



AGENCE FRANÇAISE
DE SÉCURITÉ SANITAIRE
DES ALIMENTS

Maisons-Alfort, le 17 décembre 2009

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation du rapport d'évaluation initial des autorités néerlandaises relatif à un nouvel aliment ou ingrédient alimentaire : sirop de glucides modifiés

LE DIRECTEUR GÉNÉRAL

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 3 novembre 2009 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes d'une demande d'évaluation du rapport d'évaluation initial des autorités néerlandaises concernant la demande d'autorisation de mise sur le marché d'un nouvel aliment ou ingrédient alimentaire : sirop de glucides modifiés.

Après consultation des Comités d'experts spécialisés « Nutrition humaine » et « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques », réunis le 26 novembre 2009, et du Comité d'experts spécialisé « Biotechnologie » réuni le 10 décembre 2009, l'Afssa rend l'avis suivant :

Contexte et cadre réglementaire de la demande

Le produit est constitué d'un mélange complexe de glucides, obtenus à partir de saccharose et d'un hydrolysate d'amidon riche en maltose, transformés par réaction enzymatique. Celle-ci produit des oligosaccharides contenant des liaisons glycosidiques en α -(1->3) et α -(1->6), non consommés en quantité significative dans la Communauté européenne avant 1997. Le produit contient également du leucrose, disaccharide présent naturellement en faible quantité dans quelques produits alimentaires. Le NI (nouvel ingrédient) est destiné à être utilisé en tant qu'édulcorant calorique dans une large gamme de produits.

Cette demande s'inscrit dans le cadre du règlement 258/97/CE relatif aux nouveaux aliments et nouveaux ingrédients alimentaires.

Selon le pétitionnaire, ce nouvel ingrédient peut être classé dans la catégorie C définie à l'article 1, paragraphe 2 dudit règlement, regroupant les aliments et ingrédients alimentaires présentant une structure moléculaire primaire nouvelle ou délibérément modifiée. Le produit peut également être considéré comme appartenant à la catégorie F regroupant les aliments et ingrédients alimentaires auxquels a été appliqué un procédé de production qui n'est pas couramment utilisé, entraînant des modifications de leur structure ou de leur composition. Le pétitionnaire considère que le NI appartient à la classe 2.1 comprenant les NI non génétiquement modifiés et dont la source a déjà été utilisée comme aliment dans la Communauté européenne. Compte tenu de son mode de production, le produit pourrait également appartenir à la classe 6 rassemblant les aliments produits par un nouveau procédé.

Le comité néerlandais estime que le produit peut en effet aussi bien appartenir à la classe 2.1 qu'à la classe 6. Il souligne que la même procédure d'évaluation s'applique dans les deux cas.

Ce point ne soulève pas de remarque particulière de l'Afssa.

Le NI a fait l'objet d'une première évaluation par le comité néerlandais en 2006. Dans ses conclusions, celui-ci demandait des compléments d'information, relatifs notamment à la spécification du produit, au microorganisme utilisé pour la production de l'enzyme utilisée dans le procédé de fabrication, à la sécurité du leucrose, ainsi qu'à l'absence d'une

possibilité de malabsorption du produit, particulièrement chez l'enfant. Entre 2007 et 2009, ces différents compléments d'information ont été fournis par le pétitionnaire. Leur évaluation a donné lieu à un second rapport du comité néerlandais faisant l'objet de la présente évaluation par l'Afssa.

I. Spécifications du NI

Le NI est obtenu à partir de la conversion enzymatique, sous l'action de l'alternansucrase, d'un mélange de saccharose et d'un hydrolysate d'amidon, riche en maltose, dont le ratio initial saccharose : maltose est compris entre 8 : 1 et 11 : 1.

Dans sa première évaluation du produit (2006), le comité néerlandais a estimé que la spécification du NI devait au moins comporter les limites inférieures et supérieures des teneurs des principaux produits de la réaction, c'est-à-dire du fructose, du leucrose et des oligosaccharides du NI. Ces valeurs ont été communiquées par le pétitionnaire.

Le NI est un sirop contenant 20 à 25% d'eau, composé d'un mélange de glucides répartis de la manière suivante :

- 35 à 45% de fructose ;
- 7 à 15% de leucrose (disaccharide glucose-fructose) ;
- moins de 3% d'autres disaccharides ;
- 40 à 60% d'autres saccharides de degré de polymérisation supérieur à 2, majoritairement des oligosaccharides comportant des liaisons α -(1- \rightarrow 2), α -(1- \rightarrow 3), α -(1- \rightarrow 4), α -(1- \rightarrow 5) et α -(1- \rightarrow 6).

Le leucrose est un disaccharide réducteur naturellement présent en faible quantité dans certains produits alimentaires. Il s'agit d'un isomère du saccharose au pouvoir sucrant environ deux fois plus faible que celui-ci. Sa formule est la suivante : $C_{12}H_{22}O_{11}$; Glc α (1 \rightarrow 5) Fruc, 5-O-alpha-D-glucopyranosyl-D-Fructose ou D-Glucopyranosyl-alpha(1-5)-D-fructopyranose.

Le pétitionnaire fournit les résultats des analyses des niveaux de contaminants (métaux lourds : arsenic, cadmium, plomb, mercure ; mycotoxines : aflatoxines et ochratoxine), réalisées sur trois lots du NI.

Le comité néerlandais considère que les éléments présentés dans le rapport et les compléments d'information fournis par le pétitionnaire sont suffisants pour conclure que le NI peut être produit de manière reproductible selon sa spécification. La composition finale du produit est susceptible de varier légèrement du fait de la variation du rapport des ingrédients initiaux (saccharose par rapport au maltose), mais dans des proportions correspondant à la spécification du NI.

La préparation enzymatique dont l'activité principale est l'alternansucrase, utilisée dans la synthèse du NI, provient de deux modes de production distincts (décrits ci-dessous dans la partie relative aux effets du procédé de production sur le NI). Afin de démontrer que la composition du NI est comparable quelle que soit la source de la préparation enzymatique, le pétitionnaire a fourni les résultats d'analyse de plusieurs lots de NI obtenus avec l'une ou l'autre préparation.

Le Comité néerlandais considère que les deux préparations enzymatiques utilisées permettent d'aboutir à un NI comparable.

Ce point ne soulève pas de remarque particulière de l'Afssa.

II. Effets du procédé de production appliqué au NI

Données relatives à l'enzyme utilisée dans le procédé de fabrication du NI

L'alternansucrase utilisée dans le procédé de production du NI est une enzyme de la famille des hexosyltransférases. Son nom systématique est la sucrose-1,6(1,3)- α -D-glucane 6 (3) - α -D-glucosyltransférase (EC 2.4.1.140).

Le pétitionnaire souhaite utiliser indifféremment deux préparations enzymatiques produites à partir de microorganismes et de procédés différents. Les deux souches de microorganismes producteurs sont :

- une souche de *Leuconostoc mesenteroides* non génétiquement modifiée ;
- une souche de *Bacillus licheniformis* génétiquement modifiée porteuse du gène de *Leuconostoc mesenteroides* codant l'alternansucrase.

Un résumé des essais de toxicologie réalisés avec l'alternansucrase issue de *Bacillus licheniformis* génétiquement modifiée est présenté. Ces essais comportent uniquement une étude par administration répétée par voie orale d'une durée de deux semaines chez le rat réalisée à 3 doses différentes. Les résultats ne montrent pas d'effets délétères et les auteurs concluent à une dose sans effet indésirable observé (DSEIO) de 10 mL/kg de poids corporel/jour.

Les résultats de l'étude de mutagénicité *in vitro* (test d'Ames sur quatre souches de *Salmonella typhimurium* histidine dépendante et une souche d'*Escherichia coli* tryptophane dépendante) et d'un test de micronoyau sur des lymphocytes humains en culture permettent au pétitionnaire de conclure que cette préparation enzymatique n'est pas génotoxique.

Aucune étude sur la sécurité de l'alternansucrase issue de *Leuconostoc mesenteroides* n'est présentée.

Aucune mention du risque potentiel de l'allergénicité de l'enzyme ne figure dans le dossier.

Le comité néerlandais considère que les informations fournies relatives aux deux préparations enzymatiques ne soulèvent pas de préoccupations en ce qui concerne la sécurité du NI.

L'Afssa estime que les données fournies dans le dossier sont insuffisantes pour permettre une évaluation de la sécurité de ces enzymes au regard des éléments scientifiques demandés pour une autorisation d'emploi par l'Afssa¹ ou par l'Aesa².

Données relatives au procédé de production

L'alternansucrase est ajoutée à une solution aqueuse de saccharose et d'un hydrolysate d'amidon riche en maltose. Après incubation, une étape d'inactivation irréversible de l'enzyme existe dans le procédé de production. Les protéines et les autres contaminants potentiels sont retirés. Le produit est ensuite concentré par évaporation.

Les microorganismes de production de l'enzyme sont absents du NI et la recherche d'ADN du transgène de la souche de *Bacillus licheniformis* dans le NI n'a pas permis d'amplification.

Le pétitionnaire indique que la qualité microbiologique du produit sera vérifiée une fois par mois selon un système HACCP. Des analyses annuelles seront réalisées pour vérifier les teneurs en pesticides et en métaux lourds. Enfin, le retrait effectif des protéines sera contrôlé par la détermination de la teneur en azote.

Le Comité néerlandais estime que la sécurité du procédé de production est assurée.

Ce point ne soulève pas de remarque particulière de l'Afssa.

III. Utilisation antérieure de l'organisme utilisé comme source de NI

Les ingrédients initiaux (saccharose et hydrolysate d'amidon riche en maltose) sont des ingrédients conventionnels.

Leuconostoc mesenteroides est une bactérie lactique non pathogène et non toxigène. Elle est utilisée depuis longtemps dans la production de certains aliments nécessitant une

¹ Guide pour la constitution d'un dossier relatif à l'emploi de préparations enzymatiques destinées à l'alimentation humaine (septembre 2003)

² Guidance of the Scientific Panel of Food Contact Material, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF) on the Submission of a Dossier on Food Enzymes for Safety Evaluation by the Scientific Panel of Food Contact Material, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (juillet 2009)

fermentation (produits laitiers, pâte à pain). La production de dextrane à partir de saccharose de canne à sucre grâce à *Leuconostoc mesenteroides* a été décrite dès 1878. Le dextrane obtenu à partir de ce procédé de fabrication a été autorisé sur le marché européen en tant que nouvel ingrédient en 2001. Le comité néerlandais a demandé que l'identité de ce microorganisme soit précisée, dans la mesure où le dossier du pétitionnaire mentionne parfois *Leuconostoc mesenteroides*, parfois *Leuconostoc citreum*.

Bacillus licheniformis est une bactérie non pathogène, utilisée depuis de nombreuses années pour la production de préparations enzymatiques destinées à l'alimentation humaine.

Le comité néerlandais considère que les identités et les origines des microorganismes sont clairement précisées. Il est satisfait par la réponse fournie par le pétitionnaire, qui indique que l'utilisation des deux noms (Leuconostoc mesenteroides et citreum) pour la même souche est simplement une considération de taxonomie.

L'Afssa indique que ces bactéries *Leuconostoc mesenteroides* et *Bacillus licheniformis* sont des bactéries ayant un historique d'utilisation en alimentation humaine. Cependant, aucune activité enzymatique issue de *Leuconostoc* n'a fait l'objet d'une autorisation d'emploi en France.

Le pétitionnaire nomme indifféremment dans le dossier la bactérie *Leuconostoc mesenteroides* et *Leuconostoc citreum*. Ces deux bactéries sont deux espèces différentes. L'Afssa estime qu'il conviendrait d'utiliser la dénomination officielle de la souche de production utilisée.

L'Afssa ne dispose pas des informations nécessaires pour évaluer l'innocuité des deux souches de production d'alternansucrase comme préconisées pour les dossiers de demande d'autorisation d'emploi par l'Afssa³ ou par l'Aesa⁴.

IV. Consommation/Niveau d'utilisation prévu du NI

Le NI est destiné à remplacer le sucre dans une large gamme de produits :

- boissons (boissons énergétiques, sodas) ;
- produits céréaliers (barres de céréales, barres énergétiques, céréales) ;
- substituts de repas (boissons et boissons lactées) ;
- produits laitiers (crèmes glacées, yaourts, « milk-shakes ») ;
- aliments micellaires (sauces de salade et ketchup) ;
- chewing-gum, sauces de nappage pour crèmes glacées, confitures, préparations à base de sirop d'érable, etc.

Le niveau d'exposition au NI lié à un usage généralisé a été étudié par le pétitionnaire, en utilisant des tables de consommation britanniques (*UK's National Diet and Nutrition Survey*). Les niveaux de consommation ont été définis pour les groupes suivants :

- enfants de 1 an ½ à 4 ans ½ ;
- enfants de 4 à 10 ans ;
- adolescents entre 11 et 18 ans ;
- adolescentes entre 11 et 18 ans ;
- femmes adultes entre 16 et 64 ans ;
- hommes adultes entre 16 et 64 ans.

Les estimations de consommation du NI ont été réalisées pour deux groupes distincts :

- un groupe incluant tous les consommateurs ;
- un groupe incluant seulement les consommateurs d'aliments dans lesquels le NI est susceptible d'être ajouté.

Les résultats diffèrent très peu entre ces deux groupes car les aliments pouvant contenir le NI sont très largement consommés (85,4 à 99,5 % de consommateurs).

³ Guide pour la constitution d'un dossier relatif à l'emploi de préparations enzymatiques destinées à l'alimentation humaine (septembre 2003)

⁴ Guidance of the Scientific Panel of Food Contact Material, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF) on the Submission of a Dossier on Food Enzymes for Safety Evaluation by the Scientific Panel of Food Contact Material, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (juillet 2009)

Les moyennes de consommations individuelles du NI estimées pour le groupe de consommateurs d'aliments dans lesquels le NI est susceptible d'être ajouté varient de 19,8 g/j (femmes adultes) à 30,4 g/j (enfants de 4 à 10 ans). Pour le 97,5^{ème} percentile, les consommations estimées varient de 61,8 g/j (femmes adultes) à 86,3 g/j (adolescents). Rapportées au poids, les consommations moyennes du NI estimées varient de 0,25 g/kg/jour (hommes adultes) à 1,42 g/kg/j (enfants de 1 an ½ à 4 ans ½). Pour le 97,5^{ème} percentile, les consommations estimées du NI varient de 0,84 g/kg/j (femmes adultes) à 4,72 g/kg/j (enfants de 1 an ½ à 4 ans ½).

De telles données de consommation n'existent pas pour l'Union européenne dans son ensemble. Considérant que le NI est destiné à se substituer aux sucres dans une large gamme de produits, le pétitionnaire estime que ces résultats peuvent être extrapolés à différents pays européens sur la base des données de consommation de sucre (équivalent raffiné). Le pétitionnaire estime que la consommation moyenne de sucre (équivalent raffiné) par personne au Pays-Bas est similaire à celle du Royaume-Uni (environ 100 g/j). Par ailleurs, la consommation moyenne de saccharose par jour, calculée selon une méthode différente, a été estimée par le pétitionnaire à environ 50 g pour la France, la Suède, le Danemark, la Finlande, l'Islande et la Norvège.

Le comité néerlandais considère que l'estimation de la consommation moyenne du NI semble acceptable. Toutefois, il note que le pétitionnaire n'indique pas si les niveaux de consommation des différentes catégories de produits dans lesquelles le NI est susceptible d'être ajouté diffèrent d'un pays à l'autre. Par ailleurs, les apports en NI pourraient s'avérer relativement élevés (entre 20 et 30 g/j en moyenne). Ils dépendront toutefois du développement commercial de son utilisation. L'utilisation du NI dans certains aliments, comme les substituts de repas, pourrait entraîner des niveaux de consommation individuelle particulièrement élevés chez les forts consommateurs de ces produits. Le comité néerlandais note enfin que les apports susceptibles d'être les plus élevés sont ceux des enfants les plus jeunes.

L'Afssa est en accord avec les conclusions du comité néerlandais. Le niveau d'apport estimé chez l'enfant est particulièrement élevé. Les niveaux de consommation des différents produits dans lesquels le NI est destiné à être ajouté sont susceptibles d'être différents selon les pays. L'Afssa note par exemple que la consommation moyenne de boissons rafraîchissantes sans alcool (produits dans lesquels le NI est susceptible d'être ajouté) chez les hommes adultes est estimée à 158 g/j en France d'après les données INCA 2 (Afssa, 2009) et à 287 g/j au Royaume-Uni d'après les résultats de l'enquête NDNS (UK's National Diet and Nutrition Survey).

V. Informations fournies par une exposition humaine antérieure au NI ou à sa source

Le pétitionnaire indique que les ingrédients initiaux utilisés pour la synthèse du NI sont des ingrédients couramment utilisés dans les produits alimentaires. En outre, il note que les dextrans produits par *Leuconostoc mesenteroides* ont été autorisés sur le marché européen en tant que nouvel aliment. En ce qui concerne le leucose, le pétitionnaire le présente comme un isomère du saccharose naturellement présent, en faible quantité, dans le miel.

Ce point n'a pas suscité de commentaire du comité néerlandais.

Ce point ne soulève pas non plus de remarque particulière de l'Afssa.

VI. Informations d'ordre nutritionnel sur le NI

Selon le pétitionnaire, le NI est complètement digéré en fructose et glucose, puis totalement absorbé. Pour appuyer cette affirmation, il cite une étude réalisée chez des patients ayant subi une iléostomie.

Le pétitionnaire indique par ailleurs que la consommation de fructose est reconnue pour ne pas présenter de risque pour le consommateur. Des effets indésirables peuvent toutefois se produire chez les personnes souffrant de maladies héréditaires rares du métabolisme du fructose.

Le comité néerlandais conclut à l'équivalence du NI avec les autres sucres (glucose, fructose, saccharose, maltose, leucrose) en termes de contenu énergétique, considérant que le NI est entièrement dégradé en monosaccharides dans l'intestin grêle chez l'Homme. Il note que cette question est développée de manière plus approfondie dans la partie relative aux informations d'ordre toxicologique (études d'absorption chez l'Homme).

L'Afssa estime que l'assertion du pétitionnaire selon laquelle la consommation de fructose est reconnue comme ne présentant pas de risque pour le consommateur mérite d'être commentée, compte tenu de la composition du NI, contenant non seulement du fructose mais également du leucrose hydrolysé en fructose (et glucose) au cours de sa digestion. En effet, plusieurs revues récentes de la littérature ont rapporté *a contrario* les effets métaboliques résultant de la consommation de fructose. Le métabolisme du fructose, essentiellement hépatique, diffère de celui du glucose. La consommation de fructose entraîne des réponses insulino et glycémique moindres que celles du glucose mais s'accompagne également d'une augmentation de la triglycéridémie, aussi bien à jeun qu'en situation post-prandiale, en stimulant la lipogenèse hépatique *de novo* et en diminuant la clairance des VLDL (lipoprotéines d'origine hépatique riches en triglycérides ; Schaeffer *et al.*, 2009 ; Laville & Lazare, 2008). L'effet hypertriglycéridémiant du fructose dans la phase postprandiale s'exerce aussi bien chez l'obèse insulino-sensible que chez l'insulino-résistant, conduisant ainsi à majorer encore l'hypertriglycéridémie postprandiale chez ces sujets (Teff *et al.*, 2009). Toutefois, d'après une méta-analyse (Livesey & Taylor, 2008) ces effets lipémiques n'apparaîtraient que pour des niveaux de consommations de fructose élevés, supérieurs à 50 g/jour pour l'effet sur la triglycéridémie post-prandiale et supérieurs à 100 g/jour pour l'effet sur la triglycéridémie à jeun.

De plus, des effets de la consommation chronique de fructose sur la prise de poids, la dégradation de l'insulino-sensibilité et le risque de diabète de type 2 sont également observés dans certaines études. Toutefois les données sont parfois discordantes, significatives surtout lorsque les doses utilisées sont élevées (> 100 g/jour ou > 20 % de l'apport énergétique total ; Laville & Lazare, 2009 ; Livesey & Taylor, 2008). Une étude récente permet de confirmer et compléter ces données. Stanhope *et al.* (2009) ont étudié les effets de boissons sucrées contenant soit du glucose, soit du fructose chez 32 sujets en surpoids ou obèses (IMC : 25 à 35 kg/m²). Pendant 10 semaines, chaque sujet consommait trois boissons par jour, représentant 25 % des apports caloriques journaliers. Une prise de poids similaire a été notée dans les deux groupes. Toutefois, une augmentation significative du tissu adipeux viscéral, de la lipogenèse hépatique *de novo*, de la triglycéridémie post-prandiale a été observée uniquement dans le groupe consommant des boissons sucrées à base de fructose. Ce même groupe présentait également une dyslipidémie avec augmentation de l'apolipoprotéine B, des LDL, des LDL petites et oxydées, et des concentrations de remnants post-prandiaux, ainsi qu'une augmentation de la glycémie et de l'insulinémie à jeun et une diminution de la sensibilité à l'insuline.

Ces résultats apportent donc des éléments quant aux possibles effets métaboliques délétères de la consommation chronique de fructose comparée à la consommation de glucose, chez les forts consommateurs de glucides simples. En particulier, si des consommations aiguës de fructose semblent améliorer la réponse glycémique et insulino par rapport au glucose, des fortes consommations chroniques et élevées de fructose semblent susceptibles de dégrader la sensibilité à l'insuline.

La prudence s'impose donc quant à la généralisation de l'emploi des sucres à base de fructose dans l'alimentation. Cette généralisation pourrait augmenter

considérablement les apports de fructose chez les forts consommateurs de glucides simples en particulier dans certaines catégories de population comme les obèses ou les diabétiques de type 2, chez qui une aggravation des anomalies métaboliques serait possible. Pour les enfants, les consommations estimées sont élevées, alors qu'on ne dispose pas de données métaboliques spécifiques sur la consommation de fructose ou du NI. La prudence doit donc également prévaloir en ce qui concerne cette population, les enfants forts consommateurs de sucres simples étant un groupe particulièrement exposé au risque de surpoids et d'obésité infantile.

VII. Informations d'ordre microbiologique sur le NI

Les données relatives aux microorganismes synthétisant l'enzyme utilisée ont déjà été traitées dans la partie relative aux effets du procédé de production appliqué au NI. Le pétitionnaire indique que la qualité microbiologique du NI sera assurée par un système HACCP. Pour illustrer la fiabilité des contrôles, le pétitionnaire fournit les résultats d'analyses réalisées sur trois lots.

En s'appuyant sur ces données, le comité néerlandais conclut à l'absence de risque microbiologique prévisible pour le NI.

Ce point ne soulève pas de remarque particulière de l'Afssa.

VIII. Informations d'ordre toxicologique sur le NI

Absorption, digestion, métabolisme et excrétion (ADME)

Le pétitionnaire indique que le complexe enzymatique présent dans la muqueuse intestinale (complexe saccharase – isomaltase) permet la digestion des oligosaccharides présents dans le NI, libérant ainsi du glucose et du fructose absorbés et métabolisés par les voies classiques d'assimilation. Le pétitionnaire mentionne que l'absorption de fructose peut être défaillante ou incomplète dans certaines circonstances, notamment chez des personnes souffrant de maladies héréditaires rares du métabolisme du fructose. Le pétitionnaire rappelle que les sirops de glucose et de fructose sont largement utilisés comme ingrédients. En outre, la présence de glucose facilite le transport du fructose à travers la bordure en brosse de l'intestin grêle (Rumessen & Gudmand-Høyer, 1986 ; Smith *et al.*, 1985).

Digestibilité in vitro du NI

Une étude *in vitro* a testé la digestion enzymatique par une poudre d'intestin de rat d'une quantité déterminée d'un lot de NI répondant aux spécifications. Il s'agit d'une étude réalisée en 2005 par le centre de recherches du pétitionnaire. Il est montré que la dégradation du NI (solution à 4%) à 37°C est plus lente que celle du maltose ou de l'isomaltose, mais qu'elle est complète après 4 h d'incubation.

Toxicologie préclinique

- **Toxicité à doses répétées**

Le pétitionnaire a fait réaliser par un centre de recherches indépendant une étude de toxicité par administrations répétées de 28 jours chez le rat. Cette étude a été précédée par une étude préliminaire de recherche de doses de 7 jours réalisée selon les bonnes pratiques de laboratoire (BPL).

La souche de rat utilisée est la CrI/CD (SD) IGS BR. Les animaux, âgés en moyenne de 6 semaines, ont été répartis en 4 groupes de 10 animaux/sexe/dose. Les doses administrées correspondaient à des suppléments alimentaires de 0, 50 000, 100 000 et 200 000 ppm. En plus des paramètres habituellement mesurés, des tests de comportement ont été pratiqués.

Cette étude permet de définir une DSEIO de 18 560 (mâle) et 19 800 mg/kg poids corporel/j (femelle).

Le comité néerlandais note que des augmentations de la prise alimentaire et du poids corporel ont souvent été observées chez les animaux des groupes expérimentaux.

Par ailleurs, le comité néerlandais a regretté que la durée de l'étude ne soit que de 28 jours, étant donné que les recommandations de la Commission européenne relatives aux éléments scientifiques nécessaires à l'évaluation de nouveaux aliments ou de nouveaux ingrédients préconisent une étude de 90 jours.

Dans sa réponse, le pétitionnaire explique qu'une étude de 28 jours peut suffire dans le cas présent compte tenu des marges de sécurité déduites des recherches chez l'animal, des résultats concordants obtenus dans les études chez l'Homme, des connaissances antérieures relatives au fructose et au leucrose, ainsi que des données relatives à la digestibilité des glucides contenus dans le NI. En outre, le pétitionnaire a également fourni des éléments expliquant que les quelques variations significatives observées dans cette étude étaient sans influence sur le calcul de la DSEIO.

En ce qui concerne la sécurité du leucrose, le comité néerlandais a demandé au pétitionnaire les rapports initiaux des études mentionnées dans la revue de Elias et al. (1996). Le pétitionnaire a indiqué que ces informations n'étaient pas disponibles pour des raisons de propriété industrielle.

Le comité néerlandais a finalement conclu que les études réalisées chez l'animal n'ont pas mis en évidence d'effet indésirable du NI. Compte tenu de la nature du NI et de l'ensemble des informations disponibles relatives au NI et à ses constituants principaux (fructose et leucrose), le comité néerlandais considère que des études de toxicité plus longues (90 jours contre 28 jours) ne sont pas indispensables. Toutefois, il regrette que les données brutes des études portant sur le leucrose n'aient pas été fournies par le pétitionnaire.

L'Afssa a examiné les variations significatives des consommations alimentaires, du poids corporel et de certains paramètres hématologiques et biochimiques observées entre le groupe témoin et les groupes expérimentaux.

Par rapport au groupe témoin, la consommation alimentaire moyenne est significativement augmentée toutes les semaines à toutes les doses chez la femelle et à la moyenne et à la forte dose chez le mâle.

En outre, dans le groupe recevant la forte dose, le poids corporel est augmenté dans les deux sexes d'environ 2 à 5% par rapport au poids initial pendant les 2 dernières semaines de l'étude. Bien que les variations de poids précédemment décrites ne soient pas significatives, l'élévation de poids corporel de la semaine 2 à 3 chez le mâle et l'élévation de poids corporel cumulée de la semaine 0 à la semaine 4 chez la femelle le sont. L'Afssa estime qu'il aurait été utile de pouvoir suivre ces évolutions dans le cadre d'une étude de 90 jours.

En ce qui concerne les variations hématologiques, une baisse très faible mais significative du volume moyen des globules rouges (VGM) (56,9 contre 55,2 10^{15} L) est observée à la dose élevée chez le mâle. Cette diminution ne soulève toutefois aucune inquiétude de l'Afssa.

Enfin, des élévations modérées mais significatives des taux sériques de l'alanine aminotransférase (ALAT) et de l'aspartate aminotransférase (ASAT) sont observées pour le régime à faible dose du NI (4338 mg/kg/j), d'un facteur de 0,3 pour les ALAT et de 0,25 pour les ASAT. Toutefois, ces élévations ne sont pas dose-dépendantes et sont sans traduction histologique. En outre, le suivi parallèle de la bilirubinémie a montré une absence de variation.

En conclusion, l'Afssa note que toutes les données examinées ne font pas apparaître d'effets indésirables significatifs majeurs. Les variations observées au niveau des courbes pondérales auraient nécessité un suivi dans le cadre d'une étude de 90 jours et devront être confrontées aux résultats obtenus en clinique humaine.

- **Génotoxicité**

Le pétitionnaire présente un test d'Ames réalisé par un laboratoire indépendant en 2003 en conformité avec les bonnes pratiques de laboratoire. L'ensemble des 5 souches recommandées a été utilisé, la souche *E.coli* étant substituée par la souche TA 102. Un

témoin négatif et des témoins positifs ont été testés. Aucune cytotoxicité n'a pu être mise en évidence lors d'un pré-test. Six doses du NI ont été testées jusqu'à 5000 µg/boîte, ce qui correspond au maximum recommandé. Les témoins positifs ont montré une réponse nettement significative permettant de confirmer la réactivité du test. A aucune des doses du NI testées, il n'a été observé d'élévation significative du nombre des révertants.

Considérant la nature des constituants du NI, le comité néerlandais considère que ce test d'Ames est suffisant pour exclure la possibilité d'un potentiel mutagène du NI.

L'Afssa estime que le test réalisé permet de conclure à l'absence de pouvoir mutagène du NI sur bactéries. Toutefois, un deuxième test sur cellules de mammifères aurait été souhaitable.

- **Potentiel allergisant**

L'Afssa note que cet aspect n'est pas abordé dans le dossier, mais qu'un effet allergisant du NI semble peu vraisemblable, compte tenu de sa nature glucidique.

- **Analyse des données toxicologiques portant sur le leucrose**

L'Afssa s'est procuré et a analysé les résultats des études présentées dans la revue de Elias *et al.* (1996), qui expose les résultats de plusieurs études de toxicologie portant sur le leucrose, présent dans le NI à hauteur de 7 à 15 % (w/w). Ces résultats sont résumés et commentés ci-dessous.

- Une étude de 13 semaines incluant une période de réversibilité de 4 semaines a été réalisée chez le rat (n=20/sexe/dose) et chez le chien (n=3/sexe/dose). Les animaux ont reçu par l'alimentation des doses de leucrose de 0, 1000, 2100 et 4200 mg/kg pc/j (chez le rat) et 0, 2500, 5000 et 10000 mg/kg pc/j (chez le chien). Aucun effet indésirable n'a été mis en évidence, permettant de retenir comme DSEIO les plus fortes doses administrées.

- Des études d'embryotoxicité ont été réalisées chez le rat (n=24/sexe/dose) et chez le lapin (n=12/sexe/dose). Des études préliminaires ont permis de définir le choix des doses à utiliser. Chez les mères rat, une baisse de gain de poids a été observée à la dose la plus élevée (2700 mg/kg pc/j) ; aucun effet tératogène n'a été mis en évidence à cette même dose.

- Un test d'Ames s'est révélé négatif jusqu'à 5000 µg/boîte : à l'exception de la souche TA1537, aucune élévation significative du nombre de révertants n'est observée. Il n'est pas précisé si l'essai a été répété mais l'élévation du nombre de révertants de la souche TA1537 n'est pas dose-dépendante.

- Un test du lymphome de souris s'est révélé négatif : en l'absence de cytotoxicité, la concentration de 5000 µg/mL a pu être testée. Aucun effet mutagène n'a été observé, ni à cette concentration, ni aux autres concentrations utilisées.

- Un test d'aberrations chromosomiques a été réalisé : une cytotoxicité observée dans une étude préliminaire a limité la concentration maximale à 3420 µg/mL. Quelques aberrations (non précisées) ont été rapportées à des concentrations intermédiaires (non dose-dépendantes). L'essai n'a semble t-il pas été répété.

- Un test du micronoyau réalisé chez des souris par voie orale jusqu'à 4000 mg/kg sur un nombre réduit d'animaux (n=3/sexe) n'a révélé aucune présence de micronoyaux au niveau de la moelle osseuse. Toutefois, la publication n'a pas présenté de données confirmant l'exposition de la moelle osseuse.

Evaluation des marges d'exposition

Les DSEIO disponibles pour le NI sont de 18 560 (mâle) et 19 800 mg/kg pc/j (femelle). Les consommations au 97^{ème} percentile, par kg de poids corporel, estimées par le pétitionnaire pour le Royaume-Uni sont de 1810 mg/kg/j pour les adolescents et de 4720 mg/kg/j pour les enfants de 1 an ½ à 4 ans ½.

L'Afssa estime que ces données permettent de définir une marge d'exposition acceptable chez l'adulte (facteur 10) et plus limitée chez l'enfant (facteur 4).

Conclusion relative aux données de toxicologie préclinique

Les données issues des études BPL disponibles sur le NI ne font état d'aucun effet délétère. Le comité néerlandais considère que ce nouvel ingrédient alimentaire n'est pas susceptible de présenter de risques pour le consommateur.

L'Afssa estime que les deux études spécifiques présentées par le pétitionnaire (étude de toxicité à doses répétées de 28 jours chez le rat et test de mutagenèse) présentent toutes les qualités requises (BPL) pour considérer leurs résultats comme acceptables.

Comme cela avait été souligné dans le rapport initial du comité néerlandais, les études réalisées sur le NI sont toutefois insuffisantes au regard des recommandations de la Commission européenne relatives aux éléments scientifiques nécessaires à l'évaluation de nouveaux aliments ne présentant pas d'équivalence substantielle avec un aliment existant. Une étude de 90 jours chez le rat ainsi qu'un 2^{ème} test de génotoxicité *in vitro* sur cellules de mammifères auraient été souhaitables. Toutefois, l'absence de ces données ne remet pas en cause la sécurité du NI, compte tenu de sa nature (sirop de glucides).

Etudes chez l'Homme

Le dossier du pétitionnaire présente plusieurs études menées chez l'Homme destinées à étudier l'absorption du NI, les éventuels effets indésirables liés à sa consommation, ainsi que ses effets sur la glycémie et l'insulinémie post prandiales.

- **Absorption du NI**

- Une première étude, réalisée par le pétitionnaire, porte sur dix volontaires adultes en bonne santé. Le NI est comparé à deux sirops témoins : soit un sirop de fructose contenant 42% de fructose et 58% de glucose ; soit 56 g de sirop de fructose mélangés à 24 g d'inuline. L'apport total de glucides est de 80 g dans les trois groupes. Un test respiratoire à l'hydrogène n'a pas révélé de malabsorption du NI chez l'adulte. Les sujets n'ont pas rapporté d'effet indésirable par ailleurs, ce qui corrobore l'absence de malabsorption.

- Une seconde étude a été réalisée chez dix sujets sains, comparant cette fois les effets de l'ingestion de 50g du NI ou de sirop de fructose. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes lors du test respiratoire à l'hydrogène.

- La troisième étude a porté sur des triathlètes qui ont reçu, pendant une épreuve de course à pieds et une épreuve de cyclisme, une boisson contenant soit 9% de saccharose, soit 3,6% de tréhalose et 5,4% d'isomaltulose, soit 9% d'isomaltulose, soit 9% du NI. Aucune différence significative n'a été observée en termes d'apparition de symptômes gastro-intestinaux à la suite de la consommation de ces différentes boissons glucidiques.

- Enfin, une étude chez quatre sujets iléostomisés a montré qu'après consommation de 100 g du NI, la plupart des glucides étaient absorbés, l'absorption moyenne étant de 95,4 ± 2,9 %. Le comité néerlandais avait requis des compléments d'information sur le calcul effectué pour tenir compte de la consommation de fibres pendant le déjeuner. L'information a été fournie par le pétitionnaire.

- Une étude complémentaire a été réalisée par le pétitionnaire à la demande du comité néerlandais. L'étude portait sur 10 enfants sains âgés de 8 à 10 ans et consistait en la mesure de la concentration d'hydrogène expiré après l'ingestion de 30 g de NI ou de 15 g d'inuline (des doses d'inuline supérieures à 15 g pouvant conduire à des douleurs abdominales liées à une fermentation excessive). Le test, positif pour tous les enfants avec

l'inuline, s'est révélé positif avec le NI pour 1 enfant sur 10 (concentration d'hydrogène expiré très légèrement supérieure au seuil de 10 ppm de dihydrogène). La répétition du test avec le NI chez cet enfant s'est avérée négative. Ces résultats ont conduit le pétitionnaire à conclure que la consommation du NI ne provoquait pas de malabsorption chez l'enfant.

- **Glycémie et insulïnémie**

Les effets du NI sur la glycémie et l'insulïnémie postprandiales ont été évalués au cours de plusieurs essais. La dernière étude fournie dans les compléments d'information soumis aux autorités néerlandaises porte sur la comparaison du NI avec l'isomaltulose, le tréhalose, le glucose et le saccharose chez 10 sujets en surpoids. Ces sujets ont consommé 75 g de glucides (équivalent anhydre) dans 400 mL d'eau à 8h00 et 13h00 au sein d'un repas standard.

Par rapport à la réponse au saccharose :

- le pic de glycémie (le matin et l'après-midi), le pic d'insulïnémie (le matin), l'aire sous la courbe de réponse glycémique (l'après-midi) et la réponse de la ghréline (le matin) sont diminuées en réponse au NI ;
- la dépense énergétique (l'après-midi), l'oxydation des glucides exogènes (le matin et l'après-midi) et l'oxydation des graisses (le matin et l'après-midi) sont augmentées avec le NI.

En revanche, les réponses des acides gras libres et des triglycérides, le quotient respiratoire, l'oxydation des glucides totaux et la concentration plasmatique de GLP-1 (Glucagon-like peptide 1) ne sont pas différents après la prise de saccharose ou du NI. Aucun de ces essais n'a révélé de malabsorption chez les sujets.

Les mesures de l'index glycémique du NI (différentes préparations) ont révélé de faibles valeurs, comprises entre 48,7 à 55,9 (mesures effectuées avec des doses de 50 g de glucides, avec le glucose comme référence). Ces valeurs sont inférieures à l'index glycémique du saccharose (environ égal à 65) et supérieures à celui du fructose (environ égal à 15), d'après les tables d'index glycémique de Atkinson et al. (2008).

Le comité néerlandais note qu'aucune des études fournies par le pétitionnaire n'a mis en évidence d'effets indésirables de la consommation du NI, que ce soit chez l'adulte ou chez l'enfant.

L'Afssa adhère à la conclusion du comité néerlandais mais souligne l'existence de données supplémentaires.

En ce qui concerne les données relatives aux réponses glycémiques et insulïnémiques, l'Afssa a examiné les résultats d'une étude présentée dans le dossier du pétitionnaire, publiés en partie en 2008 (Grysmán *et al.*).

Dans une première expérience dans laquelle 80 g de glucides (NI ou sirop de fructose) sont absorbés par les sujets, les profils post-prandiaux de glycémie et d'insulïnémie montrent une augmentation moins rapide, un pic moins élevé et une diminution plus lente de la glycémie et de l'insulïnémie. Les concentrations d'acides gras libres augmentent plus lentement en phase post-prandiale avec le NI qu'avec le sirop de fructose, mais le pic d'acides gras libres n'est pas significativement différent à 240 minutes. On ne note pas de différence de satiété déclarée suite à la consommation du NI ou de sirop de fructose.

Dans une deuxième expérience réalisée cette fois avec 50 g de glucides (NI ou sirop de fructose) au lieu de 80 g, on note des réponses glycémique et insulïnique (pic et aire sous la courbe) significativement moins élevées avec le NI par rapport au sirop de fructose, sans décalage dans le temps.

L'Afssa note, comme les auteurs de la publication, que les profils de réponses glycémiques et insulïniques après la consommation de 50 ou 80 g du NI apparaissent sensiblement différents, sans explication évidente.

En outre, comme cela a déjà été explicité précédemment, les effets du fructose sur les réponses glycémiques et insulïnémiques semblent différer suivant le type de

consommation (chronique ou aiguë). Des consommations aiguës de fructose pourraient améliorer les profils glycémique et insulémique alors que des consommations chroniques seraient susceptibles de dégrader la sensibilité à l'insuline. La meilleure tolérance glucidique observée lors de la consommation aiguë du NI ne préjuge donc pas de la tolérance glucidique lors de consommations chroniques.

Enfin, l'Afssa s'interroge sur l'effet du NI sur la prise alimentaire. Une étude réalisée à ce sujet figurant dans le dossier fourni par le pétitionnaire, a retenu l'attention de l'Afssa. Elle regrette que ces résultats n'aient pas été commentés dans le rapport soumis par le pétitionnaire.

Dans cette étude, 20 sujets en bonne santé ont consommé des barres de petit déjeuner de 65 g. Les glucides provenaient notamment de sirop de maïs riche en fructose (42% de fructose et 58% de glucose) dans la barre témoin et du NI dans la barre test. La consommation de la barre de petit déjeuner était suivie d'un repas *ad libitum* après 2 h ou 4 h. Il n'a pas été noté de différence sur la prise alimentaire à 2 h mais une différence sur la prise alimentaire à 4 h entre les groupes témoins et le groupe recevant le NI a été relevée. Quatre-vingt-seize kcal supplémentaires étaient en effet consommées 4 h après la barre contenant le NI par rapport à la barre contenant du sirop de maïs riche en fructose. L'étude ne comportait cependant pas en parallèle de mesures de la glycémie ou de l'insulinémie qui auraient permis de déterminer si la modification de la prise alimentaire était associée ou non à des variations de ces 2 paramètres.

Ces résultats peuvent être rapprochés de ceux obtenus dans l'étude de 28 jours chez le rat, qui montre une augmentation de la prise alimentaire des animaux consommant les régimes dans lesquels le NI était ajouté. Il n'est toutefois pas possible de déterminer si cette augmentation était liée à une plus grande appétence pour les régimes contenant le NI ou à une diminution des sensations de satiété par rapport au régime témoin.

L'Afssa s'interroge donc sur la possibilité d'une augmentation de la prise alimentaire liée à une consommation chronique du NI chez l'homme.

Conclusion

Sur le plan toxicologique, les études examinées, réalisées sur le NI selon les BPL, présentent toutes les qualités requises pour en accepter les résultats. L'Afssa note toutefois qu'une étude de 90 jours chez le rat ainsi qu'un 2^{ème} test de génotoxicité *in vitro* sur cellules de mammifères auraient été souhaitables.

L'Afssa estime que les données présentées permettent de définir une marge d'exposition acceptable chez l'adulte mais plus limitée chez l'enfant.

En ce qui concerne le procédé de production du NI, l'Afssa observe que les deux préparations enzymatiques d'alternansucrase n'ont pas d'autorisation d'emploi en France. Les éléments présents dans ce dossier ne sont pas suffisants pour se prononcer sur la sécurité des souches et des préparations enzymatiques au regard des éléments scientifiques demandés pour une autorisation d'emploi par l'Afssa ou par l'Aesa.

Sur le plan nutritionnel, l'Afssa estime que l'utilisation du NI ne présente pas de risque particulier pour le consommateur aux doses auxquelles il est susceptible d'être consommé, ni aux doses aiguës testées jusqu'à 80 g chez l'Homme, qui correspondent aux consommations des plus forts consommateurs (86,3 g/j chez l'adolescent) estimées par le pétitionnaire.

Cependant, l'Afssa s'interroge sur un éventuel effet du NI sur l'augmentation de la prise alimentaire.

Enfin, elle attire l'attention sur les possibles effets métaboliques délétères liés à une consommation chronique de fructose par rapport à d'autres glucides simples comme le glucose. Elle recommande la prudence dans la généralisation de l'usage

des sucres à base de fructose dans l'alimentation. Une telle généralisation augmenterait considérablement les apports de fructose chez les forts consommateurs de glucides simples dans certains groupes de population à risque, comme les enfants, les obèses et les diabétiques de type 2, favorisant ainsi l'apparition ou l'aggravation d'anomalies métaboliques.

L'Afssa considère en outre que la présence de leucrose hydrolysé en glucose et fructose dans le NI devrait être mentionnée sur l'étiquetage.

Le Directeur Général

Marc Mortureux

Références bibliographiques

Afssa. Etude individuelle nationale des consommations alimentaires 2 (INCA 2) (2006-2007). 2009

Atkinson FS, Foster-Powell K, Brand-Miller JC. International tables of glycemic index and glycemic load values: 2008. *Diabetes Care* 2008; 31: 2281-3.

Elias PS, Benecke H, Schwengers D. Safety evaluation studies of leucrose. *Int J Toxicol* 1996; 205: 205-18.

Grysmann A, Carlson T, Wolever TM. Effects of sucromalt on postprandial responses in human subjects. *Eur J Clin Nutr.* 2008;62:1364-71.

Laville M, Nazare JA. Diabetes, insulin resistance and sugars. *Obes Rev* 2009; 10 Suppl 1: 24-33

Livesey G, Taylor R. Fructose consumption and consequences for glycation, plasma triacylglycerol, and body weight: meta-analyses and meta-regression models of intervention studies. *Am J Clin Nutr.* 2008 88: 1419-37.

Rumessen JJ, Gudmand-Høyer, E. Absorption capacity of fructose in healthy adults. Comparison with sucrose and its constituent monosaccharides. *Gut* 1986; 27: 1161-8.

Schaefer EJ, Gleason JA, Dansinger ML. Dietary fructose and glucose differentially affect lipid and glucose homeostasis. *J Nutr.* 2009;139: 1257S-1262S.

Smith MM, Davis M, Chasalow FI, Lifshitz F. Carbohydrate absorption from fruit juice in young children. *Pediatrics* 1985; 95: 340-4.

Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, et al. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest* 2009; 119: 1322-34.

Teff KL, Grudziak J, Townsend RR, et al. Endocrine and metabolic effects of consuming fructose- and glucose-sweetened beverages with meals in obese men and women: influence of insulin resistance on plasma triglyceride responses. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94(5):1562-9.

Yannai Shmuel, *Dictionary of Food Compounds with CD-ROM: Additives, Flavors, and Ingredients*, Publié par CRC Press, 2004, p. 547

Mots-clés

novel food, édulcorant, fructose, leucose, liaisons glycosidiques, alternansucrase