de l'appareil gastro-intestinal, où le nitrite peut être réduit en donnant des oxydes nitriques (NO) (Newmark et Mergens, 1981).

Le nitrite absorbé est rapidement oxydé en nitrate dans le sang (Witter and Balish, 1979; Fritsch et al., 1985; Parks et al., 1981). Il s'agit, estime-t-on, d'un processus propre aux mammifères et non d'un processus bactérien (Witter and Balish, 1979). La transformation de nitrite en nitrate par oxydation peut également se produire dans l'estomac avant l'absorption, comme on l'a démontré *in vitro* chez la souris. Néanmoins, *in vivo*, le nitrite est probablement absorbé à partir de l'estomac avant la formation de grandes quantités de nitrate (Friedman et al., 1972).

Le nitrite présent dans le sang (nitrite d'origine exogène ou nitrite formé à partir de nitrate synthétisé de façon exogène et/ou endogène) participe également à l'oxydation de l'hémoglobine (Hb) donnant de la méthémoglobine (metHb). L'atome de Fe^{2+} présent dans l'hème prend par oxydation sa forme Fe^{3+} et le nitrite se lie solidement à cet hème oxydé. Le transport de l'oxygène du sang est ainsi inhibé (Jaffé, 1981). A faibles taux de nitrite, la formation de metHb est réversible.

Les nourrissons sont extrêmement sujets à la formation de metHb provoquée par la présence de nitrite (signalé par Ellen et Schuller, 1983) pour les raisons suivantes:

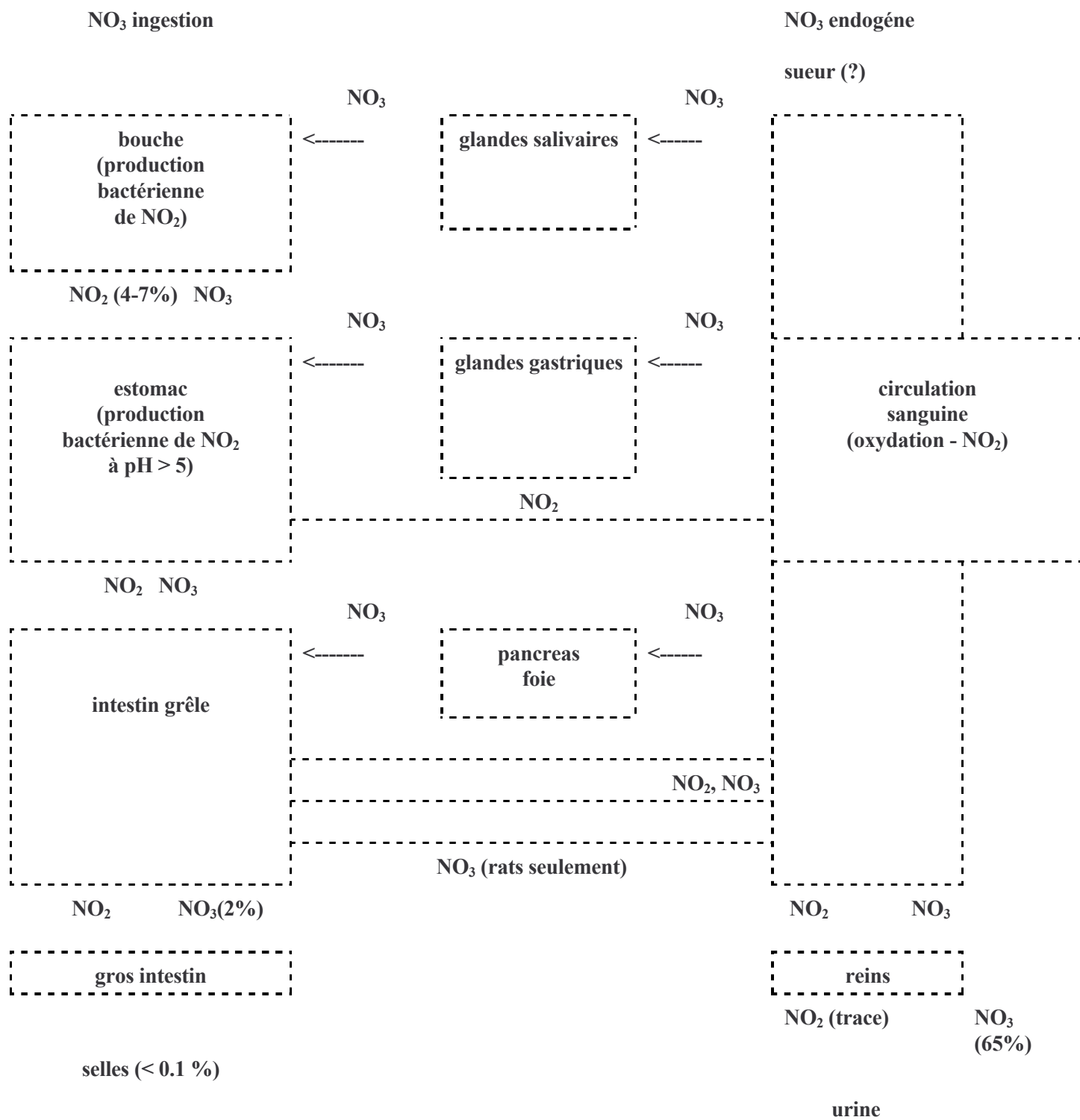
-l'hémoglobine foetale, qui constitue initialement 60-80 % de l'hémoglobine totale puis tombe à 20-30 %

au bout de 3 mois, se transforme plus facilement en metHb;

-la NADpH-metHb réductase, qui catalyse la retransformation de metHb en Hb, est normalement déficiente dans les érythrocytes néonatales.

Le sort du nitrate et du nitrite dans l'organisme des mammifères est représenté schématiquement dans la figure I.

Figure I Sort du nitrate et du nitrite chez les mammifères
(Vogtmann, 1985; adapté)



2. Expériences sur l'animal (voir annexe II)

Nitrate

On a constaté que la LD₅₀ pouvait varier pour la souris de 2.480 à 6.250 mg de nitrate de sodium/kg de poids corporel, et pour le rat de 4.860 à 9.000 mg de nitrate de sodium/kg de poids corporel, pour le lapin la LD₅₀ était de 1.600 mg et pour la vache de 450 mg de nitrate de sodium/kg de poids corporel. On peut en conclure que les vaches sont les plus sensibles aux nitrates. Des études sur la cinétique et le métabolisme ont montré que la toxicité du nitrate était largement déterminée par sa conversion en nitrite et par la formation ultérieure de méthémoglobine. Ces constatations cadrent avec l'observation d'une valeur létale moyenne inférieure pour les ruminants chez qui le taux de transformation du nitrate en nitrite est infiniment plus élevé que chez les veaux non ruminants et les rongeurs. Elles sont corroborées par l'observation que l'administration à des vaches de la dose totale par petites quantités espacées sur 24 heures réduit considérablement la toxicité (450 contre plus de 970 mg de nitrate de sodium / kg de poids corporel). Nighat et al. (1981) ont également observé une toxicité subaiguë assez élevée (200 mg/kg de poids corporel avaient encore des effets toxiques) chez le lapin, lorsque le nitrate est administré par dose quotidienne unique sous forme de gélule.

On estime que l'étude à long terme de Lehman (1958) sur le rat est celle qui permet le mieux d'établir un taux non toxique; les résultats en ont été confirmés par Til et al. (1985a et b). On considère donc que le taux non toxique pour le rat est de 500 mg de nitrate de sodium/kg de poids corporel.

Une partie des études sur l'action cancérigène sont inappropriées en raison de la durée de l'expérience, du nombre d'animaux utilisés, de la voie d'administration, ou du manque d'informations sur la présence de composés N-nitrosés dans l'alimentation. Quoi qu'il en soit, la seule étude satisfaisante, celle de Maekawa et al. (1982), comme les études qui n'atteignent pas tout à fait les normes acceptées, ont permis de conclure que le nitrate n'avait aucune activité cancérigène chez les animaux de laboratoire.

Le nitrate est sans effets mutagènes sur les bactéries et les cellules de mammifères *in vitro*. Dans les expériences *in vivo* des aberrations chromosomiques ont été provoquées dans la moelle épinière du rat mais on ne peut exclure qu'elles aient été dues à la formation de composés N-nitrosés.

Des études sur la reproduction chez le cobaye ont permis d'établir un taux non toxique de 10.000 mg de nitrate de potassium/l d'eau potable correspondant à 1.000 mg /kg de poids corporel.

En conclusion, le nitrate n'est pas cancérigène et n'est probablement pas mutagène.
On ne dispose d'aucune donnée appropriée concernant un éventuel effet tératogène.

Un autre facteur qui tend à restreindre la valeur des résultats des études sur les rongeurs - et surtout sur le rat - est l'observation que ces espèces ne conviennent que dans une mesure limitée à l'étude de la toxicité du nitrate. Comme on l'a vu, en s'appuyant sur des études de toxicité et de cinétique, la toxicité du nitrate dépend en grande partie de sa transformation en nitrite. Dans le cas du rat, cette transformation n'est pas la même que

dans le cas de l'homme, chez qui elle est de 4 à 7 %. Il faut donc probablement calculer le taux non toxique de nitrate à partir du taux non toxique de nitrite et des pourcentages de transformation constatés chez l'homme.

Nitrite

La valeur de la LD₅₀ orale aiguë pour la souris varie de 175 à 220 mg de nitrite de sodium; pour le rat elle est de 85 mg/kg de poids corporel. Lorsqu'on répartit une dose unique de nitrite en un certain nombre de doses plus petites, la toxicité diminue. L'étude de toxicité chronique chez le rat (Shuval and Grüner, 1972) a permis d'établir un taux non toxique de 100 mg de nitrite de sodium/l ou 10 mg de nitrite de sodium/kg de poids corporel. Toutefois, la dose immédiatement supérieure employée dans cette étude était 10 fois plus élevée.

De nombreuses études visant à déceler le caractère cancérigène éventuel du nitrite chez des souris et des rats ayant absorbé des aliments ou de l'eau contenant du nitrite sont également inappropriées en raison de la durée des expériences, du nombre d'animaux testés, de la voie d'administration, de la présence de composés N-nitrosés dans les aliments, de l'absence d'informations sur la teneur des aliments en composés N-nitrosés ou parce que l'unique groupe à qui l'on avait administré du nitrite servait de groupe témoin dans les études portant sur les effets cancérigènes d'une administration simultanée de nitrite et d'une amine susceptible de nitrosation.

La conclusion initiale d'une vaste étude sur les effets cancérigènes obtenus chez des rats ayant absorbé des aliments ou de l'eau contenant du nitrite, effectuée par la FDA (Newberne, 1978; 1979) et selon laquelle il y avait incidence accrue de lymphomes, a été réévaluée par un groupe de travail interinstitutionnel du Gouvernement des Etats-Unis. Ce groupe est parvenu à la conclusion qu'il n'y avait augmentation du nombre de tumeurs ni sous forme de lymphomes ni sous d'autres formes (FDA, 1980a; b).

Bien que quelques études sur le nitrite aient révélé une légère augmentation du nombre de tumeurs, résultant peut-être de la présence de nitrosamines dans les aliments administrés aux souris ou aux rats, la conclusion finale est que le nitrite n'est pas par lui-même cancérigène.

Les résultats des études sur les effets cancérigènes d'une administration combinée de nitrite et d'amines sont résumés au point 1.3.

Le nitrite présente des effets toxiques chez le fœtus. Les expériences sur des rats à qui l'on avait administré du nitrite dans de l'eau de boisson ont révélé des effets aux deux doses étudiées (200 et 300 mg/kg de poids corporel), tandis que dans des études sur les effets foetotoxiques et tératogènes sur le rat du nitrite administré dans les aliments on a constaté qu'une dose de 200 mg de nitrite de sodium par kilo de poids corporel ne provoquait aucun effet.

Dans les systèmes *in vitro*, le nitrite est mutagène et entraîne des transformations morphologiques. On a également observé une activité mutagène lors d'une expérience combinée *in vivo-in vitro* sur des hamsters syriens. Les expériences *in vivo* ont abouti à des résultats discordants.

Dans certains systèmes *in vitro* le mécanisme est probablement dû à une désamination, tandis que dans les expériences *in vivo* la formation endogène de composés N-nitrosés joue sans doute un rôle.

3. Observations sur l'homme (voir Annexe III)

La plus faible dose létale de nitrate mentionnée dans la littérature est 80 mg de NO_3^- /kg de poids corporel pour l'adulte. Des données plus récentes font apparaître une dose létale plus réaliste pour l'adulte d'environ 20 g ou 330 mg de NO_3^- /kg de poids corporel. La toxicité du nitrate chez l'homme dépend toutefois de la transformation du nitrate en nitrite. La plus faible dose létale orale aiguë de nitrite signalée pour l'homme varie de 33 à 250 mg de NO_2^- /kg de poids corporel, les chiffres inférieurs s'appliquant aux enfants et aux personnes âgées. Le nitrite est également plus toxique pour les nourrissons (moins de trois mois) que pour les adultes; il provoque en effet chez eux des taux de méthémoglobine relativement plus élevés dans le sang. La dose toxique la plus faible signalée est de 1 mg de NO_2^- /kg de poids corporel, mais dans une autre étude, des doses de 0,5 à 5 mg de NO_2^- /kg de poids corporel n'ont entraîné aucun effet toxique.

Il faut considérer les patients atteints d'achlorhydrie et/ou de lésions gastriques et les nourrissons de moins de trois mois comme des groupes à risque pour la toxicité du nitrate. En supposant une réduction de 80 % du nitrate en nitrite et en prenant pour critère de toxicité la formation de 10 % de méthémoglobine ou davantage, on peut calculer que pour ces groupes à risque la dose orale toxique la plus faible est de 1,5 à 2,7 mg de NO_3^- /kg. Dans les cas signalés de méthémoglobinémie chez les nourrissons, l'ingestion de nitrate était plus élevée (37,1 - 108,6 mg de NO_3^- /kg de poids corporel). 97,7 % de ces cas étaient localisés des régions dans lesquelles la teneur en nitrate de l'eau potable était supérieure à 10 - 20 mg de NO_3^- .1/l (ce qui équivaut à 44,3 - 88,6 mg de NO_3^- .1/l; OMS, 1984; 1985). Il est toutefois difficile d'évaluer la relation entre les cas de méthémoglobinémie chez le nourrisson et l'ingestion de nitrate car on observe souvent simultanément une contamination bactérienne de l'eau potable et des infections bactériennes qui peuvent influencer sur la réduction de nitrate en nitrite et sur la synthèse endogène du nitrate. Ainsi, Hegesh et Shiloah (1982) ont constaté chez les nourrissons souffrant de diarrhée aiguë un taux de nitrate notablement accru dans le sang, en corrélation avec un taux accru de méthémoglobine, alors que les quantités de nitrate et de nitrite ingérées étaient faibles (2 - 7 mg/jour⁻¹).

Lors d'une étude expérimentale on a fait ingérer à des nourrissons deux différentes doses de nitrate. L'administration par voie orale à des enfants sains âgés de 11 jours à 11 mois de 50 à 100 mg de NO_3^- /kg de poids corporel pendant une période allant jusqu'à 18 jours a révélé des concentrations de méthémoglobine de 5,3 à 7,5 % sans cyanose. L'administration de 100 mg de NO_3^- /kg de poids corporel à des nourrissons âgés de 6 à 7 semaines en cours de rétablissement à la suite d'une méthémoglobinémie a fait apparaître 11 % de méthémoglobine combinés à une cyanose (Cornbatt et Hartmann, 1948). Cette étude ne contenait aucune donnée témoin; les valeurs normales de méthémoglobine dans le sang se situent entre 1 et 2 % (OMS, 1985).

Pour les adultes on ne dispose d'aucune information sur la toxicité à court terme ou à long terme, à part les études épidémiologiques sur la relation entre l'ingestion de nitrate ou de nitrite et le nombre de cas de tumeurs. Dans un certain nombre de pays on a signalé une relation entre des taux élevés d'ingestion de nitrate et les cancers gastriques, et un lien a été établi entre l'exposition au nitrate et le cancer gastrique dans certaines régions du Chili, de la Colombie, du Danemark, de l'Angleterre, de la Hongrie, de l'Italie et du Japon (Hartmann, 1983). Néanmoins, aucune de ces observations n'autorise des conclusions certaines, et quelques-unes ont même été contredites par d'autres études (Davies, 1980; Armijo et al., 1981a et b). Plusieurs études ont montré l'existence d'une corrélation négative.

Dans la plupart des études épidémiologiques on a calculé l'ingestion de nitrate à partir de

réponses à un questionnaire ou en se basant sur les taux de nitrate gastrique ou urinaire. Toutefois, dans plusieurs études, on a constaté une absence totale de corrélation entre le risque de cancer gastrique et le nitrate salivaire, tandis que cette corrélation existait avec le nitrate urinaire (Cuello et al., 1976; Eisenbrand et al., 1980).

Dans les études épidémiologiques et les études connexes, il faut tenir compte de nombreux facteurs qui compliquent l'interprétation des résultats. Très souvent, on ne dispose pas d'informations complètes sur ces facteurs. Dans aucune des études résumées dans le présent chapitre et dans les Tableaux IV et V on ne trouve d'informations sur la présence de composés N-nitrosés cancérigènes préformés dans l'alimentation ou les autres éléments du mode de vie. De surcroît, le rapport entre les taux de nitrate - exogène et salivaire - et le nombre de cas de cancer gastrique au même moment est discutable en raison de la longueur de la période d'induction des tumeurs.

Des facteurs autres que les nitrates, et responsables des changements dégénératifs de la muqueuse gastrique protectrice avant l'apparition des dégâts dus aux substances cancérigènes, sont peut-être plus importants. Les particularités du mode de vie de certains pays, comme la consommation de denrées alimentaires salées ou fermentées dans les pays à forte mortalité par cancer gastrique comme le Japon et la Chine, peuvent jouer un rôle décisif dans ce processus et expliquer les résultats contradictoires trouvés dans les études.

En conclusion, bien qu'un lien ait été mentionné dans plusieurs études, aucune relation n'a été établie avec certitude chez l'individu sain et normal entre le taux estimé de nitrate ingéré et le cancer gastrique. Aucun accroissement du nombre de cas de cancer gastrique n'a été constaté après exposition au nitrate ou au nitrite en milieu professionnel.

Les sujets souffrant de lésions ou de troubles gastriques, et surtout de gastrite atrophique, les malades atteints d'anémie pernicieuse et les personnes traitées par la cimétidine ou par des médicaments antiacides constituent des groupes à risque dans lesquels une corrélation entre l'ingestion de nitrate ou de nitrite et le nombre de cas de cancer gastrique ne peut être exclue.

Tant chez les sujets sains que dans les groupes présentant un risque particulier, la corrélation possible entre l'ingestion de nitrate ou de nitrite et le cancer gastrique repose sur la formation endogène possible de composés N-nitrosés cancérigènes. En tenant compte également du fait que cette formation exige également la présence d'amines ou d'amides dans des concentrations appropriées, et que des études effectuées sur des animaux dans des conditions bien définies ont fait apparaître que ni le nitrate ni le nitrite n'étaient cancérigènes, on peut conclure que ces substances n'ont en elles-mêmes aucune propriété cancérigène.

4. Evaluation des risques

Des études expérimentales ont montré que l'ingestion de nitrate pouvait entraîner un accroissement du taux de méthémoglobine dans le sang chez les nourrissons et les animaux adultes sains. Les données relatives aux cas cliniques de méthémoglobinémie chez les nourrissons ne peuvent pas être évaluées par rapport à la quantité de nitrate ingérée car d'autres facteurs, comme la contamination bactérienne de l'eau potable et les infections gastro-intestinales entrent souvent également en jeu. On ne possède aucune donnée sur l'ingestion subchronique et chronique de nitrate par l'homme, en dehors des études épidémiologiques qui concernent l'apparition de tumeurs. Le taux non toxique de 500 mg de nitrate de sodium/kg de poids corporel a donc probablement été établi à partir d'une étude d'ingestion chronique sur le rat, dans laquelle à la dose immédiatement supérieure de 2.500 mg de nitrate de sodium/kg de poids corporel on a remarqué une légère inhibition de la croissance. Or, comme la cinétique chimio-biologique et le métabolisme du rat diffèrent de ceux de l'homme, il faut considérer que cette espèce ne se prête guère à l'étude de la toxicité du nitrate. Dans une étude de toxicité subaiguë sur le lapin, des effets ont été observés, mais on a considéré que cette étude ne permettait pas une évaluation du risque parce que le nitrate avait été administré en doses fortes sous forme de gélules, alors que les humains ingèrent quotidiennement des quantités relativement faibles de nitrate dans les denrées alimentaires et l'eau de boisson. Comme on détermine essentiellement la toxicité du nitrate à partir de la quantité de nitrate transformée en nitrite, il est donc préférable de calculer le taux non toxique de nitrate à partir du taux de transformation du nitrate en nitrite chez l'homme et du taux non toxique de nitrite (voir ci-après).

Le nitrate n'est pas mutagène dans les bactéries et les cellules de mammifères *in vitro*. Dans des expériences *in vivo*, on a provoqué des aberrations chromosomiques dans la moelle épinière du rat, mais on ne saurait exclure que la formation de composés N-nitrosés en ait été responsable. Les études sur l'animal ont abouti à la conclusion que le nitrate ne possédait pas par lui-même de propriétés cancérogènes.

Les nourrissons de moins de trois mois doivent être considérés comme un groupe à risque. Ils peuvent ingérer quotidiennement des quantités relativement élevées de nitrate dans l'eau de boisson et ils sont plus vulnérables que les adultes aux effets néfastes du nitrate parce que chez eux une quantité relativement plus importante de nitrate est transformée en nitrite et que la méthémoglobinémie est provoquée par des doses plus faibles.

On ne dispose d'aucune donnée appropriée sur l'ingestion subchronique ou chronique de nitrite par l'homme. Le taux non toxique de 10 mg de nitrite de sodium/kg de poids corporel ou de 6,7 mg de NO_2 /kg de poids corporel a donc été établi à partir d'une étude de toxicité à long terme pour laquelle on avait administré du nitrite à des rats par l'intermédiaire de l'eau de boisson. Dans cette étude, on a observé le paramètre le plus sensible, c'est-à-dire la formation de méthémoglobine pour des doses égales ou supérieures à 100 mg de nitrite de sodium/kg de poids corporel. Dans les systèmes *in vitro*, le nitrite est mutagène et provoque des transformations morphologiques. On a également constaté une activité mutagène dans une expérience combinée *in vivo-in vitro* sur des hamsters syriens. Les expériences *in vivo* ont abouti à des résultats discordants. Le mécanisme dans certains systèmes *in vitro* est probablement dû à la désamination, alors que dans les expériences *in vivo* la formation endogène de composés N-nitrosés joue probablement un rôle.

Bien que quelques études sur le nitrite aient révélé une incidence de tumeurs légèrement accrue, qui résultait peut-être de la présence de nitrosamines dans l'alimentation des souris et des rats, il faut conclure en définitive que rien ne démontre clairement que le nitrite soit en lui-même cancérogène.

En partant de l'hypothèse réaliste que chez l'adulte 5 % du nitrate se transforme en nitrite, on peut établir le taux non toxique de nitrate à partir du taux non toxique de nitrite chez le rat. $100\% / 5\% \times 10 \text{ mg/kg}$ de poids corporel = 200 mg de nitrate de sodium/kg de poids corporel ou 146 mg de NO_3/kg de poids corporel. Le développement de DJA exige, cependant, l'application de facteurs de sécurité³

La réduction bactérienne du nitrate en nitrite chez l'enfant de moins de trois mois peut être beaucoup plus élevée. En supposant qu'elle soit de 80%, le taux toxique du nitrate établi à partir du nitrite qu'il convient de retenir pour l'extrapoler aux jeunes enfants est donc de $100\% / 80\% \times 10 \text{ mg/kg}$ de poids corporel = 12,5 mg de nitrate de sodium/kg de poids corporel ou 9,1 mg de NO_3/kg de poids corporel. En outre, les nourrissons de moins de trois mois sont plus sujets que les adultes à la formation de méthémoglobine par le nitrite, de sorte que le taux non toxique réel applicable à cette catégorie est peut-être encore plus bas. Chez les nourrissons nourris au biberon, la consommation quotidienne d'eau potable est en moyenne de 500 ml au cours des premières semaines et augmente au cours du deuxième et du troisième mois pour atteindre environ 850 ml (Nelson, 1983). Selon les normes actuelles, l'eau potable peut contenir jusqu'à 50 mg de NO_3/l . On peut raisonnablement estimer que l'ingestion de NO_3 par des nourrissons pesant entre 3 et 5 kilos atteint 15 mg/kg de poids corporel/jour. Par conséquent, en cas d'exposition de longue durée, il n'existe pratiquement aucune marge de sécurité pour le nourrisson entre les quantités ingérées et le taux non toxique. Cela appelle toutefois quelques observations complémentaires.

1.Plusieurs auteurs retiennent comme critère de méthémoglobinémie aiguë chez le nourrisson une augmentation de 10 % de la méthémoglobine (Winton et al., 1971). Ce taux de méthémoglobine s'accompagne de cyanose. Shuval et Grüner (1972) ont observé un taux accru de méthémoglobine (5 %) de moins de 10 % chez le rat après administration pendant de longues périodes de 100 mg de NO_2/kg de poids corporel. En extrapolant on arrive à la conclusion qu'aucune méthémoglobinémie (clinique) n'apparaît chez le nourrisson à des doses de 91 mg de NO_3/kg de poids corporel. La marge de sécurité⁴ entre les quantités réellement ingérées et ce taux à effet "marginal" est de facteur 11.

2.En pratique, les cas cliniques de méthémoglobinémie chez le nourrisson (cyanose) ont été presque exclusivement observés dans les régions dans lesquelles la teneur en nitrate de l'eau potable est égale ou supérieure à 44,3 - 88,6 mg de NO_3/l (OMS, 1985).

Au vu d'observations sur des nourrissons, certains auteurs pensent que la principale cause de méthémoglobinémie chez le nourrisson est probablement la synthèse endogène du nitrate et du nitrite résultant d'infections gastro-intestinales (Hegesh et Shiloah, 1982, et autres). Dans certains états inflammatoires, on observe effectivement une réduction accrue du nitrate en nitrite, parfois, mais pas nécessairement toujours, accompagnée d'une augmentation de la synthèse du nitrate. Toutefois, ce n'est qu'une des causes possibles de méthémoglobinémie chez le nourrisson. Les résultats de Cornblatt et Hartmann (1948) confirment que les conclusions d'études sur des animaux (l'ingestion de nitrate entraîne une élévation des taux sanguins de méthémoglobine) valent également pour les nourrissons sains. Bien que le niveau des doses ait été élevé dans cette étude, et qu'aucune cyanose ne soit apparue, les taux de

³Pour calculer une "dose journalière acceptable" (DJA) à partir des résultats d'expérience sur des animaux, on applique généralement un facteur de sécurité en créant un écart entre la DJA et le taux non toxique déduit des études à long terme sur l'animal. Il s'agit en fait de deux facteurs : l'un pour prendre en compte les incertitudes de l'extrapolation de l'animal à l'homme (généralement 10) et l'autre tenant compte de la sensibilité individuelle (généralement 10 aussi).

⁴Comme en l'occurrence les nourrissons constituent le groupe le plus sensible, il suffit de tenir compte des incertitudes de l'extrapolation de l'animal à l'homme.

méthémoglobine ont augmenté jusqu'à atteindre 7,5%, alors que la durée de l'exposition était courte et que la plupart des enfants avaient dépassé l'âge critique de trois mois.

Comme on l'a vu, c'est nécessairement à partir d'expériences sur les animaux que l'on a calculé les risques quantitatifs d'une exposition à long terme. Le taux parfois accru de synthèse endogène du nitrate, et surtout le taux accru de réduction du nitrate en nitrite, chez les enfants souffrant d'infections gastro-intestinales, constituent une raison supplémentaire de limiter l'apport exogène dans ce groupe sensible.

On peut estimer que la dose journalière moyenne de l'homme est de 2,3 mg de NO_2 /jour ou 38 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de poids corporel. La marge de sécurité entre cette dose et le taux non toxique chez l'animal est donc de 176, si l'on ne tient pas compte du nitrite formé de façon endogène. Contrairement au nitrate, le nitrite n'est pas ingéré en plus grandes quantités par les jeunes enfants car les denrées alimentaires à concentrations de nitrite relativement élevées sont les viandes fumées. Comme on l'a vu, les nourrissons sont plus sujets à la formation de méthémoglobine.

Tableau I :Expériences de courte durée concernant les effets du nitrate et du nitrite chez l'animal				
Espèce	Voie	Dose	Résultats	Référence
rat	orale dans les aliments	1, 2, 3, 4 ou 6 % de KNO ₃ , 5 % de NaNO ₃ , 4 semaines	à 2 % de KNO ₃ , taux de metHb- légèrement augmentés chez la femelle, poids du rein légèrement accru chez le mâle	Til et al. (1985a, b)
rat F344	orale dans les aliments	1,25; 2,5; 5; 10 et 20 % NaNO ₃ , 6 semaines	gain de poids légèrement ou modérément réduit à l'autopsie, couleur de la rate et du sang légèrement anormale	Maekawa et al. (1982)
rat	orale dans l'eau de boisson	4000 mg NaNO ₃ /l, 14 mois	- taux de metHb identiques à ceux du groupe témoin - effet modéré sur les taux de vitamine E dans le plasma et sur l'incidence des lésions pulmonaires	Chow et al. (1980)
lapin	orale en gélules	200, 400 et 600 mg de KNO ₃ /kg de poids corporel, 4 semaines	au bout de 2 semaines symptômes d'intoxication (perte de poids, tachycardie, polyurie et faiblesse)	Nighat et al. (1981)
veau	orale dans le lait artificiel	400, 2000, 5000 et 10.000 mg de NO ₃ /kg, 8 semaines	aucune anomalie	Berende et al. (1977)
souris	orale par sonde gastrique	110 mg NaNO ₂ /kg de poids corporel, 7 jours	fonctions cardiaques diminuées à des distances de course forcées, anomalies de l'ECG et du muscle cardiaque	Kinoshita et al. (1985)
souris	orale dans l'eau de boisson	100, 1000, 1500 et 2000 mg de NaNO ₂ /litre, 3 mois	activité motrice diminuée; taux de méthémoglobine jusqu'à 15 %	Behroozi et al. (1971)
souris	orale dans l'eau de boisson	100, 1000, 1500 et 2000 mg de NaNO ₂ /litre, 2 semaines	activité motrice diminuée	Grüner et al. (1971)
rat	orale par sonde gastrique	40 et 80 mg NaNO ₂ /kg de poids corporel en une dose; 160 et 320 mg/kg de poids corporel en 8 doses de 20 et 40 mg/kg de poids corporel	en une dose : toxicité plus élevée qu'en plusieurs doses taux de metHb considérablement plus élevés	De Vries (1983)
rat	orale par sonde gastrique	2 x 100 mg NaNO ₂ /kg de poids corpo-rel à 2 h d'intervalle 2 x 100 mg NaNO ₂ /kg de poids corpo-rel à 4 h d'intervalle	mortalité accrue aucun trouble	Druckrey (1963)
rat	orale dans l'eau	0,06; 0,125; 0,25; 0,5 et	- diminution de la croissance légère	Maekawa et al.

Tableau I :Expériences de courte durée concernant les effets du nitrate et du nitrite chez l'animal				
Espèce	Voie	Dose	Résultats	Référence
	de boisson	1 % NaNO ₂ 6 semaines	et à 1 % modérée - à 0,5 et 1% coloration anormale du sang et de la rate due à la méthémoglobine - dose maximale tolérée 0,25% dans l'eau de boisson	(1982)
rat	orale dans l'eau de boisson	100, 300 et 2000 mg de NaNO ₂ /l	anomalies de l'EEG; réversibles seulement 2 mois après 4 mois à la dose la plus faible	Shuval et al. (1972)
rat mâle (1 mois)	orale dans l'eau de boisson	200 mg NaNO ₂ /l 16 semaines	- taux de methHb 0,5-3,1% - nombre plus élevé de lésions pulmonaires	Chow et al. (1980)
rat	orale dans les aliments	0,0093 % de NaNO ₂ 168 jours	aucun effet sur le taux de croissance et le poids des organes	Tarr et al. (1942)
rat	orale dans l'eau de boisson	170 et 340 mg/kg de poids corporel 200 jours	méthémoglobinémie; augmentation du poids de la rate et du coeur, changement du poids du foie et des reins	Musil (1966)
rat mâle âgé de 2 mois	orale dans l'eau de boisson	2000 mg de NaNO ₂ /l 14 mois	- taux de methHb 1-35 % - nette diminution du poids du corps et du foie - diminution des taux de vitamine E dans le plasma - nombre plus grand de lésions pulmonaires	Chow et al. (1980)
chat	orale dans les aliments	0,039% de NaNO ₂ , 105 jours	aucun effet sur le taux de croissance et le poids des organes	Tarr et al. (1942)
porc chien ruminants	intraveineuse	6mg de nitrite-N par kg de poids corporel	méthémoglobinémie permanente	Jensen et al. (1941) Emerick et al. (1965)
poussin (d'un jour)	orale dans les aliments	0,4% KNO ₂ 2 semaines	- inhibition de la croissance - grossissement de la glande thyroïde	Sell et al. (1963)
	orale dans les aliments	18-60 mg de NaNO ₂ /kg de poids corporel 2 semaines	- diminution des dépôts de vitamine A dans le foie	Brüggemann et al. (1964)

Tableau II :Expériences concernant la toxicité chronique et les effets cancérigènes du nitrate et du nitrite chez l'animal (voir également Birdsall, 1981)				
Espèce	Voie	Dose	Résultats	Référence
rat	orale dans les aliments (NaNO ₃)	0,1; 1,5 et 10% 2 ans	à partir de 5 % inhibition (légère) de la croissance	OMS-JECFA (1962, 1974)
souris	orale dans eau de boisson (NaNO ₃)	12,3 g/l 20-25 animaux sacrifiés 10-13 sem. plus tard	aucune augmentation du nombre de cancers du poumon	Greenblatt et al. (1973)
souris	orale dans les aliments (NaNO ₃)	25.000 et 50.000 mg/kg étude pendant la durée de vie	aucune augmentation du nombre de tumeurs	Sugiyama et al. (1979)
rat	orale dans eau de boisson	100 mg - 84 sem.; animaux sacrifiés 20 sem. plus tard	augmentation non significative des adénomes hypophysaires chez la femelle	Lijinsky et al. (1973a)
rat	orale dans les aliments (NaNO ₃)	2,5 et 5 %, 2 ans animaux sacrifiés au bout de 19 semaines	- aux doses les plus fortes chez la femelle > 10 % de diminution de la croissance - hépato- et splénomégalie - dans les groupes traités aucun accroissement du nombre de tumeurs	Maekawa et al. (1982)
rat	orale dans eau de boisson	100 mg/kg de poids corporel pendant une période longue	réduction de la durée de vie	Druckrey et al. (1963)
rat	orale dans eau de boisson	100, 1000, 2000 et 3000 mg/l 2 ans	à la dose la plus forte dégénérescence focale du muscle cardiaque, fibrose, artères coronaires minces et dilatées ; emphysème du poumon aux trois doses les plus fortes	Shuval et al. (1972)
souris	orale dans eau de boisson (NaNO ₂)	1-2 g/l - 20 sem. animaux sacrifiés au bout de 10 sem.	aucune augmentation du nombre de tumeurs du poumon	Greenblatt et al. (1973)
souris	orale dans eau de boisson (NaNO ₂)	1000, 2500 et 5000 mg/l 18 mois	aucune tumeur due à l'administration de nitrite	Inai et al. (1979)
souris	sous-cutanée	12 mg par souris 90 jours, animaux sacrifiés au bout de 11 mois	aucune augmentation du nombre de tumeurs du poumon	Nakahara et al. (1959)
souris	orale par sonde gastrique (NaNO ₂) orale dans eau de boisson	10 mg/kg de poids corporel par jour dans la dernière semaine de gestation 500 mg/l pendant toute la gestation	aucune augmentation du nombre de cancers du poumon	Börzsönyi et al. (1978)
rat	orale dans eau de boisson	2 g/l presque toute la durée de vie	aucune augmentation du nombre des tumeurs	Lijinsky et al. (1973a, b) Taylor et al.

Tableau II :Expériences concernant la toxicité chronique et les effets cancérigènes du nitrate et du nitrite chez l'animal (voir également Birdsall, 1981)				
Espèce	Voie	Dose	Résultats	Référence
	(NaNO ₂)			(1975)
rat	orale dans eau de boisson	3000 mg/l, 5 j/sem. pendant la durée de vie	papillomes de la face antérieure de l'estomac chez 8 rats sur 45	Mirvish et al. (1980)
rat	orale dans eau de boisson (NaNO ₂)	0,125 et 0,25, 2 ans, animaux sacrifiés au bout de 16 semaines	- à la dose la plus forte, la femelles > 10% de diminution de croissance - hépato- et splénomégalie - chez les mâles traités diminution liée à la dose du nombre de cancers par rapport aux groupes témoins	Maekawa et al. (1982)
rat	orale dans l'alimentation (NaNO ₂) orale dans eau de boisson (NaNO ₂)	mâles: 100 mg/kg de poids corporel femelles: 100 mg/kg de poids corporel Mâles: 50 mg/kg de poids corporel femelles: 80 mg/kg de poids corporel 2 ans	chez les deux sexes diminution du nombre de leucémies à forme mononuclées	Lijinsky et al. (1983)
rat	orale dans l'alimentation (NaNO ₂)	1000 mg/kg	augmentation du nombre de tumeurs du système lymphoréticulaire	Shank et al. (1976)
rat	orale dans l'alimentation (NaNO ₂) orale dans eau de boisson (NaNO ₂)	250, 500, 1000 et 2000 mg/kg; 1000 ou 2000 mg/l - avant la naissance - à partir de l'âge de 21 jours	à 2000 mg inhibition de la croissance également à 2000 mg inhibition de la croissance et dans une moindre mesure augmentation significative du nombre de tumeurs lymphoïdes	Newberne et al. (1978, 1979)
rat	même étude que ci-dessus; évaluée par le groupe de	travail interinstitutionnel du gouvernement	aucune augmentation des lymphomes ou des autres tumeurs	FDA (1980)
rat	orale sous forme de viande fumée (NaNO ₂)	200, 1000 et 4000 mg/kg	tendance à l'augmentation du nombre de tumeurs chez l'animal à 4000 mg; aucun effet sur la reproduction	Olsen et al. (1984)
rat	orale dans eau de boisson orale dans les aliments (NaNO ₂)	NMBA * 10 mg/l 1 g/kg	progression accrue des tumeurs de l'oesophage	Schweinsberg et al. (1985)
rat	orale dans eau de boisson	100 mg/kg de poids corporel 3 générations	aucune augmentation du nombre de tumeurs	Druckrey et al. (1963)

Tableau II :Expériences concernant la toxicité chronique et les effets cancérigènes du nitrate et du nitrite chez l'animal (voir également Birdsall, 1981)				
Espèce	Voie	Dose	Résultats	Référence
rat	orale dans les aliments	1600 mg/kg, étude achevée au bout de 16 mois	aucune augmentation du nombre des tumeurs	Matsukura et al. (1977)
rat	orale dans la farine	2000 mg/kg; 78 semaines, étude achevée au bout de 27 mois	aucune augmentation de l'incidence des tumeurs	Lijinsky et al. (1980)
rat	orale dans la viande fumée	200 et 5000 mg/kg 29 mois	aucune augmentation de l'incidence des tumeurs	Van Logten et al. (1972)

* NMBA = nitrosométhylbenzylamine

Tableau III :Expériences concernant les effets foetotoxiques et tératogènes du nitrate et du nitrite

Espèce	Voie	Dose	Résultats	Référence
cobaye	orale dans eau de boisson	300, 2500, 10000 et 30000 mg/l, 143 - 204 jours	baisse de la fécondité, comportement sexuel très altéré et diminution du nombres d'animaux gravides à 30000 mg	Sleight et al. (1968)
cobaye	orale dans eau de boisson (NaNO ₂)	300, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 et 10000 mg/l 100 - 240 jours	100% de mortalité foetale à 5000 et 10000 mg/l inhibition de la croissance à 10000 mg/l	Sleight et al. (1968)
cobaye	sous-cutanée (NaNO ₂)	50 et 60 mg/kg poids corporel	à 50 mg/kg parturition à 60 mg/kg augmentation de la mortalité foetale et des avortements; on peut prévenir la morti-natalité par l'injection de 10 mg de bleu de méthylène/kg de poids corporel	Sinha et al. (1971)
rat	orale dans eau de boisson	2000 et 3000 mg/l	anémie, taux élevé de metHb chez les animaux gravides; inhibition de la croissance et mortalité accrue de la descendance	Shuval et al. (1972)
rat	orale dans les aliments (NaNO ₂)	3 et 10 g/kg	aucun effet embryotoxique ou tératogène	Alexandrov et al. (1971)
rat: étude sur 2 gé-nérations	orale dans l'alimentation	240 -460 mg/kg	aucun effet sur l'étendue de la portée, la mortalité néonale, la durée de vie ou le taux de croissance	Shank et al. (1976)
rat: étude sur les effets tératogènes	orale dans la viande (NaNO ₂)	0,2; 1; 4; g/kg	aucun effet sur la fécondité, sur les pertes durant la pré-implantation et sur les résorptions; aucun changement dans la dimension de la portée, la répartition par sexe et le poids moyen des petits ; aucune augmentation des malformations	Cartensen et al. (1972)
mouton	orale dans le foin orale dans eau de boisson	11% NO ₃ -N 0,07; 0,14; 0,28% NO ₃ -N 41-74 jours jusqu'à la parturition	à des doses donnant des niveaux élevés de metHb aucun accroissement du nombre d'avortements	Davison et al. (1965)
vache	orale sur du foin haché	- 4 vaches traitées au nitrate de sodium donnant 20-30% metHb - 9 vaches traitées au nitrate de sodium donnant 40-50% metHb - 4 vaches traitées au nitrate de sodium donnant 40-50% metHb (entre 100 et 150 mg de NO ₃ -N/kg) 7 mois	à des doses donnant des taux de 20-30% et de 40-50% de metHb : - aucun effet sur la capacité de reproduction - aucun accroissement du nombre d'avortements	Winter et al. (1964)

Tableau IV : Résultats d'études épidémiologiques sur la relation entre le taux de nitrate dans l'eau potable, les aliments ou le milieu de travail et les cancers gastriques					
Voie d'exposition au nitrate	Origine de la population	Nombre de personnes dans chaque zone	Paramètres	Résultats et corrélation avec le cancer gastrique	Auteurs
eau potable	202 zones urbaines dans 25 provinces du Chili	population totale	- teneur en nitrate de l'eau potable - taux de décès par cancers gastrique	- teneur en nitrate de 0-30 mg/l; dans 2 provinces > 11,3 mg/l - aucun lien entre la teneur en nitrate et le cancer gastrique	Zaldivar et Wettstrand 1978
eau potable	population d'Aalborg et d'Aarhus (Danemark)	population totale	- teneur en nitrate de l'eau potable - mortalité par cancer gastrique	- teneur en nitrate à Aalborg 6,8 mg NO ₃ -N/l - à Aarhus taux plus faible - aucune corrélation	Jensen et al. 1973
eau potable	- ville minière, ancienne teneur en nitrate de 90 mg/NO ₃ /l - 5 villes minières voisines - 4 villes minières, Angleterre	Statistiques pour l'ensemble de la population sur le taux de décès par cancer gastrique	- taux de décès par cancer gastrique - ingestion de nitrate calculée à partir de la consommation supposée d'aliments et d'eau	- taux urinaires de nitrate plus élevés dans les villes minières que dans les villes témoins - corrélation positive entre le taux de nitrate et le cancer gastrique chez les femmes	Hill et al. 1973
eau potable	même population que ci-dessus	population totale comme ci-dessus	mortalité par cancer gastrique entre 1958 et 1975	- données corrigées pour la zone minière et la classe sociale - mortalité par cancer gastrique chez les femmes : accroissement non significatif, aucune corrélation	Davies 1980
eau potable	253 zones urbaines d'Angleterre	population totale	- données sur la mortalité pour la période 1969-1973 par rapport à la consommation d'eau	- aucune corrélation, même en limitant l'analyse aux zones urbaines dont l'eau a une teneur en nitrate supérieure au maximum fixé par la CEE (50 mg de NO ₃ /l)	Beresford 1985
eau potable	753 communes du nord de la France	population totale	- incidence des cancers digestifs et urinaires (1968-1975) - concentration de nitrate	- concentration moyenne de nitrate inférieure à 95 mg de NO ₃ /l, 93% au-dessous de 43 mg de NO ₃ /l - aucune corrélation entre la concentration de	Vincent et al. 1983

Tableau IV : Résultats d'études épidémiologiques sur la relation entre le taux de nitrate dans l'eau potable, les aliments ou le milieu de travail et les cancers gastriques					
Voie d'exposition au nitrate	Origine de la population	Nombre de personnes dans chaque zone	Paramètres	Résultats et corrélation avec le cancer gastrique	Auteurs
eau potable	population de 230 localités de Szabolcs-Szatmar (Hongrie)	population totale	mesurée pour la période 1974 - 1976 - incidence des cancers gastriques - teneur en nitrate de l'eau des puits	nitrate et les taux de mortalité par cancers digestif et urinaire - aucune corrélation	Juhasz et al. 1980
eau potable	volontaires	25 et 10	teneur en nitrate salivaire	- eau potable contenant 50 mg de NO ₃ /l : aucun changement significatif des teneurs salivaire en nitrite - eau potable contenant 200 mg de NO ₃ /l : augmentation des teneurs en nitrite salivaire uniformément constatées	Hart et Walters 1983
eau potable	écoliers de 11 à 13 ans au Chili	population étudiée : - 2 zones à forte mortalité par cancer gastrique - 2 zones à faible mortalité par cancer gastrique	- teneurs en nitrate urinaire - teneurs en nitrite salivaire - teneurs en nitrite et en nitrate de légumes sélectionnés	- teneurs en nitrate urinaire supérieure chez les enfants de la zone à faible risque - teneurs en nitrite salivaire analogues dans les deux zones - aucune corrélation entre l'ingestion de nitrate et la fréquence des cancers gastriques	Armijo et al. 1981b
aliments	résidents rendant visite à des malades hospitalisés venant de 2 zones à risque élevé et de 2 zones à faible risque de cancer gastrique en Angleterre	entre 200 et 250 pour chaque zone	teneur en nitrate et en nitrite de la salive (pour l'estimation de l'exposition)	- dans la population à faible risque les teneurs en nitrate et nitrite salivaires avaient notablement augmentés - tendance inverse à la tendance pour le cancer de l'estomac	Forman et al. 1985
exposition environnementale due aux engrais naturels	25 provinces du Chili	population des provinces mentionnées	- taux de mortalité par cancer de l'estomac durant la période 1957-1971 - données concernant l'usage de nitrates pour la	corrélation élevée entre les taux de mortalité et l'exposition cumulative par habitant aux engrais azotés	Armijo et al. 1975

Tableau IV : Résultats d'études épidémiologiques sur la relation entre le taux de nitrate dans l'eau potable, les aliments ou le milieu de travail et les cancers gastriques					
Voie d'exposition au nitrate	Origine de la population	Nombre de personnes dans chaque zone	Paramètres	Résultats et corrélation avec le cancer gastrique	Auteurs
			période 1945-1972		
pollution de l'environnement par les engrais naturels	25 provinces du Chili	population des provinces mentionnées	- nitrates par unité de surface (kg/ha) - taux de mortalité par cancer de l'estomac	lien significatif entre la charge de nitrate et le cancer gastrique	Zaldivar 1977
milieu professionnel	fabricants d'engrais	- base de données de 2 cohortes concernant des hommes de 35 à 64 ans entre 1961 et 1971 travaillant à la fabrication d'engrais ou de pesticides	- mortalité par cancer - fréquence d'exposition à du nitrate contenant de la poussière	faibles preuves de lien entre la mortalité par cancer et la fréquence d'exposition à du nitrate contenant de la poussière	Fraser et al. 1982

Tableau V : Résultats d'études épidémiologiques sur le taux de nitrate présent chez les personnes souffrant de troubles gastriques					
Voie d'exposition au nitrate	Origine de la population	Nombre de personnes dans chaque zone	Paramètres	Résultats et corrélation avec le cancer gastrique	Auteurs
alimentation	Toronto, Winnipeg et St Johns (Canada)	- 246 cas de cancers gastriques vérifiés par examens histologiques - 246 sujets contrôles appariés	- consommation journalière de denrées alimentaires calculée à partir des réponses à un questionnaire	- diminution du risque avec une consommation de nitrate calculée - lien entre la consommation journalière de nitrate et l'augmentation du risque de cancer gastrique - les agrumes ont un certain effet protecteur, la vitamine C dans une moindre mesure, la vitamine E n'en a aucun	Risch et al. 1985
Travail dans l'agriculture (engrais)	malades de 7 régions agricoles du Chili à très forte fréquence de cancer de l'estomac	- 360 cas d'adénocarcinomes confirmés - 360 sujets contrôles appariés	- incidence des cancers de l'estomac - activité professionnelle agricole	- contrairement aux sujets témoins les malades avaient longtemps résidés dans les régions à haut risque pendant leur jeunesse - lien entre le cancer de l'estomac et une activité professionnelle antérieure dans le secteur agricole	Armijo et al. 1981a
alimentation	40.824 personnes de 6 régions à risque élevé et de 4 régions à risque faible de cancer de l'estomac (Chine)	sur les 8644 personnes de ce groupe souffrant de troubles gastriques chroniques, 3789 ont été soumises à une biopsie de la muqueuse gastrique (1995 hommes et 1794 femmes)	- biopsie gastrique - teneur de la salive et du suc gastrique en nitrate et en nitrite - pH; teneur en acides libres, nombre total de bactéries et présence de champignons dans le contenu de l'estomac	- incidence des gastrites atrophiques accrue dans les régions à haut risque et corrélation significative avec la mortalité par cancer de l'estomac - chez les patients des régions à haut risque, la concentration d'acides libres dans le suc gastrique était inférieure, mais le pH, le nombre de bactéries capables de réduction du nitrate, les champignons et la concentration en nitrite étaient relativement élevés	Ru-fu et al. 1984
aliments et eau potable	malades d'hôpi-taux de Narino (Colombie) venant de 2 régions à risque faible et de 2	- 276 patients atteints de cancer de l'estomac - 276 sujets témoins appariés - 173 sources	- concentration de nitrate dans l'eau des puits - nitrate et nitrite salivaire	- faible teneur en nitrate de l'eau - corrélation positive entre le risque de cancer gastrique et la fréquence des gastrites atrophiques chroniques; la teneur en nitrate de l'eau des puits et les excrétiens	Cuello et al. 1976

Tableau V : Résultats d'études épidémiologiques sur le taux de nitrate présent chez les personnes souffrant de troubles gastriques						
Voie d'exposition au nitrate	Origine de la population	Nombre de personnes dans chaque zone	Paramètres	Résultats et corrélation avec le cancer gastrique	Auteurs	
	régions à risque élevé de cancer de l'estomac	d'approvisionnement en eau	- nitrate et nitrite urinaire	de nitrate de la population - relation entre les excréctions urinaires et l'ingestion de nitrate		
	population des hautes régions andines à risque de cancer gastrique très élevé (Colombie)	- 55 patients à pathologies gastrique non définie antérieurement - 18 patients à pathologie gastrique diagnostiquée liée à un état pré-cancéreux	- comparaison entre le pH < ou = 5 et les cas de pH > 5 - pH, nitrite et nitrate gastriques	- pour un pH > 5, concentration de nitrite dans le suc gastrique 20 à 100 fois plus élevée - les patients à pathologie gastrique diagnostiquée liée à un état pré-cancéreux présentaient un niveau plus élevé de précurseur cancérigène putatif	Tannebaum et al. 1979	
alimentation, eau potable et mode de vie	patients souffrant de troubles gastriques (Angleterre)	- 217 patients souffrant de troubles communs de l'appareil gastro-intestinal supérieur - 50 sujets témoins sains	dans le suc gastrique à jeun: - teneur en nitrite - concentration de composés N-nitrosés - pH - concentration de bactéries capables de réduire les nitrates	- relation entre le pH, le nitrite, les bactéries capables de réduire le nitrate et les N-nitrosamines dans le suc gastrique - lien possible avec le cancer de l'estomac	Reed et al. 1981a	
alimentation eau potable et mode de vie	patients souffrant de troubles gastriques (Angleterre)	- 140 patients prenant de la cimétidine - 267 personnes (y compris volontaires sains) ne prenant pas de cimétidine	dans le suc gastrique à jeun: - teneur en nitrite - concentration de composés N-nitrosés - pH - concentration de bactéries capables de réduire les nitrates	- chez les patients traités à la cimé-tidine, élévation notable des concentrations de composés N-nitrosés et des taux de pH; élévation fréquente du taux de nitrite gastrique - lien possible avec le cancer de l'estomac	Reed et al. 1981b	
	patients souffrant d'anémie	- 13 patients à jeun - 13 sujets témoins d'âge	dans le suc gastrique à jeun:	- concentration moyenne de nitrite près de 50 fois plus élevée chez les malades	Ruddell et al. 1978	

Tableau V : Résultats d'études épidémiologiques sur le taux de nitrate présent chez les personnes souffrant de troubles gastriques						
Voie d'exposition au nitrate	Origine de la population	Nombre de personnes dans chaque zone	Paramètres	Résultats et corrélation avec le cancer gastrique	Auteurs	
	pernicieuse et sujets témoins (Angleterre)	équivalent	- concentration de nitrite - nombre de bactéries	- nombre de bactéries également beaucoup plus grand - lien possible avec le cancer de l'estomac	Schlag et al. 1982	
	108 patients soumis à une gastroscopie	- 20 ulcères du duodénum - 11 ulcères gastriques bénins - 32 maladies inflammatoires de la muqueuse gastrique - 19 gastrites atrophiques - 20 sujets témoins	- teneur en nitrite et en nitrosamine du suc gastrique	- teneurs en nitrite et en nitrosamine notablement plus élevées chez les patients souffrant de gastrite atrophique - rapport entre l'exposition constante aux composés N-nitrosés de la muqueuse gastrique atteinte et l'incidence importante des cancers gastriques dans les cas de gastrite atrophique		
alimentation	56 personnes avant et après une opération de l'estomac	56 personnes	dans le suc gastrique - pH - nombre total de bactéries capables de réduire le nitrate	- pH moyens des échantillons post-opératoires notablement plus élevés que ceux des échantillons pré-opératoires - corrélation positive avec le pH et la concentration de bactéries réduisant le nitrate et le nitrite	Kyrtopoulos et al. 1985a	

VIII. RECHERCHES RECENTES ET SUGGESTIONS

1. Etude de 90 jours sur la toxicité orale sub-chronique du nitrite de potassium chez le rat

CIVO/Zeist ont rendu compte de cette étude en décembre 1987 (voir résumé en annexe V). On a observé chez les deux sexes une légère hypertrophie de la zone glomérulée surrénalienne en rapport avec la dose administrée. Le taux de KNO_2 ne provoquant pas ce phénomène était inférieur à 100 mg/l d'eau potable, ce qui équivaut à un niveau inférieur à 10 mg/kg de poids corporel/jour.

Un compte rendu de recherches a paru dans *Fd Chem. Toxic.* Vol. 26, n° 10, pp 851-859, 1988.

2. Toxicité chronique du nitrite de sodium chez le rat mâle F 344

Les résultats d'une étude du BIBRA, effectuée sur plus de deux ans en administrant du nitrite dans une alimentation pauvre en protéines aux doses de 0,2 ou 0,5 % (poids pour poids) de nitrite de sodium, ont paru dans *Fd Chem. Toxic.* Vol. 27, n° 9, pp 565-571, 1989.

Dans les conditions décrites, il a été constaté que le nitrite de sodium n'était pas cancérogène.

3. Rapport du Comité scientifique de la CEE sur le nitrite et le nitrate (à paraître)

La toxicologie des nitrites et des nitrates fait également l'objet d'une étude dans le cadre de la CEE, axée spécialement sur l'emploi de ces substances comme additifs. Il apparaîtra que les légumes contribuent plus que les additifs à l'exposition au nitrate.

Il sera tenu compte également du rôle des nitrates provenant de l'eau potable.

La formation de nitrosamines dans le tractus gastro-intestinal humain retient également l'attention.

4. Etudes récentes effectuées aux Pays-Bas

Des rapports relatifs à de nouvelles expériences sur l'alimentation des animaux et des informations sur le futur programme de recherche néerlandais ne sont pas encore parus. Les expériences effectuées jusqu'ici montrent qu'il faudra étudier plus en profondeur le mécanisme d'action du nitrite dans le corps humain avant de pouvoir parvenir à des conclusions quant à son importance pour la santé humaine.

A cet effet, les investigations suivantes sont envisagées :

1. Investigation du mécanisme de toxicité de nitrite (nitrate) et établissement de modèle de l'exposition (toxicokinétique et toxicodynamique)
2. Modèle d'extrapolation pour le comportement toxicodynamique de nitrate/nitrite chez l'homme
3. Etude de toxicité orale du nitrate chez l'homme.

5. Suggestions concernant les démarches futures

Compte tenu de l'importance des évaluations toxicologiques que les études mentionnées au paragraphe 4 feront probablement apparaître, on pourrait déjà envisager les actions suivantes:

- a. Il faudrait encourager des améliorations de l'horticulture susceptibles de conduire à une réduction de la teneur en nitrate de certains types de légumes. A la suite de ces progrès, les bonnes pratiques horticoles pourraient être définies en fonction des limites officielles fixées pour la teneur en nitrates de ces légumes.

- b. Des recommandations à l'adresse du public concernant la consommation régulière de certains types de légumes pourraient compléter l'action susmentionnée. Des recommandations dans ce domaine pourraient se justifier notamment pour certains groupes à risque.

IIème PARTIE ANNEXE I

1. Cinétique chimiobiologique et métabolisme

1.1 Observations sur l'animal - nitrate

Absorption

Chez le rat, le nitrate ingéré est essentiellement absorbé à partir de la portion supérieure de l'intestin grêle et peu, voire pas du tout, à partir de l'estomac et de la partie inférieure de l'intestin (iléon terminal, caecum et côlon proximal). L'absorption est rapide puisque dans l'heure qui suit l'administration par gavage de $^{13}\text{NO}_3$, on retrouve 50% du marquage radioactif dans la carcasse des rats éviscérés (Witter et al., 1979 a, b; Balish et al., 1981).

Chez les bovins, il a été montré que le nitrate est absorbé au niveau de la panse. Le taux de nitrate dans le sang culminait 4 heures après un gavage dans la panse. Quand la même quantité de nitrate était administrée dans le foin, l'absorption était plus lente en raison de la vitesse d'ingestion plus faible, et la concentration sanguine en nitrate se maintenait à un niveau sensiblement plus bas. (Wright et Davison, 1964).

Il a été montré que, chez la souris et le lapin, une absorption de nitrate a lieu au niveau de la partie supérieure de l'appareil respiratoire dans les 5 minutes qui suivent l'administration intratrachéale (Parks et al. 1981).

Distribution

Le taux de nitrate dans les fluides et les tissus des animaux de laboratoire est normalement faible (Witter et Balish, 1979; Fritsch et al., 1985). Une valeur de 6 à 10 mg/l (= 0,1 - 0,15 mM) correspond à un taux normal de nitrate plasmatique chez des chiens hybrides (Fritsch et al., 1985).

Une partie du nitrate du sang passe dans les glandes salivaires puis est sécrété sous forme de salive chez la plupart des animaux de laboratoire sauf le rat (Fritsch et al., 1985; Nighat et al., 1981; Witter et Balish, 1979). Le passage du nitrate sanguin dans la salive s'effectue probablement par l'intermédiaire de vecteurs actifs utilisés également par les iodures et les thiocyanates entre autres (SCN) (NAS, 1981), mais chez le rat, ce système de transport actif fait défaut (Cohen et Myant (1959) cités par Mirvish) (1983).

Le nitrate absorbé peut retourner dans l'estomac et dans l'intestin par le biais de la circulation sanguine et des sécrétions. La sécrétion de nitrate dans l'estomac peut s'effectuer par l'intermédiaire de vecteurs actifs semblables à ceux qui se trouvent dans les glandes salivaires (cité par Edwards et al., 1954). Il a été montré que le nitrate présent dans la partie inférieure de l'intestin du rat provient directement du sang ou des sécrétions intestinales plutôt que du transport du contenu de l'estomac ou de sécrétions de bile et de suc pancréatique (Witter et al., 1979a). Le rat peut cependant constituer une exception en raison de son aptitude à excréter des iodures dans l'intestin grêle, ce qui ne se produit probablement pas chez les autres espèces animales (Acland et Illman (1959) et Brown-Grant (1961), cités par le NAS, 1981)).

Un équilibre avec les fluides extracellulaires est atteint dans les 5 minutes qui suivent l'injection intraveineuse de nitrate marqué ^{13}N à des souris et des lapins (Parks et al., 1981).

L'instillation intratrachéale de nitrate marqué ^{13}N à des souris et des lapins donne des

résultats similaires (Parks et al., 1981).

Vingt minutes après l'injection intraveineuse de $^{13}\text{NO}_3$ à des rats, 16% de la radioactivité a été détectée dans l'estomac et dans l'intestin des animaux, 7% dans le foie, les reins et la vessie et 70 % dans la carcasse éviscérée (Witter et al., 1979). Les glandes salivaires n'ont pas été examinées.

Le nitrate passe dans le lait. Le taux de nitrate dosé dans le lait de rates et de vaches allaitantes auxquelles des doses élevées de nitrate avaient été administrées était élevé (Ariga et al., 1984; Nijhuis et al., 1982). Il est fréquent aussi de déceler du nitrate dans le lait de vaches non allaitantes (NAS, 1981). La concentration de nitrate dans le lait après injection intraveineuse de nitrate n'excédait toutefois pas sa concentration plasmatique chez un chien beagle (Green et al., 1982) ce qui indique que, contrairement à la sécrétion salivaire, le transport du nitrate dans le lait n'est pas un processus actif.

Biotransformation

Le principal métabolite du nitrate est le nitrite. Ce nitrite est toutefois converti rapidement - voir 1.2 biotransformation - et il peut être difficile à détecter. C'est pourquoi on utilise souvent la formation de méthémoglobine (dont est responsable le nitrite, voir 1.2 formation de méthémoglobine) comme indicateur de la formation de nitrite. Cette mesure peut cependant manquer de sensibilité (Ward et al., 1986).

Il a été observé qu'une partie du nitrate ingéré par des rats CV (possédant une flore intestinale normale) est métabolisée en NH_4^+ et en urée - ce qui n'est pas le cas chez des rats GF (axéniques) (Green et al., 1981; Schultz et al., 1985).

La réduction bactérienne est un mécanisme important pour la conversion du nitrate chez les mammifères (Witter et Balish, 1979; Green et al., 1981; Schultz et al., 1985). De nombreuses bactéries et d'autres micro-organismes qui se trouvent normalement dans le tractus gastro-intestinal possèdent une nitrate réductase (OMS, 1985).

Turet et al (1980) ont observé que, chez les porcs, la réduction du nitrate par la flore fécale en milieu anaérobie est plus rapide si les animaux ont reçu une alimentation riche en nitrate pendant une longue période, ce qui suggère l'éventualité d'une sélection ou d'une induction bactérienne. Wise et al. (1982) ont observé chez le rat une augmentation considérable de la production de nitrite dans le caecum si l'on ajoute 5% de pectine à la nourriture de l'animal. D'après ces auteurs, cette augmentation ne peut pas être attribuée à des différences globales de la diversité ou du nombre de micro-organismes, ce qui donne du poids à la thèse de l'induction bactérienne.

Une activité de nitrate réductase a également été démontrée dans divers tissus chez le rat (OMS, 1985; Ward et al., 1986) Schultz et al (1985) ont noté que, chez le rat, 90% de l'activité de nitrate réductase dans l'ensemble des tissus de ce mammifère se produisait dans le foie.

Les mêmes auteurs ont calculé, à partir de l'excrétion urinaire de nitrate consécutive à une injection intrapéritonéale de nitrate à des rats CV et GF, qu'environ la moitié du nitrate métabolisé chez des rats CV (soit 20 - 23% du nitrate injecté vu qu'une proportion de 40 à 45% est métabolisée) l'a été par des processus propres aux mammifères et l'autre moitié par les bactéries entériques.

Chez le furet, 67% d'une dose élevée de $^{15}\text{NO}_3$ administrée en une fois par voie orale ont été métabolisés (Dull et Hotchkiss, 1984). Le furet est peut-être un animal plus approprié que le rat pour effectuer ces expériences car son acidité gastrique de base et la morphologie de son estomac sont plus proches de celles de l'être humain.

Chez l'homme, et probablement chez la plupart des espèces animales, la réduction du nitrate a principalement lieu dans la cavité buccale (salive). Elle peut également se produire au niveau du tractus gastro-intestinal; toutefois, la conversion du nitrate étant sensible au pH, elle ne peut pas avoir lieu dans l'estomac de la plupart des animaux monogastriques (Wright et Davidson, 1964; Mirvish et al., 1975).

La panse des ruminants ainsi que le caecum et le côlon des chevaux, qui sont volumineux, sont particulièrement bien adaptés à la réduction du nitrate à cause de la densité de la population microbienne et du pH relativement élevé (Wright et Davidson, 1964).

Chez le lapin et le furet, le pH gastrique moyen est bas et on peut par conséquent estimer qu'il est analogue à celui de l'être humain (Sen et al., 1969; Dull et Hotchkiss, 1984); il est plus élevé chez le chat, le rat et le chien (2,9, 4-5 et 5,4 - 7,4 respectivement - Sen et al., 1969). Chez le rat GF, le pH des diverses parties du tractus gastro-intestinal est sensiblement plus élevé que chez le rat CV (Ward et al., 1986).

La réduction du nitrate salivaire est presque inexistante chez le rat (Witter et al., 1979a; Til, 1986), ce qui est probablement dû à la faible sécrétion de nitrate salivaire chez cette espèce.

Excrétion

L'excrétion de nitrate dans l'urine correspond généralement à l'absorption de ce produit. Plusieurs auteurs ont pourtant signalé que l'excrétion urinaire de nitrate peut excéder l'absorption si cette dernière est faible, en raison de la formation de nitrate endogène (voir la section biosynthèse ci-dessous).

Chez des rats CV, environ 55% du nitrate ¹⁵N administré par voie orale était excrété tel quel dans l'urine. 11% du marquage a été retrouvé sous forme d'ammoniaque et d'urée urinaire (Schultz et al., 1985). Le nitrate étant faiblement, voire pas du tout, excrété dans les fèces des rats CV et GF (Green et al., 1981), il reste donc 34% de la radioactivité qui n'ont pas été retrouvés (Schultz et al., 1985).

Chez le furet, l'excrétion urinaire représentait 36% de la quantité ingérée. Les composés azotés n'ont pas été examinés (Dull et Hotchkiss, 1984).

Fritsch et al. (1985) ont découvert que, chez le chien, le nitrate peut être excrété dans la salive et dans la bile à des concentrations similaires au taux de nitrate plasmatique.

Il a été montré que le temps nécessaire à l'élimination du nitrate plasmatique varie considérablement d'une espèce à l'autre. La demi-vie d'élimination du nitrate après une injection de nitrite - voir 1.2 oxydation - était de 45 heures chez le chien, alors qu'elle ne dépassait pas 4 heures chez le mouton et le poney (Schneider et Yeary, 1975).

Biosynthèse

Lorsque la quantité de nitrate absorbée est faible, la quantité excrétée dans l'urine dépasse généralement la quantité ingérée. Cette observation de Green et al. (1981) dans le cas des rat CV et GF donne à penser qu'une synthèse de novo de nitrate a eu lieu chez l'animal. En outre, le fait que l'excrétion soit plus importante que l'ingestion chez les rats GF aussi bien que chez les rats CV montre que l'activité bactérienne n'est pas indispensable à cette synthèse.

L'inhalation d'oxydes azotés se trouvant dans l'air pourrait tout au plus rendre compte de 1% de l'excès de nitrate excrété (Green et al., 1981).

La preuve incontestable de l'existence d'une biosynthèse du nitrate a été apportée par Dull et Hotchkiss (1984) pour le furet et par Saul et Archer (1984) ainsi que Wagner et al. (1983a) pour le rat. Ils ont observé que l'ingestion de sels d'ammonium marqués ^{15}N était invariablement suivie de l'excrétion urinaire de faibles quantités de nitrate marqué ^{15}N .

L'ammoniaque pourrait être d'abord oxydé pour former de l'hydroxylamine, réaction catalysée par la production de radicaux libres, cette dernière étant elle-même oxydée sous forme de nitrate (Wagner et al., 1983a). Cette hypothèse a été confirmée par la synthèse expérimentale de nitrate *in vivo* à partir d'hydroxylamine et par l'accroissement de la synthèse de nitrate à partir d'ammoniaque par des rats traités avec une endotoxine induisant la formation de radicaux libres (Saul et Archer, 1984; Wagner et al., 1983a). Wagner et al., (1983a) ont montré que l'excrétion urinaire de nitrate était multipliée par un facteur 9 après une injection intrapéritonéale de lipopolysaccharides d'E. coli, alors que l'absorption de nitrate restait inchangée. Stuer et Marletta (1985) ont découvert qu'une infection par Mycobacterium bovis pouvait accroître l'excrétion urinaire de nitrate chez la souris de 3,6 à 164 mg/kg de p.c. Ces deux études indiquent que la synthèse endogène de nitrate peut être considérablement augmentée en cas d'inflammation.

1.2 Observations sur l'animal - nitrite

Absorption

Le nitrite d'une solution tampon d'un pH inférieur à 5 (dans des conditions gastriques simulées) disparaît rapidement et la vitesse à laquelle il disparaît est accélérée par la présence d'aliments (Mirvish et al., 1975). Le nitrite est également susceptible de réagir avec le contenu gastrique (par exemple par nitrosation, OMS 1985) ou de subir une réduction par la flore gastro-intestinale (voir ci-dessous le paragraphe consacré à la réduction). Une grande partie du nitrite qui pénètre dans l'appareil gastro-intestinal peut donc avoir disparu avant qu'une absorption ait lieu.

L'absorption de nitrite-azote est plus lente que celle de nitrate dans l'appareil gastro-intestinal du rat. Quarante-cinq minutes après l'instillation intragastrique de nitrite marqué ^{13}N , la radioactivité était plus élevée dans l'estomac et plus faible dans les organes (foie, reins et vessie) et la carcasse éviscérée que lors d'expériences similaires effectuées avec du nitrate marqué au ^{13}N (Witter et al., 1979b).

Le nitrite ne peut pas être absorbé au niveau du caecum et du gros intestin chez le rat (Witter et Balish, 1979). Par contre, des études effectuées chez le rat et chez la souris à l'aide d'un marquage ou en vidant l'estomac ont révélé une absorption gastrique du nitrite (Witter et al., 1979b; Murvish et al., 1975). Il semble que celle-ci soit plus rapide chez la souris que chez le rat (Friedman et al., 1972).

Distribution

Les fluides corporels et les tissus d'animaux de laboratoire ne contiennent normalement pas de nitrite (Witter et Balish, 1979; Fritsch et al., 1985).

L'injection intraveineuse et l'instillation intratrachéale de nitrite marqué ^{13}N à des souris et des lapins ont abouti dans les deux cas, dans les cinq minutes, à une distribution homogène de la radioactivité dans le coeur, les reins, le foie, l'estomac, les intestins, les poumons et la vessie, semblable à la distribution du nitrate (Parks et al., 1981). Par contre, 30 minutes après l'injection

intraveineuse de nitrite à des chiens, on n'est pas parvenu à déceler que de faibles quantités de ce produit dans le sang et la salive (Fritsch et al., 1985).

La demi-vie plasmatique du nitrite pendant sa période de distribution était de 48 minutes chez le chien, de 12 minutes chez le mouton et de 5 minutes chez le poney (Schneider et Yeary, 1975).

Le nitrite peut franchir la barrière placentaire chez le rat et le cobaye: du nitrite injecté à des femelles pendant la période de gestation a été retrouvé dans le sang foetal - à une concentration plus faible que dans le sang maternel - après un laps de temps d'environ 20 minutes (Gruener et al., 1973; Sinha et Sleight, 1971).

Il est cependant improbable que de grandes quantités de nitrite passent dans le lait: l'administration à des rates allaitantes de doses provoquant une méthémoglobinémie n'avait pas les mêmes effets néfastes chez les petits allaités (Gruener et al., 1973).

Biotransformation

Réduction

Des rats CV auxquels on avait administré une dose de 1000 mg/l de nitrite par le biais de l'eau de boisson présentaient un taux plus faible de nitrite dans leurs tissus intestinaux et gastriques que des rats GF, alors que le taux de nitrate était approximativement le même. Cela indique que l'absorption de nitrite est la même dans les deux groupes mais que la conversion est plus rapide chez les rats CV. Des expériences *in vitro* ont confirmé que les bactéries de la flore intestinale participent à la réduction du nitrite (Balish et al., 1981; Witter et Balish, 1979).

Oxydation

Le nitrite absorbé est rapidement oxydé en nitrate dans le sang (Witter et Balish, 1979; Fritsch et al., 1985; Parks et al., 1981). Il s'agit, estime-t-on, d'un processus propre aux mammifères et non d'un processus bactérien (Witter et Balish, 1979). L'injection intraveineuse de nitrite de sodium (20 mg/ kg de p.c.) à des chiens, des moutons et des poneys a abouti en quelques minutes à des taux de nitrate plasmatique de 40 à 100 mg/l (= 0,6 - 1,5 mM) chez les trois espèces (Schneider et Yeary, 1975).

La transformation du nitrite en nitrate par oxydation peut également se produire dans l'estomac avant l'absorption, comme on l'a démontré *in vitro* pour la souris. Néanmoins, *in vivo*, le nitrite est probablement absorbé au niveau de l'estomac avant qu'il ne se forme de grandes quantités de nitrate (Friedman et al., 1972).

Formation de méthémoglobine

Le nitrite participe à l'oxydation de l'hémoglobine (Hb), qui se trouve normalement dans le sang, en méthémoglobine (métHb). L'atome de Fe^{2+} présent dans l'hème prend par oxydation sa forme Fe^{3+} et le nitrite se lie solidement à cet hème oxydé. Le transport de l'oxygène du sang se trouve par conséquent inhibé (Jaffé, 1981).

La vitesse de formation de la métHb varie considérablement d'une espèce à l'autre. Elle est beaucoup plus grande lors de l'incubation d'une solution de nitrite de sodium fraîchement préparée avec une solution d'Hb de ruminants (mouton, chèvre, bovins) qu'avec de l'Hb d'origine humaine ou équine, alors qu'elle est plus faible avec de l'Hb de porc (Smith et Beutler, 1966).

Lorsque la concentration en nitrite est faible, la formation de MétHb est réversible; il a été montré que le taux de réduction de la métHb en Hb normale, par catalyse sous l'effet d'enzyme, la NADPH-métHb réductase, varie également d'une espèce à l'autre; la corrélation entre le taux de formation et le taux de réduction de la métHb est étroite (Smith et Beutler, 1966).

Le bleu de méthylène a un effet protecteur vis-à-vis de la formation de métHb induite par le nitrate (Sheehy et Way, 1974) et on peut par conséquent l'utiliser comme antidote en cas d'intoxication par le nitrite; on l'utilise également pour déterminer si certains effets toxiques se produisent par l'intermédiaire du nitrite et de la métHb ou d'autres substances, par exemple dans le cadre d'études relatives à l'absorption alimentaire de nitrate.

Des facteurs alimentaires peuvent avoir un effet protecteur vis-à-vis de la formation de métHb: l'addition d'acide ascorbique et de méthionine à la nourriture de cobayes a réduit la quantité de métHb induite par le nitrite, alors que des cobayes carencés en vitamine C avaient un taux de métHb induite par le nitrite supérieur à celui des animaux témoins (plusieurs auteurs, cités dans le document de l'OMS, 1977).

Des facteurs alimentaires peuvent également renforcer les effets du nitrate et du nitrite: une forte ingestion de pectine stimule la formation de nitrite à partir du nitrate absorbé et augmente par conséquent la formation de métHb chez le rat (Wise et al., 1982).

Il est probable que la réduction de la quantité de vitamine A dans le foie qui a été signalée à la suite de l'absorption de nitrite soit due à une réaction directe du nitrite avec le carotène avant l'absorption (OMS, 1977; Emerick, 1974).

Excrétion

L'excrétion urinaire et fécale du nitrite est très faible du fait que la plus grande partie du nitrite qui pénètre dans la circulation sanguine ou qui traverse le tractus gastro-intestinal est rapidement convertie en nitrate, liée au contenu gastro-intestinal ou réduite par les bactéries entériques. Le nitrite n'est pas sécrété dans la bile ou dans la salive en quantité considérable (Fritsch et al., 1985).

La demi-vie d'élimination du nitrite (métabolisme plus excrétion urinaire), est similaire chez le chien, le mouton et le poney (0,5 heure) (Schneider et Yeary, 1975).

1.3 Observations sur l'homme - nitrate

Absorption

Chez l'homme, le nitrate ingéré est essentiellement absorbé à partir de la portion supérieure de l'appareil digestif (Bartholomew et Hill, 1984; Witter et al., 1979a). L'absorption est rapide puisque les taux maxima de nitrate dans le sérum, la salive et l'urine ont été observés par plusieurs chercheurs entre une et trois heures après ingestion de nitrate par le biais de denrées alimentaires et de boissons, (Bartholomew et Hill, 1984; Ellen et al., 1982b; Spiegelhalder et al., 1976; Turek et al., 1980).

Distribution

Le nitrate absorbé est rapidement distribué aux glandes salivaires et probablement également à d'autres glandes exocrines. De une à trois heures après l'ingestion, on peut observer un pic de concentration du nitrate dans la salive et dans la sueur. L'augmentation de la quantité de nitrate sécrétée par les glandes salivaires dépend directement de la quantité de nitrate ingérée (Spiegelhalder et al., 1976); (Bartholomew et Hill, 1984).

Le passage du nitrate dans les glandes salivaires s'effectue probablement par l'intermédiaire de vecteurs actifs. Edwards et al. (1954) ont signalé une inhibition de substrat de la sécrétion active d'iodure dans la salive par le nitrate ainsi que par le thiocyanate (SCN) et le perchlorate (ClO₄⁻). SNC⁻, iodures et ClO₄⁻ seraient donc également capables d'inhiber la sécrétion de nitrate dans la salive. Ce point pourrait être important pour les fumeurs chez lesquels le niveau de SNC⁻ est de trois à quatre fois plus élevé que chez les non-fumeurs (cité par Boyland et Walker, 1974). Forman et al. (1985) ont effectivement décelé un taux de nitrate plus faible dans la salive des fumeurs que dans celle des non-fumeurs.

Le taux de nitrate salivaire augmente généralement avec l'âge chez l'adulte (Forman et al., 1985). Toutefois ce taux dépend en grande partie de la quantité ingérée; les concentrations salivaires relevées chez des adultes s'échelonnent entre moins de 0,1mM après ingestion d'une petite quantité de nitrate (Turek et al., 1980) et plus de 40 mM après absorption d'une forte dose de nitrate (Ellen et al., 1982b). Les taux de nitrate salivaire relevés chez des nourrissons nourris au sein et au biberon étaient de 0,1 à 1,0 mM, avec une moyenne de 0,5 mM (Turek et al., 1980).

Après administration par voie intraveineuse de nitrate marqué au ¹³N à un volontaire, le marquage a rapidement été distribué dans tout le corps par la circulation sanguine. La radioactivité s'est accumulée de manière pratiquement linéaire en fonction du temps dans une petite région abdominale, ce qui était probablement dû au nitrate salivaire avalé (Witter et al., 1979a).

Le nitrate peut passer dans le lait. On a relevé des taux de nitrate pouvant atteindre 5 mg de NO₃/kg de lait (Sukegawa et Matsumoto, 1975). Néanmoins, le taux de nitrate dans le lait d'une mère allaitante après un dîner normal n'excédait pas le taux de nitrate plasmatique (Green et al., 1982, résultats non publiés).

Biotransformation

Une partie du nitrate est convertie en nitrite par des micro-organismes qui se trouvent dans la salive. On peut trouver dans la salive, sous forme de nitrite, de 4 à 7% du nitrate ingéré (Eisenbrand et al., 1980; Stephany et Schuller, 1980). De 1 à 2 heures après l'ingestion de diverses doses de nitrate, le rapport nitrite/nitrate dans la salive est remarquablement constant chez un individu mais peut varier considérablement d'une personne à l'autre (de 0,06 à 3,6, Bartholomew et Hill, 1984; Ellen et al., 1982b).

Certains facteurs peuvent modifier la flore microbienne buccale, comme le régime alimentaire, une infection, la température ambiante et l'âge. Une chute brutale de la température a provoqué un effondrement du taux de nitrite dans la salive, mais celui-ci peut avoir été provoqué par une augmentation de la sécrétion de salive aussi bien que par une réduction de l'activité microbienne (Eisenbrand et al. 1980). Le taux de nitrite salivaire est généralement plus élevé dans les groupes d'âge élevé, bien que des écarts considérables aient été observés d'une personne à l'autre (Eisenbrand et al. 1980; Forman et al., 1985). On considère qu'un pH gastrique faible (1 à 2) est normal chez un adulte à jeun; or la réduction bactérienne du nitrate ne se produit pas avec un pH peu élevé, en raison du faible développement bactérien.

Des valeurs élevées de pH gastrique accompagnées parfois de taux élevés de nitrite ont toutefois été observées chez des malades souffrant d'un cancer de l'estomac ou d'un ulcère gastrique et chez des patients atteints de gastrite atrophique ou traités avec de la cimétidine ou d'autres antiacides (Correa et al., 1975; Ruddell et al., 1976; Schlang et al., 1982; Bartsch et al., 1984).

Les nourrissons de moins de trois mois sont également très exposés à la réduction bactérienne du nitrate gastrique parce qu'ils produisent très peu d'acide gastrique (cité dans une analyse d'Ellen et

Schuller, 1983). Les infections gastro-intestinales, fréquentes chez eux, peuvent entraîner une augmentation supplémentaire de la réduction du nitrate en nitrite.

Ruddell et al., (1976) et Mueller et al., (1984) ont découvert que, contrairement à la supposition habituelle selon laquelle il serait normal que le pH gastrique soit bas, une grande partie des adultes normaux en bonne santé (30 - 40 %) ont, à jeun, un pH gastrique supérieur à 5 et relativement stable pendant une période prolongée, accompagné d'une activité bactérienne intense et d'un taux de nitrite élevé. Chez le tiers de 15 volontaires sains, il se produisait parfois des variations importantes du pH gastrique à jeun accompagnées de modifications correspondantes des paramètres biologiques (Mueller et al., 1984).

Schultz et al. (1985) ont développé, pour le sort du nitrate dans le corps humain un modèle reposant sur diverses données concernant l'homme et qui a été testé chez le rat. Ce modèle donne à penser que les bactéries du gros intestin sont responsables d'approximativement la moitié de l'élimination extrarénale du nitrate.

L'acide ascorbique n'affectait ni la quantité de nitrate excrétée dans l'urine, les fèces et la salive, ni le taux de nitrate plasmatique, ce qui indique qu'il n'interfère pas avec le métabolisme du nitrate (Wagner et al., 1983b).

On a constaté que la demi-vie du nitrate dans le corps humain est approximativement de 5 heures après son ingestion (Wagner et al., 1983b).

Excrétion

Des doses orales de 25 à 170 mg de nitrate de potassium se sont traduites par une excrétion de nitrate urinaire de 65 à 70% indépendamment de la dose. L'excrétion était maximale 5 heures après l'ingestion et retrouvait les niveaux de base dans les 18 heures. Des niveaux de base de 10 à 20 mg/l de nitrate urinaire ont été signalés chez des sujets à jeun (Bartholomew et Hill, 1984). Tannenbaum et Green (1981) ainsi que Wagner et al. (1983b) ont obtenu des résultats similaires.

Wagner et al. (1983b) ont également décelé dans l'urine de petites quantités d'ammoniaque et d'urée marqués ^{15}N après l'ingestion de nitrate marqué au ^{15}N .

Des doses orales uniques plus importantes (7 - 10,5 g) de nitrate d'ammonium se traduisaient par une excrétion de nitrate urinaire de 75% en moyenne dans les 24 heures, tandis que de petites quantités de nitrite étaient décelées dans 26% des échantillons seulement. Dans cette étude, les niveaux de base de nitrate urinaire étaient supérieurs (2,4 - 9,3 mmol/l = 149 - 577 mg/l), probablement du fait que les sujets n'étaient soumis à aucune restriction alimentaire (Ellen et al., 1982b).

Dans une étude portant sur des nourrissons, on a signalé une excrétion de nitrate urinaire se situant entre 80 et 100% de l'absorption moyenne, sans toutefois mentionner aucune donnée spécifique sur la consommation de nitrate (Turek et al., 1980).

Dans une autre étude sur des nourrissons en bonne santé, l'excrétion de nitrate urinaire (3 à 16 mg, en moyenne 8,7 mg, de NO_3 par jour) était égale ou supérieure à la (faible) absorption de NO_3 , qui, cumulée avec celle de NO_2 , était en moyenne de 2 à 7 mg par jour (Hegesh et Shiloah, 1982). La conclusion tirée de ces observations a été que l'excrétion inclut probablement du nitrate synthétisé de façon endogène.

De faibles taux de nitrate et de nitrite ont été décelés dans les fèces d'êtres humains soumis à un régime alimentaire occidental normal, d'une teneur en nitrate inconnue, (Saul et al., 1981) et on a

trouvé moins de 0,1% de nitrate marqué ^{15}N dans les fèces de 12 volontaires qui avaient ingéré 298 mg de nitrate de sodium marqué ^{15}N . On a également détecté de petites quantités d'ammoniaque et d'urée marquées ^{15}N (Wagner et al., 1983b).

L'incubation de fèces humaines fraîches en présence de nitrate en milieu anaérobie a abouti à une conversion rapide du nitrate par la microflore fécale, ce qui donne à penser que l'excrétion fécale de nitrate pourrait en réalité être supérieure à celle qui est détectable (Archer et al., 1981; Saul et al., 1981).

Biosynthèse.

Plusieurs auteurs ont signalé chez l'homme l'excrétion d'un excès de nitrate (excrétion urinaire de 0,3 à 1,9 mmol/jour) pour l'absorption de faibles quantités de ce produit (moins de 0,25 mmol/jour) (Bartholomew et Hill, 1984; Green et al., 1981b; Lee et al., 1986; Tannenbaum et Green, 1981; Wagner et al., 1983b). En cas d'ingestion de grandes quantités de nitrate marqué ^{15}N (jusqu'à 3,5 mmol), l'excrétion urinaire de nitrate non marqué restait considérable (0,7 à 1,3 mmol pour 0,2 mmol ingérée - Green et al., 1981b).

Ellen et Schuller (1983) ont calculé que jusqu'à 20% de cet excès pouvait provenir de l'inhalation de NO_2 et de NO_3 présents dans l'air intérieur et extérieur et dans la fumée de cigarettes.

L'excès restant de nitrate urinaire, inférieur ou égal à 1 mmol/jour, provenait probablement de la synthèse endogène. La preuve de l'existence d'une synthèse du nitrate *in vivo* à partir d'ammoniaque et d'hydroxylamine a été apportée pour le rat et pour le furet - voir 1.1 biosynthèse. Bien que l'activité bactérienne ne soit pas indispensable à cette synthèse chez l'animal, elle peut accroître la biosynthèse de nitrate; ainsi, la présence d'une infection gastro-intestinale peut jouer un rôle important Hegesh et Shiloah (1982) ont constaté une augmentation considérable de l'excrétion de nitrate urinaire chez des nourrissons souffrant de diarrhée aiguë (de 8,7 à 39 mg de NO_3 par 24 heures), alors que l'absorption quotidienne cumulée de NO_2 et de NO_3 était faible (de 2 à 7 mg).

1.4 Observations sur l'homme - nitrite

Absorption

Aucune donnée concernant l'absorption du nitrite chez l'homme n'a pu être trouvée. Néanmoins, vu qu'une partie du nitrate ingéré est convertie en nitrite dans la cavité buccale et dans l'estomac, et que des taux élevés de méthHb ont été observés chez des nourrissons qui avaient ingéré de grandes quantités de nitrate (Shuval et Gruener, 1972), il est clair que le nitrite peut être absorbé au niveau de l'appareil gastro-intestinal.

Distribution

Aucune donnée concernant la distribution du nitrite dans le corps humain n'a pu être trouvée.

Biotransformation

Réduction

La réduction du nitrite *in vivo*, qui se traduit par la production d'oxyde nitrique (NO), peut être catalysée par des composants alimentaires tels que l'acide ascorbique et l'alpha-tocophérol (Newmark et Mergens, 1981).

Oxydation

Aucune donnée concernant l'oxydation du nitrite en nitrate *in vivo* chez l'homme.

Formation de méthémoglobine

Chez l'homme comme chez l'animal, le nitrite peut donner lieu à la formation de métHb. Les vitesses de formation et de réduction de la métHb sont plus lentes chez l'homme que chez les ruminants, mais plus rapides que chez le cheval et le porc (Smith et Beutler, 1966).

Les nourrissons sont extrêmement sujets à la formation de métHb induite par la présence de nitrite (signalés par Ellen et Schuller, 1983):

- l'Hb foetale, qui constitue initialement 60 à 80% de l'Hb totale puis tombe à 20 - 30 %, se transforme plus facilement en métHb
- la NADPH-métHb réductase, qui catalyse la retransformation de la métHb en Hb, est normalement déficiente dans les érythrocytes des nouveaux-nés.

Excrétion

Archer et al (1981) et Saul et al. (1981) ont détecté de faibles taux de nitrite dans les fèces d'êtres humains soumis à un régime alimentaire occidental normal, d'une teneur en nitrite et en nitrate inconnue. Le nitrite incubé en présence de fèces fraîches d'origine humaine en milieu anaérobie a, comme le nitrate, été rapidement transformé par la microflore fécale, ce qui donne à penser que l'excrétion réelle de nitrite pourrait bien être supérieure à celle qui est détectable.

IIème partie

ANNEXE II

2. Expériences sur l'animal

2.1 Nitrate

Toxicité aiguë

La DL₅₀ orale variait, pour la souris, de 2.480 à 6.250 mg de nitrate de sodium/kg de poids corporel et, pour le rat, de 4.860 à 9.000 mg de nitrate de sodium/kg de poids corporel. Chez le rat, les femelles ont semblé plus sensibles que les mâles (Toxic Substances List, 1980; Mamm Toxicity Array, 1982; Corrè et Breimer, 1979). Pour le lapin, la DL₅₀ était de 1.600 mg de nitrate de sodium/kg de poids corporel. Une dose létale de 300 mg nitrate de sodium/kg de poids corporel a été signalée pour le porc. Pour la vache, la DL₅₀ en cas d'administration unique par voie orale a été estimée à 450 mg de nitrate de sodium/kg de poids corporel (Bradley et al., 1942), alors qu'elle était de 970-1360 mg/kg de pc (Crawford, 1960), lorsque la dose totale était administrée sur une période de 24 heures. La dose létale s'est révélée être dix fois plus faible pour la vache que pour les non-ruminants (Gwatkin et Plummer, 1946; Emerick, 1974). Une intoxication aiguë s'est manifestée chez des bovins dont la ration alimentaire contenait 6% ou plus de nitrate en matière sèche. Des intoxications fatales chez les bovins ont également été signalées à des doses de 1,5 % dans la nourriture (Bradley et al., 1940) alors qu'aucun effet néfaste n'a été observé avec du foin contenant 0,75% de nitrate en matière sèche (Geurink et Kemp, 1983).

Toxicité subaiguë

(Des données expérimentales détaillées sont présentées dans le tableau I)

Lors d'une étude de toxicité de 4 semaines, des rats (10 animaux/sexe/groupe) ont reçu une nourriture contenant 0, 1, 2, 3, 4 ou 6 % de nitrate de potassium ou 5% de nitrate de sodium (soit approximativement 0, 500, 1.000, 1.500, 2.000, 3.000 ou 2.500 mg/kg de p.c). Deux types de nourriture ont été utilisés: des aliments à base de céréales et des aliments semi-purifiés. A une dose de 2% de nitrate de potassium (1.000 mg/kg de p.c) dans l'alimentation, les femelles présentaient un léger accroissement des taux de méthémoglobine et les mâles une augmentation relative du poids des reins. A une dose de 1 % (500 mg/kg de p.c.), aucun effet toxique n'a été décelé. Aucune différence importante n'a été remarquée entre les deux types d'alimentation (Til et al., 1985a,b).

Une étude de toxicité subaiguë sur des rats F 344 (10 animaux/sexe/groupe) qui avaient reçu pendant 6 semaines une nourriture contenant 1,25; 2,5; 5; 10 et 20% de nitrate de sodium (approximativement 625, 1.250, 2.500, 5.000 et 10.000 mg/kg de pc.) a mis en évidence une réduction légère à modérée du gain de poids aux deux doses les plus élevées et, à l'autopsie, une coloration anormale du sang et de la rate, due à une méthémoglobinémie. La dose maximale tolérée dans l'alimentation était de 5% (Maekawa et al., 1982).

Lors d'une étude de 4 semaines, des lapins (6 mâles /groupe) ont reçu une dose de 0, 200, 400 et 600 mg de nitrate de potassium/kg de poids corporel sous forme de gélules. Les animaux de tous les groupes traités ont présenté des symptômes d'intoxication dans les deux semaines consécutives à l'administration, notamment une réduction de poids significative, une tachycardie, une polyurie et des signes de faiblesse (Nighat et al., 1981).

Au cours d'une expérience de toxicité subaiguë, trois chiens (2 femelles et un mâle) ont reçu pendant 105 et 125 jours une nourriture contenant 2% de nitrate de sodium (ce qui correspond

approximativement à 500 mg/kg de p.c.). Aucun effet indésirable n'a été observé (Lehman, 1958).

Lors d'une étude de toxicité de 8 semaines, des veaux (12 mâles/groupe) ont reçu du lait artificiel contenant 18 (groupe témoin), 400, 2.000, 5.000 et 10.000 mg de NO₃/kg. Aucun effet nocif n'a été observé sur la croissance et le poids des animaux, ni sur la transformation des denrées alimentaires, les paramètres sanguins biochimiques et la morphologie du foie et des reins (Berenda et al., 1977).

Toxicité semichronique

(Des données expérimentales détaillées sont présentées dans le tableau I)

Lors d'une étude de toxicité semi-chronique (12 semaines), on a administré à des rats 0 ou 1/20 de la DL₅₀ de nitrate de sodium ou de calcium par intubation gastrique. Dans les groupes traités au nitrate, on a observé une altération des processus de conversion d'énergie, comme la glycolyse et le cycle du pentose phosphate, et des modifications du système glutathione-ascorbinate des tissus hépatiques et cérébraux (Diskalenko et al., 1972a et b; cité dans le document de l'OMS, 1978).

Au cours d'une expérience de toxicité de 14 mois, des rats (10 animaux/sexe/groupe) ont reçu de l'eau potable contenant 0 ou 4.000 mg de nitrate de sodium/l (ce qui correspond approximativement à 0 ou 400 mg/kg de p.c.). Le taux de méthémoglobine était le même dans le groupe traité que chez les animaux témoins. Le nitrate avait un effet modéré sur le taux de vitamine E dans le plasma et sur l'apparition d'une pneumonie chronique (Chow et al., 1980).

Toxicité à long terme

(Des données expérimentales détaillées sont présentées dans le tableau II)

Lors d'une expérience de 2 ans, on a fait ingérer à des rats (20 animaux/sexe/groupe) une nourriture contenant approximativement 0, 0,1, 1, 5, et 10% de nitrate de sodium. A la dose de 5%, on a observé un léger ralentissement de la croissance, alors qu'une inanition a été notée à la dose de 10%. Un examen histopathologique complet, comprenant une recherche des tumeurs, a été effectué: aucune autre anomalie ou augmentation de la fréquence des tumeurs n'a été décelée. Dans cette étude, la dose non toxique était de 1% (soit 500 mg/kg de p.c.) (Lehman, 1958; OMS, 1962, 1974).

Carcinogénicité

(Des données expérimentales détaillées sont présentées dans le tableau II)

Lors d'une étude de plus d'un an, des souris (10 animaux/sexe/groupe) ont reçu de la nourriture contenant 0, 25.000 et plus de 50.000 mg de nitrate de sodium/kg. Aucune différence n'a été observée chez ces animaux quant à l'incidence des tumeurs (Greenblat et al., 1973; Sugiyama et al., 1979, résumé seulement).

Une expérience de carcinogénicité a été effectuée sur des rats au cours de laquelle les animaux (15/sexe/groupe) ont reçu 0 ou 0,5 % de nitrate de sodium/l d'eau potable (ce qui correspond approximativement à 500 mg/kg de p.c.) pendant 84 semaines. Les animaux ont été sacrifiés 20 semaines plus tard et soumis à un examen histopathologique qui n'a révélé aucune augmentation de la fréquence des tumeurs (Lijinsky et al., 1973a). Lors d'une autre étude de carcinogénicité (de 2 ans) effectuée sur des rats F 344, les animaux (50/sexe/groupe) ont reçu une eau de boisson contenant 0, 2,5 ou 5,0% de nitrate de sodium (ce qui correspond à environ 0, 2.500 ou 5.000 mg/kg de p.c.) et, dans ce cas non plus, aucun effet carcinogène n'a été décelé. On a observé, dans les groupes traités,

une diminution de l'incidence des leucémies mononucléaires qui étaient fréquentes chez les animaux témoins de cette souche (Maekawa et al., 1982). Cette étude a été considérée comme valable.

Reproduction/foetotoxicité

(Des données expérimentales détaillées sont présentées dans le tableau II)

Lors d'une étude sur la reproduction effectuée sur des cobayes, on a ajouté des concentrations de 0, 300, 2.500, 10.000 et 30.000 mg de nitrate de potassium/l à l'eau de boisson des animaux (groupes de 4 animaux témoins, de 6 animaux (300 mg) et de 3 animaux (femelles) / autres groupes) pendant 143-204 jours. Ces doses correspondaient à 0, 12, 102, 507 et 1.130 mg de nitrate de potassium/kg de p.c. Les comportements de reproduction étaient considérablement perturbés à une dose de 30.000 mg/l et le nombre de femelles gravides était sérieusement réduit. La fertilité des animaux des autres groupes traités au nitrate ne semblait pas réduite puisqu'il se trouvait des femelles gravides dans tous les groupes. Le gain de poids des animaux et l'absorption de nourriture et d'eau étaient normaux à toutes les concentrations. Aucune altération macroscopique ni microscopique des organes reproducteurs n'a été observée (Sleight et Atallah, 1968).

Une expérience de 7 mois a été effectuée sur 15 génisses qui ont reçu, du 2ème mois de gestation jusqu'à la mise bas une nourriture contenant 445 et 665 mg de NO_3^- /kg. Aucune perturbation de la gestation imputable au traitement n'a été observée, bien que les doses choisies se fussent traduites par une méthémoglobinémie de 20 - 50%. L'examen macroscopique des animaux nouveaux-nés n'a révélé aucune anomalie (Winter et Hokanson, 1964).

Lors d'une étude portant sur 25 moutons (5 animaux/groupe), l'administration, du 21ème au 49ème jour de gestation jusqu'à la mise bas, d'une dose de 0,3; 0,6 et 1,2% de NO_3^- dans l'eau de boisson (pendant un total de 41 - 74 jours), dose par ailleurs suffisamment élevée pour induire une méthémoglobinémie sévère, n'a eu aucune incidence sur le taux d'avortements (Davison et al., 1965).

Mutagénicité

Le nitrate n'a eu aucun effet mutagène lors de tests bactériens effectués avec Salmonella typhimurium; la mutagénicité a été testée en milieu aérobie et anaérobie avec Escherichia coli et on a observé un effet mutagène qu'en milieu anaérobie. Cet effet était toutefois probablement dû à la réduction du nitrate en nitrite qui peut se produire dans ces conditions (Konetzka, 1974).

Un test d'aberration chromosomique *in vitro* sur des cellules de hamster a révélé un effet mutagène du nitrate de sodium, alors que les résultats obtenus avec le nitrate de potassium étaient négatifs. Le chlorure de sodium, contrairement au chlorure de potassium, donnait également des résultats positifs à forte concentration avec le même test (Ishidate et al., 1984). Il est donc vraisemblable que se produisent entre les chromosomes et les ions sodium à concentration élevée des interactions susceptibles d'aboutir à des aberrations chromosomiques (Ashby, communication personnelle).

L'administration par voie orale de 500 mg de nitrate de sodium/kg de p.c. à des femelles gravides de hamster syrien n'a induit aucune augmentation du nombre de mutations génétiques, d'anomalies chromosomiques et de micronoyaux ni aucune transformation morphologique des cellules d'embryons de hamsters en culture (Inui et al., 1979).

Des expériences de toxicité aiguë effectuées sur des souris (administration par intubation gastrique de doses de 78,5; 235,5; 707 et 2.120 mg de nitrate de sodium/kg de p.c.) n'ont permis

d'observer une augmentation des aberrations chromosomiques qu'à une concentration (707 mg/kg de p.c.), et le nombre de micronoyaux s'est accru pour les doses de 78,5 et de 235,5 mg/kg de p.c. A une dose supérieure ou égale à 707 mg/kg, on a noté une cytotoxicité au niveau de la moelle osseuse qui se manifestait par une dépression concomitante de la moelle osseuse.

Par contre, les expériences de toxicité aiguë sur le rat par administration de doses allant jusqu'à 2.120 mg/kg de p.c. n'ont révélé aucune anomalie chromosomique au niveau de la moelle osseuse. Néanmoins, les rats soumis à un traitement subaigu avec les mêmes doses de nitrate de sodium présentaient une augmentation significative du nombre d'aberrations chromosomiques dans la moelle osseuse. Il est toutefois, selon les auteurs, impossible d'exclure que les lésions de la moelle osseuse soient dues à la formation de composés N-nitrosés. (Luca et al., 1985).

2.2 Nitrite

Toxicité aiguë

La valeur de la DL₅₀ par administration orale variait pour la souris de 175 à 220 mg de nitrite de sodium/kg de p.c. (Greenberg 1945; Lehman, 1958) et elle était de 85 mg/kg de p.c. pour le rat (Lehman 1958). La toxicité aiguë du nitrite se manifestait par une vasodilatation, une chute de la pression artérielle, une diminution de la teneur hépatique en vitamine A et des troubles fonctionnels de la glande thyroïde.

Des chiens auxquels avait été administrée une dose unique de 1 - 2g de nitrite de sodium/kg de saucisse (on ne dispose pas d'indications plus détaillées) présentaient une respiration et un rythme cardiaque accélérés, une modification de l'électrocardiogramme (ECG), une méthémoglobinémie dans l'heure ou les 2 heures ont suivi, une concentration de sodium accrue, une chute de la concentration de potassium et une augmentation de l'activité de l'aspartate amino transférase (ASAT) dans le sérum (OMS, 1974).

Une différence de toxicité a été observée lors d'une étude spécifique portant sur des rates chez lesquelles on a comparé l'administration d'une dose unique avec l'administration de la même dose répartie en plusieurs prises en utilisant la formation de méthémoglobine comme critère de toxicité. Une dose de 160 ou 320 mg de nitrite de sodium/kg de p.c. répartie en doses plus petites administrées sur une certaine période (3 intervalles de 15 minutes, suivis de 4 intervalles de 30 minutes) a semblé moins toxique qu'une dose unique de 40 ou 80 mg/kg de p.c. (De Vries, 1983).

Lors d'une autre expérience de toxicité aiguë, l'administration à des rats de deux doses de 100 mg de nitrite de sodium/kg de p.c. avec un intervalle de deux heures a provoqué une mortalité élevée, alors que tous les animaux ont survécu à des administrations espacées de 4 heures (Druckrey, 1963a). Cette différence peut s'expliquer par la durée de la demi-vie d'élimination de la méthémoglobine, qui est de 90 minutes chez le rat (Shuval et Grüner, 1972).

Toxicité subaiguë

(Des données expérimentales détaillées sont présentées dans le tableau I)

Une expérience de toxicité d'une durée de 7 jours a été effectuée sur des souris âgées de 6 ou 55 semaines (5 animaux/groupe). Après l'administration de 0 ou 110 mg de nitrite de sodium par intubation gastrique, on a observé chez les animaux traités une diminution de la distance parcourue en course forcée, des anomalies de l'ECG et des modifications ultramicroscopiques du muscle cardiaque (Kinoshita et al., 1985).

Lors d'une expérience de 2 semaines, l'adjonction de nitrite de sodium à l'eau de boisson à une concentration de 0, 100, 1.000, 1.500 et 2.000 mg/l a réduit l'activité motrice des souris des groupes traités. Ces doses correspondaient approximativement à 0, 10, 100, 150 et 200 mg/kg de p.c. (Grüner et Shuval, 1971).

Dans une étude de toxicité de six semaines, on a donné à boire à des rats (10/sexe/groupe) de l'eau contenant 0, 0,06, 0,125, 0,25, 0,5 et 1% de nitrite de sodium. Ces doses correspondaient environ 0,60, 125, 250, 500 et 1000 mg/kg p.c. Dans le groupe à 1% on a observé un léger ralentissement de la croissance. A l'autopsie, on a constaté un changement notable de couleur du sang et de la rate dû à la méthémoglobinémie dans les deux groupes ayant reçu les doses les plus élevées. La dose maximum tolérée dans l'eau de boisson était de 0,25% (Maekawa et al., 1982).

Dans une étude de toxicité de deux mois sur des rats (8 mâles/groupe) recevant de l'eau potable contenant 0, 100, 300 et 2000 mg de nitrite de sodium par litre, on a observé des anomalies de l'EEG, surtout dans le groupe ayant reçu la dose la plus élevée et, dans une moindre mesure, dans les autres groupes. Les doses correspondaient à environ 0, 10, 30 et 200 mg/kg p.c. (Shuval et Grüner, 1972).

Dans deux expériences de toxicité subaiguë (deux semaines), on a donné à des poulets des aliments contenant 0 ou 0,4% de nitrite de potassium (environ 0 ou 400 mg/kg/p.c.), ou 0 ou 18-60 mg/kg p.c. de nitrite de sodium, respectivement. Les animaux ayant reçu du nitrite de sodium ont présenté un retard de croissance et une dilatation de la glande thyroïde, ainsi qu'une baisse de la vitamine A dans le foie, malgré un régime riche en cette vitamine (Sell et Roberts, 1963; Brüggeman et Tiewes, 1964).

Toxicité semi-chronique

(Des données expérimentales détaillées sont présentées dans le tableau II)

Au cours d'une étude de toxicité semi-chronique, on a donné à boire à des souris (10 mâles/groupe) de l'eau contenant du nitrite de sodium aux concentrations suivantes: 0, 100, 1000, 1500 et 2000 mg/l, ce qui correspond approximativement à 1, 10, 100, 150 et 200 mg/kg p.c. L'activité motrice de ces animaux a diminué, surtout dans le groupe recevant la plus forte dose. On a également noté une méthémoglobinémie. D'après les auteurs (Behroozi et al, 1971), l'effet sédatif observé chez ces souris n'était pas lié à la méthémoglobinémie.

Dans une étude de toxicité semi-chronique (16 semaines), on a donné à des rats d'un mois (8 mâles/groupe) de l'eau potable contenant soit 1, soit 200 mg de nitrite de sodium/l (0 ou 20 mg/kg p.c). Les niveaux de méthémoglobine chez ces animaux variaient de 1,5 à 3,1%, contre 0 à 1,2% dans le groupe témoin. On a observé également une plus forte incidence de lésions pulmonaires. Dans une deuxième expérience menée sur des rats de deux mois (12 dans le groupe traité au nitrite et 9 dans le groupe témoin), on a administré du nitrite de sodium aux doses de 0 ou 2000 mg/l pendant 14 mois. Les niveaux de méthémoglobine ont fluctué entre 1 et 35%, contre 0 et 1% dans le groupe témoin. Chez les animaux traités au nitrite, le poids corporel et le poids du foie, ainsi que le niveau de vitamine E dans le sérum, étaient inférieurs à ceux du groupe témoin, et ils présentaient tous de graves lésions pulmonaires. On a également constaté des taux plus élevés de globules rouges et une augmentation du taux de glutathion réduit dans les globules rouges (Chow et al., 1980).

Toxicité à long terme

(Des données expérimentales détaillées sont présentées dans le tableau II)

Chez un certain nombre d'espèce animales, notamment rats, porcs, moutons et volailles, on a signalé une carence en vitamine A due à une intoxication chronique par les nitrites. La teneur en vitamine A du foie est abaissée chez les non ruminants du fait de sa dégradation en milieu acide dans le conduit intestinal (Emerick, 1974; Sell et Roberts, 1863).

Une étude de toxicité à long terme a été effectuée sur des rats: les animaux (8 mâles/groupe) ont reçu pendant deux ans une dose de 0, 100, 1.000, 2.000 et 30.000 mg de nitrite de sodium/l dans leur eau de boisson. Aucune différence significative n'a été observée entre le groupe témoin et les groupes traités sur le plan de la croissance, du développement, de la mortalité et du taux d'hémoglobine totale. Chez les groupes traités avec des doses de 1.000, 2.000 et 3.000 mg de nitrite de sodium/l, les taux sanguins de méthémoglobine ont considérablement augmenté jusqu'à atteindre une proportion de 5, 12 et 22% de l'hémoglobine totale, respectivement. Des modifications histopathologiques majeures ont été observées au niveau des poumons et du coeur. A la concentration la plus élevée, correspondant à l'administration de 250 - 300 mg de nitrite de sodium/kg de p.c. pendant 2 ans, on a observé une dégénérescence focale et une fibrose du muscle cardiaque. L'observation selon laquelle les artères coronaires de ces animaux âgés étaient dilatées et avaient des parois minces au lieu d'être épaissies et de présenter une constriction comme c'est généralement le cas à cet âge, était difficile à interpréter. Des modifications au niveau des poumons consistant en une dilatation des bronches accompagnée d'une infiltration de lymphocytes et de l'emphysème ont été observées chez les rats traités avec 1.000, 2.000 et 3.000 mg de nitrite de sodium/l d'eau potable (Shuval et Grüner, 1972).

Carcinogénicité

(Des données expérimentales détaillées sont présentées dans le tableau II)

Vingt et une études relatives à la carcinogénicité éventuelle du nitrite, effectuées sur la souris et sur le rat, ont été résumées (Birdsall, 1981) dans le rapport de la National Academy of Sciences, U.S. (NAS, 1981). Néanmoins, selon les auteurs, certaines de ces études ne répondaient pas aux normes acceptées pour une évaluation appropriée de la carcinogénicité, en raison de la brièveté de l'expérience, de la voie d'administration ou du fait que l'étude n'était pas conçue pour tester le nitrite (voir Tableau II). Aucune des études citées n'a fait état d'un effet carcinogène du nitrite (NAS, 1981; Birdsall, 1981).

Jusqu'à une date récente, la plupart des informations relatives à une carcinogénicité éventuelle du nitrite provenaient de données sur l'incidence de tumeurs chez des animaux utilisés comme témoins ne recevant que du nitrite données provenant d'études conçues pour étudier les effets carcinogènes de l'administration simultanée de nitrite et d'une amine susceptible de nitrosation. Ces travaux sont pour la plupart résumés dans le tableau II.

Lors d'une expérience de carcinogénicité, des souris (50 animaux/sexe/groupe) ont reçu pendant 18 mois de l'eau potable contenant 0, 1.000, 2.500 et 5.000 mg de nitrite de sodium/l. Ces doses correspondaient à 0, 200, 500 et 1.000 mg/kg de p.c. Aucune modification de l'incidence des tumeurs n'a été observée (Inai et al., 1979).

La FDA a effectué une vaste étude (Newberne, 1978; 1979) sur 573 rats utilisés comme témoins et 1.383 rats auxquels on avait administré du nitrite dans la nourriture ou l'eau de boisson à des concentrations de 0, 250, 500, 1.000 ou 2.000 mg/kg (soit approximativement 0, 25, 50, 100 ou 200 mg/kg de p.c.). Une partie des animaux ont été exposés toute leur vie depuis le 5ème jour de gestation, alors que les autres n'ont été traités qu'à partir de leur sevrage. Deux types de nourriture ont été utilisés: des aliments classiques pour animaux de laboratoire et des aliments semi-synthétiques à base de gélose. Newberne a observé une incidence accrue de lymphomes dans tous les groupes traités au nitrite (10,2% contre 5,4% chez les animaux témoins). Un groupe de travail interinstitutionnel du

Gouvernement des États-Unis est toutefois parvenu à une conclusion différente après avoir procédé à l'examen des mêmes préparations histologiques. Il n'a diagnostiqué de lymphomes que dans le cas d'un petit nombre de lésions et il a évalué l'incidence à 1%, approximativement, dans les groupes traités comme dans les groupes témoins. Cette divergence est due à une distinction entre les lymphomes, tels que Newberne les identifie, et l'hématopoïèse extramédullaire, la plasmacytose ou les sarcomes histiocytiques identifiés par le Groupe interinstitutionnel. L'incidence d'autres types de tumeurs n'était pas non plus accrue (FDA, 1980a, b).

Aucun effet carcinogène n'a été décelé lors d'une expérience de carcinogénicité portant sur des rats F 344 (50 animaux/sexe/groupe) ayant absorbé pendant 2 ans du nitrite de sodium à une concentration de 0, 0,125 ou 0,25% dans leur eau de boisson. Une diminution significative de l'incidence de tumeurs par rapport au groupe témoin a été observée dans les groupes de femelles qui avaient reçu une forte dose de nitrite. Cette diminution a été attribuée en partie aux leucémies mononucléaires dont la fréquence spontanée est assez élevée (environ 25%) dans cette souche (Maekawa et al., 1982).

Aucun effet carcinogène n'a été décelé non plus lors d'une expérience portant sur des rats F 344 (24 animaux/sexe/groupe) auxquels on avait administré une dose de nitrite de sodium de 2.000 mg par kg de nourriture ou litre d'eau potable. Les doses utilisées correspondaient à 100 et 200 mg/kg de p.c. environ. Une diminution du nombre de leucémies monoblastiques (néoplasme spontané très courant chez les rats F 344) a été observée dans les groupes d'animaux traités des deux sexes. On n'a noté aucune augmentation du nombre de tumeurs d'autres types, ni chez les animaux auxquels avaient été administré du nitrite dans la nourriture, ni chez ceux qui l'avaient absorbé dans leur eau de boisson (Lijinsky et al., 1983).

Au cours d'une étude récente, des rats F0 (70 mâles et 140 femelles) - répartis en six groupes - et leur descendance mâle et femelle (F1) ont été nourris avec de la viande fumée contenant 0, 200, 1.000 et 4.000 mg de nitrite de sodium/kg pendant toute leur vie. La viande de porc en conserve, mélangée dans un rapport de 45% avec des aliments semi-synthétiques, était consommée à volonté par les animaux. L'exposition quotidienne au nitrite de sodium était donc d'environ 0, 5, 25 ou 100 mg/kg de p.c. On n'a observé aucun effet sur la reproduction ni aucune augmentation significative de l'incidence de tumeurs (Olsen et al., 1984). Cette étude a confirmé les conclusions précédentes de Van Logten et al. (1972), qui avaient eux aussi étudié des rats (30 animaux/sexe/groupe) nourris de viande fumée contenant 0, 200 ou 5.000 mg de nitrite de sodium/kg. Dans ce cas, la viande en conserve était mélangée dans un rapport de poids de 40% à une nourriture standard et consommée à volonté d'abord, puis par rations quotidiennes de 20 g/jour environ. La dose quotidienne de nitrite de sodium était donc d'environ 0, 4 ou 100 mg de nitrate de sodium/kg de p.c..

Reproduction/foetotoxicité

(Des données expérimentales détaillées sont présentées dans le tableau III)

Lors d'une expérience de foetotoxicité effectuée sur les cobayes, du nitrite de potassium a été administré aux animaux dans l'eau de boisson à une concentration de 300, 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000 et 10.000 mg.l pendant 100 - 240 jours. Ces doses correspondaient à 110, 270, 940, 1.110, 1.190, 1.490 et 3.520 mg/kg de p.c. respectivement. Le nombre de femelles utilisées pour constituer les différents groupes était le suivant: témoin: 4; 300, 1.000 et 2.000 mg: 3; 4.000 mg: 6; 5.000 mg: 4; et 10.000 mg: 3. Au moins un mâle était présent dans chaque cage. Des taux de méthémoglobine pouvant atteindre 20% ont été mesurés. Une mortalité foetale de 100% a été enregistrée dans les groupes traités avec des doses de 5.000 ou 10.000 mg de nitrite de potassium/l, et une femelle est morte. A la dose la plus élevée, on a noté une inhibition de la croissance chez les mères. Chez les animaux portant des foetus avortés, momifiés ou résorbés, on a décelé des lésions inflammatoires de

l'utérus et du col ainsi que des lésions dégénératives du placenta. Aucune mortalité foetale n'a été observée aux doses plus faibles (300, 1.000, 2.000, 3.000 et 4.000 mg/ml (Sleigh et Atallah, 1968).

Une autre expérience de foetotoxicité a été effectuée en administrant par injection sous-cutanée à 4 cobayes gravides/groupe des doses de 0, 50 ou 60 mg de nitrite de sodium/kg de p.c. pendant les 15 derniers jours de gestation. Dans le groupe traité avec 50 mg, les naissances étaient normales, alors que, une heure après l'administration de 60 mg de nitrite, une mort foetale suivie d'un avortement s'est produite chez trois animaux. La concentration sanguine maternelle et foetale en méthémoglobine avait alors atteint un pic et la pression d'oxygène dans le sang foetal était plus faible que chez les animaux témoins. Dans les groupes ayant reçu 70 mg/kg, les mères sont mortes dans les 60 minutes. Lors d'une seconde expérience, on a administré par voie sous-cutanée une dose unique de 0 ou de 60 mg/kg à des cobayes gravides en fin de gestation (9 animaux/groupe). Les mères ont été sacrifiées à des intervalles de 0, 25 - 56 heures après l'injection de nitrite. 96% des foetus sont morts 3 heures, ou plus, après l'administration du nitrite. On a observé une marge relativement étroite entre les doses de nitrite de sodium sans effet sur la reproduction, les doses responsables d'une mortalité foetale et les doses mortelles pour les mères (Sinha et Sleight, 1971).

Dans une autre étude, on a ajouté du nitrite de sodium à l'eau de boisson de rates gravides (12 animaux/groupe) à des concentrations de 0, 2.000 ou 3.000 mg/l. Des femelles non-gravides ont subi le même traitement. Les doses utilisées correspondaient à environ 0, 200 ou 300 mg/kg de p.c.. Les rates gravides ont développé une anémie et leur taux de méthémoglobine était plus élevé que celui des rates non-gravides ayant subi le même traitement. On a observé une augmentation considérable de la mortalité chez les rats nouveaux-nés des groupes traités, en particulier au cours des 3 semaines précédant le sevrage. La mortalité de la descendance était respectivement de 6, 30 et 53%. On a noté une réduction significative de la croissance chez les descendants des animaux traités, alors que les poids à la naissance étaient semblables.

Chez des rates gravides ayant reçu une dose unique de nitrite de sodium comprise entre 2,5 et 50 mg/kg de p.c., on a noté le passage du produit chimique au travers de la barrière placentaire accompagné d'une production de méthémoglobine chez les foetus (Shuval et Grüner, 1972).

Lors d'une étude de reproduction portant sur deux générations, des groupes de rats ont reçu une nourriture contenant 0, 240 ou 460 mg/kg de nitrite de sodium pendant 28 mois à partir de leur conception. Ces doses correspondaient environ à 0, 12 et 23 mg/kg de p.c. Aucun effet n'a été observé sur la taille des portées, sur la mortalité postnatale, sur le taux de croissance ni sur la durée de vie (Shank et Newberne, 1976).

Tératogénicité

(Voir Tableau III)

Lors d'une étude de tératogénicité/reproduction, des rats ont été nourris avec de la viande stérilisée par la chaleur contenant 0, 200, 1.000 et 4.000 mg de nitrite de sodium à partir du 40ème jour d'âge de leur naissance. Ces doses correspondaient à 0, 10, 50 ou 200 mg/kg de p.c. La génération F1b a été sacrifiée le 21ème jour de gestation. L'indice de fertilité, le nombre de pertes pré-implantation et de résorptions n'ont pas été affectés par le traitement au nitrite. Aucune différence par rapport aux témoins n'a été observée en ce qui concerne la taille des portées, le rapport de sexes et le poids moyen des nouveaux-nés. Aucune augmentation significative du nombre de malformations n'a été relevée (Carstensen et Hasselager, 1972, résumé seulement).

Une expérience réalisée en administrant du nitrite de sodium à deux groupes de 10 et de 15 rates gravides, le 9 et le 10ème jour de gestation, par adjonction à leur nourriture, à des concentrations

de 3 et 10 g/kg de nourriture (doses correspondant environ à 150 et 500 mg/kg de p.c.) n'a permis de déceler aucun effet embryotoxique ni tératogène (Alexandrov et Jänisch, 1971).

Mutagénicité

L'exposition *in vitro* d'ADN purifié à de l'acide nitreux se traduit par une activité mutagène, qui a été mesurée par l'apparition de mutations létales dans l'ADN de Bacillus subtilis traité à l'acide nitreux (Strack et al., 1964; Bresler et al., 1968). Une activité mutagène du nitrite (ou de l'acide nitreux) a été signalée dans des systèmes bactériens tels que Escherichia coli et Salmonella typhimurium (Kaudewitz, 1959; Verly et al., 1967), dans des micro-organismes tels que des champignons (plusieurs espèces d'Aspergillus, Neurospora crassa: OMS, 1078; De Serres et al., 1967), des levures (Saccharomyces cerevisiae) et dans le virus de la mosaïque du tabac et le bactériophage T4 (Strack et al., 1964; OMS, 1978). Lors d'une étude portant sur des cellules de souris, le nitrite de sodium, sans activation métabolique, n'a pas augmenté le nombre de ruptures des molécules simple brin, mais on a observé à des doses relativement élevées une augmentation des mutations génétiques et des aberrations chromosomiques proportionnelle à la dose. D'après les auteurs, l'activité mutagène était probablement due à une désamination de l'ADN et non à la formation de nitrosamine, puisque, sans activation métabolique, la nitrosodiméthylamine ne changeait guère la fréquence des mutations (Kodama et al., 1976). Du nitrite de sodium administré dans un milieu acide (pH + 5) induisait *in vitro* une augmentation du nombre de mutations 6 - TG dans des cellules de hamster V9 (Budayova, 1985). Le nombre d'aberrations chromosomiques était considérablement augmenté dans des cultures de cellules de hamster (Tsuda et al., 1976). Une endoreduplication a également été signalée (Tsuda et Kato, 1977). Le nitrite de sodium a été responsable d'une augmentation brutale du nombre de "cellules aberrantes" obtenues à partir de tissu pulmonaire embryonnaire humain (Institut de Recherche de Stanford, 1972, rapport non disponible).

Après l'administration par voie orale de nitrite de sodium à des femelles gravides de hamsters syriens les 11ème et 12ème jours de gestation, on a observé une augmentation de mutations résistant à certaines substances (8-AG et ouabaïne) dans des cultures cellulaires préparées à partir des embryons. On a également noté une augmentation de la formation de micronoyaux proportionnelle à la dose, bien qu'aucune augmentation du nombre d'aberrations chromosomiques n'ait été décelée (Inui et al., 1979). Il est possible que le nitrite n'agisse pas uniquement sur les acides nucléiques mais aussi sur les protéines ou les composés -SH, de telle sorte que l'appareil mitotique, à savoir la formation du fuseau, se trouve également touché et endommagé. Cela pourrait expliquer la présence d'un grand nombre de cellules contenant des micronoyaux alors que l'on n'a observé aucune anomalie chromosomique.

Une transformation morphologique *in vitro* de cellules de hamster par le nitrite de sodium a été signalé (Tsuda et al., 1973). Dans les cellules embryonnaires également, on a constaté une transformation *in vitro* alors que l'implantation *in vivo* des cellules transformées a abouti à des néoplasmes (Inui et al., 1979).

Aucune activité mutagène n'a été décelée lors des deux tests suivants effectués *in vivo*: un titrage réalisé par l'intermédiaire d'un hôte et l'épreuve du micronoyau sur la souris (Couch et Friedman, 1975; Hayashi et al., 1981). Néanmoins, l'administration, par adjonction à l'eau de boisson, d'environ 210 mg de nitrite de sodium/kg de p.c. à des rates non gravides ou à des rates gravides depuis 5 - 18 jours a provoqué des aberrations chromosomiques au niveau de la moelle osseuse chez les femelles gravides ou non et du foie des embryons. Le nombre de métaphases accompagnées d'aberrations chez les animaux et les témoins était supérieur dans le foie embryonnaire que dans la moelle osseuse des adultes. Cette incidence plus grande provenait peut-être du nombre accru de cellules en mitose dans les tissus embryonnaires, du fait d'une durée réduite du cycle cellulaire (El Nahas et Globus, 1984).

Aucun effet significatif sur les chromosomes métaphasiques n'a été décelé dans la moelle osseuse de rats adultes lors d'une autre étude. Les données expérimentales telles que les doses étaient inconnues vu que le rapport n'était pas disponible (Institut de Recherche de Stanford, 1972).

Selon Zimmermann, (1977), l'activité mutagène du nitrite pourrait se manifester au moyen de trois mécanismes. Premièrement, le nitrite peut désaminer les bases d'une molécule d'ADN viral simple brin. Les désaminations spontanées sont toutefois fréquentes et les bactéries, et probablement aussi les cellules de mammifères, possèdent des systèmes de réparation de l'ADN qui corrigent ces lésions. Deuxièmement, il peut se former des liaisons inter- ou intracaténares entre résidus de purine aboutissant à une distorsion de l'hélice dans le cas de l'ADN double brin. L'apparition de ce type de lésion peut être favorisée par la présence à proximité de l'ADN de molécules comme des polyamines, des glycols, des alcools et des phénols (Thomas et al., 1979). En troisième lieu, le nitrite peut réagir avec des agents de nitrosation pour former des composés N-nitrosés et présenter ainsi une activité mutagène (et carcinogène) indirecte.

IIème PARTIE ANNEXE III

3. Observations sur l'homme

3.1 Toxicité du nitrate et du nitrite chez l'homme

Chez l'homme comme chez l'animal, la toxicité du nitrate dépend de la transformation de celui-ci en nitrite. Il faut par conséquent considérer les nourrissons et les patients atteints d'hypo- ou d'achlorhydrie et/ou de lésions gastriques comme des groupes spécifiquement à risque (voir 1.3) Ces patients peuvent également être plus sensibles à la toxicité du nitrate.

Des doses létales de 4-50 grammes de NO_3 , ce qui correspond à 80-833 mg de NO_3/kg de p.c., sont décrites dans la littérature. Les doses toxiques - déterminées en utilisant la formation de méthémoglobine comme critère de toxicité - se sont situées entre 2 et 5 grammes (Corré et Breimer, 1979) et entre 6 et 9 grammes de NO_3 (Fasset, 1973). Ces valeurs correspondaient à 33-83 et 100-150 mg de NO_3/kg de poids corporel, respectivement. Fasset a décrit les symptômes d'intoxication aiguë par le nitrate comme suit: apparition rapide d'une gastroentérite sévère accompagnée de douleurs abdominales et présence de sang dans les urines et dans les fèces. Des administrations répétées ont donné lieu à une dyspepsie, une dépression, des maux de tête et un état de faiblesse.

Les données disponibles proviennent en partie de publications relativement anciennes, dont certaines ne contiennent aucun détail quant à l'âge des patients ou leur état gastrique. Les valeurs faibles de ces doses létales et toxiques sont difficiles à interpréter. L'absence de symptôme d'intoxication chez douze volontaires ayant reçu 9,5 grammes de nitrate de sodium en une heure par voie intraveineuse, et le fait que parmi douze autres personnes auxquelles avait été administrée par voie orale une dose unique de nitrate d'ammonium de 7 à 10,5 grammes, deux ont souffert de vomissements et de diarrhée sont des éléments parmi d'autres, qui plaident contre ces valeurs (Ellen et al., 1982b). La dose de nitrate létale pour l'adulte tourne probablement autour de 20 grammes de NO_3 ce qui correspond à 330 mg environ de NO_3/kg de poids corporel (Leu et al., 1986; Ellen, 1986).

Il a déjà été mentionné aux points 1.3 et 1.4 que la transformation du nitrate en nitrite et la formation de méthémoglobine sont élevées chez les nourrissons de moins de 3 mois. Les troubles gastrointestinaux jouent un rôle crucial à cet égard; la réduction dans l'estomac du nitrate en nitrite est favorisée par la prolifération microbienne due au pH gastrique élevé chez ces nourrissons. Les effets toxiques interviennent par conséquent à une dose de nitrate beaucoup plus faible que chez l'adulte. D'après Corré et Breimer (1979), en supposant que 80% du nitrate se transforme en nitrite chez ces nourrissons et en prenant comme critère de toxicité la formation de 10% au moins de méthémoglobine, on peut calculer que pour ce groupe la dose toxique est de 1,5 à 2,7 mg de NO_3/kg de poids corporel (Wintone, 1971). Cette valeur concorde avec la dose toxique de 8,6 mg de NO_3 calculée par Grau dans le cas des nourrissons. Dans le même rapport, une dose létale pour les nourrissons de 43,2 mg de NO_3 est calculée d'après la stochiométrie de transfert hémoglobine/méthémoglobine (OMS, 1985).

Cependant, dans les cas de méthémoglobinémie signalés chez les nourrissons, les quantités de nitrate ingérées étaient supérieures: de 37,1 à 108,6 mg/kg de p.c. avec une moyenne de 56,7 mg/kg.

On a signalé des intoxications aiguës dues à l'absorption d'eau de puits présentant une forte teneur en nitrate (OMS, 1978; NAS, 1978). Sur tous les cas de méthémoglobinémie infantile signalés, 97,7 % étaient localisées dans des régions où la teneur en nitrate de l'eau potable dépassait 44,3 - 88,6 mg de NO_3/l (OMS, 1985). Aux Pays-Bas, de telles intoxications se sont produites sporadiquement au cours des deux dernières décennies. Il est toutefois difficile d'évaluer la relation entre les cas de méthémoglobinémie chez le nourrisson et l'ingestion de nitrate car on observe souvent simultanément

une contamination bactérienne de l'eau potable et des infections bactériennes qui peuvent influencer sur la réduction de nitrate en nitrite et sur la synthèse endogène du nitrate. Ainsi, Hegesh et Shiloah (1982) ont constaté chez les nourrissons souffrant de diarrhée aiguë un taux de nitrate notablement accru dans le sang, en corrélation avec un taux accru de méthémoglobine, alors que les quantités de nitrate et de nitrite ingérées étaient faibles (2 - 7 mg/jour)

L'administration par voie orale à des enfants sains âgés de 11 jours à 11 mois de 50 ou 100 mg de NO_3/kg de p.c. pendant plusieurs jours a provoqué une augmentation de la méthémoglobinémie (5,3 - 7,5 %) sans cyanose. Après administration de 100 mg de NO_3/kg de p.c. on a décelé, chez des nourrissons de 6 à 7 semaines à peine rétablis d'une méthémoglobinémie un taux de méthémoglobine allant jusqu'à 11 %, combiné à une cyanose (Cornblath et al., 1948). Cette étude ne donnait aucun détail sur l'âge des nourrissons ni sur le nombre de jours de traitement .

Le nitrite est plus toxique pour les nourrissons que pour les adultes; il provoque en effet chez eux des taux de méthémoglobine plus élevés, comme il est mentionné au point 1.3. Des intoxications accidentelles chez l'homme, dues à la présence de nitrite dans les aliments, ont été signalées. On peut conclure de ces observations que la dose létale orale pour l'homme va de 33 à 250 mg de NO_2/kg de p.c. (Corré et Breimer, 1979). Les doses du bas de cette échelle valent pour les enfants et les personnes âgées. Les doses toxiques donnant lieu à une méthémoglobinémie se situent entre 1 et 8,3 mg/kg de p.c. (Winton et al., 1971; Simon, 1970).

L'utilisation du nitrite de sodium comme médicament vasodilatateur ou antidote en cas d'empoisonnement au cyanure constitue une autre source d'informations sur la toxicité du nitrite pour l'homme. Aucun effet toxique n'a été observé à des doses de 30-300 mg/personne ou de 0,5-5 mg/kg de p.c. (NAS, 1981).

Outre les nourrissons de moins de 3 mois, d'autres catégories de personnes présentant un état physiologique déficient ou atteintes de maladies héréditaires ou acquises peuvent être sujettes à une méthémoglobinémie induite par le nitrite ou par le nitrate; il s'agit des femmes enceintes (Metcalf, 1961), des adultes chez qui l'acidité gastrique est réduite (y compris les personnes soignées pour un ulcère peptique ou souffrant de gastrite chronique ou d'anémie pernicieuse) et un groupe rare d'individus présentant un déficit héréditaire de NADH ou une activité de méthémoglobine réductase dans leurs globules rouges (Scott, 1960).

Les individus présentant des anomalies structurelles héréditaires de l'hémoglobine, appelées hémoglobine Ms, constituent probablement un autre groupe à risque élevé vis-à-vis du nitrite et du nitrate dans les aliments (Jaffé et Heller, 1964; cité dans NAS, 1981).

3.2 Relations entre l'ingestion de nitrite et de nitrate et le risque éventuel de cancer (gastrique) chez l'homme

Plusieurs auteurs (Tableaux IV et V) estiment que le risque de développer un cancer gastrique est lié à trois facteurs: 1) le taux de nitrate dans l'eau potable, 2) l'excrétion urinaire de nitrate et 3) la présence d'une gastrite atrophique.

L'incidence des cancers gastriques diminue depuis une trentaine d'années et l'opinion a été émise que cette évolution positive pourrait être due à des facteurs tels qu'une réduction significative des taux de nitrite et de nitrate dans les viandes fumées et l'usage de plus en plus répandu de réfrigérateurs et de congélateurs (Hartmann, 1983).

L'incidence des cancers gastriques reste élevée dans les pays où la consommation de poisson salé est fréquente (Japon, Islande, Chili) ou dans les pays où les hivers sont longs et où les aliments sont par conséquent conservés pendant des périodes prolongées (Europe de l'Est, URSS).

Plusieurs études épidémiologiques et des études connexes montrent que l'absorption quotidienne de nitrate semble avoir un rapport avec l'apparition de cancers gastriques (Weisburger et Raineri, 1975; Fraser et al., 1980; NAS, 1981). Fine et al. (1982), qui ont comparé les données publiées sur l'absorption quotidienne de nitrate dans différents pays avec les taux de mortalité par cancer gastrique ($r = 0,88$), pensent également qu'il existe une corrélation entre l'absorption de nitrate et la mortalité par cancer gastrique.

Deux hypothèses ont été formulées d'après les résultats de recherches épidémiologiques et d'études connexes portant sur le lien entre des composants alimentaires et l'apparition de cancers gastriques (Joossens et Geboers, 1981; Food Council Report, 1986): 1) l'hypothèse "du sel" selon laquelle une absorption importante de sel apparaît comme un facteur non négligeable et 2) l'hypothèse du "nitrate/nitrite" telle qu'elle est envisagée dans ce chapitre. Les produits alimentaires contenant du nitrate et d'autres sels, une combinaison des deux hypothèses est vraisemblable (Corre et al., 1975; 1983; Weisburger et al., 1981).

Plusieurs facteurs ou états susceptibles d'influencer la formation de tumeurs gastriques sont mentionnés dans la figure ci-après. En ce qui concerne la corrélation entre l'absorption de nitrate et l'incidence de tumeurs il s'agit des facteurs qui favorisent la réduction du nitrate en nitrite. Ces facteurs, étudiés en détail au point 1, comprennent le thiocyanate (fumeurs comparés aux non-fumeurs), les iodures, l'âge (augmentation des taux de nitrate et de nitrite salivaire avec l'âge), les conditions favorables à la prolifération bactérienne dans l'appareil gastro-intestinal (pH gastrique ou matières indigestibles dans les aliments) et les médicaments antiacides (Armijo et al., 1981a et b; Boyland et Walker, 1974; Eisenbrand et al., 1980; Foreman et al., 1985; NAS, 1981; Reed et al., 1981b; Ruddell et al., 1978; Tannenbaum et al., 1979; Tannenbaum et Correa, 1985; Ward, 1984).

Les facteurs modulant la formation de composés N-nitrosés carcinogènes jouent également un rôle important dans la corrélation entre l'absorption de nitrate ou de nitrite et l'incidence des tumeurs gastriques. Ces modulateurs de la nitrosation des amines et des amides englobent le thiocyanate, le sel absorbé en grandes quantités, le pH gastrique, la vitamine C et d'autres composants de l'alimentation, des médicaments (cimétidine et autres antiacides) et les lésions et troubles gastriques (Armijo et al., 1981a et b; Foreman et al., 1985; Mirvish, 1985; Risch et al., 1985; Tannenbaum et Correa, 1985). Ces facteurs sont par conséquent examinés par plusieurs auteurs dans un grand nombre d'études épidémiologiques et d'études connexes concernant l'absorption de nitrite et de nitrate et l'apparition de tumeurs gastriques (Tableaux IV et V).

La plupart de ces études n'ont révélé aucune corrélation entre l'absorption de nitrate et le

cancer gastrique, ou ont même dans certains cas, mis en évidence une corrélation négative. Une consommation importante de certains légumes, qui sont pourtant une source importante de nitrate, semble associée à un risque plus faible de cancer gastrique, ce qui pourrait s'expliquer par la présence simultanée dans ces produits de facteurs protecteurs, tel l'acide ascorbique.

Des études épidémiologiques sur la relation entre les cancers gastriques et l'exposition au nitrate par le biais de l'eau potable ont été menées dans plusieurs pays. Chez des volontaires, les taux de nitrite salivaire étaient considérablement plus élevés après l'ingestion d'eau potable contenant 200 mg de NO_3/l qu'après celle contenant 50 mg de NO_3/l (lignes directrices des CE). Néanmoins, des études effectuées sur de vastes groupes de population au Chili, au Danemark, en Angleterre, en France et en Hongrie n'ont apporté aucune preuve d'une corrélation entre la présence de nitrate dans l'eau potable et le cancer gastrique. Cette constatation restait valable lorsque l'analyse se limitait à des zones urbaines où le taux de nitrate dépassait les limites fixées par les lignes directrices des CE (Hart et Walters, 1983; Hill et al., 1973; Zaldivar et Wetterstrand, 1978; Juhasz et al., 1980; Davies, 1980; Jensen et al., 1982; Vincent, 1983; Beresford, 1985; OMS, 1985). Voir également le tableau IV.

La corrélation positive signalée initialement pour les femmes de la ville minière de Workson (Hill et al., 1973) après correction en fonction des régions minières et des classes sociales - n'est plus significative - (Davies, 1980).

**Modèle pour l'étiologie des carcinomes gastriques (en partie d'après
Correa, 1983)**

facteur alimentaire

cavité gastrique

muqueuse gastrique

		normale
irritants (NaCl, aspirine)		
	pH élevé	gastrite superficielle
séjour prolongé dans l'estomac		
		gastrite atrophique
formation accrue et effets des mutagènes N-N=O	prolifération bactérienne	
nitrate (NO ₃)	taux accru de NO ₂	
composés azotés _____ (aliments, médicaments)	mutagènes N-N=O	
		carcinomes gastriques

La comparaison, au Chili et en Angleterre, de populations vivant dans des régions à faible ou à haut risque de cancer gastrique n'a pas non plus révélé l'existence d'un lien avec la concentration en nitrate des aliments seuls ou des aliments et de l'eau potable (Armijo et al., 1981 b; Foreman et al., 1985).

L'exposition au nitrate par le biais de la pollution de l'environnement ou des aliments cultivés à l'aide d'engrais naturels au Chili a fait apparaître une corrélation significative entre la charge de nitrate et l'apparition d'un cancer gastrique (Armijo et al., 1985; Zaldivar, 1977). Voir aussi le tableau IV.

Des études relatives à la mortalité par cancer gastrique ont été effectuées sur des ouvriers exposés dans leur activité professionnelle du fait qu'ils travaillaient dans des usines d'engrais.. Aucun signe de corrélation avec le cancer gastrique n'a été décelé (Fraser et al., 1982; Al-Dabbagh et al., 1986). Voir aussi le tableau IV.

Une étude effectuée de 1958 à 1976, sur 556 rémouleurs exposés dans leur activité professionnelle à des liquides de coupe contenant du nitrite et des amines, n'a révélé aucune augmentation du risque de cancer (Järvholm et al., 1986).

Les personnes présentant une achlorhydrie gastrique et les patients suivant un traitement à la cimétidine ou prenant des médicaments antiacides constituent un groupe à risque particulier. Il semble que la gastrite chronique, notamment sous sa forme atrophique, constitue un facteur intrinsèque important dans la genèse du cancer de l'estomac (Cuello et al., 1976; Ru-fu et al., 1984; Tannenbaum et Correa, 1985). Voir aussi le tableau V.

La gastrite atrophique est un facteur à prendre en compte dans la détermination du taux de nitrite gastrique; en effet, l'administration de nitrate à des sujets atteints de ce type de gastrite se traduit par une concentration de nitrite dix fois supérieure à celle qui est trouvée chez des individus dont la muqueuse gastrique est normale. Une dose de nitrate donnée peut être inoffensive pour des sujets normaux mais nocive pour des patients atteints de gastrite atrophique, particulièrement en cas de présence de précurseurs des nitrosamines ou des nitrosamides dans les denrées alimentaires (voir 1.3.).

D'après Ruddell et al. (1978), les patients présentant un déficit en fer accompagné de lésions gastriques et les patients atteints d'anémie pernicieuse (AP) sont prédisposés au cancer gastrique; leur taux de réduction du nitrate en nitrite est élevé. Les taux de réduction ainsi que le nombre de bactéries étaient presque cinquante fois plus élevés chez les patients atteints d'AP que chez des personnes témoins (Ruddell et al., 1978; Reed et al., 1981b).

IIème PARTIE

ANNEXE IV

Résumé du rapport V 87.378 des Instituts TNQ-CIVO concernant la toxicité orale subchronique du nitrite de potassium chez le rat

1. Une étude de toxicité orale sub-chronique a été effectuée chez le rat avec du nitrite de potassium (KNO_2). Des groupes de rats Wistar âgés de 6 semaines, constitués de 10 animaux mâles et de 10 femelles, ont reçu du KNO_2 à des doses de 0, 100, 300, 1000 ou 3000 ppm dans leur eau de boisson (eau du robinet) pendant une période de 13 semaines. La concentration en potassium des solutions d'essai a été ajustée à une concentration en potassium égale à celle de la solution de KNO_2 contenant 3000 ppm par addition d'une quantité appropriée de KCl . Un groupe supplémentaire constitué de 10 animaux mâles et de 10 femelles a reçu de l'eau de boisson à laquelle on avait ajouté uniquement du KCl , en quantité égale à la concentration en K de la solution contenant 3000 ppm de KNO_2 .

2. L'état de santé général, le comportement et la survie des animaux n'étaient pas affectés par l'ingestion de nitrite de potassium.

3. Le poids corporel moyen, l'ingestion de nourriture et le rendement des aliments étaient diminués à une dose de 300 ppm, chez les mâles uniquement. L'ingestion de liquide était diminuée à des doses de 1000 et de 3000 ppm chez les mâles et à une dose de 3000 ppm chez les femelles, chez les mâles, les modifications étaient en corrélation avec la dose.

4. La concentration en méthémoglobine était considérablement accrue à 3000 ppm chez les animaux des deux sexes.

On a noté une légère diminution de la concentration en hémoglobine, du volume des cellules tassées et du nombre de globules rouges à des doses de 1000 et 3000 ppm chez les animaux des deux sexes.

5. La densité de l'urine était augmentée, alors que son volume était réduit, dans le groupe ayant reçu une dose de 3000 ppm.

6. Le taux d'azote à l'urée dans le plasma était augmenté et l'activité de la phosphatase alcaline du plasma était plus basse à une dose de 3000 ppm chez les animaux des deux sexes.

7. On a décelé une très petite quantité de nitrite (1 mg/l environ) dans la salive des rats recevant une dose de 3000 ppm de KNO_2 .

8. On n'a décelé aucun signe d'activité mutagène dans l'urine des rats recevant 3000 ppm de KNO_2 , en présence comme en absence de mélange S9 et de B-glucuronidase.

9. Le poids relatif des reins était considérablement augmenté à une dose de 3000 ppm. Le poids relatif de la rate était augmenté chez les femelles ayant reçu la dose la plus forte.

10. L'autopsie des animaux n'a révélé aucune anomalie associée au traitement.

11. L'examen microscopique a révélé une légère hypertrophie de la zone glomérulée de la glande surrénale chez les animaux appartenant à tous les groupes traités avec du KNO_2 , quel que soit leur sexe. L'incidence de ce phénomène était liée à la dose. Cette hypertrophie n'a été décelée chez aucun des mâles des deux groupes témoins et n'a été observée que chez l'une des femelles du groupe témoin recevant du KCl .

12. L'hyperplasie de la glande surrénale se produisant même dans les groupes recevant la dose la plus faible, on est parvenu à la conclusion que, dans les conditions expérimentales utilisées, la dose sans effet du KNO_2 était inférieure à 100 ppm dans l'eau de boisson, ce qui était inférieur à 10 mg/kg de poids corporel/jour environ.

Bibliographie de la IIème partie ⁵

- Al-Dabbagh, S. et al. (1986) Mortality of nitrate fertiliser workers. *Brit. J. Ind. Med.* 43: 507-515.
- Alexandrov, V.A. and Jänisch, W. (1971) Die teratogene Wirkung von Äthylharnstoff und Nitrit bei Ratten. *Experientia* 27, 538-539.
- Amacher, D.E. and Paillet, S.C. (1982) Hamster hepatocyte mediated activation of procarcinogens to mutagens in the L5178Y/TK mutation assay. *Mutat. Res.* 106, 305-316.
- Amacher, D.E. and Paillet, S.C. (1983) The activation of procarcinogens to mutagens by cultured rat hepatocytes in the L5178Y/TK mutation assay. *Mutat. Res.* 113, 77-88.
- Amlacher, E. (1982) Short-term tests in screening programs of environmental chemical carcinogens. *Exp. Pathol.* 22, 187-202.
- Amlacher, E. and Rudolph, Ch. (1978) Kern-DNS-Syntheserate und Markierungsindex in ihrem Verhalten bei Einwirkung carcinogener und nichtcarcinogener Substanzen auf den Organismus wachsender CBA-Mäuse. Das Thymidineinbau-Screening-System (TSS). *Exp. Pathol.* 16, 69-82.
- Anonymous (1966) Spinach - a risk to babies. *Brit. Med. J.* i, 250-251
- Aoyagi, M. et al. (1980) Induction of liver tumors in Wistar rats by sodium nitrite given in pellet diet. *J. Natl. Cancer Inst.* 65, 411-414.
- Ariga, H. et al. (1984) Transfer of sodium nitrate administered in maternal rat to milk and suckling offspring. *Nippon Eiyo, Shokuryo Gakkaishi* 37, 177-184.
(Abstract in *Chemical Abstracts* 101, 85246)
- Armijo, R. and Coulsen, A.H. (1975) Epidemiology of gastric cancer in Chile - the role of nitrogen fertilizers. *Int. J. Epidemiol.* 4, 301-309.
- Armijo, R. et al. (1981a) Epidemiology of gastric cancer in Chile. I. Case - control study. *Int. J. Epidemiol.* 10, 53-56.
- Armijo, R. et al. (1981b) Epidemiology of gastric cancer in Chile. II. Nitrate exposures and stomach cancer frequency. *Int. J. Epidemiol.* 10, 57-62.
- Ashby, J. (1981) Overview of study and test chemical activities. *Prog. Mutat. Res.* 1, 112-171.

⁵La bibliographie a été complétée en juillet 1986. Quelques études plus récentes sont également mentionnées.

- Balish, E. et al. (1981) Distribution and metabolism of nitrate and nitrite in rats. Banbury Report 7, 305-317; 337-341.
- Bartholomew, B. and Hill, M.J. (1984) The pharmacology of dietary nitrate and the origin of urinary nitrate. *Fd. Chem. Toxicol.* 22, 789-795.
- Behroozi, K. et al. (1971) Changes in the motor activity of mice given sodium nitrite drinking solution. In: Proceedings of a Symposium on Environmental Physiology, Beersheba.
- Berende, P.L.M. et al. (1977) Dynamic and kinetic aspects of nitrate in rations for milk fed calves. ILOB Reports 430-430a.
- Beresford, S.A.A. (1985) Is nitrate in the drinking water associated with the risk of cancer in the urban UK? *Int. J. Epidemiol.* 14, 57-63.
- Bermudez, E. et al. (1982) Detection of DNA damage in primary cultures of rat hepatocytes following *in vivo* and *in vitro* exposure to genotoxic agents. *Environ. Mutagen.* 4, 667-679.
- Bhide, S.V. et al. (1984) Epidemiological and experimental studies on tobacco-related oral cancer. *IARC Sci. Publ.* 57, 851-857.
- Bianchi, V. et al. (1982) Scintillometric determination of DNA repair in human cell lines: a critical appraisal. *Mutat. Res.* 93, 447-463.
- Bignami, M. et al. (1981) Growth-mediated metabolic activation of promutagens in *Aspergillus nidulans*. *Mutat. Res.* 80, 265-272.
- Birdsall, J.J. (1981) Human dietary nitrite intake and results of animal feeding studies of nitrite. Paper presented at the Public Meeting of the Committee on Nitrite and Alternative curing Agents in Food, National Academy of Sciences, Washington.
- Bloomfield, R.A. et al. (1962) Gastric concentration of nitrate in rats. *J. Anim. sci.* 21, 1091, Abstr. 221.
- Boyland, E. and Walker, S.A. (1974) Effect of thiocyanate on nitrosation of amines. *Nature* 248, 601-602.
- Bradley, W.B. et al. (1942) Livestock poisoning by oat hay and other plants containing nitrate. *Wyoming Agr. Expt. Sta. Bull.* 241.
- Bresler, S.E. et al. (1968) Inactivation and mutagenesis on isolated DNA.
III. Additivity of action of different agents on transforming DNA. *Mutat. Res.* 5, 209-215.
- Bruce, W.R. and Heddle, J.A. (1979) The mutagenic activity of 61 agents as determined by the micronucleus, Salmonella, and sperm abnormality assays. *Can. J. Genet. Cytol.* 21, 319-334.

- Brüggemann, J. and Tiews, J. (1964) Über den Einfluss von NO₂- Ionen und unterschiedlichen Umwelttemperaturen auf die Karotinumwandlung beim Küken. *Int. Z. Vitaminforsch.* 2, 233-240.
- Budayova, E. (1985) Effects of sodium nitrite and potassium sorbate on *in vitro* cultured mammalian cells. *Neoplasma* 32, 341-350.
- Carlo, P. et al. (1983) Viscometric analysis of DNA damage in kidney and lung following exposure of rats to small doses of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 4, 137-140.
- Carratore, R. del et al. (1983) Cytochrome P-450 factors determining synthesis in strain D7 *Saccharomyces cerevisiae*: an alternative system to microsomal assay. *Mutat. Res.* 121, 117-123.
- Carstensen, J. and Hasselager, L.B. (1972) *Int. Meeting on Terat. Act. Pisa.*
- Charnley, G. et al. (1982) Gastric cancer : An etiologic model. *Banbury Report* 12, 503-319.
- Chen, D.J. et al. (1982) Induction of 6-thioguanine-resistant mutations by rat-liver homogenate (S9)-activated promutagens in human embryonic skin fibroblasts. *Mutat. Res.* 101, 87-98.
- Chow, C.K. et al. (1980) Effect of nitrate and nitrite in drinking water on rats. *Toxicol. Letters* 6, 199-206.
- Clive, D. et al. (1979) Validation and characterisation of the L5178 Y/TK+/- mouse lymphoma mutagen assay system. *Mutat. Res.* 50, 61-108.
- Cohen, B. and Myant, N.B. (1959) Concentration of salivary iodide : A comparative study. *J. Physiol.* 145, 595-610.
- As cited in Mirvish (1983) *J. Natl. Cancer Inst.* 71, 629-647.
- Cole, R.J. et al. (1983) Short-term tests for transplacentally active carcinogens: a comparison of sister-chromatid exchange and the micronucleus test in mouse fetal liver erythroblasts. *Mutat. Res.* 113, 61-75.
- Comly, H.H. (1945) Cyanosis in infants caused by nitrates in well water. *J. Amer. Med. Ass* 129 112 - 116.
- Committee on Nitrate Accumulation (1972) *Accumulation of nitrate.* Washington D.C., National Academy of Sciences, 48.
- Coordinating Committee for the Monitoring of Radioactivity and Xenobiotic substances (CCRX) van Went, G.F. (1986) Effects of nitrates, nitrites and nitrosamines on animals and humans. In: *Evaluation report nitrogen - compounds in the Dutch environment.*

- Cornblatt, M. and Hartmann, A.F. (1948) Methaemoglobinaemia in young infants. *J. Ped.* 33.
- Corré, W.J. and Breimer, T. (1979) Nitrate and nitrite in vegetables. Literature Survey nr. 39, Center for Agricultural Publishing Documentation, Wageningen.
- Correa, P. (1983) The gastric precancerous process. *Cancer surveys* 2, 437-450.
- Correa, P. et al. (1975) A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet* ii, 58-60.
- Correa, P. et al. (1976) Gastric cancer in Colombia, III. Natural history of precursor lesions. *J. Natl. Cancer Inst.* 57, 1027-1035.
- Crawford, R.F. (1960) Some effects of nitrates in forage on ruminant animals. Thesis. Ph.D., Cornell University, Ithaca, New York.
- Cuello, C. et al. (1976) Gastric cancer in Colombia. I. Cancer risk and suspect environmental agents. *J. Natl. Cancer Inst.* 57, 1015-1020.
- Czygan, P. et al. (1973) Cytochrome P-450 content and the ability of liver microsomes from patients undergoing abdominal surgery to alter the mutagenicity of a primary and a secondary carcinogen. *J. Natl. Cancer Inst.* 51, 1761-1764.
- Davies, J.M. (1980) Stomach cancer mortality in Worksop and other Nottinghamshire mining towns. *Br. J. Cancer* 41, 438-445.
- Davison, K.L. et al. (1964) Nitrate toxicity in dairy heifers. I. Effects on reproduction, growth, lactation, and vitamin A nutrition. *J. Dairy Sci.* 47, 1065-1073.
- Davison, K.L. et al. (1965) Responses in pregnant ewes fed forages containing various levels of nitrate. *J. Dairy Sci.* 48, 968-977.
- De Serres, F.J. et al. (1967) Allelic complementation among nitrous acid-induced ad- 3B mutants of *Neurospora crassa*. *Mutat. Res.* 4, 415-424.
- Den Tonkelaar, E.M. (1985) Personal communication, RIV Bilthoven, Neth.
- De Vos, R.H. (1978) Additieven en chemische kontaminanten in ons voedsel. *Voedingsmiddelentechnologie* 11, 24-26.
- De Vos, R.H. and Van Dokkum, W. (1978) Vreemde stoffen in het voedsel. TNO-Project 6, 16-20.
- De Vries, Th. Onderzoek naar de toxiciteit van nitriet. Bijlage brief d.d. 30 december 1983, ref. U 275/83 AlgTox st/ah Nitriet-toxiciteit, RIV, Bilthoven, Neth.
- Diskalenko, A.P. and Dobrjanskaja, E.V. (1972a) Changes in redox processes in hepatic and cerebral tissues as a result of the ingestion of nitrates with drinking water. In: Topical questions of hygiene and epidemiology. Kisinev, 22-23.

- Diskalenko, A.P. and Trofimenko, Ju.N. (1972b) Changes in the activity of the glutathione - ascorbic acid system and respiration in erythrocytes as a result of the ingestion of nitrites with drinking water. In: Topical questions of hygiene and epidemiology, Kisinev, 23 -25.
- Druckrey, H. et al. (1963b) Prüfung von Nitrit auf chronisch toxische Wirkung an Ratten. *Arzneim. Forsch.* 13, 320-323.
- Dull, B.J. and Hotchkiss, J.H. (1984) Nitrate balance and biosynthesis in the ferret. *Toxicol. Lett.* 23, 79-89.
- Edwards, D.A.W. et al. (1954) Antagonism between perchlorate, iodide, thiocyanate, and nitrate for secretion in human saliva. *Lancet*, March 6, 498-499.
- Eisenbrand, G. et al. (1980) Nitrate and nitrite in saliva. *Oncology* 37, 227-231.
- Ellen, G. and Schuller, P.L. (1983) Nitrate, origin of continuous anxiety. In: *Das Nitrosamin Problem*. R. Preusmann (ed.), Deutsche Forschungsgemeinschaft, Verlag Chemie GmbH, Weinheim, 97-134.
- El Nahas, S.M. and Globus, M. (1984) Chromosomal aberrations induced by sodium nitrite in bone marrow of adult rats and liver cells of transplacentally exposed embryos. *J. Toxicol. Environ. Health* 13, 643-647.
- Emerick, R.J. (1974) Consequences of high nitrate levels in feed and water supplies. *Fed. Proc. Fed. AM. Soc. Exp. Biol.* 33, 1183-1187.
- Emerick, R.J. et al. (1965) Rate of formation and reduction of nitrite-induced methaemoglobin *in vitro* and *in vivo* as influenced by diet of sheep and age of swine. *J. Anim. Sci.* 24, 221-230.
- Fahrig, R. et al. (1981) Mutagenicity of selected chemicals in the mammalian spot test. *Environ. Sci. Res.* 24, 709-727.
- Fasset, D.W. (1973) Nitrates and nitrites. Toxicants occurring naturally in foods. *Comm. in Food Protection*. Washington D.C.: Natl. Acad. Sci., 7-25.
- Fine, D.H. et al. (1982) Endogenous synthesis of volatile nitrosamines: model calculations and risk assessment. *IARC Sci. Publ.* 41, 379-396.
- Fitzsburgh, O.G. and Nelson, A.A. Unpublished data. Div. Pharmacology, FDA.
- Food and Drug Administration (1980a) Re-evaluation of the Pathology Findings of Studies on Nitrite and Cancer: Histologic lesions in Sprague-Dawley Rats. Final Report submitted by the Universities Associated for Research and Education in Pathology, to the Food and Drug Administration, Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Washington D.C..

- Food and Drug Administration. (1980b) Evaluation of the MIT Nitrite Feeding Study to Rats. Report by the Interagency Working Group on Nitrite Research. Food and Drug Administration, Public Health Service, Department of Health and Human Services, Washington, D.C.
- Food Council (1986) Factors in the food and the development of cancer. Committee Food and Cancer.
- Forman, D. et al. (1985) Nitrates, nitrites and gastric cancer in Great Britain, *Nature* 313, 620-625.
- Fraser, P. et al. (1980) Nitrate and human cancer: a review of the evidence. *Int. J. Epidemiol.* 9, 3-11.
- Fraser, P. et al. (1982) Census-based mortality study of fertiliser manufacturers. *Br. J. Ind. Med.* 39, 323-329.
- Freund, H.A. (1937) Clinical manifestations and studies in parenchymatous hepatitis. *Ann. Int. Med.* 10, 1144-1155. As cited by Pedal et al. (1982).
- Frezza, D. et al. (1983) The intrasanguineous host-mediated assay procedure using *Saccharomyces cerevisiae*: comparison with two other metabolic activation systems. *Mutat. Res.* 108, 161-168.
- Friedman, M.A. and Staub, J. (1976) Inhibition of mouse testicular DNA synthesis by mutagens and carcinogens as a potential simple mammalian assay for mutagens. *Mutat. Res.* 37, 67-76.
- Friedman, M.A. et al. (1972) Rapid gastric absorption of sodium nitrite in mice. *J. Pharm. Sci.* 61, 1492-1494.
- Fritsch, P. et al. (1985) Excretion of nitrates and nitrites in saliva and bile in the dog. *Fd. Chem toxicol.* 23, 655-659.
- Geurink, J.H. and Kemp, A. (1979) Nitraat in ruwvoeders in relatie tot de gezondheid van het vee. *Stikstof* 102, 35-42.
- Geurink, J.H. et al. (1979) Nitrate poisoning in cattle. 3. The relationship between nitrate intake with hay or fresh roughage and the speed of intake on the formation of methemoglobin. *Neth. J. Agric. Sci.* 27, 268-276.
- Green, L.C. et al. (1981a) Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science* 212, 56-58.
- Green, L.C. et al. (1981b) Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 7764-7768.
- Green, L.C. et al. (1982) Nitrate in human and canine milk. *New Engl. J. Med.* 306, 1367-1368.

- Greenberg, M. (1945) Outbreak of sodium nitrite poisoning. *Am. J. Publ. Health* 35, 1217-1220.
- Grüner, N. and Shuval, H.I. (1971) Health aspects of nitrates in drinking water. In : *Environmental Quality and Safety*, vol. II.
- Grüner, N. et al. (1973) Methemoglobinemia induced by transplacental passage of nitrites in rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 9, 44-48.
- Gwatkin, R. and Plummer, P.J.G. (1946) Toxicity of certain salts of sodium and potassium for swine. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci* 10, 183-190.
- Hack, W.W.M. et al. (1983) Spinazie: bron van nitrietvergiftiging bij jonge kinderen. *Ned. T. v. Geneesk.* 127, 1428-1431.
- Hartmann, P.E., in *Chemical Mutagens Vol. 7* (Eds. de Serres, J.J. and Magee, P.N.) 211-294, Plenum New York (1981).
- Hartmann, P.E. (1983) Review: Putative mutagens and carcinogens in foods. I. Nitrate/nitrite ingestion and gastric cancer mortality. *Environ. Mutagen.* 5 111-121.
- Hayashi, M. et al. (1981) Micronucleus tests on food additives, Annual Report Mutagen. Toxicol. 4, 80.
- Hegesh, E. and Shiloah, J. (1982) Blood nitrates and infantile methemoglobinemia. *Clin. Chim. Acta* 125, 107-115.
- Helgason, T. and Jonasson, M.R. (1981) Evidence for a food additive as a cause of ketosis-prone diabetes. *Lancet* ii 716-620.
- Helgason, T. et al. (1982) Diabetes produced in mice by smoked/cured mutton. *Lancet* ii, 1017-1021.
- Hill, M.J. et al. (1973) Bacteria, nitrosamines and cancer of the stomach. *Br. J. Cancer* 28, 562-567.
- Hugot, D. et al. (1980) Influence de fortes doses de nitrite de sodium sur les performances de reproduction chez la rate. *Ann. Knitter. Alim.* 34, 1115-1124.
- Hunt, J.N. and Pathak, J.D. (1960) The osmotic effects of some simple molecules and ions on gastric emptying. *J. Physiol.* 154, 254-269.
- Ide, F. et al. (1981) Detection of chemical carcinogens by assay of unscheduled DNA synthesis in rat tracheal epithelium in short-term organ culture. *J. Cancer Res. Clin Oncol.* 102, 115-126.
- Ide, F. et al. (1982) Unscheduled DNA synthesis in human oral mucosa treated with chemical carcinogens in short-term organ culture. *J. Natl. Cancer Inst.* 69, 557-563.

- Inai, K. et al. (1979) Chronic toxicity of sodium nitrite in mice, with reference to its tumorigenicity. *Gann* 70, 203-208.
- Inoue, K. et al (1983) Induction of sister-chromatid exchanged in human lymphocytes by indirect carcinogens with and without metabolic activation. *Mutat. Res.* 117, 301-309.
- Inui, N. et al (1979) Transplacental action of sodium nitrite on embryonic cells of Syrian golden hamster. *Mutat. Res.* 66, 149-158.
- Ishidate, M. et al. (1981) Chromosomal aberration tests *in vitro* as a primary screening tool for environmental mutagens and/or carcinogens. *Gann Monogr. Cancer Res.* 27, 95-108.
- Ishidate, M. (1985) Personal communication.
- Ishidate, M. et al. (1984) Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. *Fd. Chem. toxicol.* 22, 623-636.
- Jaffé, E.R. (1981) Methaemoglobinaemia. *Clin. Haematol.* 10, 99-122.
- Järholm, B. et al. (1986) Cancer morbidity in workers exposed to cutting fluids containing nitrites and amines. *Br. J. Ind. Med.* 43, 563-565.
- Jensen, C.W. and Anderson, H.D. (1941) Rate of formation and disappearance of methemoglobin following oral administration or injection of sodium nitrite. *Proc. S. D. Acad. Sci.* 21, 37-40.
- Jensen, O.M. (1982) Nitrate in drinking water and cancer in Northern Jutland, Denmark, with special reference to stomach cancer. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 6, 258-267.
- Joossens, J.V. and Geboers, J. (1981) Nutrition and gastric cancer. *Proc. Nutr. Soc.* 40, 37-46.
- Juhász, L. et al. (1980) Possible relationship between nitrate in drinking water and incidence of stomach cancer. *IARC Sci. Publ.* 31, 619-623.
- Kada, T. (1981) Mutagenicity of selected chemicals in the rec-assay in *Bacillus subtilis*. *Environ. Sci. Res.* 24, 18-26.
- Katz, M. et al. (1980) An analysis of weak mutagens in the Ames assay. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 3, 171-187.
- Kaudewitz, F. (1959) Production of bacterial mutants with nitrous acid. *Nature* 183, 1829-1830.
- Kawachi, T. et al. (1980) Results of recent studies on the relevance of various short-term screening tests in Japan. In: the predictive value of short-term screening tests in carcinogenicity evaluation; ed. by Williams, G.M. et al., Elsevier, A'dam, 253-257.

- Kinoshita, S. and Kakihiro, H. (1985) Effects of sodium nitrite on the cardiac muscle of mice. *Nippon Koshu Risei Zasshi* 32, 79-84.
- Kligerman, A.D. et al. (1985) Induction of sister-chromatid exchange (SCE) and cell cycle inhibition in mouse peripheral blood B lymphocytes exposed to mutagenic carcinogens *in vivo*. *Mutat. Res.* 157, 181-187.
- Kodama, F. et al. (1976) Mutagenic effect of sodium nitrite on cultured mouse cells. *Mutat. Res.* 40, 119-124.
- Koenig, C.C. and Chasar, M.P. (1984) Usefulness of the hermaphroditic marine fish, *Rivulus marmoratus*, in carcinogenicity testing. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 65, 15-33.
- Konetzka, W.A. (1974) Mutagenesis by nitrate reduction in *Escherichia coli*. Abstract Annual Meeting Am. Soc. Microbiol., Washington. Abstr. no. G106.
- Lee, K. et al. (1986) Nitrate, nitrite balance, and *de novo* synthesis of nitrate in humans consuming cured meats. *Am. J. Clin. Nutr.* 44, 188-194.
- Lehman, A.J. (1958) Quarterly report to the Editor on Topics of Current Interest. Nitrates and Nitrites in Meat Products. *Quart. Bull. Ass. Food Drug Off.* 22, 136-138.
- Leu, D. et al. (1986) Bericht über Nitrate im Trinkwasser-Standortbestimmung 1985. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 77, 227-315.
- Li, M. et al. (1980) Recent progress in research on esophageal cancer in China. *Adv. Cancer Res.* 33, 163-249.
- Lijinsky, W. et al. (1983) Altered incidences of hepatic and hemopoietic neoplasms in F344 rats fed sodium nitrite. *Carcinogenesis* 4, 1189-1191.
- Lowenfels, A.B. et al. (1978) Nitrite studies in oesophageal cancer. *Gut* 19, 199-201.
- Luca, D. et al. (1985) Chromosomal aberrations and micronuclei induced in rat and mouse bone marrow cells by sodium nitrate. *Mutat. Res.* 155, 121-125.
- Maekawa, A. et al. (1982) Carcinogenicity studies of sodium nitrite and sodium nitrate in F-344 rats. *Fd. Chem. Toxicol.* 20, 25-33.
- Mamber, S.W. et al. (1983) The *Escherichia coli* WP2/WP100 rec assay for detection of potential chemical carcinogenesis. *Mutat. Res.* 119, 135-144.

- Mammalian Toxicity Array; Series "Scientific Reviews of Soviet Literature on Toxicity and Hazards of Chemicals" (1982).
- Manoharan, K. and Banerjee, M.R. (1985) Measurements of chemical carcinogen-induced sister-chromatid exchanges in a whole organ *in vitro*. *Mutat. Res.* 147, 165-169.
- Marquardt, H. et al. (1977) On the aetiology of gastric cancer: mutagenicity of food extracts after incubation with nitrite. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 15, 97-100.
- Martin, C.N. et al. (1978) Testing of known carcinogens and noncarcinogens of their ability to induce unscheduled DNA synthesis in HeLa cells. *Cancer Res.* 38, 2621-2627.
- Matsuoka, A. et al. (1979) Chromosomal aberration test on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro*. *Mutat. Res.* 66, 277-290.
- Matter, B.E. and Wild, D. (1981) Mutagenicity of selected chemicals in the mammalian micronucleus test. *Environ. Sci. Res.* 24, 657-680.
- McCann, J. et al. (1975) Detection of carcinogens and mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 5135-5139.
- McCarroll, N.E. et al. (1981a) An E.coli microsuspension assay for the detection of DNA damage induced by direct-acting agents and promutagens. *Environ. Mutag.* 3, 429-444.
- McCarroll, N.E. et al. (1981b) A microsuspension adaption of the Bacillus subtilis "rec" assay. *Environ. Mutag.* 3, 607-616.
- McIlwain, P.K. and Schipper, J.A. (1963) Toxicity of nitrate nitrogen to cattle. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 142, 502-505.
- McQueen, C.A. et al. (1983) The hepatocyte primary culture DNA repair assay using mouse or hamster hepatocytes. *Environ. Mutag.* 5, 1-8.
- Michalopoulos, G. et al. (1981) Mutagenesis induced by procarcinogens at the phosphoribosyl-transferase locus of human fibroblasts cocultured with rat hepatocytes. *Cancer Res.* 41, 1873-1878.
- Mihara, S. and Shibamoto, T. (1982) Mutagenicity of products obtained from cysteamine-glucose browning model systems. *J. Agric. Fd. Chem.* 28, 62.
- Mirsalis, J.C. and Butterworth, B.E. (1980) Detection of unscheduled DNA synthesis in hepatocytes isolated from rats treated with genotoxic agents: an *in vivo-in vitro* assay for potential carcinogens and mutagens. *Carcinogenesis* 1, 621-625.
- Mirsalis, J.C. et al. (1982) Detection of genotoxic carcinogens in the *in vivo-in vitro* hepatocyte DNA repair assay. *Environ. Mutagen.* 4, 553-562.

- Mirvish, S.S. (1985) Gastric cancer and salivary nitrate and nitrite. *Nature* 315, 461-462.
- Mirvish, S.S. et al. (1975) Disappearance of nitrite from the rat stomach : contribution of emptying and other factors. *J. Natl. Cancer Inst.* 54, 869-875.
- Modan, B. et al, (1974) The role of starches in the etiology of gastric cancer. *Cancer* 34, 2087-2092.
- Mohn, G.R. et al. (1983) A differential DNA-repair test using mixtures of *E. coli* K12 strains in liquid suspension and animal-mediated assays. *Mutat. Res.* 113, 403-415.
- Mueller, R.L. et al. (1984) Dynamik der endogenen bakteriellen Nitritbildung im Magen. I. Mitteilung: Verlaufsbeobachtung am Menschen unter natürlichen Bedingungen. *Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. B.* 179, 381-396.
- Musil, J. (1966) Der Einfluss einer chronischen Natriumnitrit-Intoxikation auf Ratten. *Acta biol. med. germ.* 16, 388-392.
- Natarajan, A.T. et al (1978) An evaluation of the use of peripheral blood lymphocyte systems for assessing cytological effects induced *in vivo* by chemical mutagens. In: *Mutagen-induced chromosome damage in man*; ed. by Evans and Lloyd, Edinburgh, Univ. Press, 268-274.
- National Academy of Sciences (1981) The Health Effects of Nitrate, Nitrite and N-nitroso-compounds. Part 1 of a 2-part study by the Committee on Nitrite and Alternative Curing Agents in Foods. National Academy Press, Washington.
- Neal, S.B. and Probst, G.S. (1983) Chemically induced sister-chromatid exchange *in vivo* in bone-marrow of Chinese hamsters; an evaluation of 24 compounds. *Mutat. Res.* 113, 33-42.
- Nelson, W.E. et al. (1983) *Textbook of pediatrics*. 12th edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 148-163.
- Nestmann, E.R. et al. (1982) differential survival as an indicator of potential mutagenicity using repair deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Can. J. Genet. Cytol.* 24, 771-775.
- Newberne, P.M (1978) Dietary Nitrite in the rat. Final report on contract FDA 740-2181 Food and Drug Administration, USA ; Dept Nutrition and Food Science MIT, Cambridge Massachusetts USA.
- Newberne, P.M. (1979) Nitrite promotes lymphoma incidence in rats. *Science* 204 1079 - 1081.

- Newberne, P. M. (1984) Personal communication.
- Newberne, P.M. and Shank, R.C. (1973) Induction of liver and lung tumors in rats by the simultaneous administration of sodium nitrite and morpholine. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 11, 819-825.
- News (1984) Doubts over nitrate cancer link increase. *Chemistry and Industry* 4 March, 139.
- News (1984) Geologist reaffirms nitrate fears. *Chemistry and Industry* 16 Oct., 678.
- News (1985) Government appoints nitrate study team. *Chemistry and Industry* 21 Jan., 35.
- Nighat, S. et al. (1981) Induced nitrate poisoning in rabbits. *Pakistan Vet. J.* 1, 10-12.
- Nijhuis, H. et al. (1982) Tierexperimentelle Untersuchungen zur Ermittlung der carry over-Rate von Nitrat in die Milch nach oraler Aufnahme beim laktierenden Rind. *Milchwissenschaft* 37, 30-32.
- Noordam, P.C. (1985) Nitraatnorm drinkwater realistisch. *H₂O* 18, 252-253.
- O'Connor, P.J. (1981) Interaction of chemical carcinogens with macromolecules. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 99, 167-186.
- Okinaka, R.T. et al. (1981) Comparison between sister-chromatid exchange and mutagenicity following exogenous metabolic activation of promutagens. *Mutat. Res.* 91, 57-61.
- Olsen, P. et al. (1984) Animal feeding study with nitrite-treated meat. *IARC Sci. Publ.* 57, 667-675.
- O'Neill, J.P. et al. (1977) A quantitative assay of mutation induction at the hypoxanthin guanine phosphoribosyl transferase locus in Chinese hamster ovary cells (LHO/HGPRT system): Utilization with a variety of mutagenic agents. *Mutat. Res.* 45, 103-109.
- Painter, R.B. and Howard, R. (1982) The HeLa DNA-synthesis inhibition test as a rapid screen for mutagenic carcinogens. *Mutat. res.* 92, 427-437.
- Parks, N.J. et al. (1981) Nitrogen-13-labeled nitrite and nitrate: distribution and metabolism after intratracheal administration, *Science* 212, 58-60.
- Parodi, S. et al. (1978) A practical procedure for testing DNA damage *in vivo* proposed for a prescreening of chemical carcinogens. *Mutat. Res.* 54, 39-46.

- Petzold, G.L. and Swenberg, J.A. (1978) Detection of DNA damage induced *in vivo* following exposure of rats to carcinogens. *Cancer Res.* 38, 1589-1598.
- Pocock, S.J. (1985) editorial: Nitrates and gastric cancer. *Human Toxicol.* 4 471-474.
- Probst, G.S. et al. (1981) Chemically-induced unscheduled DNA synthesis in primary rat hepatocyte cultures: A comparison with bacterial mutagenicity using 218 compounds. *Environ. Mutagen.* 3, 11-32.
- Pueyo, C. et al. (1979) Evaluation of three metabolic activation systems by a forward mutation assay in Salmonella. *Mutat. Res.* 64, 183-194.
- Racine, R.R. and Schmid, B.P. (1983) Biological monitoring of mice sperm heads for UDS after exposure to various chemicals. *Mutat. Res.* 113, 295-296.
- Reed, P.I. et al. (1981) Effect of cimetidine on gastric juice N-nitrosamine concentration. *Lancet* *ii*, 553-555.
- Risch, H.A. et al. (1985) Dietary factors and the incidence of cancer of the stomach. *Am. J. Epidemiol.* 122, 947-959.
- Rosenfield, A.B. and Huston, R. (1950) Infant methaemoglobinemia in Minnesota due to nitrates in well water. *Minn. Med.* 33, 787-796.
- Rosenkranz, H.S. (1981) Mutagenicity of selected chemicals in Escherichia coli DNA repair deficient assay. *Environ. Sci. Res.* 24, 5-17.
- Ruddell, W.S.J. et al. (1976) Gastric juice nitrite: a risk factor for cancer in the hypochlorhydric stomach? *Lancet* *ii*, 1037-1039.
- Ruddell, W.S.J. et al. (1978) Pathogenesis of gastric cancer in pernicious anaemia. *Lancet* *i*, 521-523.
- Ru-fu, Z. et al. (1984) A comprehensive survey of etiologic factors of stomach cancer in China. *Chin. Med. J.* 97, 322-332.
- Sander, J. and Seif, F. (1969) Bakterielle Reduktion von Nitrat im Magen des Menschen. *Arzneim. Forsch.* 19, 1091 - 1093
- Saul, R.L. and Archer, M.C. (1984) Oxidation of ammonia and hydroxylamine to nitrate in the rat. In: *IARC Sci. Publ.* 57, 241-246.
- Saul, R.L. et al. (1981) Reevaluation of nitrate and nitrite levels in the human intestine. *Cancer Res.* 41, 2280-2283.
- Savostianow, G. M. (1937) On the question of nitrites in saliva. *Fiziol. Zh. SSR* 23, 159-164.

- Schneider, N.R. and Yeary. R.A. (1975) Nitrite and nitrate pharmacokinetics in the dog, sheep and pony. *Am. J. Vet. Res.* 36, 941-947.
- Schultz, D.S. et al. (1985) Pharmacokinetics of nitrate in humans: role of gastrointestinal absorption and metabolism. *Carcinogenesis* 6, 847-852.
- Schwartz, M. et al. (1979) DNA damage induced *in vivo* evaluated with a non-radioactive alkaline elution technique. *Cancer Lett.* 6, 221-226.
- Schwartz, M. et al. (1980) Carcinogen metabolism and carcinogen-induced strand breaks in DNA of isolated liver cells. *Arch. Toxicol.* 44, 157-166.
- Schweinsberg, F. and Bürkle, V. (1985) Nitrite: a co-carcinogen? *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 109, 200-202.
- Sega, G.A. (1982) DNA repair in spermatocytes and spermatids of the mouse. *Banbury Report* 13, 503-513.
- Sega, G.A. and Mitchell, A.D. (1981) Mutagenicity of selected chemicals in unscheduled DNA synthesis assay. *Environ. Sci. Res.* 24, 633-656.
- Seiler, J.P. (1981) Testicular DNA synthesis inhibition, an *in vivo* system for the detection of mutagenic and carcinogenic chemicals. *Toxicol, Environ. Chem.* 3, 239-247.
- Sell, J.L. and Roberts, W.K. (1963) Effects of dietary nitrite on the chick growth, liver vitamins A stores and thryoid weight. *J. Nutr.* 79, 171-178.
- Sen, N.P. et al. (1969) Formation of N-nitrosamines from secondary amines and nitrite in human and animal gastric juice. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 7, 301 - 307
- Sharma, R.K. et al. (1983) Studies of *in utero* sister chromatid exchange induction and cell replication kinetics. *Environ. Mutagen.* 5, 406.
- Sheehy, M.W. and Way, J.L. (1974) Nitrite intoxication : protection with methylene blue and oxygen. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 30, 221-226.
- Shooter, K.V. (1978) DNA phosphotriester as indicators of cumulative carcinogen-induced damage. *Nature* 274, 612-613.
- Shuval, H.I. and Grüner, N. (1972) Epidemiological and toxicological aspects of nitrates and nitrites in the environment. *Am. J. Public Health* 62, 1045-1052.
- Shuval, H.I. and Grüner, N. (1977) Infant methaemoglobinemia and other health effects of nitrate in drinking water. *Prog. Water Techn.* 8, 183-193.

- Simon, J. et al. (1958) Pathological changes associated with the lowland abortion syndrome in Wisconsin. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 132, 164-169.
- Sina, J.F. et al. (1983) Evaluation of the alkaline elution/rat hepatocyte assay as a predictor of carcinogenic/mutagenic potential. *Mutat. Res.* 113, 357-391.
- Sinha, D.P. and Sleight, S.D. (1971) Pathogenesis of abortion in acute nitrite toxicosis in guinea-pigs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 18, 340-347.
- Sirianni, S.R. and Huang, C.C. (1978) Sister chromatid exchanges by promutagens/carcinogens in Chinese hamster cells cultured in diffusion chambers in mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 158, 269-274.
- Sleight, S.D. and Atallah, O.A. (1968) Reproduction in the guinea-pig as affected by chronic administration of potassium nitrate and potassium nitrite. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 12, 179-185.
- Smith, J.E. and Beutler, E. (1966) Methemoglobin formation and reduction in man and various animal species. *Am. J. Physiol.* 210, 347-350.
- Stanford Research Institute (1972) Study of mutagenic effects of sodium nitrite. Report PB-221 818 1-103.
- Stewart, B.W. (1981) Generation and persistence of carcinogen-induced repair intermediates in rat liver DNA *in vivo*. *Cancer Res.* 41, 3238-3243.
- Strack, H.B. et al. (1964) Comparison of mutation and inactivation rates induced in bacteriophage and transforming DNA by various mutagens. *Mutat. Res.* 1, 10-21.
- Strom, S.C. et al. (1981) Comparison of the effects of chemical carcinogens in mixed cultures of rat hepatocytes and human fibroblasts. *Carcinogenesis* 2, 709-715.
- Strom, S.C. et al. (1983) Human hepatocyte-mediated mutagenesis and DNA repair activity. *Carcinogenesis* 4, 683-686.
- Süss, R. (1965) *Z. Naturforsch.* 20b, 714-715. As cited in Preussmann, R. and Stewart, B.W. (1984).
- Stuer, D.J. and Marletta, M.A. (1985) Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages nitrite and nitrate in response to *E. coli* lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 7738-7742.
- Sugiyama, K. et al. (1979) Carcinogenicity examination of sodium nitrate in mice. *Gifu Daigaku Igakubu Kyo* 27, 1-6.

- Sukegawa, K. and Matsumoto, T. (1975) Nitrate and nitrite contents in cow and human milk. *Eiyō To Shokuryō* 28, 389-393. (Abstract in *Chemical Abstracts* 84, 102816).
- Suter, W. and Jaeger, I. (1982) Comparative evaluation of different pairs of DNA repair-deficient and DNA repair-proficient bacterial tester strains for rapid detection of chemical mutagens and carcinogens. *Mutat. Res.* 97 1-18.
- Suter, K.E. and Kubli, I. (1982) The micronucleus test as a model system for transparentally induced chromosome aberrations. *Teratology* 26(3), 10A.
- Tannenbaum, S.R. and Green, L. (1981) Metabolism of nitrate. In "Gastrointestinal cancer: endogenous factors". *Banbury Report* 7, Bruce, W.R. et al., eds., Cold Spring Harbor Lab., NY 331-.
- Tannenbaum, S.R. et al. (1976) The effect of nitrate intake on nitrite formation in human saliva. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 14, 549-552.
- Tannenbaum, S.R. et al. (1978) Nitrite and nitrate are formed by endogenous synthesis in the human intestine. *Science* 200, 1487-1489.
- Tannenbaum, S.R. et al. (1979) Gastric cancer in Colombia. IV. Nitrite and other ions in gastric contents of residents from a high-risk region. *J. Natl. Cancer Inst.* 62, 9-12.
- Tarr, H.L.A. and Carter, M.H. (1942) The effect of sodium nitrite on experimental animals. *J. Fish. Res. Board Can.* 6, 63-73.
- Taylor, H.W. and Lijinsky, W. (1975) Tumour induction in rats by feeding heptamethylene-imine and nitrite in water. *Cancer Res.* 35, 812-815.
- Thomas, H.F. et al. (1979) Nitrous acid mutagenesis of duplex DNA as a three component system. *Mutat. Res.* 61, 129-151.
- Thorp, F. (1938) Further observations on oat hay poisoning. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 92 159-170.
- Til, H.P. (1986) Nitriet in speeksel na eenmalige dosering van 400 en 2500 mg/kg NO₃ aan ratten. Preliminary comm. TNO, Neth.
- Til, H.P. et al. (1985a) Short-term (4 week) oral toxicity in rats with nitrate added to a cereal basal diet. Interim report V85.288/250458, TNO. Neth.
- Til, H.P. et al. (1985b) Short-term (4 week) oral toxicity in rats with nitrate added to a semi-purified basal diet. Interim report V85.289/250458, TNO. Neth.
- Toxic Substances List (1980).

- Trzos, R.J. et al (1978) The evaluation of sixteen carcinogens in the rat using the micronucleus test. *Mutat. Res.* 58, 79-86.
- Tsuda, H. and Kato, K. (1977) High rate of endoreduplications and chromosomal aberrations in hamster cells treated with sodium nitrite *in vitro*. *Mutat. Res.* 56, 69-74.
- Tsuda, H. et al. (1973) *In vitro* transformation of newborn hamster cells by sodium nitrite. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55, 1117-1124.
- Tsuda, H. et al. (1976) *In vitro* transformation of newborn hamster cells induced by sodium nitrite. *Gann* 67, 165-173.
- Turek, B. et al. (1980) The fate of nitrates and nitrites in the organism. In: IARC Sci. Publ. 31, 625-632.
- Tyson, C. and Mirsalis, J.C. (1983) Measurement of chemically induced DNA repair in rat kidney following *in vivo* treatment. *Environ. Mutagen.* 5, 482.
- Van Beek, C.G.E.M., et al. (1984) Nitraat en drinkwatervoorziening Rep. 84 KIWA, Arnhem, Neth.
- Van Dokkum, W. et al. (1982) Food additives and food components in total diets in the Netherlands. *Br. J. Nutr.* 48, 223-231.
- Van Logten, M.J. et al. (1972) Long-term experiment with canned meat treated with sodium nitrite and glucono-delta-lactone in rats. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 10, 475-488.
- Verly et al. (1967) A comparative study of the action of ethyl methane sulfonate and HNO₂ on the mutation to streptomycin resistance of *Escherichia coli* K12. *Bioch. Biophys. Acta* 145, 752-762.
- Vincent, P. et al. (1983) Nitrates dans l'eau de boisson et mortalité par cancer. *Rev. Epidém. Santé Publ.* 31, 199-207.
- Vogel, E.W. et al. (1981) Mutagenicity of selected chemicals in *Drosophila*. *Environ. Sci. Res.* 24, 175-256.
- Vogtmann, H. (1985) The nitrate story - no end in sight. *Nutrition and Health* 3, 217-239.
- Wagner, D.A. et al. (1983a) Mammalian nitrate biosynthesis: incorporation of ¹⁵NH₃ into nitrate is enhanced by endotoxin treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4518-4521.

- Wagner, D.A. et al. (1983b) Metabolic fate of an oral dose of ¹⁵N-labeled nitrate in humans: effect of diet supplementation with ascorbic acid. *Cancer Res.* 43, 1921-1925.
- Ward, M. (1984) New findings fuel nitrate fears. *Chemistry and Industry*, 16 Oct. 677.
- Watanabe, M. et al. (1982) Mutagenic effects of combinations of chemical carcinogens and environmental pollutants in mice as shown by the micronucleus test. *Mutat. Res.* 97, 43-48.
- Weinstein, D. et al. (1981) Use of rat/hamster S-9 mixture in the Ames mutagenicity assay. *Environ. Mutagen.* 3, 1-9
- Weisburger, J.H. and Raineri, R. (1975) Dietary factors and the etiology of gastric cancer. *Cancer Res.* 35, 3469-3474.
- Weisburger, J.H. et al. (1980) Induction of cancer of the glandular stomach in rats by an extract of nitrite-treated fish. *J. Natl. Cancer Inst.* 64, 163-166.
- Weisburger, J.H. et al. (1981) Dietary factors in the causation and prevention of neoplasia. In: *Cancer achievements, challenges and prospects for the 1980's*. Vol. 1, 545-612. Grune and Stratton, New York.
- WHO Drinking Water Quality Guidelines. WHO Geneva (1984).
- WHO Evaluation of the Toxicity of a number of Antimicrobials and Antioxidants. Sixth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Techn. Rep. Ser. 228, (1962).
- WHO Toxicological Evaluation of some Food Additives including anti-caking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents. WHO-Food Additives Series, nr. 5 (1974).
- WHO Nitrates, Nitrites and N-nitroso-compounds. *Environ. Health Criteria* 5, WHO Geneva (1978).
- WHO Health hazards from nitrate in drinking-water. WHO Copenhagen (1985).
- Wing, M. (1982) Garlic and gastric cancer - the effect of garlic on nitrite and nitrate in gastric juice. *Acta Nutrimenta Sinica* 4, 53-58.
- Winter, A.J. and Hokanson, J.F. (1964) Effects of long-term feeding of nitrate, nitrite or hydroxylamine on pregnant dairy heifers. *Am. J. Vet. Res.* 25 353-361.
- Winton, E.F. et al. (1971) Nitrate in drinking water. *J. Am. Water Works Assoc.* 63, 95-98.

- Wise, A. et al. (1982) Dietary fibre, bacterial metabolism and toxicity of nitrate in the rat. *Xenobiotica* 12, 111-118.
- Witter, J.P. and Balish, E. (1979) Distribution and metabolism of ingested NO₃ and NO₂ in germfree and conventional flora rats. *Appl. Environ. Microbiol.* 38, 861-869.
- Witter, J.P. et al. (1979a) Distribution of nitrogen-13 from labeled nitrate (¹³NO₃) in humans and rats. *Science* 204, 411-413.
- Witter, J.P. et al. (1979b) Distribution of nitrogen-13 from labeled nitrate and nitrite in germfree and conventional flora rats. *Appl. Environ. Microbiol.* 38, 870-878.
- Woodruff, R.C. and Brodberg, R.K. (1983) Comparison of mating schemes for screens of chemical induced heritable translocations in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 119, 293-297.
- Woodruff, R.C. et al. (1984) Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*: I. Comparison of positive and negative control data for sex-linked recessive lethal mutations and reciprocal translocations in three laboratories. *Environ. Mutagen.* 6, 189-222.
- Working, P.K. and Butterworth, B.E. (1984) An assay to detect chemically induced DNA repair in rat spermatocytes. *Environ. Mutagen.* 6, 273-286.
- Wright, A.J. and Davison, K.L. (1964) Nitrate accumulation in crops and nitrate poisoning in animals. *Advan. Agron.* 16, 197-247.
- Wurgler, F.E. and Vogel, E.W. (1985) *In vivo* mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Published in *Chemical Mutagens* 10. Ed. by F.J. de Serres.
- Zaldivar, R. (1977) Nitrate fertilizers as environmental pollutants: positive correlations between nitrates (NaNO₃ and KNO₃) used per unit area and stomach cancer mortality rates. *Experientia* 33, 264-265.
- Zaldivar, R. and Wetterstrand, W.H. (1978) Nitrate-nitrogen levels in drinking water of urban areas with high- and low- risk populations for stomach cancer : an environmental epidemiological study. *Z. Krebsforsch.* 92, 227-234.
- Zhang, R. et al. (1984) A comprehensive survey of etiologic factors of stomach cancer in China. *Chin. Med. J.* 97, 322- 332.
- Zimmermann, F.K. (1977) Genetic effects of nitrous acid. *Mutat. Res.* 39, 127-147.