



Maisons-Alfort, le 3 mars 2009

AVIS

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments
relatif à l'évaluation du rapport d'évaluation initial établi par les autorités
britanniques concernant la mise sur le marché d'un nouvel ingrédient
alimentaire : un extrait de *Lentinula edodes* (Shiitake) riche en β -glucanes,
dans le cadre du règlement 258/97/CE**

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 14 janvier 2009 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes d'une demande d'avis relatif à «une demande d'autorisation de mise sur le marché d'un nouvel ingrédient qui est un extrait de *Lentinula edodes* (Shiitake) riche en β -glucanes, destiné à la supplémentation alimentaire». Le rapport d'évaluation initial a été rédigé et transmis aux services de la Commission européenne par l'autorité compétente britannique.

Contexte réglementaire

Cet avis s'inscrit dans le cadre du règlement 258/97/CE relatif aux nouveaux aliments et nouveaux ingrédients alimentaires. Ce nouvel ingrédient est classé sous la catégorie D qui regroupe les aliments et ingrédients alimentaires composés ou isolés à partir de micro-organismes, de champignons ou d'algues, sous l'article 1, paragraphe 2. Le pétitionnaire considère que sa demande doit être traitée comme un cas de classe 2.1 car, selon lui, la source du nouvel ingrédient a déjà été utilisée comme aliment dans la Communauté. Cependant, les autorités britanniques considèrent que l'objet de cette demande appartient à la classe 2.2, considérant que la source du nouvel ingrédient n'a jamais été utilisée comme aliment dans la Communauté.

Précision concernant le rapport d'évaluation initiale fourni par le premier évaluateur

L'extrait de *Lentinula edodes* riche en β -glucanes a fait l'objet d'une expertise par l'*Advisory Committee on Novel Foods and Processes* (ACNFP), autorité britannique compétente. Cette instance a estimé que l'extrait, dont il est question dans cette saisine, remplit les critères requis pour accepter cet extrait comme nouvel ingrédient alimentaire tel que défini par l'article 3(1) du règlement 258/97. Un complément d'information a été demandé au pétitionnaire pour permettre l'évaluation initiale de ce nouvel ingrédient. Des réponses partielles ont été obtenues.

Les autorités britanniques précisent qu'une première évaluation par le ACNFP en 2006-7, dans le cadre de l'article 3 (4) du règlement 258/97, avait conclu à une impossibilité de prononcer l'équivalence en substance entre cet extrait et les produits issus de la pulvérisation du sporophore déshydraté de *Lentinula edodes*.

Précision concernant la source du nouvel ingrédient

La Société Mycologique de France signale que le nom botanique du Shiitake est *Lentinula edodes* et non *Lentinus edodes*. Le Shiitake est un champignon (Basidiomycète) qui se développe en Asie et notamment au Japon et en Chine, sur des arbres tombés et morts. Cet aliment est couramment consommé dans les pays asiatiques mais il ne l'est que depuis récemment en Europe. Les champignons frais sont maintenant largement produits et commercialisés aux Etats-Unis et en Europe.

Concernant la spécification du nouvel ingrédient

Le nouvel ingrédient (NI) est une source de lentinane, un (1-3)(1-6) β -glucane hydrosoluble issu de *L. edodes*. Son poids moléculaire est de 5×10^5 Daltons. Son degré de branchement est de 2/5 et il possède une structure en triple hélice. Il semble être constitué, en dehors des unités glucose constitutives des β -glucanes, d'autres monomères mais aucune composition précise du polymère n'est fournie par le pétitionnaire.

Le NI en suspension aqueuse a une valeur énergétique de 1,44 kcal par 10 ml. Il contient environ 1 mg/ml de lentinane ainsi que des traces de glucose, de protéines et acides aminés. Le NI contient de faibles quantités d'acides aminés libres : les 3 acides aminés prépondérants sont l'acide glutamique, la leucine et l'alanine (respectivement 1,39, 0,69 et 0,65 g/kg MS).

Les caractéristiques de l'ingrédient sont les suivantes :

Paramètre	Spécification
Apparence	Brun clair, légèrement trouble
Charge microbiologique	Stérile
Lentinane	1mg/ml \pm 0,2
Glucose résiduel	<20 mg/ml
Protéines totales	<100 μ g/ml
pH	3,0-4,0
Protéines incluant les acides aminés libres	<10 mg/ml
Pesticides	Non détectables

Les autorités britanniques rapportent que le pétitionnaire a vérifié la stabilité du NI. Les analyses fournies par le pétitionnaire montrent que le NI est considéré comme stable et qu'il peut être consommé dans les 12 mois suivant sa production.

Le ACNFP déplore le manque de données relatives à la composition du NI et s'interroge sur la teneur relativement basse en β -glucanes du NI par rapport à la matière première.

L'Afssa considère que la composition chimique du NI devrait être mieux précisée. Seule la teneur en lentinane (β -glucane) est indiquée avec précision (1 mg/ml). La teneur énergétique étant de 14,4 kcal pour 100 ml, l'origine de cette énergie ne peut être expliquée par les seules indications du pétitionnaire. En outre, une teneur en matière sèche du NI paraît indispensable.

Concernant les effets du procédé de production appliqué au nouvel ingrédient

L'ingrédient est produit par fermentation liquide d'une culture pure du champignon *L. edodes* dans des conditions contrôlées. La souche de champignon utilisée est déposée à l'*International Depositary Authority* sous le numéro IHEM 1892.

Selon le pétitionnaire, le procédé de production du NI entraîne, par rapport aux méthodes traditionnelles de culture du sporophore, une réduction du temps de production, une optimisation de la composition du milieu de culture et une amélioration des rendements de production. Le milieu de culture contient du glucose, de l'extrait de malt, de la peptone de soja et de l'extrait de levure. Après fermentation, la biomasse est séparée, par filtration, du milieu de culture qui est ensuite utilisé pour la production du NI.

Le milieu de culture est stérilisé à 115°C pendant 20 minutes. Le NI est standardisé sur sa concentration en lentinane. Du benzoate de sodium (E211) peut être ajouté comme conservateur.

Le NI est produit conformément aux procédures de bonnes pratiques de fabrication employées dans l'industrie pharmaceutique.

Le procédé adopté est très proche de celui utilisé pour la production de lentinane à partir de champignon Shiitake frais commercialisé comme ingrédient alimentaire « ordinaire ».

Suite à la demande du Comité britannique, le pétitionnaire a confirmé que toutes les analyses ont été réalisées à partir de matière première cultivée en cuve de fermentation. Malgré la demande du ACNFP, le pétitionnaire n'a pas fourni de données pour démontrer l'absence de métabolites secondaires mais s'appuie sur l'absence de mycotoxines dans le NI pour affirmer l'absence des composés toxiques. Il s'appuie en outre sur le fait que les études chez l'Homme ne révèlent aucun effet néfaste pour étayer l'hypothèse d'une absence de production de métabolites secondaires néfastes. Le ANCFP mentionne que les conditions de culture ne sont pas propices à la production de métabolites secondaires car elles visent à produire un maximum de β -glucanes (métabolite primaire). De plus, compte tenu de l'historique de consommation du sporophore, forme la plus différenciée du champignon et la plus susceptible de contenir des métabolites secondaires, les autorités britanniques considèrent que les données relatives au risque lié à des métabolites secondaires sont rassurantes.

L'Afssa estime que les données concernant les procédés de production et de purification sont trop succinctes pour que les effets de ces procédés sur le NI puissent être évalués.

Concernant l'utilisation antérieure de l'organisme utilisé comme nouvel ingrédient

Le champignon dont est issu le NI est largement consommé sous sa forme sporophore en Asie mais aussi en Europe. Le pétitionnaire signale que ce champignon est une source majeure de β -glucanes, incluant le lentinane. L'ingestion de 90 g de *L. edodes* (c'est-à-dire 4 ou 5 sporophores) apporte 1,8 g de lentinane. Les autorités britanniques rapportent qu'un précédent dossier du pétitionnaire portait sur la reconnaissance de l'équivalence substantielle de l'extrait riche en β -glucanes issus du mycellium (le NI présenté ici) et du sporophore. Elles considèrent que s'il est vrai que l'équivalence en substance n'est pas prouvée entre le NI et le champignon *per se*, la consommation de β -glucanes, issus du champignons ou d'autres sources, peut être considérée comme une utilisation antérieure de l'organisme utilisé comme NI.

L'Afssa considère que compte tenu de l'absence de données détaillées sur la composition chimique exacte du NI, il n'est pas possible de se prononcer quant aux risques sanitaires du NI. Par ailleurs, l'Afssa (2008) rappelle que l'utilisation de champignons ou d'extraits de champignons sous forme de compléments alimentaires est très éloignée de l'usage alimentaire traditionnel ; les processus de transformation peuvent, en particulier, modifier la toxicité des produits. Le recul d'utilisation à travers des usages traditionnels et les éléments d'information disponibles ne sont pas suffisants pour juger de la sécurité du NI puisque les usages et les modes de préparation présentés s'éloignent considérablement de la tradition culinaire de consommation de ce champignon.

Concernant la consommation/niveau d'utilisation prévu du nouvel ingrédient

Le pétitionnaire envisage de proposer le NI dans *une large gamme de catégories d'aliments autres que les compléments alimentaires*. Le NI devrait être utilisé sous forme de gélule, liquide, poudre, gel, dans des produits laitiers (yaourts et yaourts à boire), des fruits et légumes (jus de fruits, nectars, sodas, soupes...), confiseries ou encore dans les aliments cuits ou préparés. Le pétitionnaire envisage un enrichissement des denrées alimentaires à hauteur de 2,5 mg de lentinane / jour soit 2,5 ml du NI par jour.

La dose journalière recommandée par le pétitionnaire est estimée entre 1 et 2,5 mg. Les autorités britanniques mettent en évidence la faible teneur en lentinane du NI par rapport à la matière première mais considèrent que cette teneur est suffisante compte tenu des doses d'utilisation prévues.

A l'instar des autorités britanniques, l'Afssa estime que les doses d'exposition au lentinane présents dans le NI (1 - 2,5 mg/jour) sont très faibles par rapport à la consommation moyenne de lentinane apportés par 90 g de champignons frais et estimée dans ce rapport, à 1800 mg/jour.

Concernant les informations d'ordre nutritionnel sur le nouvel ingrédient

Le pétitionnaire présente les composants du NI (protéines et glucose) en pourcentage d'apports journaliers recommandés (RDI¹) sur la base des données américaines. Le ANCFP considère que cette présentation de données n'est ni représentative pour la population européenne ni pertinente pour les compléments alimentaires compte tenu des faibles quantités proposées. Le pétitionnaire indique que le NI est nutritionnellement équivalent à d'autres produits à base du champignon Shiitake déjà commercialisés. Une bouteille de 100 ml du NI contenant 1mg/ml de lentinane contient autant de lentinane qu'un quart de champignon Shiitake.

L'Afssa souligne qu'en l'absence de composition chimique détaillée du NI, elle ne peut se prononcer sur les informations d'ordre nutritionnel du NI.

¹ Recommended Daily Intakes

Concernant les informations d'ordre microbiologique sur le nouvel ingrédient

D'après le pétitionnaire, la stérilité du produit a été confirmée par culture bactérienne. Le ANCFP reconnaît que les conditions de stérilisation sont acceptables et qu'en conséquence, le risque de contamination microbienne est réduit au maximum.

L' Afssa considère que ces éléments n'appellent pas de remarques particulières.

Concernant les informations d'ordre toxicologique sur le nouvel ingrédient

Le NI est produit en utilisant une eau potable conforme aux normes norvégiennes. Les autorités britanniques rapportent l'absence de substances indésirables : Cd<10µg/l, Cr<50µg/l, Mn<280µg/l, Pb<70µg/l, Ni<100µg/l, Hg<20µg/l, Cu<550µg/l. Le NI ne contient pas de dose détectable de pesticides (méthodes de l'Agence Médicale de Norvège). A la demande du ANCFP, des analyses complémentaires ont été réalisées : de faibles taux de chlorures, nitrates, nitrites, sulfates, phosphates, cuivre, fer et aluminium ont été mesurés.

Le NI a fait l'objet d'études sur rongeurs, poulets et porcs. Selon le pétitionnaire, ces études fournissent la preuve que le NI ne modifie pas le métabolisme de ces animaux dans les conditions d'utilisation expérimentales. Le ANCFP note que ces études ne sont pas des études toxicologiques mais plutôt des études d'efficacité même s'il est rapporté que tous les rats ont subi une série de tests de toxicité incluant des variables immunologiques, hématologiques, musculaire ou encore comportementales. Aucun effet néfaste n'a été constaté avec des doses comprises entre 15 et 580 fois les doses proposées chez l'Homme.

La sécurité du NI a été testée au cours d'un essai clinique qui a conclu à l'innocuité du NI pour l'Homme. Cette étude a été réalisée en double aveugle, en cross-over avec 2,5 ml du NI administrés aux participants (42 sujets âgés sains) pendant 6 semaines. Il n'y a eu aucune différence dans l'incidence d'effets négatifs entre le NI et le placebo (cellulose). Toutefois, les autorités britanniques se sont interrogées sur l'augmentation du taux sérique de la protéine C-réactive (CRP) chez les sujets de l'étude et qui suggère une réponse inflammatoire.

A la demande des autorités britanniques, le pétitionnaire a indiqué que l'augmentation des niveaux de CRP a été observé dans le groupe témoin comme dans le groupe recevant le NI. Les autorités britanniques considèrent que les études présentées n'ont servi qu'à déterminer une certaine activité du NI.

Le ANCFP a estimé que des études toxicologiques chez l'animal réalisées selon les lignes directrices définies par l'OCDE sont souhaitables.

Aucun essai spécifique concernant l'évaluation de la toxicité du NI n'a été mené sur des modèles animaux. L'étude menée chez des volontaires sains âgés n'a pas révélé d'effets secondaires néfastes.

Selon le rapport d'évaluation initiale, il ne semble pas y avoir d'effets indésirables significatifs attribuables au NI. Cependant, les études d'intervention chez des volontaires sains âgés avec le NI, telles que mentionnées par les autorités britanniques, sont de courte durée et n'ont pas été établies à des fins toxicologiques.

Si la littérature scientifique sur la toxicologie des β -glucanes ne fait pas apparaître d'effets néfastes attribuables à ces composés, le manque de données précises sur la composition chimique du NI ne permet pas à l'Afssa de se prononcer sur la sécurité d'emploi du NI dans les conditions envisagées.

Par ailleurs, diverses instances (Afsca, 2008 ; Afssa, 2001) ont noté que le taux naturel de formaldéhyde mesuré dans les champignons Shiitake est généralement plus élevé que dans d'autres espèces de champignons cultivés. Il a été rapporté des teneurs pouvant s'élever jusqu'à 300 mg/kg sans qu'il puisse être clarifié si cette présence était endogène ou liée à des pratiques de désinfection. En France, une teneur maximale en formaldéhyde des champignons Shiitake a été fixée à 63 mg/kg par l'arrêté du 30 avril 2002². Compte tenu des caractéristiques toxicologiques et surtout de la forte réactivité de ce composé, il est nécessaire que le pétitionnaire vérifie la teneur en formaldéhyde au cours du procédé de production du NI.

² Arrêté du 30 avril 2002 relatif à la teneur maximale en formaldéhyde que doivent présenter les champignons shiitake (*Lentinus edodes*) pour être reconnus propres à la consommation humaine. JO du 4 mai 2002, p. 8328-8329.

Allergénicité et étiquetage

Les réactions allergiques au champignon Shiitake sont très rares. Le pétitionnaire a reconnu qu'il existe plusieurs cas de sensibilité allergique de travailleurs de champignonnières suite à l'inhalation de spores de Shiitake. Néanmoins, le pétitionnaire affirme qu'en raison de la méthode de production, le NI ne contient pas de spores ou dérivés et confirme l'absence de réaction allergique dans les études menées chez les personnes âgées, décrites ci-dessus.

Le ANCFP estime qu'il est peu probable que les protéines de *L.edodes* du NI entraînent une réaction allergique spécifique. Toutefois, le ANCFP a noté la présence de peptones de soja dans le milieu de culture. Il suggère un étiquetage du NI informant de la présence de dérivés de soja, en toute cohérence avec la réglementation européenne.

A l'instar des autorités britanniques, l'Afssa estime qu'en l'absence de spores de Shiitake dans le NI, le risque allergique lié à la consommation du NI peut être écarté. Cependant, la présence de peptone de soja dans le milieu de culture doit également être mentionné sur l'étiquetage à des fins de mise en garde des consommateurs allergiques au soja comme l'exige la directive 2007/68/CE³.

Conclusions

Les autorités britanniques considèrent que l'extrait riche en β -glucanes de *Lentinula edodes* remplit les critères d'acceptation d'un nouvel aliment tel que défini dans l'Article 3(1) du règlement 258/97.

En conclusion, le ANCFP :

- reconnaît l'antériorité de consommation des champignons ainsi que des β -glucanes qui en sont extraits, en Europe ;
- s'en tient aux informations relatives à la composition du NI ;
- considère que les études présentées dans le dossier toxicologique n'ont pas été réalisées dans un but toxicologique et que des études toxicologiques chez l'animal seraient souhaitables;
- estime qu'il est peu probable que le procédé de production du NI soit susceptible de générer des métabolites secondaires ;
- estime qu'il n'est pas nécessaire d'exiger de nouvelles études de sécurité alimentaire de la part du pétitionnaire.

Le Comité britannique rend un avis favorable à la mise sur le marché du NI sous réserve d'étiquetage des dérivés de soja.

L'Afssa considère qu'en l'absence de composition chimique détaillée du NI issu d'un processus de fermentation, elle ne peut se prononcer définitivement sur les risques sanitaires liés à la consommation du NI. L'Afssa souligne l'absence d'études toxicologiques réalisées avec le NI. Par ailleurs, une recherche de formaldéhyde au cours du procédé de production du NI apparaît nécessaire. Enfin, une mise en garde, figurant sur l'étiquetage, relative à la possible présence de dérivés de soja est exigée conformément à la réglementation.

La Directrice Générale

Pascale BRIAND

Références Bibliographiques

Afssa, 2008- Avis du 20 juin 2008 relatif l'évaluation d'un projet d'arrêté relatif à l'emploi de substances à but nutritionnel ou physiologique et de plantes et préparations de plantes dans la fabrication de compléments alimentaires.

Afssa (Agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire, Belgique), 2008 - Avis 24-2008 relatif au formaldéhyde dans des champignons cultivés.

Afssa, 2001- Avis du 24 septembre 2001 relatif à un projet d'arrêté relatif à la teneur maximale en formaldéhyde que doivent présenter les champignons de l'espèce shiitake (*Lentinus edodes*).

Mots clés : *Lentinula edodes*, Shiitake, formaldéhyde, novel food

³ Directive 2007/68/CE de la commission du 27 novembre 2007 modifiant l'annexe III bis de la directive 2000/13/CE du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne certains ingrédients alimentaires.