

AVIS

de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

relatif à l'évaluation initiale des autorités britanniques concernant l'autorisation de mise sur le marché d'un nouvel ingrédient alimentaire : extrait de crête de coq

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.

1. RAPPEL DE LA SAISINE

L'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail a été saisie le 21 novembre 2011 par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (Dgcrf) d'une demande d'avis relatif à l'évaluation initiale des autorités britanniques concernant l'autorisation de mise sur le marché d'un nouvel ingrédient alimentaire : extrait de crête de coq.

2. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Le nouvel ingrédient (NI) est produit à partir de crêtes de coqs (*Gallus gallus*). L'extrait obtenu a fait l'objet d'une autorisation d'une demande de mise sur le marché auprès des autorités britanniques au titre du Règlement CE n°258/97 relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients alimentaires. Le rapport d'évaluation initiale établi par les autorités britanniques est soumis à l'Anses pour observations ou objections éventuelles.

Le NI contient principalement du hyaluronate de sodium, des glycosaminoglycanes et des protéines partiellement hydrolysées. Il est destiné à être ajouté à certains produits laitiers. Selon le pétitionnaire, le hyaluronate de sodium contenu dans le NI permet le maintien de la santé articulaire.

Le pétitionnaire considère que le NI appartient à la classe 2.1 définie dans la Recommandation 97/618 de la Commission européenne regroupant les NI complexes issus de sources non génétiquement modifiées, et dont la source a déjà été utilisée comme aliment dans la Communauté. Les informations requises pour les NI de la classe 2.1 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

- X. Informations fournies par une exposition antérieure au NI ou à sa source
- XI. Informations d'ordre nutritionnel sur le NI
- XII. Informations d'ordre microbiologique sur le NI
- XIII. Informations d'ordre toxicologique sur le NI

Les autorités britanniques ont accepté cette proposition de classement et ont considéré que le NI ajouté à des produits laitiers comme les boissons à base de lait fermenté, les laits, les yaourts et les fromages frais ne présente pas de risque pour la santé des consommateurs. Elles ont néanmoins demandé que l'étiquetage des aliments auxquels le NI est ajouté mentionne clairement la présence du NI notamment à l'attention des consommateurs végétariens.

3. 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 (2003) ».

L'expertise collective a été réalisée par les Comités d'experts spécialisés (CES) « Nutrition humaine » (CES pilote), « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques » (AAAT) et « Biotechnologie » réunis le 15 décembre 2011, sur la base de rapports initiaux rédigés par 4 rapporteurs.

4. ANALYSE ET CONCLUSION DES CES

4.1. Spécifications du NI (point I)

Le NI est obtenu à partir de crêtes de coq. Il contient entre 60 et 80 % de hyaluronate de sodium¹, environ 20 % de glycoaminoglycanes et environ 20 % de protéines partiellement hydrolysées. Le pétitionnaire indique que le hyaluronate de sodium se trouve dans la matrice intercellulaire des tissus conjonctifs. Il s'agit d'un polysaccharide linéaire de 800 kDa environ, dont l'unité de base est un disaccharide formé d'acide D-glucuronique et de N-acétyl-D-glucosamine liés en 1-3. Ces diosides sont liés entre eux par des liaisons glucosaminidiques (1-4). Les glycoaminoglycanes sont des polysaccharides non ramifiés constitués d'unités disaccharidiques répétées. Ils sont présents dans le cartilage articulaire. Les protéines hydrolysées du NI sont des polypeptides, des peptides et des acides aminés issus de l'hydrolyse des protéines présentes dans la crête de coq, comme le collagène. Le NI contient également d'autres composés présents dans la crête de coq comme des minéraux (sodium, calcium, etc.).

Selon les spécifications proposées par le pétitionnaire, le NI se présente sous la forme d'une poudre hygroscopique quasi-blanche. Le pH de la poudre dispersée (1 g pour 100 mL), mesuré par potentiométrie doit être compris entre 5,0 et 8,5. Le NI doit contenir, par rapport à la matière sèche, entre 60 et 80 % de hyaluronate de sodium, des teneurs en chlorures et azote respectivement inférieures à 1 et 8 %. Les teneurs maximales spécifiées pour les métaux lourds, dioxines et furanes, et PCB sont les suivantes : métaux lourds totaux : 10 ppm ; mercure : 0,10 ppm ; arsenic : 1 ppm ; cadmium : 1 ppm ; chrome : 10 ppm ; plomb : 0,5 ppm ; dioxines et furanes : 2,0 pg/g ; PCB : 4,0 pg/g. Le nombre total de bactéries aérobies doit être inférieur à 10² ufc/g de NI.

Le pétitionnaire fournit les résultats d'analyses réalisées sur des échantillons provenant de 10 lots indépendants. Certains paramètres ne sont pas analysés dans les 10 lots mais au moins trois lots ont été analysés pour chaque composé spécifié. Les résultats indiquent que tous les lots sont conformes aux spécifications prévues. Les méthodes analytiques utilisées sont celles décrites par la Pharmacopée Européenne et par l'EPA (Environmental Protection Agency, U.S.). La mesure de chlorures a été réalisée par la méthode de Mohr alors que les métaux lourds ont été mesurés

¹ Numéro CAS : 9067-32-7

par le test USP<231> (United States Pharmacopeia). Ces méthodes sont précisément décrites dans le dossier.

Les données présentées ne soulèvent pas de remarques de la part du comité britannique

Ces données ne soulèvent pas de remarques de la part du CES « Nutrition humaine ».
Le CES AAAT considère que les spécifications sont bien décrites dans le dossier mais estime que le pétitionnaire doit justifier les limites qu'il a proposées pour les contaminants.

4.2. Effets du procédé de production appliqué au NI (point II)

Le NI est produit à partir de crêtes de coq par un procédé d'extraction faisant notamment intervenir une hydrolyse enzymatique, une filtration, une concentration et une précipitation. L'enzyme utilisée dans le procédé de production n'est plus détectée après le traitement thermique.

Concernant la stabilité du NI, le pétitionnaire a réalisé des études en conditions de conservation accélérées (environ 40 °C et 75 % d'humidité relative pendant 6 mois) et des études à long terme dans des conditions plus proches des conditions réelles de conservation (25 °C et 60 % d'humidité relative pendant plus de 40 mois). Le stockage a été réalisé dans des sacs en polyéthylène de basse densité placés dans des bidons métalliques. Le pétitionnaire indique que la stabilité du NI n'est pas altérée dans ces études.

La stabilité du NI a également été testée à différentes concentrations (entre 0 et 1,28 mg de NI/g) dans des yaourts réfrigérés pendant 1 à 1,5 mois, durée qui dépasse la durée de conservation moyenne d'un yaourt (estimée à 3 semaines par le pétitionnaire). Le pétitionnaire estime que les variations observées au niveau de la teneur en NI sont mineures. Pour la concentration d'ajout envisagée par le pétitionnaire, égale à 0,64 mg/g soit 80 mg de NI dans un yaourt de 125 g, on observe après 1,5 mois une concentration égale à 0,56 mg/g. Par ailleurs, on n'observe pas de contamination bactérienne après 1,5 mois.

Ce point ne soulève pas de remarques du comité britannique concernant les aspects liés à la sécurité du NI. En revanche, concernant la question du bien-être animal, le comité britannique s'est interrogé sur la provenance des crêtes de coq utilisées pour la fabrication du NI. Selon le certificat fourni par le pétitionnaire, les crêtes proviennent d'abattoirs et sont prélevées post-mortem sur des coqs dont l'utilisation pour la consommation humaine est agréée par des services vétérinaires. Le comité britannique a jugé satisfaisante la réponse du pétitionnaire.

Le CES « Biotechnologie » estime que les données fournies dans le dossier sont insuffisantes pour permettre une évaluation de la sécurité de l'enzyme au regard des éléments scientifiques demandés pour une autorisation d'emploi².

Le CES AAAT considère qu'il est nécessaire de mieux préciser les modalités d'ajout du NI aux produits laitiers auxquels il est destiné. L'impact du procédé de production de ces produits, comme par exemple la stabilité du NI aux traitements thermiques devrait être étudié.

Le CES « Nutrition humaine » souligne la nécessité de veiller à ce que tous les abattoirs d'où proviennent les crêtes de coq soient agréés pour la production de volailles propres à la consommation humaine.

² Arrêté du 7 mars 2011 relatif aux lignes directrices pour la constitution des dossiers de demande d'autorisation d'emploi d'auxiliaires technologiques en alimentation humaine

4.3. Utilisation antérieure de l'organisme utilisé comme source du NI (point III)

Le pétitionnaire indique que le NI provient de coqs *Gallus gallus* non génétiquement modifiés et que ni les coqs ni les crêtes de coq ne présentent de risques pour la consommation humaine. Les crêtes de coq sont consommées depuis longtemps en Europe et sont encore aujourd'hui utilisées dans certains plats (sous forme par exemple de ragoûts et de soupes à reconstituer) et servies dans des restaurants. Des livres de recettes datant du 15^{ème} siècle feraient déjà référence aux crêtes de coq.

Ce point ne soulève pas de remarques de la part du comité britannique.

Ce point ne soulève pas de remarques de la part du CES AAAT.

Le CES « Nutrition humaine » ne conteste pas que les crêtes de coq soient consommées par certaines populations européennes mais estime que des données de consommation seraient utiles.

4.4. Niveaux d'utilisation et de consommation prévus du NI (point IX)

Le pétitionnaire indique que le NI pourrait être introduit dans de nombreuses matrices alimentaires. Toutefois, il propose dans un premier temps de limiter son utilisation à certains produits laitiers : lait, boisson à base de lait fermenté, yaourt, fromage frais. Les produits contenant le NI sont destinés à la population générale, à l'exception des femmes enceintes, des enfants, des personnes allergiques au hyaluronate de sodium ou aux protéines d'origine aviaire. Le NI est plus particulièrement destiné à la population adulte, aux sportifs, aux personnes âgées et aux femmes ménopausées.

Le pétitionnaire prévoit d'indiquer sur l'étiquetage que le produit n'est pas destiné aux enfants et aux femmes enceintes. Il précise que l'exclusion de ces populations n'est pas liée à un risque avéré pour elles mais à l'absence d'études de toxicité spécifiques.

Le pétitionnaire propose une consommation quotidienne d'une portion de produit enrichi contenant 80 mg de NI. D'après les calculs du pétitionnaire, cette dose correspond à la quantité de NI susceptible d'être apportée par la consommation d'une crête de coq, une portion moyenne étant estimée à trois crêtes de coq (soit 25 g de crêtes de coq correspondant à 250 mg de NI).

Afin d'estimer le niveau de consommation maximal prévisible, le pétitionnaire fait l'hypothèse d'un ajout systématique de NI à hauteur totale de 80 mg dans tous les produits laitiers consommés (soit 1,14 mg/ kg poids corporel (pc)/jour (j)). Les données de consommation de produits laitiers des pays européens utilisées proviennent de la base de données FAOSTAT (données de consommations apparentes). Dans les pays pour lesquels les niveaux de consommation de produits laitiers sont les plus élevés (comme en Finlande, 975,34 g/j et en Suède, 1032,88 g/j), le pétitionnaire obtient une estimation du niveau d'exposition égale à 0,624 g/j de NI pour la Finlande et à 0,661 g/j pour la Suède.

Le comité britannique a demandé des calculs d'exposition au NI prenant en compte les populations ne faisant pas partie des populations ciblées, comme les enfants. Le pétitionnaire a souligné qu'il prévoit une mention d'étiquetage afin de réduire la probabilité de consommation du produit par des populations non ciblées comme les enfants et les femmes enceintes. Il reconnaît qu'il est toutefois possible que les enfants consomment occasionnellement des produits laitiers contenant le NI. En considérant l'hypothèse d'un enrichissement systématique de tous les produits laitiers frais (yaourts, fromage frais, desserts lactés) en NI, le pétitionnaire estime un apport quotidien de NI maximal inférieur à 2,4 mg/kg pc/j chez les enfants de 4 à 10 ans et à 3,8 mg/kg pc/j chez les enfants de 1 an environ.

Sur la base des données de consommation britanniques fournies par la FSA (British National diet and nutrition survey), le comité britannique a considéré les apports de NI chez les jeunes enfants (1 an environ) les plus gros consommateurs de produits laitiers frais (yaourts et fromage frais). Leurs calculs indiquent que l'exposition pourrait atteindre 9,3 mg/kg pc/j.

Le CES AAAT rejoint les observations du comité britannique.

Le CES « Nutrition humaine » a bien noté que les produits enrichis en NI ne sont pas destinés à l'enfant mais estime que ces produits pourraient toutefois être occasionnellement consommés par ces derniers. Il souligne que les calculs d'exposition réalisées chez les enfants n'ont considéré que la consommation de produits laitiers frais (yaourts, fromage frais) sans intégrer la consommation de lait, qui constitue pourtant un aliment susceptible d'être enrichi en NI.

Par ailleurs, le CES « Nutrition humaine » estime que l'élargissement probable de la gamme d'aliments pouvant contenir le NI, devra faire l'objet d'évaluations spécifiques et devra donner lieu à une réévaluation approfondie des niveaux de consommation prévus.

4.5. Informations fournies par une exposition humaine antérieure au NI ou à sa source (point X)

Le pétitionnaire rappelle que les crêtes de coq sont consommées depuis longtemps dans la communauté européenne. Il souligne par ailleurs qu'il existe de nombreux compléments alimentaires contenant du hyaluronate de sodium sur le marché européen et qu'aucun effet indésirable n'a été rapporté. Les doses de hyaluronate de sodium susceptibles d'être apportées par ces compléments (jusqu'à plus d'1 g de hyaluronate de sodium/j, et souvent entre 200 et 400 mg/j) sont supérieures aux quantités auxquelles le NI exposerait. Par ailleurs, le pétitionnaire indique que des essais cliniques ont été réalisés avec le NI chez l'Homme et le cheval et qu'aucun effet indésirable n'a été observé. (cf. § 4.8.3)

Ce point ne soulève pas de remarques de la part du comité britannique.

Ce point ne soulève pas de remarques du CES AAAT.

Comme indiqué précédemment, le CES « Nutrition humaine » regrette l'absence de données de consommation de crêtes de coq, ainsi que des principaux constituants du NI.

4.6. Informations d'ordre nutritionnel sur le NI (point XI)

Le pétitionnaire souligne que l'ajout du NI aux produits laitiers n'est pas destiné à remplacer un autre ingrédient. Il compare la composition d'un yaourt écrémé de 125 g contenant ou non le NI. La teneur en sodium est augmentée de 3,11% dans le yaourt contenant le NI. Toutefois, le pétitionnaire estime que la teneur en sodium du yaourt enrichi en NI reste faible (72,25 mg de sodium pour une portion de 125 g). Au final, le pétitionnaire estime que l'ajout du NI ne modifie pas la composition nutritionnelle du yaourt.

Ce point ne soulève pas de remarques de la part du comité britannique.

Ce point ne soulève pas non plus de remarques de la part du CES « Nutrition humaine ».

4.7. Informations d'ordre microbiologique sur le NI (point XII)

Le pétitionnaire prévoit des spécifications portant sur des critères microbiologiques suivants : nombre de bactéries aérobies viables < 10² ufc/g et absence d'*Escherichia coli*, de *Salmonella sp.*, de *Staphylococcus aureus* et de *Pseudomonas aeruginosa*. Les résultats d'analyses réalisées sur 10 lots de production sont conformes à ces spécifications.

Par ailleurs, le pétitionnaire rappelle que le NI est fabriqué selon des bonnes pratiques et que les crêtes utilisées proviennent de carcasses de coqs agréées pour la consommation humaine. Il présente en outre les résultats d'une expérience montrant que les étapes du procédé de production permettent l'inactivation ou le retrait de virus utilisés comme modèles (MLV, influenza,

REO3, PPV). Enfin, des résultats d'analyses de stabilité réalisées sur des yaourts de 1,5 mois contenant le NI montrent l'absence de microorganismes pathogènes.

Le comité britannique a estimé que les résultats des analyses de stabilité sur les yaourts de 1,5 mois indiquant que le produit était « conforme » sur le plan microbiologique étaient insuffisants (p.33 du dossier du pétitionnaire). Il a ainsi souhaité connaître précisément le nombre des différentes bactéries recherchées. Les compléments d'informations fournis par le pétitionnaire, à ce sujet, ont été jugés satisfaisants par le comité britannique qui conclut à l'absence d'effet de l'introduction du NI sur la composition microbiologique des yaourts.

Ce point ne soulève pas de remarques de la part des CES « Nutrition humaine » et AAAT.

4.8. Informations d'ordre toxicologique (point XIII)

4.8.1. Absorption, distribution, métabolisme, excrétion

L'absorption intestinale du NI a été étudiée *in vitro* par le pétitionnaire. Celui-ci rapporte que les résultats montrent que l'extrait est absorbable par la muqueuse intestinale, essentiellement au niveau du duodénum. Toutefois, cette étude n'a pas été trouvée dans le dossier fourni par le pétitionnaire.

Dans la littérature scientifique identifiée par le CES AAAT, le hyaluronate de sodium marqué avec du ^{99m}technetium est peu absorbé *in vivo* chez le rat et le chien. L'excrétion totale urinaire et fécale est comprise entre 87 et 96 %, dont la plus grande partie est excrétée dans les fèces. Il a été calculé qu'environ 13 % du hyaluronate de sodium marqué a été absorbé dans ces expérimentations. Les tissus examinés chez les animaux ont montré une incorporation de la radioactivité 15 minutes après ingestion du produit, qui a persisté au moins pendant 48 heures. Les mesures de scintigraphie de tout l'organisme ont montré que le hyaluronate de sodium marqué se déposait de manière préférentielle dans les tissus conjonctifs tels que les articulations et les vertèbres (Balogh *et al.*, 2008).

Le CES « Nutrition humaine » regrette l'absence de données relatives au métabolisme du NI dans le dossier fourni par le pétitionnaire.

4.8.2. Etudes de toxicité réalisées avec le NI

Etude chez le rat : essai préliminaire 2 semaines (2004-2005)

Etude de *range finding* conduite selon les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) selon les lignes directrices OCDE³ et la directive 2004/10/CE :

En résumé, 40 rats (20 mâles+20 femelles) Wistar Hannover ont reçu par voie orale (gavage) 0, 200, 400, 600 mg/kg poids corporel (pc)/jour (j) du NI. Des analyses anatomo-pathologiques ont été conduites sur tous les animaux, ainsi que des examens macroscopiques sommaires (orifices, cavités abdominale, crâniale et thoracique). Quelques organes ont été pesés et analysés sur le plan histologique. Les résultats n'ont pas montré de mortalité liée au traitement, ni de modifications de la prise alimentaire et du poids corporel. Les examens anatomo-pathologiques n'ont montré aucun effet indésirable, sauf des colorations rougeâtres au niveau du thymus et des ganglions lymphatiques mandibulaires pour quelques animaux, dans l'un des groupes testés (400 mg/kg pc/j).

Cette coloration pour quelques animaux seulement et dans un seul groupe n'est pas considérée comme un effet indésirable par le CES AAAT.

La dose journalière de 600 mg/kg pc/j est proposée comme la dose la plus élevée pour l'étude 4 semaines. Cette dose est la dose maximale administrable par voie orale compte tenu de la solubilité du NI dans le véhicule (eau distillée).

³ Organisation de Coopération et de Développement Économiques

Etude chez le rat : toxicité par voie orale 4 semaines (2005)

Etude sous BPL selon les lignes directrices OCDE et la directive 2004/10/CE.

En résumé, 100 rats (50 mâles + 50 femelles) Wistar Hannover ont reçu par gavage 0, 5, 55, 600 mg/kg pc/j du NI. Dix rats du lot témoin et 10 rats du lot recevant 600 mg/kg pc/j (5 mâles + 5 femelles) n'ont pas été sacrifiés à la fin des 4 semaines de traitement et ont été utilisés pour une étude de réversibilité de deux semaines. Des analyses de biologie clinique (sang et urine) ont été conduites à la 4^{ème} semaine chez 10 mâles et 10 femelles de chaque groupe, et à la fin de la 6^{ème} semaine chez tous les animaux participant à l'étude de réversibilité. Tous les animaux ont subi des examens anatomo-pathologiques : examen macroscopique sommaire (orifices, cavités abdominale, crâniale et thoracique), pesée et analyses histologiques sur les rats témoins et traités (600 mg/kg pc/j) et chez les rats participants dans l'étude de réversibilité. Les résultats n'ont pas montré de mortalité ni de signes cliniques liés au traitement. Aucune modification du poids corporel ni de la prise alimentaire n'a été remarquée. Les résultats de biologie clinique n'ont pas montré d'effets, ni ceux des examens anatomo-pathologiques, sauf une diminution du poids du thymus chez les femelles du lot recevant 600 mg/kg pc/j. Toutefois, aucune modification histologique n'a été remarquée dans les tissus examinés dont le thymus. En l'absence d'effets indésirables observés, une Dose sans effet indésirable observé (DSEIO) de 600 mg/kg/j a été proposée pour cette étude 4 semaines.

Le CES AAAT observe que la dose du 1^{er} lot exposé est justifiée par les auteurs comme se rapprochant de l'exposition envisagée chez l'Homme (qu'ils estiment à 0,66 mg/kg pc/j). Cette très faible dose explique le niveau, également faible du lot intermédiaire (moyenne géométrique).

Le CES AAAT remarque que les effets rapportés sur le poids du thymus chez les femelles du groupe exposé à 600 mg/kg pc/j ne se traduisent pas par des modifications histopathologiques du thymus et sont observés dans un seul groupe chez les femelles et uniquement sur certains animaux dans le groupe.

Etude chez le rat : toxicité par voie orale 13 semaines avec réversibilité 4 semaines (2008)

Etude sous BPL selon lignes directrices OCDE (n°45 2, 1981) et la directive 2004/10/CE.

En résumé, 100 rats (50 mâles + 50 femelles) Wistar Hannover (HsdBrlHan : WIST), avec 10 animaux de chaque sexe par lot, ont reçu par voie orale (gavage), 0, 5, 55, 600 mg/kg pc/j. Deux lots satellites ont été constitués pour l'étude de réversibilité 4 semaines : 5 rats de chaque sexe témoins et 5 rats de chaque sexe traités à 600 mg/kg pc/j. Des analyses de biologie clinique ont été conduites sur du sang (prélèvement au plexus rétro-orbitaire) et de l'urine chez tous les animaux. Tous les animaux ont subi des examens anatomo-pathologiques, mais seuls les lots témoins et ceux du groupe 600 mg/kg pc/j ont fait l'objet d'examens histologiques. Les résultats n'ont pas montré de mortalité liée au traitement ni de signes cliniques notables (sauf quelques cas de salivation excessive chez les animaux traités). Aucune modification du poids corporel ni de la consommation du régime n'a été remarquée chez les mâles. Seules quelques femelles du groupe recevant 55 mg/kg pc/j ont montré un abaissement du poids corporel en fin de traitement. Les examens hématologiques ont montré quelques modifications (réversibles) sans intérêt toxicologique. Les résultats de biologie clinique n'ont montré aucun effet. Les résultats anatomo-pathologiques n'ont pas montré de lésion marquée, les résultats rapportés demeurant dans les limites des données historiques. Aucun effet sur les poids des organes n'a été rapporté chez les mâles. Une augmentation de la masse relative du foie a été rapportée chez les femelles traitées à 5 mg/kg pc/j et 600 mg/kg pc/j mais sans modification histologique de l'organe. En revanche, aucun effet n'a été observé chez les animaux dans l'étude de réversibilité.

La dose journalière de 600 mg/kg pc/j est proposée comme DSEIO pour cette étude de 13 semaines voie orale. Cette dose est la plus élevée testée dans l'essai.

Etudes de génotoxicité *in vitro*

Mutation réverse chez la bactérie

Etude réalisée selon les recommandations OCDE (n°471), la directive 2000/32/CE et les recommandations du ICH (1995).

En résumé, il s'agit d'un test d'Ames conduit avec et sans activation métabolique (S-9) sur cinq souches de *Salmonella typhimurium* : TA-1535, TA-1537, TA-98, TA-100 et une souche de *Escherichia coli* WP2 uvrA pkM101. L'essai a inclus des témoins positifs et non-traités. Les résultats montrent une absence de cytotoxicité aux cinq concentrations testées de 60 à 5000 µg/boîte. Le NI, dans ces conditions expérimentales, ne présente aucun effet mutagène sur les 5 souches testées.

Les CES AAAT considère cette étude *in vitro* classique recevable. Les conclusions apportées sont claires et démontrent une absence d'effet mutagénique *in vitro* associé au NI.

Autres études expérimentales

Le dossier fait mention d'une étude sur la concentration en acide hyaluronique dans le liquide synovial dans un modèle cheval après ingestion orale (Carmona *et al.*, 2009). L'étude est randomisée en « double-aveugle » et porte sur 11 jeunes chevaux atteints d'ostéochondrose traités avec 250 mg du NI par voie orale pendant 60 jours. Aucun effet indésirable n'a été rapporté chez les chevaux recevant le NI dans cette étude.

4.8.3. Etudes toxicologiques relatives au hyaluronate de sodium

Le pétitionnaire résume brièvement les données de la littérature relatives au hyaluronate de sodium. Il rapporte des DL₅₀ généralement supérieures à 1 g/j quelle que soit la voie d'administration (orale, intra-péritonéale, sous-cutanée). Des DL₅₀ de 800 mg/kg (rat), 2400 mg/kg (rat) et < 1 g/kg (lapin) sont rapportées dans trois études pour la voie orale. Sur la base des données présentées, le pétitionnaire estime que le hyaluronate de sodium n'est pas susceptible de présenter de risque pour la santé.

4.8.4. Etudes réalisées chez l'Homme

Deux études ont été réalisées chez l'Homme avec le NI. Il s'agit d'études destinées à étudier l'effet du NI sur l'inconfort et la douleur articulaire.

La première étude (Kalman *et al.*, 2008) est une étude randomisée en double aveugle réalisée chez 20 adultes (> 40 ans) souffrant d'ostéoarthrite du genou, recevant pendant 8 semaines une capsule contenant 80 mg de NI (n=11) ou un placebo (n=9).

Concernant la sécurité du NI, le protocole d'étude prévoyait notamment le suivi des effets indésirables ainsi que de la pression artérielle, de la fréquence cardiaque et des numérations et formules sanguines. Le pétitionnaire souligne qu'aucun effet indésirable majeur n'a été observé pendant l'étude. Un sujet recevant le NI a quitté l'étude en raison de douleurs articulaires aiguës du genou. Le pétitionnaire estime que cet effet n'est pas attribuable au NI. Aucune modification du poids des sujets ni des paramètres physiques et biochimiques mesurés n'a été observée.

L'autre étude a été soumise pour publication en 2009. Elle porte sur 40 sujets consommant chaque jour pendant 12 semaines un yaourt contenant ou non 80 mg de NI (20 sujets dans chaque groupe). Les paramètres relatifs à la sécurité du NI mesurés dans l'étude sont les suivants : suivi du poids corporel, de la pression artérielle, de la fréquence cardiaque, et des effets indésirables.

Le pétitionnaire indique qu'aucune modification des paramètres suivis et qu'aucun effet indésirable n'ont été rapportés pendant l'étude.

Sur la base de ces études (études de toxicité réalisées chez l'animal, études chez l'Homme) et de l'historique de consommation de crêtes de coq, le pétitionnaire estime que le NI ne présente pas de risques.

4.8.5. Marge de sécurité

Sur la base des études précédentes, le pétitionnaire estime que la DSEIO chez le rat est de 600 mg/kg pc/j. S'appuyant sur cette valeur, il calcule une DSEIO chez l'Homme selon la méthode proposée par Reagan-Shaw et al. (2007) égale à 5,76 g/j pour un homme de 60 kg, c'est-à-dire 96 mg/kg pc/j. Ainsi, il indique que les niveaux de consommation de NI calculés pour les différents pays européens (selon l'hypothèse maximaliste d'un ajout systématique de NI à hauteur de 80 mg dans tous les produits laitiers consommés, cf. § 4.4) n'excèdent pas 12 % de la DSEIO calculée chez l'Homme.

Conclusions sur les études de toxicité réalisées avec le NI

Le comité britannique a interrogé le pétitionnaire sur le choix de la méthode de Reagan Shaw et al (2007) pour l'établissement de la DSEIO chez l'Homme et a souligné le caractère inhabituel de l'utilisation de cette méthode dans le cadre de l'évaluation des expositions alimentaires.

Le pétitionnaire a indiqué que cette méthode permet de convertir la dose utilisée chez l'animal en dose équivalente chez l'Homme, en utilisant des facteurs de sécurité inter-espèces définis à partir de la surface corporelle. Il souligne que cette approche est recommandée par le FDA pour déterminer les doses à utiliser dans des essais cliniques. Bien que le pétitionnaire ne remette pas spécifiquement en question l'approche usuelle, il estime qu'un facteur de sécurité de 100 serait ici trop élevé compte tenu des propriétés de l'acide hyaluronique, composé principal du NI (substance biologique présente chez l'Homme, demi-vie brève, turnover élevé, etc.).

Utilisant la méthode usuelle pour la détermination des marges de sécurité (sans prise en compte de la surface corporelle), et considérant un poids corporel de 60 kg, le comité britannique obtient un facteur de sécurité de 54 pour les consommateurs suédois, pour un apport de 0,661 g/j de NI, et de 137 pour les consommateurs bulgares, pour un apport de 0,263 g/j de NI.

Bien que la marge de sécurité entre le niveau de consommation prévu de NI chez les très jeunes enfants (environ 1 an) et la DSEIO établie chez le rat soit parfois inférieure à 100, le comité britannique souligne que le niveau d'apport est estimé sur la base d'hypothèses peu susceptibles d'être réalisées ou toutes réalisées conjointement. Il estime ainsi que la consommation de NI notamment chez l'enfant n'est pas susceptible de présenter de risques. Toutefois, il estime que l'extension de l'utilisation du NI à d'autres aliments devra faire l'objet d'une meilleure évaluation du niveau de consommation.

Le CES AAAT estime qu'il n'y a pas d'effet indésirable apparaissant dans les études de toxicologie résumées précédemment et réalisées selon des lignes directrices reconnues. Le choix de la dose maximale testée dans ces études est justifié par les auteurs par les critères de solubilité de la substance d'essai.

Le CES AAAT considère que, prenant en compte la dose préconisée pour le NI qui est de 80 mg par jour du NI, équivalente à 1,14 mg/kg poids corporel/jour pour une personne pesant 70 kg, les marges de sécurité entre l'exposition maximale attendue et la DSEIO de 600 mg/kg pc/jour identifiée dans les études chez l'animal seraient de l'ordre de 526.

Le CES « Nutrition humaine » observe que les données présentées chez l'Homme, sur la base d'une étude publiée, ne font pas apparaître d'effets indésirables liés à la consommation du NI. Toutefois, il regrette l'absence de données relatives au métabolisme du NI dans le dossier du pétitionnaire.

4.8.6. Allergénicité et étiquetage

Le pétitionnaire indique qu'aucun épisode allergique n'a été décrit dans les études réalisées avec le NI chez l'Homme ou chez l'animal. De plus, le hyaluronate de sodium (60 à 80 % du NI) et les glycoaminoglycanes (environ 20 % du NI) présentent un historique de consommation sur le marché européen (sous forme de compléments alimentaires notamment) et aucun effet indésirable de nature allergique n'a été rapporté. Les protéines présentes dans le NI sont partiellement hydrolysées. Leur masse moléculaire moyenne est de $1\,234 \pm 5$ Da ; le pétitionnaire estime ainsi que le potentiel allergique du NI est très faible.

Toutefois, il souligne qu'une hypersensibilité au hyaluronate de sodium ou aux protéines aviaires ne peut être exclue en théorie. Il propose ainsi une mention sur l'étiquetage des produits contenant le NI indiquant que le produit ne convient pas aux personnes allergiques au hyaluronate de sodium et/ou aux protéines aviaires.

Le comité britannique estime qu'en l'absence de risque avéré lié aux composants du NI, une telle mention est trop restrictive et limite le choix du consommateur, et ce peut-être sans que cela ne soit nécessaire. A la demande du comité britannique, le pétitionnaire a réalisé des tests complémentaires afin de contrôler l'absence de réactions croisées entre les protéines d'œuf et le NI. Sur les trois lots de NI testés, il n'a pas été mis en évidence de capacité du NI à lier les immunoglobulines E provenant de sérum de patients allergiques aux protéines d'œuf. Le pétitionnaire a également rappelé la petite taille des protéines hydrolysées présentes dans le NI. Il a souligné par ailleurs que le NI est produit à partir de tissu conjonctif, contenant essentiellement du collagène, qui est moins allergisant que les protéines d'œuf.

Ces compléments d'information ont été jugés de bonne qualité par le comité britannique et lui ont fourni les données nécessaires permettant de s'assurer de l'absence de réactions croisées avec les protéines d'œuf. Le comité britannique soulève par ailleurs la possibilité que les personnes allergiques à la viande de poulet puissent être allergiques au NI et recommande ainsi une mention sur l'étiquetage à ce sujet.

Enfin, le comité britannique estime que l'étiquetage des produits contenant le NI devrait comporter des mentions alertant les populations non ciblées (enfants, femmes enceintes) et les végétariens de la présence du NI. S'agissant d'un ingrédient d'origine animale, la source du NI devrait clairement figurer sur l'étiquetage, les produits laitiers pouvant être consommés par des végétariens.

Ce point ne soulève pas de remarques de la part du CES « Nutrition humaine ».

Compte tenu du profil protéinique de bas poids moléculaire du NI, le CES AAAT estime que le risque allergique paraît faible.

4.9. Conclusion

Le NI ne soulève pas d'inquiétudes particulières pour le comité britannique. Les compléments d'informations fournis par le pétitionnaire (allergénicité, toxicité, niveaux de consommation prévus, microbiologie, bien-être animal) ont permis de répondre aux questions soulevées au cours de l'évaluation. Le comité britannique a également pris en compte certaines remarques émises au cours de la consultation publique de son avis. Il souligne que son évaluation ne porte pas sur les effets bénéfiques du NI qui pourraient être revendiqués, qui doivent être évalués dans le cadre du règlement CE 1924/2006. Il rappelle que la relation de cause à effet entre la consommation d'acide hyaluronique et le maintien de la santé articulaire n'est pas démontrée, d'après un récent avis de l'Efsa (2009).

Au final, le comité britannique estime que le NI, destiné à être ajouté à certains produits laitiers (lait fermenté à boire, yaourt, lait, fromage frais, etc.) à la dose proposée par le pétitionnaire, n'est pas susceptible de présenter de risques pour la santé des consommateurs. Si le NI était autorisé, le comité britannique souligne la nécessité de mentionner sa présence et son origine sur l'étiquetage, notamment en raison de son introduction dans des produits susceptibles d'être consommés par des végétariens.

Conclusions des CES :

Concernant le procédé de production, le CES « Biotechnologie » ne peut pas déterminer si la préparation enzymatique utilisée est autorisée en France. Les éléments présents dans ce dossier ne sont pas suffisants pour se prononcer sur la sécurité de l'enzyme au regard des éléments scientifiques demandés pour une autorisation d'emploi.

Le CES AAAT estime qu'il n'y a pas d'effet indésirable apparaissant dans les études de toxicologie résumées précédemment, qui par ailleurs ont été menées en appliquant des

lignes directrices reconnues. Le choix de la dose maximale testée dans ces études est justifié par les auteurs par les critères de solubilité de la substance d'essai.

Le CES AAAT considère que, prenant en compte la dose préconisée pour le NI qui est de 80 mg par jour, équivalente à 1,14 mg/kg poids corporel/jour pour une personne pesant 70 kg, les marges de sécurité entre l'exposition maximale attendue et la DSEIO de 600 mg/kg pc/jour identifiée dans les études chez l'animal seraient de l'ordre de 526. L'acide hyaluronique étant un composé endogène que l'on trouve dans la matrice extracellulaire des tissus conjonctifs de tous les animaux, y compris l'Homme, le CES AAAT considère que les marges de sécurité identifiées dans cet avis sont suffisantes pour établir que la consommation du NI aux doses maximales préconisées ne présente pas de risque pour le consommateur.

Le CES « Nutrition humaine » estime que les données présentées ne font pas apparaître de risque d'effets indésirables de la consommation de NI, dans les conditions d'emploi envisagées par le pétitionnaire. Toutefois, il regrette l'absence de données relatives au métabolisme du NI dans le dossier du pétitionnaire.

Par ailleurs, le CES Nutrition humaine souligne que la présente évaluation concerne l'autorisation d'emploi du NI dans des produits laitiers. L'élargissement probable de la gamme d'aliments pouvant contenir le NI ainsi que l'extension éventuelle de la population cible, devront faire l'objet d'évaluations spécifiques le cas échéant. De même, l'évaluation des effets bénéfiques de la consommation de NI susceptibles d'être revendiqués n'a pas été réalisée dans cet avis et la communication afférente relève du règlement (CE) n° 1924/2006.

5. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail adopte les conclusions des CES « Nutrition humaine, « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques » et « Biotechnologie ».

Le directeur général

Marc MORTUREUX

MOTS-CLES

Novel food – produits laitiers - acide hyaluronique - hyaluronate de sodium – glycoaminoglycanes – crêtes de coq

BIBLIOGRAPHIE

Balogh L, Polyak A, Mathe D, Kiraly R, Thuroczy J, Terez M, Janoki G, Ting Y, Bucci LR, Schauss AG. Absorption, uptake and tissue affinity of high-molecular-weight hyaluronan after oral administration in rats and dogs. *J Agric Food Chem* 2008; 56 : 10582-93.

Carmona JU, Argüelles D, Deulofeu R, Martínez-Puig D, Prades M. Effect of the administration of an oral hyaluronan formulation on clinical and biochemical parameters in young horses with osteochondrosis. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2009; 22: 455-9.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to hyaluronic acid and maintenance of joints (ID 1572, 1731, 1932, 3132). *EFSA Journal* 2009; 7: 1266 [14 pp] <http://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/pub/1266.htm>.

Kalman DS, Heimer M, Valdeon A, Schwartz H, Sheldon E. Effect of a natural extract of chicken combs with a high content of hyaluronic acid (Hyal-Joint) on pain relief and quality of life in subjects with knee osteoarthritis: a pilot randomized double-blind placebo-controlled trial. *Nutr J* 2008; 7: 3.

Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 2008; 22: 659-61.