

Maisons-Alfort, le 22 novembre 2005

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur le rapport d'évaluation initiale, rédigé par les autorités belges, relatif à l'autorisation d'emploi d'alpha-cyclodextrine comme ingrédient alimentaire dans le cadre du règlement (CE) n° 258/97

LA DIRECTRICE GENERALE

Par courrier reçu le 14 octobre 2005, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 10 octobre 2005 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) d'une demande d'avis sur le rapport d'évaluation initiale, rédigé par les autorités belges, relatif à l'autorisation d'emploi d' α -cyclodextrine comme ingrédient alimentaire dans le cadre du règlement (CE) n° 258/97¹, adressée par le bureau C2.

L' α -cyclodextrine (ou cyclohexa-amylose ou cyclomalto-hexaose) est un malto-oligosaccharide cyclique α - (1 \rightarrow 4) composé de 6 molécules de glucose. Elle est synthétisée par l'action d'une cyclodextrine-glucosyltransférase (CGTase) sur de l'amidon liquéfié, en présence de 1-décanol. La CGTase est produite par une souche modifiée d'*Escherichia coli* K12.

Par référence à la recommandation de la Commission 97/618/CE du 29 juillet 1997, le pétitionnaire a classé l' α -cyclodextrine dans la classe 1.2. « produits chimiques purs ou mélanges simples issus de sources non génétiquement modifiées ; la source du nouvel aliment n'a jamais été utilisée comme aliment dans la Communauté ».

L' α -cyclodextrine est destinée selon le pétitionnaire à un usage en tant que fibre alimentaire.

Après consultation des Comités d'experts spécialisés « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques », réuni le 8 novembre, et « Biotechnologie », réuni le 17 novembre 2005, l'Afssa rend l'avis suivant :

Spécifications du nouvel aliment/ingrédient:

Considérant que, la substance est présentée comme pure à 98%. Des impuretés de masse moléculaire élevée, provenant du milieu de fermentation, apparaissent au cours du processus de production mais sont éliminées ultérieurement par les étapes de purification. La teneur résiduelle en protéines inconnues est de 5 mg/kg (ppm) d' α -cyclodextrine.

Arsenic :

La spécification du nouvel ingrédient/aliment prévoit une limite de 3 mg/kg pour l'arsenic. L'arsenic inorganique a été classé comme cancérigène (groupe I) par le CIRC et il est également suspecté d'être un perturbateur endocrinien (Bodwell *et al.*, 2004). Différentes VTR (valeur toxicologique de référence) existent dont une DHTP (dose hebdomadaire tolérable provisoire) de 15 μ g/kg de poids corporel (p.c.) établie par l'OMS. L'OMS a montré que pour une teneur de 10 μ g/l dans l'eau, l'excès de risque de cancer serait de 6 pour 10 000, pour une exposition durant la vie entière (2l d'eau par jour pour une personne de 70 kg pendant 70 ans). L'apport moyen d'arsenic par l'alimentation est

¹ Règlement (CE) n° 258/97 du Parlement européen et du Conseil du 27 janvier 1997 relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients alimentaires.

d'environ 15 µg/personne/j (Afssa, 2004) en France. L'apport d'arsenic par l'eau est au maximum de 20 µg /personne/j² pour une eau potable.

En prenant en compte les valeurs de consommation d'α-cyclodextrine pouvant contenir jusqu'à 3 mg/kg d'arsenic présentées par le pétitionnaire, la consommation totale par l'intermédiaire de l'eau et des produits contenant ce nouvel ingrédient/aliment serait de 69 à 95 µg/personne/j.

En conséquence, la spécification proposée pour l'arsenic de 3 mg/kg (1mg/kg pour la β-cyclodextrine) constitue un apport non négligeable à considérer au regard des niveaux actuels d'ingestion d'arsenic.

Protéines :

Les spécifications du nouvel ingrédient/aliment prévoient la présence de protéines non identifiées à hauteur de 5 mg/kg de substance. L'éventuelle allergénicité de ces protéines n'a pas été évoquée dans l'évaluation et mériterait d'être abordée par le pétitionnaire.

A ce propos, dans la mesure où l'α-cyclodextrine est synthétisée par l'action de la cyclodextrine glucosyltransférase sur de l'amidon liquéfié et que le blé, source d'amidon, est un allergène d'étiquetage obligatoire, il conviendrait de spécifier la provenance de cet amidon.

Procédé de production du nouvel aliment

Sécurité de la souche de production de la cyclodextrine-glucosyltransférase (CGTase)

Considérant que le micro-organisme producteur de l'enzyme, *Escherichia coli* K12, est un micro-organisme non pathogène et non toxigène ;

Considérant que la séquence codante du gène d'intérêt est isolée de la souche *Klebsiella oxytoca* M5a1, souche non pathogène et non toxigène ;

Considérant que ce transgène est introduit dans le vecteur plasmidique pJF118EH, vecteur multicopie non intégratif ;

Considérant que la souche de production de la préparation enzymatique est la souche d'*Escherichia coli* génétiquement modifiée par le vecteur pJF118EH recombinant ;

Production et toxicité de la préparation enzymatique de cyclodextrine-glucosyltransférase

Considérant que le procédé de production de la préparation enzymatique est un procédé de culture suivie d'étapes de centrifugation, de filtrations, d'ultrafiltration et de standardisation de l'enzyme ;

Considérant que la tétracycline et l'IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) sont utilisés respectivement comme pression de sélection et comme inducteur, et que sur trois lots distincts d'α-cyclodextrine, les concentrations en tétracycline et en IPTG sont inférieures respectivement aux seuils de 0,5 mg/kg et de 1 mg/kg ;

Considérant que les critères biologiques de la préparation enzymatique sont inférieurs à 1000 cfu (colonie formant unité)/g d'enzyme pour les micro-organismes totaux, 0 cfu/10g pour les coliformes dont la souche de production de l'enzyme, et 0 cfu/10g pour les salmonelles au lieu du dosage pour 25g demandé par l'arrêté du 5 septembre 1989³ ;

² Evaluation des risques sanitaires liés aux situations de dépassement des limites et références de qualité des eaux destinées à la consommation humaine. AFSSA, septembre 2004.

JE. Bodwell, LA. Kingsley, JW. Hamilton : Arsenic at very low concentrations alters glucocorticoid receptor (GR)-mediated gene activation but not GR-mediated gene repression : Complex dose-response effects are closely correlated with levels of activated GR and require a functional GR DNA binding domain. Chem. Res. Toxicol. (2004) 17, 1064-1076.

OMS : Arsenic in : Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed. vol. 2. Health criteria and other supporting information. Geneva, WHO, 1996.

³ Arrêté du 5 septembre 1989 relatif à l'emploi de préparations enzymatiques dans la fabrication de certaines denrées et boissons destinées à l'alimentation humaine.

Considérant que la présence de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs et de *Staphylococcus aureus* n'a pas été recherchée ;

Considérant que la concentration en ADN du transgène dans l' α -cyclodextrine est inférieure à 0,005 ng par réaction ;

Considérant que les tests de génotoxicité *in vitro* (test d'Ames), d'aberration chromosomique *in vitro* et de toxicité orale subchronique chez le rat n'ont révélé aucun effet toxique ou mutagène généré par la préparation enzymatique ;

Considérant que le facteur de sécurité indiqué est de 1000 ;

Devenir de la préparation enzymatique de cyclodextrine-glycosyltransférase dans l' α -cyclodextrine

Considérant que le procédé technologique utilisé pour la production de l' α -cyclodextrine conduit à l'absence de la préparation enzymatique dans le nouvel aliment ;

Considérant que toute trace de la préparation enzymatique perdurant dans le nouvel aliment serait inactivée par le procédé de production de l'aliment décrit par le pétitionnaire ;

Consommation et niveau d'utilisation prévus du nouvel aliment/ingrédient

Considérant que, les percentiles moyen et élevé (90^{ème}) d'exposition à l' α -cyclodextrine sur la base de tous les aliments susceptibles de la contenir, hormis le chewing-gum, seraient respectivement de 0,21 g/kg pc/j et 0,43 g/kg pc/j. Ces valeurs correspondraient à 11,4 et 19,8g/j. Pour les enfants de 2 à 5 ans ces valeurs seraient respectivement de 0,61 et 0,98 g/kg pc/j. L'apport par le chewing-gum (3 chewing-gums/j) serait de 0,6 à 0,9 g/j.

Cependant, les chiffres de l'exposition journalière totale et de l'exposition par kg de pc semblent avoir été établis uniquement pour des individus pesant entre 46 et 54 kg. Or, les calculs réalisés sur un adulte de 60 kg (poids moyen retenu par l'OMS) en utilisant les valeurs annoncées aboutissent à des valeurs de 12,6 et 25,8 g/j, valeurs supérieures à celles rapportées, 11,4 et 19,8 g/j. La consommation de chewing-gum aboutirait à des valeurs de l'ordre de 13,5 et 27,7 g/j pour un adulte de 60 kg. Cependant, les utilisations prévues et les niveaux d'utilisation ne figurent pas dans l'évaluation initiale.

Aspects toxicologiques liés au nouvel aliment/ingrédient

Il est observé l'absence d'études de toxicité à long terme pour l' α -cyclodextrine.

Aspects physiologiques liés au nouvel aliment/ingrédient

Considérant que, le rapport d'évaluation fait état de la non-digestibilité de l' α -cyclodextrine par les amylases salivaire et pancréatique, et de sa digestibilité par les amylases et cyclodextrinases bactériennes. Il est rapporté la fermentescibilité chez l'homme, sans augmentation de la glycémie et du glucose urinaire et il est conclu à l'analogie avec les fibres solubles fermentescibles. L'interaction avec l'absorption d'autres substances/nutriments a été étudiée et il a été montré la formation de complexes réversibles avec les substances lipophiles mais non avec le rétinol et les vitamines D et E, l'absence d'effet sur l'absorption des minéraux, et le retard et la réduction de la réponse glycémique de l'amidon en présence d' α -cyclodextrine.

Les données disponibles permettent de considérer que l' α -cyclodextrine semble se comporter comme une fibre soluble du type de la pectine ou de certaines hémicelluloses. Cependant, toutes les fibres solubles ne présentent pas les mêmes effets biologiques. Elles se distinguent les unes des autres par des effets particuliers sur le métabolisme en raison de leur nature moléculaire et il paraîtrait donc nécessaire de mieux connaître les effets métaboliques qui peuvent être attribués spécifiquement à l' α -cyclodextrine. En outre, les apports conseillés en fibres totales en France sont de l'ordre de 25 à 30 g/j dont environ la moitié de fibres solubles (ANC 2000). Or, compte-tenu des emplois prévus pour la substance la contribution à la consommation totale des fibres serait de 12,6 à 25,8 g/j,

hors chewing-gum, ce qui représenterait une large proportion des apports conseillés en France.

Dans ces conditions, il apparaît important de caractériser précisément les propriétés métaboliques de cette nouvelle fibre et plus particulièrement les effets sur le métabolisme glucidique et lipidique (non évoqué dans l'évaluation) et sur les minéraux chez l'homme. De même, il conviendrait de préciser si cet apport viendrait s'ajouter à l'apport en fibres solubles fourni par une alimentation normale. En effet, il conviendrait alors d'estimer les conséquences métaboliques sur l'organisme et sur la composition de la flore intestinale du quasi doublement de la consommation en fibres solubles apportée par ce nouvel ingrédient/aliment.

Compte-tenu de la propriété de piège moléculaire de la substance, combinée aux effets laxatifs rapportés, il conviendrait d'apprécier l'impact sur les processus métaboliques et sur le transit intestinal.

Conclusion :

En conséquence, l'Afssa reste réservée quant à la sécurité d'emploi de l' α -cyclodextrine en tant qu'ingrédient alimentaire et estime que le dossier devrait être complété notamment au regard :

- de la teneur limite en arsenic,
- de la présence résiduelle de protéines non identifiées et du risque allergique,
- de la caractérisation précise des propriétés métaboliques de l' α -cyclodextrine,
- du retentissement potentiel de la consommation d' α -cyclodextrine sur la physiologie de l'appareil digestif.

Pascale BRIAND