

**EXTRAIT de l'AVIS du 17 octobre 2013**  
**de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,**  
**de l'environnement et du travail**

**relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché d'un nouvel ingrédient :**  
**la L-ergothionéine synthétique**

---

*L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.*

*L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.*

*Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.*

*Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).*

*Ses avis sont rendus publics.*

---

L'Anses a été saisie le 6 juin 2013 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (Dgcrf) pour la réalisation de l'expertise suivante : « Demande d'avis relatif à la demande d'autorisation de mise sur le marché d'un nouvel aliment : la L-ergothionéine synthétique ».

## **1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE**

La saisine concerne une demande d'autorisation de mise sur le marché d'un NI alimentaire, la L-ergothionéine synthétique en vertu du règlement (CE) N°258/97 du Parlement Européen et du Conseil (27 janvier 1997) relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients alimentaires.

Le pétitionnaire propose de mettre sur le marché de la L-ergothionéine synthétique, comme nouvel ingrédient (NI) dans les aliments conventionnels en Europe, y compris dans les compléments alimentaires. Ce NI sera introduit dans différentes denrées alimentaires consommées couramment par la population excepté par les femmes enceintes ou allaitantes, du fait de l'absence d'évaluation de la toxicité pour la reproduction sur deux générations. À ce jour, cette molécule n'a pas été utilisée comme ingrédient au sein des aliments généralement consommés par la population de l'UE et s'inscrit, selon le pétitionnaire, dans le premier article (chapitre 2) du règlement (CE) n° 258/97: « aliments et ingrédients alimentaires pour lesquels la consommation humaine est restée négligeable jusqu'alors ».

Suite à la Recommandation de la Commission européenne du 29 juillet 1997 (n°97/618/CE), le pétitionnaire considère la L-ergothionéine synthétique comme appartenant à la classe (1) « produit chimique pur ou mélange simple issu de sources non génétiquement modifiées » et plus précisément à la sous-classe (1.2) « produit chimique pur issu de sources non génétiquement modifiées et dont la source n'a jamais été utilisée comme aliment dans la Communauté ». De fait et selon le tableau II des Recommandations de la Commission du 29 juillet 1997 (n°97/618/CE), les informations requises pour les NI de cette classe sont les suivantes :

- I. Spécification du NI
- II. Effet du procédé de production appliqué au NI
- III. Utilisation antérieure de l'organisme utilisé comme source de NI

- IX. Consommation/Niveau d'utilisation prévu du NI
- XI. Informations d'ordre nutritionnel sur le NI
- XII. Informations d'ordre microbiologique sur le NI
- XIII. Informations d'ordre toxicologique sur le NI

## 2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

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

L'expertise collective a été réalisée par le Comité d'experts spécialisé (CES) « Nutrition humaine », NUT, réuni le 5 septembre 2013, et le groupe de travail (GT) pérenne « Evaluation des substances et procédés soumis à autorisation en alimentation humaine (ESPA) » réuni le 19 septembre 2013. Les travaux ont été adoptés par le CES le 10 octobre 2013. Cette expertise a été réalisée sur la base de rapports initiaux rédigés indépendamment par quatre rapporteurs.

## 3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DES GROUPES D'EXPERTS

### 3.1. Spécification du NI (I)

La L-ergothionéine est un composé naturel identifié pour la première fois dans l'ergot de seigle par un pharmacien français Charles Tanret en 1909. Chimiquement, il s'agit d'un dérivé de thiohistidine, la 2-thio-L-histidine bétaine. Cette molécule est synthétisée naturellement par des bactéries et des champignons comestibles. Elle est absorbée par l'Homme au travers de son alimentation et pénètre dans les tissus grâce à un transporteur spécifique, commun avec la carnitine, l'OCTN1 (*Organic Cation Transporter*).

Le NI correspond à de la L-ergothionéine obtenue par voie de synthèse selon un procédé original de synthèse industrielle s'inspirant, selon le pétitionnaire, de la voie de biosynthèse et intégrant les principes de chimie verte. Ce procédé de synthèse a été breveté par le pétitionnaire. En apparence, le NI est une poudre blanche inodore. Sa pureté chimique, mesurée par HPLC et 1H-RMN, est supérieure à 99%. Son pouvoir rotatoire est identique à la L-ergothionéine naturelle.

La quantité de solvants résiduels (méthanol, acétate d'éthyle, isopropanol, éthanol) est inférieure aux normes en vigueur selon la pharmacopée européenne<sup>1</sup>. La présence de microorganismes et de métaux lourds reste également en deçà des normes, respectivement de la Pharmacopée Européenne<sup>2</sup> et du Règlement Européen n°1881/2006/CE. Enfin, les concentrations des substances indésirables associées à la synthèse du produit, la L-Hercynine et la 1-méthyl-ergothionéine, sont inférieures à 0,2%. Ce taux de contamination de produit résiduel comme la L-Hercynine a été défini par le pétitionnaire sans que soit précisé l'origine de cette norme.

La molécule est fabriquée selon les Bonnes Pratiques de Fabrication, dont le certificat (certificat GMP, Good Manufacturing Practice) est présenté en annexe du document. De plus, les matières premières utilisées pour la synthèse du NI sont des molécules chimiquement définies (la L-hercynine et la L-cystéine) présentant un haut degré de pureté. Le pétitionnaire souligne que l'analyse de 4 lots produits synthétisés à différentes échelles, semble démontrer l'homogénéité et la reproductibilité du procédé de fabrication.

**Le CES estime qu'il y a bien identité chimique du NI avec la L-ergothionéine naturelle.**

### 3.2. Effet du procédé de production appliqué au NI (II)

Le procédé de fabrication de la L-ergothionéine synthétique est un procédé chimique inspiré de la biosynthèse de cette molécule. Il suit les normes de bonne pratique de fabrication (GMP) et repose

<sup>1</sup> Ph. Eur. 01/2008 :50400

<sup>2</sup> Ph. Eur. 01/2011 :50104

sur les indications du brevet EP 2486020 A1 publié le 15 août 2012, détaillé également dans une publication (Erdelmeier et al. 2012).

En résumé, la synthèse s'effectue à partir de la L-hercynine (Herc) qui réagit avec la cystéine (Cys) en présence de brome. L'intermédiaire obtenu est transformé en L-ergothionéine par chauffage en présence de l'acide 3-mercaptopropionique. Le produit final, la L-ergothionéine, est ensuite isolée par cristallisation, après séparation préalable des sels et de l'excès de cystéine utilisée. Le pétitionnaire précise que l'ensemble de ces réactions se déroule en milieu hydrique et qu'aucun réactif dit CMR (Cancérogène et/ou mutagène et/ou toxique pour la reproduction) n'est utilisé.

**Le CES note que pour former la L-ergothionéine, le pétitionnaire utilise l'acide 3-mercaptopropionique en large excès, soit 10 équivalents. Après extraction par l'acétate d'éthyle, qui doit enlever l'excès de l'acide 3-mercaptopropionique et les produits secondaires de sa réaction, la L-ergothionéine est obtenue sous forme solide. Le pétitionnaire ne semble pas avoir vérifié, dans le produit final, l'absence de l'acide 3-mercaptopropionique, produit toxique en cas d'ingestion et corrosif. Certes, les études analytiques semblent prouver qu'il n'y a pas d'impureté, mais le CES estime qu'il est souhaitable de procéder systématiquement à la vérification spécifique de son absence dans le produit final.**

**Il importe également de déterminer la nature des produits résultant de la réaction de l'acide 3-mercaptopropionique sur l'adduit Herc-Cys, de s'assurer de leur innocuité et de leur absence dans le NI.**

Concernant la stabilité du produit, le pétitionnaire a testé, à 3, 6, 9 et 12 mois, deux formes de stockage (30°C à 65% d'humidité relative et 40°C à 75% d'humidité relative) selon les normes ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use). Les résultats des études à 9 et 12 mois sont en cours au moment du dépôt de dossier et ne sont donc pas renseignés.

**Le CES estime que la stabilité est satisfaisante à 3 mois et 6 mois.**

### **3.3. Utilisation antérieure de l'organisme utilisé comme source de NI (III)**

#### **3.3.1. Sources**

Le pétitionnaire rappelle que la demande concerne un produit issu d'un procédé de synthèse chimique et n'est donc pas obtenu à partir d'une source biologique. Aussi, selon l'arbre décisionnel présenté dans le règlement (CE) n° 258/97, les informations fournies dans le chapitre 2 de la demande (« Effet du procédé de production appliqué au NI ») sont suffisantes. Néanmoins, le pétitionnaire présente dans ce chapitre des informations relatives à l'origine de la molécule, ses sources alimentaires et son exposition dans la population via l'alimentation.

Le pétitionnaire rappelle que la L-ergothionéine est un composé naturel, identifié pour la première fois dans l'ergot de seigle. Les seuls organismes connus capables de synthétiser cette molécule sont des bactéries, plus précisément des mycobactéries et des cyanobactéries, et des champignons inférieurs mais également supérieurs comestibles. Certaines plantes renferment également la L-ergothionéine grâce à des associations symbiotiques entre leurs racines et des champignons du sol. Les animaux et les hommes les absorbent uniquement au travers leur chaîne alimentaire respective puisque ces organismes sont incapables de la synthétiser. De plus, des travaux anciens ont montré que le microbiote ne participe pas à la présence de la L-ergothionéine chez l'Homme et l'animal (Melville and Lubschez, 1953, Konishi *et al.*, 1972).

Il a été montré chez l'Homme et l'animal que la L-ergothionéine se distribue dans beaucoup de tissus mais de façon inégale, elle est très présente dans les érythrocytes, le foie et le rein, en particulier au niveau cytoplasmique, membranaire et mitochondrial.

Le passage de la molécule de la mère au nouveau-né via le lait maternel a été mis en évidence chez l'animal (Ontko and Phillips, 1957).

Le pétitionnaire note qu'un régime appauvri en L-ergothionéine se traduit par une réduction de sa concentration dans les érythrocytes.

**Bien que des études (Mayumi *et al.*, 1978 ; Heath *et al.*, 1952 ; Kato *et al.*, 2010) se soient intéressées à l'élimination de la L-ergothionéine dans l'organisme, en particulier grâce à l'utilisation de L-ergothionéine marqué par un isotope radioactif, le CES remarque que le pétitionnaire ne les mentionne pas. Ainsi, il a été mis en évidence, chez l'animal, que cette molécule s'accumulait dans les tissus et présentait un turnover très lent, avec une demi-vie après une prise unique estimée à 30 jours chez le rongeur.**

### 3.3.2. Information relative à l'exposition antérieure au NI ou à sa source

Comme précisé précédemment, les aliments les plus riches en L-ergothionéine sont les champignons avec des teneurs allant de 0,06 à plus de 500 mg/kg de poids humide. Le foie (8 à 10 mg/kg de poids humide), les haricots rouges et noirs (4 à 13 mg/kg de poids humide) et le son (1 à 4 mg/kg de poids humide) sont également des sources alimentaires de L-ergothionéine.

Le pétitionnaire fait remarquer que selon certains auteurs (Kawano *et al.*, 1982 ; Cheah and Halliwell, 2012), des discordances existent concernant les teneurs en L-ergothionéine dans les aliments et les tissus du fait des modes de culture et d'obtention des aliments (concentration d'histidine dans les milieux de culture des champignons) et des méthodes d'analyse considérées.

Afin de calculer le niveau d'exposition de la population européenne, le pétitionnaire a utilisé les valeurs proposées par Ey *et al.* (2007) concernant la teneur des principaux aliments en L-ergothionéine et des données de consommation de ces aliments grâce à des bases de données de l'EFSA, d'Eurostat et des pays choisis (France, Irlande, Italie, Finlande). A partir de ces données, deux approches ont été utilisées : une approche déterministe supposant que toute la population consomme la même quantité de ces aliments qui contiennent une concentration constante de L-ergothionéine et une approche probabiliste prenant en considération la variabilité de consommation des aliments et de leur concentration en L-ergothionéine. Les calculs ont été réalisés pour un sujet adulte de 70 kg et un enfant de 19 kg.

Concernant la population française, il apparaît que l'exposition aiguë (sur 1 repas ou sur 1 journée) soit de loin la plus forte comparativement aux 3 autres populations européennes : entre 0,85 et 0,95 mg/kg selon la méthode utilisée (déterministe ou probabiliste). Le pétitionnaire explique que la valeur pour la France peut être surestimée du fait de la consommation de champignons comme compléments ou dans des sauces.

Le pétitionnaire a également considéré l'exposition chronique qui prend en considération à la fois la population cible (population totale ou consommateurs avérés) et la durée d'exposition. Dans ce cas, la consommation de la population française n'est pas la plus importante en Europe (3<sup>ème</sup> sur les 4 pays considérés) et représente en moyenne entre 0,03 et 0,06 mg/kg/j selon la méthode utilisée. Cet apport correspond à 2 mg de L-ergothionéine par jour pour la population générale et à 3,5 mg/j pour les consommateurs avérés. Il est à noter que 95 % de l'exposition à la L-ergothionéine en Europe s'expliquent par la consommation de champignons.

Concernant les enfants, seuls deux pays ont été considérés, à savoir l'Italie et la Belgique. La consommation chronique des enfants se situe environ à 0,06 mg/kg/j pour la population générale et à 0,4 mg/kg/j pour la population avérée.

Le pétitionnaire rapporte qu'un complément alimentaire contenant de la L-ergothionéine synthétique existe déjà sur le marché américain et est accessible en Europe via internet. Ce produit contient de la L-ergothionéine mais également de l'acide hyaluronique, de la glucosamine et d'autres composés. La dose conseillée de la L-ergothionéine est de 0,5 mg/j. Le pétitionnaire mentionne une étude clinique publiée en 2012 (Benson *et al.*, 2012) qui a montré que ce complément est susceptible de réduire les douleurs articulaires. Aucune information concernant des effets secondaires ou des effets indésirables n'est donnée dans cet article.

**Le CES estime que les discordances entre études en ce qui concerne les teneurs en L-ergothionéine mériteraient d'être prises en compte par le pétitionnaire dans l'estimation des apports. En effet, certaines techniques d'analyses ne permettant pas de détecter la L-ergothionéine associée aux protéines dans les matrices alimentaires, le calcul de l'exposition au NI pourrait s'en trouver affecté.**

### 3.4. Consommation/niveau d'utilisation prévu du NI (IX)

#### 3.4.1.1. Propriétés de la L-ergothionéine

Le pétitionnaire rappelle que le NI est destiné à être utilisé dans différentes catégories de denrées alimentaires, notamment dans des compléments alimentaires, pour ses propriétés cytoprotectrices. De nombreuses d'études menées in vitro ont montré des propriétés antioxydantes de ce composé (pour revue, Cheah and Halliwell, 2012) ; très peu d'études ont permis de montrer un effet in vivo. Toutes ces expérimentations ont été réalisées à l'aide de différents modèles animaux subissant un stress oxydant important par différents moyens. A titre d'exemple, la L-ergothionéine semble capable de protéger les macromolécules biologiques au sein de la cellule, de sauvegarder les systèmes antioxydants endogènes, de prévenir la mort cellulaire par apoptose et de réguler négativement la réponse inflammatoire. Il est rapporté également que ce composé permet d'augmenter l'efficacité de la reproduction chez l'animal (brebis, étalon,...).

En termes de mécanismes, la L-ergothionéine est absorbée et est incorporée dans les tissus grâce à l'existence d'un transporteur OCTN1. D'ailleurs, l'appauvrissement d'une cellule en culture en L-ergothionéine, par une diminution des capacités d'expression de son transporteur augmente la sensibilité de ces cellules au stress oxydant. Une étude récente (Kato *et al.*, 2010), non reprise par le pétitionnaire, a montré que des souris KO pour le gène de l'OCTN1 sont déficientes en L-ergothionéine et sont plus susceptibles à un stress induit par un épisode d'ischémie/reperfusion (connu pour induire un fort stress oxydant), comparativement à leurs congénères sauvages. Une fois dans la cellule, il apparaît que la L-ergothionéine soit capable à la fois de réduire ou désactiver des entités chimiques à fort pouvoir oxydant et de chélater des cations métalliques comme le cuivre et ainsi prévenir les effets pro-oxydants de ces composés.

**Le CES note qu'à ce jour, aucune donnée ne permet d'étayer un éventuel effet cytoprotecteur de cette molécule chez l'Homme.**

#### 3.4.1.2. Niveaux d'utilisation envisagée dans les denrées alimentaires

Le pétitionnaire rappelle que les denrées alimentaires au sein desquelles la L-ergothionéine devrait être ajoutée sont les boissons rafraichissantes sans alcool, les barres céréalières, le lait, les produits laitiers ultra-frais (crème fraîche, yaourt, fromage blanc), le chocolat, certaines denrées alimentaires destinées à une alimentation particulière (DADAP), ainsi que des compléments alimentaires. Au moment du dépôt du dossier le demandeur ne connaissait pas les formulations spécifiques utilisant le NI. Cependant, il précise dans le rapport que cette molécule présente un caractère hydrophile qui exclut toute utilisation dans des denrées alimentaires à forte teneur en matière grasse (beurre, huile, margarine).

Au regard des différentes informations en sa possession, le pétitionnaire sollicite l'autorisation d'utiliser le NI à la hauteur de 5 mg par portion. Concernant les compléments alimentaires, la dose journalière recommandée par le demandeur est jusqu'à 30 mg/j chez l'adulte et 20 mg/j chez l'enfant.

Le pétitionnaire présente quelques exemples de concentration requise en L-ergothionéine dans différents produits pour atteindre une quantité de 5 mg par portion, ainsi que les niveaux d'utilisation correspondants. Ces calculs ont été réalisés à partir de la taille théorique des portions dans la population française fournie par l'Observatoire de la Qualité de l'Alimentation (OQALI).

	Taille de la portion	Concentration requise pour atteindre 5 mg/portion	Niveau d'utilisation (%)
Barres céréalières	25 g	200 mg/kg	0,02
BRSA*	200 ml	25 mg/kg	0,0025
Produits laitiers ultra-frais	125 g	40 mg/kg	0,004
Lait	200 ml	25 mg/kg	0,0025
Chocolat	20 g	250 mg/kg	0,025
DADAP**	200 ml	25 mg/kg	0,0025

\*Boissons rafraichissantes sans alcool

\*\*Denrées alimentaires destinées à une alimentation particulière

Les niveaux de consommation ont été calculés par le pétitionnaire à partir de ces chiffres et de l'enquête de consommation INCA 2 (Afssa, 2006). Sachant que les catégories d'aliments dans lesquelles les fabricants de produits finis vont intégrer le NI ne sont pas totalement définies, le demandeur a choisi l'hypothèse supposant que toutes les applications alimentaires potentielles contiennent suffisamment de ce composé pour en fournir 5 mg/portion.

L'utilisation des données de consommation INCA 2 et des concentrations théoriques du NI dans les 6 catégories d'aliments ciblées par le pétitionnaire a permis l'estimation d'un apport quotidien moyen de 14 mg par un sujet adulte de 70 kg hors compléments alimentaires. Le calcul de l'apport théorique extrême prend en compte, pour des raisons non présentées par le demandeur, le 95<sup>ème</sup> percentile de la consommation des deux premiers contributeurs (BRSA et lait) et la consommation moyenne des autres catégories. Selon le calcul présenté, un apport quotidien extrême serait de 38 mg pour un sujet adulte de 70 kg hors compléments alimentaires. Si on prend en considération la consommation de compléments alimentaires (20 % de la population selon INCA 2), l'apport théorique moyen s'élèverait à 0,628 mg/kg/j. Concernant l'évaluation de l'apport extrême en prenant les compléments en considération, le pétitionnaire estime un apport de 4 fois la dose journalière recommandée c'est-à-dire de 2,26 mg/kg/j.

Concernant les enfants, l'apport moyen a été calculé à 18,6 mg/j pour un enfant de 31 kg et l'apport extrême serait de 36,5 mg/j. En considérant les compléments alimentaires ces chiffres passeraient à 1,245 mg/kg/j pour les apports théoriques moyens et à 3,759 mg/kg/j pour les apports extrêmes.

Le pétitionnaire considère ensuite d'autres populations européennes grâce à la base de données de consommation alimentaire publiée par l'EFSA. Ces informations ont permis d'estimer l'apport moyen le plus élevé en Europe à 1,714 mg/kg/j, et l'apport extrême à 4,552 mg/kg/j, compléments alimentaires compris. Il semble que la population islandaise puisse être considérée comme étant la plus représentative des niveaux de consommation les plus élevés en Europe.

**Le CES s'interroge sur les modalités de calcul du niveau d'exposition. En effet, il n'est pas clairement expliqué la raison pour laquelle le pétitionnaire n'a pas utilisé le 95<sup>ème</sup> percentile de la consommation pour toutes les catégories d'aliment.**

### 3.5. Informations d'ordre nutritionnel sur le NI (XI)

Le pétitionnaire souligne que le NI ne présente pas d'équivalent avec un autre ingrédient déjà présent sur le marché. Pour le pétitionnaire, ce composé n'est pas de nature protéique, lipidique ou glucidique, sa valeur nutritive est donc considérée comme nulle. La L-ergothionéine est synthétisée à partir de l'hercynine, un dérivé de l'histidine, et sa formule chimique ressemble à celle de cet acide aminé. Le pétitionnaire ne présente pas de données sur le métabolisme de ce composé dans les tissus.

**Le CES constate que le dossier ne présente aucune donnée sur le métabolisme du NI et que la section relative aux informations d'ordre nutritionnel n'a pas été suffisamment documentée par le pétitionnaire.**

**Le CES attire l'attention sur l'existence de données bibliographiques sur des questions essentielles permettant d'évaluer l'impact de la molécule sur le métabolisme et qui auraient donc mérité d'être abordées par le pétitionnaire comme :**

- l'accumulation de la L-ergothionéine dans l'organisme associée aux statuts hormonaux, en particulier aux concentrations sanguines de testostérone (Mackenzie and Mackenzie, 1957 ; Kumosani, 2001) ;
- le rôle potentiel de la L-ergothionéine dans la modulation de la glycolyse au sein de certaines cellules, les érythrocytes notamment (Kawano *et al.*, 1982 ; Kerby and Taylor, 1969) ;
- les conséquences potentielles des capacités chélatrices de la L-ergothionéine des cations métalliques, en particulier du zinc, sur les capacités de stockage de l'insuline qui nécessitent la présence de ce cation (Salt, 1931, Epanand, 1982, Fraser and Jegard, 1950) ;
- l'impact potentiel du polymorphisme du gène OCTN1, transporteur de la L-ergothionéine, sur les capacités d'absorption et la captation tissulaire de la L-

ergothionéine et, sur le développement des pathologies inflammatoires telles que la maladie de Crohn ou l'arthrite rhumatoïde (Taubert *et al.*, 2003 ; Taubert *et al.*, 2005 ; Taubert *et al.*, 2009 ; Tokuhiko *et al.*, 2006; Peltekova *et al.*, 2004 ; Leung *et al.*, 2006 ; Cheah and Halliwell, 2012 ; Petermann *et al.*, 2009).

### 3.6. Informations d'ordre microbiologique sur le NI (XII)

Dans ce chapitre le demandeur rappelle succinctement que le risque microbiologique est très faible, la L-ergothionéine étant obtenue par synthèse chimique selon les Bonnes Pratiques de Fabrication et maintenue dans des conditions de stockage contrôlées.

En outre, des analyses ont été effectuées pour rechercher la présence de microorganismes bactériens ou fongiques. Les résultats confirment que la présence de microorganismes est indétectable dans le produit

Ces données n'appellent pas de remarques particulières du CES.

### 3.7. Informations d'ordre toxicologique sur le NI (XIII)

#### 3.7.1. Evaluation toxicologique du NI

##### 3.7.1.1. Toxicologie expérimentale *in vivo in toto*

Le NI est stable dans les mélanges proposés aux animaux (au moins jusqu'à 23 jours, durée maximale testée dans des conditions de stockage déterminées) et présente une pureté supérieure à 98 % (m/m). Tous les résultats des études sont fournis dans le dossier. Les études ont été réalisées par un laboratoire indépendant du pétitionnaire sous BPL et assurance qualité.

##### 3.7.1.1.1. Toxicologie orale par administration unique (« DL50 » estimée)

L'étude conduite par étape (arbre de décision) sur un lot de 3 rats femelles, avec une entrée à 2000 mg/kg (gavage) puis une période d'observation sur 15 jours, a été répétée pour confirmation. L'absence de signes cliniques et, *a fortiori* de décès, ainsi que l'absence d'observations anormales lors de l'étude d'anatomo-pathologique macroscopique, conduit à une ATE (acute toxicity estimate) de  $\geq 2000$  mg/kg (absence de toxicité). L'étude a été réalisée selon la ligne directrice OCDE n°423, sous assurance qualité.

**Le GT « ESPA » considère que toutes les précisions nécessaires sont fournies par le rapport d'étude, y compris les données historiques pertinentes et que les résultats de l'étude sont acceptables.**

##### 3.7.1.1.2. Etude préliminaire de toxicité par administration répétée

Quatre-vingt rats Sprague-Dawley (40 mâles (M) et 40 femelles (F)) sont répartis en lots de 6 (1 lot témoin et 3 lots exposés, mâles et femelles), dont les doses de traitement sont, exprimées en pourcentage (%) dans le régime, 0 (témoins), 0,3, 0,5 et 0,9 %. La plus forte dose administrée (0,9 %) correspond 660 mg/kg pc/jour (F) et 780 mg/kg PC/jour (M) et a été choisie comme présentant une marge de 1600 par rapport à la teneur maximale envisagée dans les portions des consommateurs. Les dosages plasmatiques du NI effectués montrent une exposition des animaux dans les limites admises ( $\pm 10$  %) par rapport aux valeurs nominales (niveaux cibles). Cette étude a également permis de préciser que chez le rat la concentration plasmatique en NI atteint un plateau en 1 heure après ingestion et qu'il n'y a plus de NI détectable dans le plasma au bout de 12 jours. Après 2 semaines de traitement, les animaux sont sacrifiés, et tous font l'objet d'une étude anatomo-pathologique macroscopique complète.

Le NI apparaît dans cette étude comme très bien toléré à ces doses : pas d'effet sur la consommation ni sur la croissance pondérale, pas de signes cliniques ni d'anomalies liées au traitement dans l'étude anatomo-pathologique.

Les auteurs de l'étude sont donc amenés à considérer la dose de 0,9% (9000 ppm) dans le régime comme convenable pour la dose la plus élevée pour l'étude 13 semaines.

**Le GT « ESPA » note que cet essai d'orientation, bien documenté, a été réalisé selon un plan**

d'étude classique et que les résultats de l'étude sont acceptables.

### 3.7.1.1.3. Etude de toxicité par administration répétée, combinée à un essai de toxicité sur la reproduction et le développement

Trois groupes de rats Sprague-Dawley (10 mâles M et 10 femelles F, par groupe) sont exposés à des doses exprimées en % dans le régime de 0 (témoins), 0,1 ; 0,3 et 0,9 %. Pour les mâles l'exposition a eu lieu, pendant les 10 semaines précédant la période d'accouplement, pendant la période d'accouplement (durée jusqu'à 3 semaines), puis pour la durée totale de l'étude jusqu'au sacrifice, qui n'intervient qu'au bout d'au moins 13 semaines de traitement. Les femelles sont exposées pendant les 13 semaines précédant la période d'accouplement avec un mâle du même groupe, pendant celle-ci (durée jusqu'à 3 semaines), puis pendant la gestation et la lactation (jusqu'à 5 jours inclus après la mise bas), c'est-à-dire que le sacrifice intervient au 6e jour post-partum. Les dosages plasmatiques de L-ergothionéine effectués montrent une exposition effective des animaux dans les limites admises ( $\pm 10\%$ ) par rapport aux valeurs nominales (niveaux cibles). La substance d'essai, incluse dans le pré-mélange alimentaire, est administrée par voie orale dans le régime *ad libitum*. A la fin de l'étude, 5 mâles et 5 femelles sont soumis à une batterie d'observation fonctionnelle (enregistrement de l'activité motrice, réactivité aux stimuli...). Après la mise bas, les expérimentateurs procèdent à la détermination de la taille et de la répartition des sexes des portées, à l'observation des nouveaux nés sur les plans clinique et comportemental, et à la recherche des anomalies externes. Un examen post mortem de tous les animaux de la génération F0 (n=20 par groupe) est effectué : anatomopathologie macroscopique avec une attention particulière pour les organes de reproduction).

En ce qui concerne l'étude de la toxicité par administrations répétées, aucun signe clinique anormal en lien avec le traitement par le NI n'a été observé. Les animaux n'ont pas montré d'effets indésirables quant au poids corporel moyen ou la croissance pondérale.

Seules quelques modifications hématologiques sont statistiquement significatives (diminution de [Hb] cellulaire chez les F et du taux de céphaline activée chez les M d'un lot intermédiaire), mais sont considérées par les auteurs comme non liées au produit en raison de l'absence de relations dose-effet.

En ce qui concerne l'étude de reproduction, il n'y a pas de preuves significatives de signes cliniques et des variations des paramètres classiques (durée de gestation, pertes de produits de conception, portées, viabilité, sex ratio, taux de fertilité...). Aucun effet indésirable n'a été rapporté concernant des paramètres tels que le nombre des corps jaunes, le nombre d'implantations fœtales etc. Par ailleurs, les petits nés des femelles traitées n'ont pas montré d'anomalies liées au traitement.

En ce qui concerne l'analyse d'anatomie pathologique, sur le plan macroscopique, il n'y a pas de différences avec les animaux témoins. Compte tenu de ces résultats, c'est-à-dire de l'absence d'effets ou de lien entre les observations et le traitement par la L-ergothionéine, le rapport d'étude propose:

- o pour la toxicité par administration répétée par voie orale chez le rat mâle et femelle, respectivement, une DSEIO de 614,90 et 715,4 mg/kg pc /jour (dose maximale testée)
- o pour les performances de reproduction : 614,90 (M) et 715,4 mg/kg pc /jour (F) la dose maximale testée.
- o pour la viabilité et le développement des portées : 614,90 (M) et 715,4 mg/kg pc /jour (F) la dose maximale testée.
- o pour la tolérance maternelle, 540,8 mg/kg pc /jour (dose ingérée par les femelles pendant la période de lactation) dose maximale testée.
- o et pour les effets toxiques dans la progéniture : 994 mg/kg pc/jour, la dose maximal testée.

**Le GT « ESPA » considère que le protocole de cette étude appelée « combinée », aux objectifs multiples, est atypique, ce qui rend l'interprétation des résultats malaisée ; en effet, la durée totale de traitement des femelles est imprécise dans le rapport (même si supérieure à 13 semaines). Dans ce même rapport, il est question de l'«état physiologique particulier» des femelles pendant la gestation sans le décrire précisément.**

**Par ailleurs, la DSEIO proposée est la plus forte dose de l'étude mais n'est pas « encadrée »**



par une dose révélant des effets indésirables.

En ce qui concerne la partie de l'étude relative à la reproduction, le GT « ESPA » note, d'une part, la faible durée de suivi des petits : il aurait été souhaitable de les suivre jusqu'à la maturité sexuelle, et d'autre part, l'absence d'analyse anatomo-pathologique approfondie des petits. Cette dernière aurait permis de mettre en évidence ou d'exclure des anomalies squelettiques et/ou viscérales. Il en résulte que l'étude de toxicité vis-à-vis de la reproduction ne remplit pas tous les critères espérés dans ce type d'étude, comme ceux du protocole OCDE n° 422 intitulé « Etude de toxicité par dosage répété avec des tests de dépistage de toxicité sur la reproduction et le développement ».

### 3.7.1.2. Etudes de génotoxicité

#### 3.7.1.2.1. Mutagénicité in vitro

➤ *Test de mutation réverse sur bactéries (mutations géniques)*

Le rapport d'étude complet est fourni (test réalisé selon la ligne directrice OCDE n° 471<sup>3</sup>, sous BPL.).

Les tests ont été réalisés sur 5 souches bactériennes : *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535 et TA1537, *Escherichia coli* WP2 (pKM101), auxquelles correspondent les témoins positifs (respectivement) NaN<sub>3</sub>, 2-nitrofluorène, NaN<sub>3</sub>, 9-aminoacridine et 4-nitroquinoline-N-oxide.

L'essai a été réalisé pour 5 concentrations du NI (0,06, 0,19, 0,56, 1,67 et 5 mg par boîte) et témoin négatif, avec (prise en compte de la promutagénicité) ou sans (mutagénicité directe) activation par S9Mix.

Dans tous les cas, le NI (introduit en solution dans l'eau purifiée) ne provoque pas d'augmentation des révertants.

Les auteurs de l'étude concluent à la non-mutagénicité (mutations ponctuelles ou par frame-shift) du NI dans ces conditions expérimentales.

**Le GT « ESPA » considère ici qu'il s'agit d'un test d'Ames classique, dont les résultats sont recevables.**

Un autre essai est rapporté dans la littérature (SCHAUSS et al., 2010), réalisé selon les lignes directrices de l'OCDE et de l'US EPA, sous BPL. Cinq souches bactériennes (*Salmonella typhimurium* TA98, 100, 1535, 1537 et *Escherichia coli* WP2 uvrA), avec et sans activation (S9 mix) sont utilisées. La L-Ergothionéine est introduite à des concentrations comprises entre 15,8 à 1500 µg/boîte.

Les résultats montrent une absence d'augmentation du nombre des révertants dans ces conditions expérimentales.

**Le GT « ESPA » considère qu'il s'agit d'un test d'Ames classique, avec des teneurs en substances d'essai inférieures au test présenté précédemment. Le GT note que la substance d'essai, bien que s'agissant de L-ergothionéine, n'est pas le NI.**

➤ *Test d'aberrations chromosomiques sur cellules CHL*

Dans la publication précédente (SCHAUSS et al., 2011), un essai d'aberrations chromosomiques sur cellules d'hamster chinois CHL est réalisé selon les lignes directrices de l'OCDE n°473<sup>4</sup> et de l'US EPA, sous BPL hongroises.

Il s'agit de cultures de cellules V79 (Chinese hamster lung), avec introduction de la L-Ergothionéine comprise entre 1250 à 5000 µg/mL, avec et sans activation métabolique (S9 mix).

En conclusion les auteurs estiment que la L-Ergothionéine n'induit pas, dans ces conditions expérimentales d'aberrations chromosomiques structurelles.

**Le GT « ESPA » observe qu'il s'agit d'un test d'aberrations chromosomiques classique et comme le précédent test publié par les mêmes auteurs, la substance d'essai, bien que s'agissant de L-ergothionéine, n'est pas le NI.**

<sup>3</sup> Lignes directrices de l'OCDE n° 471: Essai de mutation réverse sur des bactéries.

<sup>4</sup> Lignes directrices de l'OCDE n° 473: Essai d'aberration chromosomique in vitro chez les mammifères.

### 3.7.1.2.2. Mutagénicité in vivo

L'essai (SCHAUSS *et al.*, 2011) est réalisé selon les lignes directrices de l'OCDE n°474<sup>5</sup> et de l'US EPA, sous BPL hongroises.

Il s'agit d'un test du micronucleus sur cellules de moelle osseuse de mammifère. La substance d'essai est administrée par voie orale à 3 lots de 5 souris M (375, 750 et 1500 mg/kg).

Le dénombrement des érythrocytes polychromatophiles micronucléés (sur 2000 GR) ne montre pas d'augmentation par rapport aux témoins.

**Le GT « ESPA » considère qu'il s'agit d'un test classique du micronucleus pour une évaluation du potentiel clastogène. Les doses d'essai semblent correctes du fait des signes de toxicité pour la dose la plus élevée. Le GT note que la substance d'essai n'est pas identifiée comme étant celle du pétitionnaire.**

**En conclusion sur la génotoxicité au vu des tests pratiqués, la L-Ergothionéine n'induit pas de mutations géniques et ne possède pas d'effet clastogène. Le GT relève le caractère univoque des réponses pour les 3 tests de la batterie.**

### 3.7.2. Allergénicité

Le pétitionnaire signale que le NI ne comporte aucun groupe chimique susceptible de réagir avec des protéines en vue de leur modification. Il ajoute que le NI est de faible poids moléculaire, ce qui n'est pas allergénique en tant que tel.

**Cette question nécessite d'être étayée.**

## 3.8. Conclusions du CES « Nutrition Humaine » et du GT « ESPA »

**Le CES « Nutrition Humaine » considère que le NI peut être synthétisé par un procédé proche de la biosynthèse de la L-ergothionéine, permettant l'obtention d'une molécule d'une pureté satisfaisante et présentant un faible taux de contaminants.**

**Le CES « Nutrition Humaine » estime qu'il est souhaitable de procéder de manière systématique à la vérification spécifique de l'absence de l'acide 3-mercaptopropionique dans le produit final. Il importe également de déterminer la nature des produits résultant de la réaction de l'acide 3-mercaptopropionique sur l'adduit Herc-Cys, de s'assurer de leur innocuité et de leur absence dans le NI.**

**Le CES « Nutrition Humaine » estime que les conséquences d'une très longue demi-vie estimée à 30 jours (après une prise unique chez le rongeur) n'ont pas été suffisamment étudiées par le pétitionnaire notamment une éventuelle accumulation de la molécule dans des compartiments tissulaires avec possibles effets toxiques.**

**En ce qui concerne l'évaluation toxicologique, le GT « ESPA » remarque que trois études de génotoxicité *in vitro* et une étude de génotoxicité *in vivo* ont été réalisées avec le NI. Toutes ces études montrent des résultats négatifs. Le GT « ESPA » estime ainsi que le NI n'induit pas de mutations géniques et ne possède pas d'effet clastogène, comme le montre le caractère univoque des réponses dans les essais de génotoxicité conduits avec le NI.**

**Le GT « ESPA » considère que les conclusions de la partie toxicité du développement analysée avec une étude de 13 semaines conduite chez le rat avec le NI sont incomplètes. Dans ce contexte, le GT « ESPA » est en accord avec le pétitionnaire sur le fait de suggérer aux femmes enceintes ou allaitantes d'éviter de consommer le NI.**

**Concernant les considérations d'ordre nutritionnel, le CES « Nutrition Humaine » constate l'absence de données dans le dossier du pétitionnaire. Or, il existe dans la littérature des données faisant état d'effets métaboliques notamment sur l'homéostasie glucidique et l'équilibre acide-base.**

<sup>5</sup> Lignes directrices de l'OCDE n° 474: Le test de micronoyaux sur les érythrocytes de mammifères.

Le CES « Nutrition Humaine » note la possibilité d'interactions entre le NI et des polymorphismes génétiques associés à des maladies inflammatoires comme la maladie de Crohn ou l'arthrite rhumatoïde.

En conclusion, le GT « ESPA » considère que les données de toxicologie obtenus avec le NI sont globalement rassurantes et les DSEIO proposées sont acceptables.

Le CES « Nutrition Humaine » conclut pour sa part que les éléments du dossier ne permettent pas de s'assurer de la sécurité nutritionnelle d'emploi du NI.

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

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail estime que s'il est établi que le NI présente une sécurité toxicologique dans les conditions d'emploi proposées, il n'est pas possible, en l'état actuel des données présentées dans le dossier de statuer de sa sécurité nutritionnelle. Des éléments complémentaires doivent être amenés concernant les effets métaboliques du NI (notamment sur l'homéostasie glucidique et l'équilibre acide-base), l'interaction potentielle du NI et des polymorphismes génétiques associés à des maladies inflammatoires (maladie de Crohn, arthrite rhumatoïde,...).

**Le directeur général**

Marc Mortureux

#### MOTS-CLES

Novel food, ergothionéine, cytoprotection, synthèse chimique.

#### BIBLIOGRAPHIE

**AFSSA.** Etude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires (INCA 2). 2006.

**Benson KF, Ager DM, Landes B, Aruoma OI, Jensen GS.** Improvement of joint range of motion (ROM) and reduction of chronic pain after consumption of an ergothioneine-containing nutritional supplement. *Prev Med.* 2012;54 Suppl:S83-9.

**Cheah IK, Halliwell B.** Ergothioneine; antioxidant potential, physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta.* 2012 May;1822(5):784-93.

**EFSA.** Use of the EFSA Comprehensive European Food Consumption Database in Exposure Assessment. *EFSA Journal* 2011;9(3):2097.

**Endelmeier I., Daunay S., Lebel R., Farescour L., Yadan J-C.** Cysteine as a sustainable sulfur reagent for the protecting-group-free synthesis of sulfur amino acids: biomimetics synthesis of L-ergothioneine in water. *Green chemistry.* 2012; 14(8):2256-2265.

**Epand RM.** The role of dietary ergothioneine in the development of diabetes mellitus. *Med Hypotheses.* 1982 Aug;9(2):207-13.

**Ey J, Schömig E, Taubert D.** Dietary sources and antioxidant effects of ergothioneine. *J Agric Food Chem.* 2007 Aug 8;55(16):6466-74.

**Fraser R, Jegard S.** Blood ergothioneine levels in diabetes mellitus. *J Lab Clin Med.* 1950 Jun;35(6):960-7.

**Heath H, Rimington C, Searle CE, Lawson A.** Some effects of administering ergothioneine to rats. *Biochem J.* 1952 Feb;50(4):530-3.

**Kato Y, Kubo Y, Iwata D, Kato S, Sudo T, Sugiura T, Kagaya T, Wakayama T, Hirayama A, Sugimoto M, Sugihara K, Kaneko S, Soga T, Asano M, Tomita M, Matsui T, Wada M, Tsuji A.** Gene knockout and metabolome analysis of carnitine/organic cation transporter OCTN1. *Pharm Res.* 2010 May;27(5):832-40

**Kawano H, Higuchi F, Mayumi T, Hama T.** Studies on ergothioneine. VII. Some effects on ergothioneine on glycolytic metabolism in red blood cells from rats. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1982 Jul;30(7):2611-3.

**Kerby GP, Taylor SM.** Effect of carnitine and ergothioneine on human platelet metabolism. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1969 Nov;132(2):435-9.

**Konishi T, Tamaki N, Hama T.** Studies on ergothioneine. *Vitamins.* 1972 3 :127-130.

**Kumosani TA.** L-ergothioneine level in red blood cells of healthy human males in the Western province of Saudi Arabia. *Exp Mol Med.* 2001 Mar 31;33(1):20-2.

**Leung E, Hong J, Fraser AG, Merriman TR, Vishnu P, Krissansen GW.** Polymorphisms in the organic cation transporter genes SLC22A4 and SLC22A5 and Crohn's disease in a New Zealand Caucasian cohort. *Immunol Cell Biol.* 2006 Apr;84(2):233-6.

**Mackenzie JB, Mackenzie CG.** The effect of age, sex, and androgen on blood ergothioneine. *J Biol Chem.* 1957 Apr;225(2):651-7.

**Mayumi T, Kawano H, Sakamoto Y, Suehisa E, Kawai Y, Hama T.** Studies on ergothioneine. V. Determination by high performance liquid chromatography and application to metabolic research. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1978 Dec;26(12):3772-8.

**Melville DB, Lubschez R.** A method for the determination of ergothioneine in blood. *J Biol Chem.* 1953 Jan;200(1):275-85.

**Ontko JA, Phillips PH.** Transfer of ergothioneine to newborn and weaning rats. *Federation Proceedings,* 1957;16(1):229.

**Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X, Newman B, Van Oene M, Cescon D, Greenberg G, Griffiths AM, St George-Hyslop PH, Siminovitch KA.** Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet.* 2004 May;36(5):471-5.

**Petermann I, Triggs CM, Huebner C, Han DY, Gearry RB, Barclay ML, Demmers PS, McCulloch A, Ferguson LR.** Mushroom intolerance: a novel diet-gene interaction in Crohn's disease. *Br J Nutr.* 2009 Aug;102(4):506-8.

**Schauss AG, Béres E, Vértési A, Frank Z, Pasics I, Endres J, Aruoma OI, Hirka G.** The effect of ergothioneine on clastogenic potential and mutagenic activity: genotoxicity evaluation. *Int J Toxicol.* 2011 Aug;30(4):405-9.

**Schauss AG, Vértési A, Endres JR, Hirka G, Clewell A, Qureshi I, Pasics I.** Evaluation of the safety of the dietary antioxidant ergothioneine using the bacterial reverse mutation assay. *Toxicology.* 2010 Nov 28;278(1):39-45.

**Salt HB.** The ergothioneine content of the blood in health and disease. *Biochem J.* 1931;25(5):1712-9.

**Taubert D, Grimberg G, Jung N, Rubbert A, Schömig E.** Functional role of the 503F variant of the organic cation transporter OCTN1 in Crohn's disease. *Gut.* 2005 Oct;54(10):1505-6.

**Taubert D, Lazar A, Grimberg G, Jung N, Rubbert A, Delank KS, Perniok A, Erdmann E, Schömig E.** Association of rheumatoid arthritis with ergothioneine levels in red blood cells: a case control study. *J Rheumatol.* 2006 Nov;33(11):2139-45.

**Taubert D, Jung N, Goeser T, Schömig E.** Increased ergothioneine tissue concentrations in carriers of the Crohn's disease risk-associated 503F variant of the organic cation transporter OCTN1. *Gut.* 2009 Feb;58(2):312-4.

**Tokuhiro S, Yamada R, Chang X, Suzuki A, Kochi Y, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Ohtsuki M, Ono M, Furukawa H, Nagashima M, Yoshino S, Mabuchi A, Sekine A, Saito S, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y, Yamamoto K.** An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* 2003 Dec;35(4):341-8.