



Maisons-Alfort, le 3 juin 2010

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à une demande d'évaluation du rapport d'évaluation initiale des autorités néerlandaises concernant la mise sur le marché d'un nouvel ingrédient alimentaire : lactoferrine bovine

LE DIRECTEUR GÉNÉRAL

1. RAPPEL DE LA SAISINE

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 16 avril 2010 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 initiale des autorités néerlandaises concernant la mise sur le marché d'un nouvel ingrédient alimentaire : la lactoferrine bovine.

2. CONTEXTE

La lactoferrine bovine a fait l'objet d'une demande de mise sur le marché auprès des autorités néerlandaises au titre du règlement CE n°258/97 relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients alimentaires. Le pétitionnaire souhaite introduire la lactoferrine bovine purifiée à partir de lait de vache dans une gamme de produits (produits laitiers, denrées alimentaires destinées à des populations particulières, etc.) en tant qu'ingrédient. Le rapport d'évaluation initiale établi par les autorités néerlandaises est soumis à l'Afssa pour observations ou objections éventuelles.

Selon le pétitionnaire, ce nouvel ingrédient (NI) peut être classé dans la catégorie e) définie à l'article 1, paragraphe 2 dudit règlement, regroupant « les aliments et ingrédients alimentaires composés de végétaux ou isolés à partir de ceux-ci et les ingrédients alimentaires isolés à partir d'animaux [...] ».

Le pétitionnaire considère que le NI appartient à la classe 2.1 définie dans la Recommandation 97/618 de la Commission européenne regroupant les nouveaux aliments et nouveaux ingrédients complexes non génétiquement modifiés.

Le comité néerlandais note que le NI pourrait également appartenir à la classe 1.1 regroupant les produits chimiques purs ou mélanges simples issus de sources non génétiquement modifiées. Cela est toutefois sans conséquences dans la mesure où la même procédure d'évaluation s'applique dans les 2 cas.

Cette classification ne soulève pas de remarque de la part de l'Afssa. L'Afssa note que dans l'Union européenne, la lactoferrine est autorisée dans les compléments alimentaires. Le statut GRAS a été accordé à la lactoferrine bovine en 2001 par la FDA. En 2008, l'Afssa a rendu un avis relatif à l'évaluation du rapport initial des autorités belges concernant la mise sur le marché de lactoferrine bovine sur la base de l'équivalence substantielle avec la lactoferrine présente dans le lait de vache. La procédure d'évaluation européenne relative à ce nouvel ingrédient n'a pas encore abouti.

3. METHODE D'EXPERTISE

L'expertise collective a été réalisée par les Comités d'experts spécialisés (CES) « Nutrition humaine » et « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques » réunis respectivement le 6 mai 2010 et le 20 mai 2010.

4. ARGUMENTAIRE

L'argumentaire de l'Afssa est fondé sur les avis des Comités d'experts spécialisés (CES) « Nutrition humaine » et « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques » dont les éléments sont présentés ci-dessous :

4.1. Spécification du NI

En ce qui concerne la composition du NI :

La lactoferrine bovine est une protéine composée d'une seule chaîne polypeptidique glycosylée contenant des ponts disulfures. Sa séquence d'acides aminés est connue. Il s'agit d'une transferrine dont la chaîne polypeptidique est bilobée. Chaque lobe présente un site de fixation du fer, ce qui permet de lier 2 molécules de fer par molécule de protéine. Le pétitionnaire estime que le produit fini contient habituellement 120 mg de fer/kg de NI.

Le pétitionnaire indique que le NI contient un minimum de 93 % de protéines, la lactoferrine représentant plus de 95 % de celles-ci. D'autres protéines laitières sont susceptibles d'être présentes dans le produit en faible quantité, notamment de la caséine, de l' α -lactoglobuline et de la β -lactoglobuline. Le produit ne contient pas plus de 4,5 % d'eau et 1 % de cendres. La teneur en métaux lourds totaux (cadmium, plomb, arsenic, mercure, cuivre) n'excède pas 1 mg/kg de NI. S'appuyant sur des tests de stabilité réalisés jusqu'à 6 ans, le pétitionnaire indique que les caractéristiques chimiques (teneur en protéines, matière sèche et minéraux, pH, capacité à lier le fer) et microbiologiques (numération bactérienne) du produit sont stables.

Le pétitionnaire fournit les résultats d'analyse de 6 lots de production.

S'appuyant sur ces analyses, le comité néerlandais estime que la composition du NI est constante dans les différents lots et que celle-ci respecte les valeurs spécifiées par le pétitionnaire. A la demande du comité néerlandais, le pétitionnaire a fourni des données relatives à la teneur en fer de différents lots de production. Pour trois lots issus de la période de production 2006-2008, la teneur en fer était comprise entre 100 et 216 mg/kg ; pour 11 lots de 2009, la teneur en fer était d'environ 140 mg/kg. Le pétitionnaire s'est engagé à spécifier une teneur maximale en fer, qu'il a fixée à 250 mg/kg.

Le comité néerlandais note que le pétitionnaire ne fournit pas de données relatives aux teneurs en métaux lourds dans les lots testés. S'appuyant sur la comparaison des teneurs maximales spécifiées par le pétitionnaire aux teneurs maximales admissibles établies pour ces métaux lourds par l'institut national de santé publique néerlandais (Baars et al., 2001), le comité néerlandais estime que les limites supérieures spécifiées pour le cadmium (<0,02 mg/kg), le plomb (0,2 mg/kg), l'arsenic (0,2 mg/kg), le mercure (<0,01 mg/kg) et le cuivre (1,5 mg/kg) sont suffisamment basses.

En conclusion, le comité néerlandais estime que les informations disponibles sur le NI permettent de juger de sa composition. Celui-ci ne contient pas de contaminants susceptibles d'avoir des effets indésirables. Le comité néerlandais estime que la stabilité du NI est garantie pour une longue période.

En accord avec le comité néerlandais, l'Afssa estime que les informations relatives à la spécification du NI permettent de le caractériser de manière satisfaisante. La stabilité du produit est assurée à température ambiante.

En ce qui concerne la stabilité du NI au cours de son procédé de production ou de celui des produits dans lesquels il est susceptible d'être introduit :

Le traitement thermique de la lactoferrine bovine peut modifier l'état natif (structure moléculaire dans l'espace) de la protéine et les propriétés liées à celui-ci. Le pétitionnaire indique que le degré de dénaturation dépend de nombreux paramètres, dont l'intensité du traitement thermique, le pH et le degré de saturation en fer. Le pétitionnaire présente les résultats d'études testant la stabilité du NI lors de son introduction dans certains produits (produits laitiers, préparations pour nourrissons et préparations de suite, etc.). Le pétitionnaire souligne que les traitements thermiques qu'il utilise ne dénaturent pas la lactoferrine bovine.

Le comité néerlandais estime que cette affirmation n'est pas étayée. Il considère en outre que la lactoferrine dénaturée a, au plus, la même activité que la lactoferrine native. Ainsi, pour l'évaluation de la sécurité du NI, le comité néerlandais a considéré que toute la lactoferrine se trouve sous sa forme native.

L'Afssa note que le pétitionnaire ne justifie pas l'affirmation selon laquelle son procédé de production ne dénature pas la lactoferrine bovine. Une étude récente à ce sujet (Schwarcz et al., 2008) montre notamment que la pasteurisation du lait est susceptible d'induire une modification de la structure tertiaire de la lactoferrine bovine et donc des propriétés liées à celle-ci. L'Afssa s'interroge sur l'équivalence nutritionnelle entre la lactoferrine bovine native et la lactoferrine plus ou moins dénaturée.

4.2. Effets du procédé de production appliqué au NI

Le pétitionnaire décrit le procédé de production permettant d'isoler la lactoferrine bovine à partir de lait ou de produits dérivés du lait de vache comme le lactosérum. Le pétitionnaire indique que la qualité du lait utilisé pour la production du NI est identique à celle du lait destiné à l'alimentation humaine. La première étape du procédé de production aboutit à l'obtention de lait écrémé pasteurisé ou de lactosérum, soumis à une microfiltration afin de diminuer la charge microbienne ainsi que la teneur en matières grasses. Une chromatographie par échange d'ions, puis une élution et une filtration permettent d'isoler la protéine. Le produit ainsi obtenu est séché, tamisé et conditionné. Les installations sont certifiées ISO 9000:2000 et les procédés de production soumis aux plans de contrôle HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point). Conformément au règlement CE 853/2004 fixant les règles spécifiques d'hygiène applicables aux produits d'origine animale, les installations ont été agréées pour la production de produits laitiers.

Le comité néerlandais note que le NI est produit selon des techniques communément utilisées dans l'industrie laitière. Bien que le dossier du pétitionnaire ne présente aucune donnée relative au système de qualité, le comité néerlandais estime qu'il n'y a aucune raison de douter de la sécurité du procédé de production.

En accord avec le comité néerlandais, l'Afssa estime que le procédé de production du NI ne pose pas de problèmes sanitaires et respecte la réglementation européenne en matière d'hygiène.

4.3. Utilisation antérieure de l'organisme utilisé comme source du NI

Le NI est obtenu à partir de lait de vache ou de produits dérivés du lait de vache comme le lactosérum. Le lait de vache utilisé constitue une source tout à fait caractérisée.

Le comité néerlandais estime que les informations fournies par le pétitionnaire sur la source du NI sont satisfaisantes.

Ce point n'appelle pas de remarque particulière de la part de l'Afssa.

4.4. Consommation/Niveau d'utilisation prévus du NI

Le pétitionnaire envisage d'introduire le NI dans une large gamme de catégories de produits, aux concentrations maximales indiquées dans le tableau 1 ci-dessous :

Catégories de produits	Concentration maximale en lactoferrine bovine (mg/100g)
Nutrition infantile – Préparations pour nourrissons et préparations de suite	100
Nutrition infantile – Laits de croissance	200
Nutrition infantile – Aliments de sevrage	667
Addfms* – Formules liquides et en poudre	125
Addfms – Nutrition entérale et parentérale	50
Addfms – Autres	800
Nutrition du sportif – Formules liquides et en poudre	303
Nutrition du sportif – Barres énergétiques	4000
Boissons sans alcool	120
Gâteaux et pâtisseries	1000
Produits fromagers	2000
Lait et produits laitiers	200
En-cas	1200
Confiseries	750

Tableau 1 : Catégories de produits et taux d'enrichissements maximaux envisagés par le pétitionnaire

* Addfms : aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales

Afin d'estimer les apports en lactoferrine bovine, le pétitionnaire a supposé que les produits des catégories mentionnées dans le tableau 1 ci-dessus étaient enrichis à la concentration maximale envisagée. Une liste détaillée des produits de chaque catégorie dans lesquels le pétitionnaire envisage d'introduire le NI figure dans le dossier du pétitionnaire (Appendice A, Annexe A1).

En ce qui concerne l'estimation des apports de NI pour la population générale :

L'estimation des apports en lactoferrine *via* la consommation de produits dans lesquels le pétitionnaire envisage son utilisation est fondée sur les données de consommations individuelles (1997-1998) collectées dans la 3^{ème} étude nationale néerlandaise des consommations alimentaires (Dutch National Food Consumption Survey, DNFCS), conduite en 1997-1998. Cette étude n'a pas évalué les consommations alimentaires des enfants de moins de 1 an. Ce cas sera donc traité séparément.

L'apport moyen de lactoferrine a été estimé pour tous les individus de l'échantillon, incluant les non consommateurs (les résultats portant sur les seuls consommateurs s'avérant similaires).

En considérant le taux maximal d'incorporation du NI dans les vecteurs envisagés par le pétitionnaire, les niveaux d'exposition atteints sont indiqués dans le tableau 2 ci-dessous :

	Moyenne (mg/l) Moyenne (mg/kg pc*/l)	P 95 (mg/l) P 95 (mg/kg pc/l)	P 97,5 (mg/l) P 97,5 (mg/kg pc/l)
Population totale	1531,4 31,7	3035,7 130,9	3568 135,1
Enfants de 1 à 3 ans	1670,6 124	2709,4 202,7	2898,3 224,7
Garçons de 4 à 9 ans	1876,6 80,4	3111,3 138,8	3567,1 165,4
Filles de 4 à 9 ans	1723 75,6	2756,3 125,0	3012,8 152,2
Garçons de 10 à 18 ans	2330,8 45,8	4202 88,3	4872 123,3
Filles de 10 à 18 ans	2000,2 40,8	3381,8 75,0	3771,4 93,1
Hommes de plus de 19 ans	1423,1 17,9	2930,4 37,3	3568 42,9
Femmes de plus de 19 ans	1378,6 20,1	2796,6 41,4	3297 48,4
Femmes enceintes	1845,4 25	-	-

Tableau 2 : Expositions moyennes, au 95^{ème} et au 97,5^{ème} percentile au NI de la population néerlandaise d'après l'étude DNFCS 3. L'échantillon de femmes enceintes n'étant composé que de 50 individus, les expositions des percentiles les plus élevés n'ont pu être calculées pour cette population.

* pc : poids corporel

L'apport moyen pour la population totale est de 1,5 g/j. Il atteint respectivement 2,0 et 2,3 g/j chez les filles et les garçons de 10 à 18 ans. La consommation au 97,5^{ème} percentile atteint 4,8 g/j chez ces derniers.

En ce qui concerne l'apport par kg de poids corporel (kg pc), l'apport moyen est estimé à 31,7 mg/kg pc/j. Il atteint 124 mg/kg pc/j chez les enfants de 1 à 3 ans. La consommation au 97,5^{ème} percentile atteint 225 mg/kg pc/j chez ces derniers.

Les contributions respectives des produits laitiers, des boissons sans alcool, des gâteaux et pâtisseries à l'apport en lactoferrine sont respectivement de 48 %, 22 %, et 15 %, entraînant une contribution cumulée de 84%.

En ce qui concerne l'estimation des apports de NI pour les nourrissons (0-1 an) :

Pour les nourrissons de 0 à 6 mois, le pétitionnaire a estimé la consommation de préparation pour nourrissons à environ 1,2 litre par jour (s'appuyant sur les recommandations en matière de nutrition pédiatrique), ce qui correspond à un apport de lactoferrine de 1,2 g par jour (le pétitionnaire ayant estimé la concentration en lactoferrine de la préparation pour nourrissons à environ 100 mg par litre).

Pour les nourrissons de plus de 6 mois, le pétitionnaire s'est appuyé sur les résultats d'une étude des consommations alimentaires réalisée pendant 2 jours auprès de 941 enfants néerlandais. Seuls les résultats portant sur les nourrissons de 8 à 10 mois ont été utilisés, indiquant une consommation moyenne de 608 g de lait et produits laitiers par jour et de 189 g/j d'aliments de diversification (petits pots pour bébé, etc.). Le pétitionnaire en déduit un apport moyen en lactoferrine bovine de 1868 mg/j.

Considérant un poids de respectivement 5,8 kg et 9,7 kg pour des nourrissons de 5 et 11 mois (Efsa, 2008b), le pétitionnaire estime que l'apport en lactoferrine augmente de 207 à 214 mg/kg de poids corporel/j pendant la première année de vie.

Le comité néerlandais souligne que le pétitionnaire a mené une étude satisfaisante des estimations des apports en lactoferrine. Il considère que les estimations obtenues sont très certainement supérieures aux apports qui seront réellement observés, compte tenu de l'hypothèse maximaliste retenue. Toutefois, il est possible que les usages de la lactoferrine ou la consommation des vecteurs envisagés puissent être étendus ou augmenter au cours du temps. Les données de consommations utilisées datant de 1997-1998, le comité néerlandais s'interroge sur la pertinence d'une extrapolation des résultats obtenus à la population néerlandaise actuelle.

Par ailleurs, le comité néerlandais estime que le pétitionnaire ne précise pas dans quelle mesure les données de consommation retenues sont représentatives des consommations des autres états européens. Il souligne notamment les différences importantes de consommations de produits laitiers entre les différents états membres (cf. tableau 2.1 de l'annexe A du dossier du pétitionnaire, Efsa 2008).

En outre, le comité néerlandais considère qu'une estimation de l'exposition à la lactoferrine bovine via la consommation de compléments alimentaires serait hautement pertinente pour l'évaluation de la sécurité d'utilisation. En réponse à une demande formulée par le comité néerlandais, et en s'appuyant sur les données de vente d'un complément alimentaire contenant de la lactoferrine bovine qu'il commercialise, le pétitionnaire a estimé à 160 mg l'apport quotidien de lactoferrine chez des adolescents utilisant le complément alimentaire pour des problèmes de peau, soit 3 à 4 mg/kg pc/j, ce qui contribue relativement peu à l'apport total (apport moyen de 10 à 18 ans via le NI : 40 à 45 mg/kg pc/j). Toutefois, le comité néerlandais note que le niveau d'utilisation actuelle de compléments alimentaires à base de lactoferrine bovine des différents fabricants n'est pas connu.

L'Afssa note que le nombre de produits susceptibles d'être enrichis est très élevé. Près de 500 sont indiqués dans l'annexe A du dossier du pétitionnaire.

L'Afssa confirme les variations importantes de consommations alimentaires entre les différents pays européens. En France, des différences importantes sont constatées notamment pour les produits laitiers et les boissons rafraîchissantes sans alcool¹. Les données de consommations moyennes pour différentes catégories d'aliments dans les pays

¹ La consommation moyenne de lait et de produits laitiers en France est estimée à 206 g/j (Afssa 2009), contre 388 g/j aux Pays-Bas (Efsa, 2008). La consommation de boissons rafraîchissantes sans alcool est estimée à 158 g/j en France, contre 254 g/j aux Pays-Bas.

européens (Efsa, 2008) indiquent des consommations de produits laitiers très supérieures à celle des Pays-bas (388 g/j) en Finlande, en Islande et en Norvège (respectivement 437, 442 et 522 g/j). La consommation de boissons rafraîchissantes sans alcool est également très supérieure à celle des Pays-Bas (254 g/j) en Belgique (346 g/j), en Norvège (416 g/j), et en Islande (426 g/j). Ainsi, les estimations des apports en lactoferrine pour les populations de certains pays sont susceptibles d'être supérieures aux apports estimés par le pétitionnaire pour les Pays-Bas.

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

Exposition actuelle

La lactoferrine bovine est naturellement présente en petites quantités dans le lait de vache. Le pétitionnaire estime sa concentration à environ 100 mg par litre. S'appuyant sur les données de consommation de la population néerlandaise (âgée de plus de 1 an), le pétitionnaire estime que la consommation moyenne actuelle de lactoferrine bovine *via* les produits laitiers est de 40 mg par jour. Chez les nourrissons, l'apport de lactoferrine *via* les produits laitiers est estimé à 63 mg/j. Aux Etats-Unis, elle atteindrait 100 mg/j au 95^{ème} percentile chez l'adulte.

Le comité néerlandais précise que la quantité de lactoferrine dans le lait de vache est susceptible de varier considérablement. Il cite à ce sujet l'étude de Yamauchi et al. (2000), qui rapportent des concentrations comprises entre 100 et 400 mg/L, ainsi que les concentrations rapportées par les autorités australiennes, comprises entre 20 et 200 mg/L.

Le comité néerlandais estime que la quasi-totalité de la lactoferrine bovine est dénaturée au cours du traitement thermique du lait. Il cite l'avis de l'Afssa du 2 septembre 2008 (Afssa, 2008) indiquant que l'apport moyen de lactoferrine bovine non dénaturée est estimé à 5,3 mg/j et provient de lait cru et de fromages à base de lait cru.

Le comité néerlandais rappelle qu'il n'existe pas de données de consommation en Europe relatives aux compléments alimentaires à base de lactoferrine bovine. Le pétitionnaire indique que la consommation de certains d'entre eux peut apporter jusqu'à 1200 mg de lactoferrine par jour.

Comme elle l'indiquait dans son précédent avis (Afssa, 2008), l'Afssa estime que l'ingestion moyenne de lactoferrine totale par un adulte peut varier de 20 à 50 mg/j, selon la nature des produits laitiers consommés.

Etudes cliniques humaines relatives à l'exposition au NI :

Le comité néerlandais a examiné 30 études cliniques utilisant la lactoferrine bovine présentées par le pétitionnaire. Il souligne que toutes les études sauf une utilisent des produits à base de lactoferrine provenant de compagnies autres que celle du pétitionnaire, mais pouvant toutefois être considérés comme équivalents à celui-ci. En outre, comme le signale le pétitionnaire, le comité néerlandais note que l'objectif de ces études est d'évaluer l'efficacité de lactoferrine et non pas sa sécurité d'emploi.

Chez les nourrissons, le comité néerlandais estime qu'une seule étude (King et al., 2007) est pertinente en termes d'évaluation de la sécurité d'emploi de la lactoferrine bovine (les autres études n'évaluant que l'efficacité du produit). Il s'agit de l'unique étude utilisant la lactoferrine bovine produite par le pétitionnaire. Elle est réalisée en double insu et contrôlée ; pendant 1 an, les nourrissons du groupe expérimental ont reçu 850 mg de lactoferrine par litre de préparation pour nourrissons contre 102 mg dans le groupe témoin (n=26 nourrissons/groupe). Tout comme les auteurs, le comité néerlandais note le faible effectif de l'étude (n=26/groupe). Toutefois, compte tenu du caractère approfondi de cette étude par ailleurs, il estime que ces données sont suffisantes et conclut que la consommation à long terme de lactoferrine bovine à des doses similaires au niveau d'utilisation prévu par le pétitionnaire ne provoque pas d'effets indésirables sur la croissance ou la santé des nourrissons.

Chez l'enfant, une seule étude a été retenue par le comité néerlandais pour l'évaluation de la sécurité du produit. Il note son faible effectif (n=26 enfants/groupe au début de l'étude). Elle porte

sur des enfants de 1 à 3 ans recevant 500 mg de lactoferrine bovine par jour pendant 9 mois (étude contrôlée en double insu). Les auteurs indiquent qu'aucun effet indésirable n'a été observé.

Dix-neuf études réalisées chez l'adulte sont présentées par le pétitionnaire. Cinq d'entre elles portent sur des sujets en bonne santé recevant jusqu'à 2 g de lactoferrine par jour. Le traitement a été bien toléré par les participants.

Les 14 autres études portent sur des patients souffrant souvent d'infection à *Helicobacter pylori* ou d'hépatite C parfois chronique. Les doses de lactoferrine reçues par les patients peuvent aller jusqu'à 3,6 g/j dans 3 études et 7,2 g/j dans une étude (Okada et al., 2002). S'appuyant sur cette dernière étude, le pétitionnaire conclut à l'absence d'effets indésirables pour la santé de la lactoferrine bovine jusqu'à 7,2 g/j chez l'adulte. Le comité néerlandais note que les patients participant à cette étude souffraient d'hépatite C chronique et qu'une telle dose n'a pas été testée chez des individus en bonne santé. Le comité souligne qu'il s'agit de la seule étude dans laquelle des effets indésirables ont été rapportés (chez 3 des 15 patients recevant 7,2 g/j de lactoferrine et un patient recevant 3,6 g/j). Les effets indésirables rapportés étaient les suivants : éruptions cutanées, perte de l'appétit, constipation, diarrhée. De nature réversible, ils n'ont pas été accompagnés de modifications significatives des paramètres sanguins mesurés. Le comité néerlandais note l'absence d'effets indésirables sérieux.

En conclusion, le Comité néerlandais estime que, de façon générale, aucun effet indésirable majeur clairement lié à la consommation quotidienne de lactoferrine bovine pendant plusieurs mois n'apparaît aux quantités d'utilisation proposées par le pétitionnaire.

Ainsi, sur la base de cet ensemble de données, l'utilisation de la lactoferrine bovine dans les conditions spécifiées par le pétitionnaire ne soulève pas d'inquiétudes de la part du comité néerlandais. Il note toutefois qu'il n'existe pas d'étude de sécurité à grand échelle réalisée avec le produit chez des sujets en bonne santé.

L'Afssa note que les études présentées ne font pas apparaître d'effets indésirables de l'ingestion de lactoferrine bovine chez l'adulte, l'enfant et le nourrisson, même pour des apports très supérieurs à l'ingestion habituelle. Il faut cependant noter que ces études ont été réalisées dans le but d'évaluer l'efficacité et non pas l'innocuité du NI. L'Afssa souligne l'absence d'étude évaluant directement l'innocuité de la lactoferrine bovine sur le long terme chez des sujets en bonne santé. De telles études permettraient de disposer d'éléments supplémentaires pour l'évaluation de la sécurité d'emploi de la lactoferrine bovine.

4.6. Informations d'ordre nutritionnel sur le NI

Selon le pétitionnaire, l'enrichissement de l'alimentation en lactoferrine pourrait permettre à celle-ci de s'ajouter à la lactoferrine endogène synthétisée par l'organisme. Le pétitionnaire indique que 70% de la séquence d'acides aminés est commune aux lactoferrines humaine et bovine.

Le comité néerlandais estime que les produits issus de la digestion des 2 protéines ne sont pas strictement équivalents. Les peptides formés sont de types différents et possèdent une activité différente, résultant en particulier de leur transformation par des enzymes microbiennes du côlon.

Le comité néerlandais a comparé l'apport nutritionnel via la lactoferrine bovine provenant de l'enrichissement des produits en NI à l'apport protéique total dans les différentes classes d'âge de la population néerlandaise. Ce rapport est le plus élevé chez les nourrissons, chez qui 5 à 10% de l'apport protéique proviendrait de la lactoferrine bovine.

L'enrichissement de 1 g de lactoferrine par litre de préparation pour nourrissons ou préparation de suite proposé par le pétitionnaire correspond à un apport en fer maximal de 0,25 mg. Le comité néerlandais note que cette valeur correspond à 2 à 3 % de la teneur maximale fixée par la directive 2006/241 relative aux préparations pour nourrissons et préparations de suite. L'étude de King et al. (2007) dans laquelle des nourrissons ont reçu de la lactoferrine bovine à une dose de 850 mg par litre de préparation pour nourrissons ou de suite pendant un an montre l'absence de modifications des taux sanguins d'hémoglobine et de l'hématocrite.

Chez les individus de plus de 1 an, l'apport de fer lié à la lactoferrine est de l'ordre de 0,14 mg/g de NI, mais ne dépasse jamais 0,25 mg/g de NI (cf. résultats d'analyse des lots de production). Chez les consommateurs dont les apports sont susceptibles d'être les plus élevés (4 g de NI/j chez les

hommes adultes au 97,5^{ème} percentile), cela pourrait entraîner un apport de 1 mg de fer par jour via le NI. Comparant cet apport supplémentaire à l'apport via l'alimentation courante (de 6 à 13 mg par jour selon l'âge et le sexe), le comité néerlandais conclut à l'absence d'effets indésirables liés à l'enrichissement.

Digestion et absorption du NI :

Le pétitionnaire décrit longuement les aspects liés à la digestion et l'absorption de lactoferrine, comparant les différences entre les lactoferrines bovine et humaine, les différences entre les résultats obtenus chez l'Homme et chez l'animal et les différences observés entre l'adulte et l'enfant.

Le comité néerlandais a limité son analyse aux modalités d'absorption et de digestion de la lactoferrine bovine chez l'Homme. Il note que la digestion de cette protéine dépend de l'âge, en raison du développement progressif de la fonction intestinale chez l'Homme. La protéolyse de la lactoferrine bovine est relativement lente chez le nouveau-né. En raison d'une protéolyse incomplète, la lactoferrine bovine peut être retrouvée dans les fèces des nourrissons. Le comité néerlandais note l'absence d'étude similaire réalisée chez l'adulte.

Le pétitionnaire indique que la lactoferrine non dégradée peut être absorbée et rejoindre la circulation sanguine chez le nourrisson. Le comité néerlandais estime que cela n'a été mis en évidence que pour la lactoferrine de l'espèce (via le lait maternel), et que le dossier ne contient aucune information mettant en évidence une absorption de lactoferrine bovine chez le nourrisson. Toutefois, le comité néerlandais note que cela a été mis en évidence chez la souris adulte ayant une fonction intestinale mature (Fischer, 2007).

En conclusion, le Comité néerlandais estime qu'il n'y a pas de raison de supposer que la digestion de la lactoferrine diffère de celle des autres protéines du régime alimentaire. Il semble toutefois que la lactoferrine bovine soit relativement résistante aux enzymes protéolytiques du tractus intestinal. Enfin, le comité néerlandais note l'absence d'informations relatives à l'absorption intestinale de lactoferrine bovine chez l'Homme.

En accord avec le comité néerlandais, l'Afssa constate le manque de données relatives aux modalités de digestion et d'absorption de la lactoferrine bovine, particulièrement chez l'adulte. L'Afssa confirme qu'il est possible de considérer que la digestion de la lactoferrine bovine n'est pas différente de celle des autres protéines alimentaires. La relative résistance de la lactoferrine bovine à la protéolyse pourrait favoriser l'absorption de molécules plus ou moins intactes, voire une action de cette protéine au niveau du tractus digestif.

Par ailleurs, les conséquences de l'enrichissement en NI sur la nutrition protéique et martiale ne soulèvent pas d'inquiétudes de la part de l'Afssa.

L'Afssa rappelle que les effets bénéfiques du NI sur la santé revendiqués par le pétitionnaire ne sont pas l'objet de la présente évaluation et que ceux-ci devraient être démontrés au cas par cas, dans les vecteurs envisagés, si le NI recevait une autorisation de mise sur le marché.

4.7. Informations d'ordre microbiologique sur le NI

Le pétitionnaire rappelle que le procédé de production ne fait pas intervenir l'utilisation de microorganismes. Par ailleurs, le procédé est soumis à une procédure HACCP afin de s'assurer de sa sécurité. Le pétitionnaire a testé la présence de plusieurs microorganismes indésirables (salmonelles, staphylocoques, moisissures, etc.) dans 6 lots de production. Les quantités décelées se sont avérées inférieures aux limites de spécification du NI.

S'appuyant sur ces éléments, le comité néerlandais écarte la possibilité d'un risque microbiologique.

En accord avec le comité néerlandais, et compte tenu des procédures de fabrication et de contrôle, l'Afssa estime que le NI n'est pas susceptible de présenter un risque microbiologique.

4.8. Informations d'ordre toxicologique

Le comité néerlandais note que la quasi-totalité des études de toxicologie a été réalisée avec de la lactoferrine bovine provenant d'un fabricant japonais. Le contenu en lactoferrine bovine du produit ainsi utilisé est au moins aussi élevé que celui du NI. Le comité néerlandais note que la composition des autres protéines laitières présentes n'est pas précisée et que la teneur en fer est inférieure à celle du NI. Toutefois, il reconnaît que le produit utilisé est représentatif du NI proposé par le pétitionnaire pour l'évaluation de la sécurité.

Etude de génotoxicité :

Un test sur bactéries a été réalisé en 2000 sur les 4 souches de salmonelles TA98, 100, 1535, 1537 et sur une souche d'*Escherichia coli*, jusqu'à la dose de 5000 µg par boîte avec et sans activation métabolique incluant une étape de pré-incubation. Aucune potentialité mutagène n'a été observée.

D'après le comité néerlandais, ce test suffit à exclure toute mutagénicité due au NI.

L'Afssa partage la position des experts néerlandais. S'agissant d'une protéine, le test limité aux bactéries est suffisant.

Etudes de toxicité :

- Etude en dose unique :

Les résultats de cette étude réalisée en 1997 chez le rat indiquent l'absence de toxicité jusqu'à 200 mg/kg de poids corporel.

- Etude de 4 semaines :

Cette étude a été réalisée en 1997 chez le rat adulte Sprague-Dawley recevant par gavage des doses de lactoferrine bovine de 0, 200, 600 et 2000 mg/kg de poids corporel(pc)/jour (j). Aucun cas de mortalité n'est rapporté. Quelques effets sporadiques sans rapport avec la substance testée (persistance de l'artère hyaloïde au niveau de l'œil, dilatation pulmonaire, ulcère, érosions de l'estomac, foyers hémorragiques pulmonaires, etc.) touchant seulement 1 ou 2 animaux par groupe (y compris les témoins) sont rapportés. Selon cette étude, la dose sans effet nocif indésirable est de 2000 mg/kg pc/j.

- Etude de 13 semaines :

Cette étude (Yamauchi et al., 2000) a été réalisée chez le rat adulte Sprague-Dawley (n=12/sexe/dose) recevant par gavage des doses de lactoferrine bovine (pureté > 95 %) de 0, 200, 600 et 2000 mg/kg pc/j. Deux cas de mortalité sans rapport avec la substance testée sont observés (l'un résultant d'une erreur de gavage, l'autre d'un lymphome généralisé chez une femelle recevant la forte dose de lactoferrine bovine). Aucun changement de poids corporel des animaux ou de la consommation de nourriture n'est observé. A la fin de l'étude, les seuls changements statistiquement significatifs observés dans l'analyse urinaire étaient des élévations dans la teneur en sodium, potassium et chlorure observées uniquement chez les mâles à la dose de 200 mg/kg pc/j. Les résultats des analyses hématologiques et biochimiques réalisées étaient normaux. La mesure du poids des organes a montré une diminution du poids absolu et relatif de la thyroïde, uniquement chez les femelles recevant la plus forte dose (2000 mg/kg pc/j). Ce changement de poids n'a pas été accompagné de changements morphologiques ni histologiques de la thyroïde et a été considéré comme ponctuel et sans rapport avec la substance testée. Les analyses histo-pathologiques ont montré des cas de fibrose des îlots pancréatiques dans tous les groupes mâles, plus précisément chez 50 % des animaux dans tous les groupes traités. Les mêmes changements histo-pathologiques ont été observés chez 25 % des mâles du groupe témoin. Aucun cas n'a été rapporté chez les femelles traitées avec 2000 mg/kg pc/j² de lactoferrine bovine, ni dans le groupe témoin des femelles. Les auteurs concluent à l'absence d'effets toxiques et proposent une DSEIO ou NOAEL³ de 2000 mg/kg pc/j.

² Absence de mesure réalisée dans les groupes expérimentaux recevant des doses intermédiaires (200 et 600 mg/kg pc/j)

³ Dose sans effet indésirable observé ou non observed adverse effect level

Le comité néerlandais note l'absence de précision quant au statut BPL⁴ de l'étude de Yamauchi et al. (2000). Toutefois, il estime que la qualité de cette étude est suffisante pour l'évaluation de la sécurité.

Le comité néerlandais note que les variations des paramètres urinaires ne sont observées que chez le mâle et sont variables au cours du temps. Elles ne sont pas accompagnées de modifications anormales des tissus rénaux ou des paramètres sanguins mesurés. Comme le pétitionnaire, le comité néerlandais estime en conséquence que ces modifications ne sont pas significatives pour l'évaluation toxicologique. En ce qui concerne les cas de fibrose des îlots pancréatiques, le comité néerlandais estime qu'ils ne sont pas attribuables au traitement par la lactoferrine. Il explique que ces manifestations se produisent spontanément avec l'âge mais peuvent être liées également à des déséquilibres hormonaux des animaux (Imaoka et al., 2007 & 2009).

L'Afssa note que les données disponibles proviennent de synthèses issues d'un dossier relatif à la demande de statut GRAS⁵, sans précisions sur les protocoles d'essais utilisés, ce qui rend difficile leur appréciation.

Par ailleurs, le statut BPL des études en dose unique et doses répétées pendant 4 semaines et 13 semaines n'est pas précisé. Toutefois, l'Afssa estime que la qualité de l'étude de 13 semaines est d'un niveau acceptable.

L'étude de 13 semaines susmentionnée ne montre pas d'effets statistiquement significatifs de la lactoferrine bovine sur la majorité des analyses biochimiques et histo-pathologiques réalisées. Le seul effet significatif observé concerne l'apparition de cas de fibrose des îlots du pancréas. Ces effets ont été observés chez les mâles traités mais aussi chez les témoins non traités. Toutefois, leur intensité et leur fréquence sont plus élevées dans les groupes expérimentaux mâles recevant la lactoferrine bovine, mais sans relation avec la dose. L'Afssa note l'absence de cas de fibrose pancréatique chez les femelles testées et chez les témoins.

L'Afssa estime que l'origine de la fibrose ne peut être attribuée avec certitude à l'âge des animaux, dans la mesure où il s'agit d'une étude de 13 semaines et que les animaux ne sont donc pas très âgés. En outre, l'Afssa note que ce type de lésions n'est pas communément rapporté dans les études toxicologiques chez le rat. En conséquence, l'Afssa estime qu'afin d'écarter ces effets comme étant « sans relation avec le traitement », un historique de la fréquence d'apparition des fibroses chez les animaux traités par le laboratoire chargé de tester la substance, devrait être fourni.

L'Afssa note par ailleurs que les cas de fibrose ne présentent pas de différence de morphologie entre les animaux recevant de la lactoferrine bovine et ceux du groupe témoin et qu'ils ne sont pas suivis de phénomènes d'hyperplasie. L'Afssa regrette qu'une période sans traitement n'ait pas été prévue chez quelques animaux à la fin de cette étude afin de tester le degré de réversibilité de ces lésions.

Compte tenu de l'ensemble de ces éléments, l'Afssa estime que les données disponibles ne permettent pas de conclure quant à l'existence ou non d'un lien causal entre la consommation de lactoferrine et la survenue de fibrose des îlots pancréatiques chez le rat.

Conclusion relative aux données toxicologiques :

S'appuyant sur l'étude des données toxicologiques disponibles, le comité néerlandais conclut que la lactoferrine bovine ne provoque pas d'effets indésirables. Comme le pétitionnaire, il estime que les effets observés ne sont pas attribuables à la lactoferrine bovine et valide la NOAEL de 2000 mg/kg/j testée dans l'étude de 13 semaines.

En conclusion, l'Afssa estime que les informations disponibles ne permettent pas de fixer une NOAEL pour la lactoferrine bovine.

Potentiel allergisant :

Le pétitionnaire s'appuie sur plusieurs revues de la littérature parues depuis 2001 étudiant le potentiel allergisant de la lactoferrine bovine. Sur la base de ces données, il conclut que la

⁴ Bonnes pratiques de laboratoire

⁵ Generally recognised as safe

lactoferrine bovine ne peut être considérée comme un allergène *majeur* du lait de vache. Il n'exclut pas la possibilité que la lactoferrine puisse être une des protéines allergisantes du lait, mais en l'absence de tests de provocation orale, il estime que cela n'est pas démontré.

Le comité néerlandais reconnaît l'absence de mise en évidence de relation de cause à effet mais rappelle que des anticorps de type IgE spécifiques de la lactoferrine bovine ont pu être retrouvés dans le sang de patients présentant une allergie aux protéines de lait de vache. Ainsi, la possibilité pour la lactoferrine d'induire des allergies aux protéines du lait de vache ne peut être exclue, bien qu'aucune donnée expérimentale ne confirme ce résultat. En conséquence, le comité néerlandais estime que la présence de protéines de lait de vache doit être mentionnée sur l'étiquetage des produits contenant le NI, et ce d'autant plus que le NI contient de basses quantités d'autres protéines du lait de vache (caséine, α -lactoglobuline et β -lactoglobuline).

Le comité néerlandais note par ailleurs qu'il est impossible de se prononcer sur le développement d'allergies aux protéines du lait de vache liées à une exposition croissante à la lactoferrine bovine. Le comité néerlandais souligne que des études cliniques à court et moyen termes ne permettraient pas de répondre à cette question, qui nécessite un suivi à long terme. Pour le comité néerlandais, l'absence de réponse à cette question ne constitue toutefois pas un élément bloquant pour l'utilisation de lactoferrine bovine en tant que nouvel ingrédient. En effet, il existe un risque inévitable de développement d'allergie pour chaque nouvelle protéine que consomme un individu.

En accord avec le comité néerlandais, l'Afssa estime que l'étiquetage du NI et des aliments enrichis, dans l'hypothèse d'une autorisation de mise sur le marché, devrait mentionner clairement la présence de protéines laitières, afin d'informer les consommateurs allergiques à ces protéines.

En ce qui concerne l'implication du NI dans des réactions autoimmunes, l'Afssa partage la position du comité néerlandais et considère peu probable que la lactoferrine soit susceptible d'induire ce type de réactions. L'implication suspectée de certaines protéines laitières dans le diabète de type 1 a récemment été écartée par l'Efsa par une revue bibliographique (Efsa, 2009). Par ailleurs, l'Afssa n'a connaissance d'aucune étude ayant mis en évidence un effet délétère de la lactoferrine bovine sur les fonctions immunitaires. Toutefois, comme le souligne le comité néerlandais, il existe peu ou pas d'études ayant exploré la possibilité de survenue de ces effets.

Evaluation des marges de sécurité :

Le pétitionnaire estime que le facteur de sécurité de 10 relatif aux différences inter-espèces n'est pas nécessaire.

Le comité néerlandais n'accepte pas cet argumentaire, compte tenu notamment des incertitudes relatives aux modalités d'absorption chez l'enfant et chez l'adulte.

La consommation moyenne estimée chez le nourrisson (0-1 an) se situe aux alentours de 210 mg/kg pc/j, c'est-à-dire environ 10 fois moins que la NOAEL. Le comité néerlandais estime que cette marge de sécurité est acceptable compte tenu de la nature du NI. Il note en outre qu'il est peu probable que les nourrissons dépassent ce niveau de consommation. Pour la population générale (hors nourrissons), il existe un facteur de 50 chez l'adulte et un facteur de 10 chez l'enfant de 1 à 3 ans entre l'apport au 95^{ème} percentile et la NOAEL. Le comité estime que ces marges de sécurité sont également acceptables.

L'Afssa rappelle qu'il n'est pas possible de considérer que la NOAEL est clairement établie. Toutefois, si la valeur de 2 g/kg pc/j venait à être retenue par les autorités compétentes dans le cadre de cette évaluation, l'Afssa estime qu'il serait nécessaire de maintenir le facteur de sécurité inter-espèces, compte tenu notamment du manque de données disponibles chez l'Homme relatives aux modalités de digestion et d'absorption de la lactoferrine bovine. Un facteur de sécurité final de 100 devrait donc être appliqué, comme le recommande la FAO⁶ (2006) par ailleurs. Ainsi, l'Afssa estime que les niveaux d'enrichissement ne devraient pas entraîner des apports supérieurs à 20 mg/kg pc/j. Or, l'Afssa note que les niveaux

⁶ Food and agriculture organization

d'enrichissement proposés par le pétitionnaire entraînent, sur la base des données de consommation de la population néerlandaise, un apport moyen variant de 41 à 124 mg/kg pc/j dans les différentes populations d'enfants et d'adolescents.

5. CONCLUSION

En accord avec le comité néerlandais, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime que le NI est suffisamment caractérisé et que son procédé de fabrication ne soulève pas d'inquiétude.

L'Afssa note que les études cliniques de supplémentation ne font pas apparaître d'effets indésirables liés à l'ingestion de lactoferrine bovine chez l'adulte, l'enfant et le nourrisson. Toutefois, ces études ont été réalisées dans le but d'évaluer l'efficacité et non pas l'innocuité du NI. L'Afssa relève l'absence d'étude approfondie évaluant spécifiquement l'innocuité de la lactoferrine bovine sur le long terme et sur des effectifs suffisants.

Par ailleurs, les données de toxicologie présentées dans l'étude de 13 semaines sont insuffisantes pour conclure quant à l'existence ou non d'un lien causal entre la consommation de lactoferrine bovine et la survenue de fibrose des îlots pancréatiques chez le rat. Ainsi, une NOAEL ne peut être clairement établie à partir de ces données.

Si la NOAEL de 2 g/kg pc/j venait à être reconnue par les autorités compétentes dans le cadre de cette évaluation, l'Afssa estime qu'un facteur de sécurité de 100 devrait lui être appliqué. Les niveaux d'enrichissement devraient ainsi être limités afin de garantir un apport inférieur à 20 mg/kg pc/j par l'alimentation totale (apports totaux via l'alimentation courante, enrichie ou non, incluant les compléments alimentaires). Les niveaux d'enrichissement actuellement proposés par le pétitionnaire sont susceptibles d'entraîner des apports très supérieurs à cette valeur, notamment pour de nombreux enfants et adolescents.

Dans le cas d'une autorisation de mise sur le marché, l'Afssa estime par ailleurs que l'étiquetage du NI et des aliments susceptibles d'être enrichis devrait mentionner la présence de protéines laitières.

Enfin, l'Afssa ajoute que la présente évaluation ne porte pas sur les éventuels effets bénéfiques de la lactoferrine bovine, susceptibles d'être revendiqués, qui devront faire l'objet d'évaluations spécifiques. L'Afssa rappelle que les données disponibles à ce jour ne fournissent pas de base suffisante pour justifier des apports supplémentaires en lactoferrine pour l'Homme en bonne santé recevant une alimentation variée, équilibrée et avec un apport calorique suffisant pour couvrir ses besoins.

Le directeur général

Marc MORTUREUX

MOTS-CLES

Mots clés : Novel food, protéine laitière, transferrine, fer, règlement 258/97/CE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Afssa (2008) Avis du 2 septembre 2008 relatif à l'évaluation du rapport d'évaluation initiale établi par les autorités belges concernant la mise sur le marché d'un nouvel ingrédient alimentaire : la lactoferrine bovine, dans le cadre du règlement 258/97/CE.

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

Baars et al. Re-evaluation of human-toxicological maximum permissible risk levels. 2001. RIVM(National Institute for Public Health and the Environment) report 71 1701 025
<http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/711701025.pdf>

Efsa (2008) Concise European consumption database
<http://www.efsa.europa.eu/en/datex/datexfooddb.htm>

Efsa (2009), Scientific Report. Review of the potential health impact of β -casomorphins and related peptides. Report of the DATEX Working Group on β -casomorphins (Question N° EFSA-Q-2008-379).
http://www.guernsey.net/~wgcf/PageMill_Resources/EFSA_report.pdf

FAO/WHO. A Model for Establishing Upper Levels of Intake for Nutrients and Related Substances: Report of a Joint FAO/WHO Technical Workshop on Nutrient Risk Assessment. 2006
http://www.who.int/ipcs/highlights/nutrientproject_may18/en/index.html

Fischer R, Debbabi H, Blais A, Dubarry M, Rautureau M, Boyaka PN, Tomé D. Uptake of ingested bovine lactoferrin and its accumulation in adult mouse tissues. *Int Immunopharmacol* 2007; 7: 1387-93.

Imaoka M, Satoh H, Furuhashi K. Age- and sex-related differences in spontaneous hemorrhage and fibrosis of the pancreatic islets in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 388-94.

Imaoka M, Kato M, Tago S, Gotoh M, Satoh H, Manabe S. Effects of estradiol treatment and/or ovariectomy on spontaneous hemorrhagic lesions in the pancreatic islets of Sprague-Dawley rats. *Toxicol Pathol* 2009; 37: 218-26.

King JC Jr, Cummings GE, Guo N, Trivedi L, Readmond BX, Keane V, Feigelman S, de Waard R. A double-blind, placebo-controlled, pilot study of bovine lactoferrin supplementation in bottle-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007 ; 44: 245-51.

Okada S, Tanaka K, Sato T, Ueno H, Saito S, Okusaka T, Sato K, Yamamoto S, Kakizoe T. Dose-response trial of lactoferrin in patients with chronic hepatitis C. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93: 1063-9.

Schwarz WD, Canelocce L, Silva JL, Oliveira AC, Gonçalves RB. Conformational changes in bovine lactoferrin induced by slow or fast temperature increases. *Biol Chem* 2008 ; 389: 1137-42.

Yamauchi K, Toida T, Nishimura S, Nagano E, Kusuoka O, Teraguchi S, Hayasawa H, Shimamura S, Tomita M. 13-Week oral repeated administration toxicity study of bovine lactoferrin in rats. *Food Chem Toxicol* 2000 ; 38: 503-12.