

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

**relatif à l'évaluation initiale des autorités irlandaises concernant l'autorisation de mise sur le marché d'un nouvel ingrédient alimentaire :  
acide (6S)-5-méthyltétrahydrofolique sous forme de sel de glucosamine**

---

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

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

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

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

*Ses avis sont rendus publics.*

---

L'Anses a été saisie le 7 mars 2012 par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (Dgccrf) pour la réalisation de l'expertise suivante : évaluation du rapport d'évaluation initiale des autorités irlandaises concernant l'autorisation de mise sur le marché d'un nouvel ingrédient alimentaire : acide (6S)-5-méthyltétrahydrofolique sous forme de sel de glucosamine.

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

Le nouvel ingrédient (NI) est produit par réaction chimique à partir d'acide folique et de glucosamine. Il est proposé par le pétitionnaire pour être utilisé dans les compléments alimentaires comme nouvelle forme d'apport de folates. La liste des formes d'apports de folates autorisées pour la fabrication des compléments alimentaires est fixée par la directive 2002/46/CE, modifiée par la directive 2006/37/CE. En vue d'une inscription sur la liste des formes d'apports autorisées, le NI a fait l'objet d'une demande d'autorisation de mise sur le marché auprès des autorités irlandaises 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 irlandaises est soumis à l'Anses pour observations ou objections éventuelles.

La Recommandation 97/618 de la Commission européenne définit une classification des nouveaux aliments et ingrédients ainsi que les informations à fournir pour chaque classe dans le cadre d'une demande de mise sur le marché. En accord avec le pétitionnaire, la classification initiale du NI a fait l'objet d'une modification au cours de l'expertise réalisée par les autorités irlandaises, qui ont considéré qu'il relevait de la classe 1.1. Cette classe regroupe les produits chimiques purs ou mélanges simples issus de sources non génétiquement modifiées, dont la source a déjà été utilisée comme aliment dans la Communauté. D'après le tableau II de la recommandation 97/618, les informations requises pour les NI de la classe 1.1 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 humaine 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

**Le CES AAAT est d'accord avec la reclassification du NI en classe 1.1.**

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

## **2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE**

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

L'expertise collective a été réalisée par les comités d'experts spécialisés (CES) « Nutrition humaine » (CES pilote) et « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques (AAAT) », sur la base de rapports initiaux rédigés par 3 rapporteurs. Les travaux ont été adoptés par le CES « Nutrition humaine » par correspondance et par le CES AAAT réuni le 12 avril 2012.

## **3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES**

### **3.1. Spécification du NI (I)**

Selon les spécifications proposées par le pétitionnaire, le NI se présente sous la forme d'une poudre de couleur crème à marron clair, contenant au maximum 8 % (masse/masse) d'eau. Le numéro CAS du NI est 118972-37-1. La teneur en glucosamine est comprise entre 34 et 46 % et la teneur en acide (6S)-5-méthyltétrahydrofolique (MTHF) entre 54 et 59 %. Le NI contient au maximum 2,5 % d'impuretés correspondant à des produits de dégradation ou d'oxydation de l'acide folique. Ces produits de dégradation ont été détectés et déterminés selon des méthodes validées par chromatographie liquide haute performance (la spécificité, les limites de détection et de quantification, la linéarité et la répétabilité ont été fournis dans le dossier). Les diastéréo-isomères 6S de l'acide 5-méthyltétrahydrofolique ont été également caractérisés. L'acide folique libre a été recherché mais non détecté. La pureté de l'isomère 6S est supérieure à 99 % selon une méthode décrite dans le dossier de séparation des diastéréoisomères (au nombre de 4 au total). Les concentrations de ces différents composants déterminés sur trois lots de production indépendants correspondent aux spécifications chimiques définies par le pétitionnaire pour le NI. De l'éthanol pouvant être utilisé dans le procédé de fabrication, une limite maximale de 0,5 % d'éthanol dans le NI a ainsi été fixée. Concernant les métaux lourds, le NI doit contenir respectivement moins de 2 mg/kg, 1 mg/kg et 0,1 mg/kg de plomb, cadmium et mercure, Le pétitionnaire souligne que ces limites maximales sont conformes au règlement 629/2008<sup>1</sup>. Des critères de qualité microbiologique sont également proposés par le pétitionnaire dans les spécifications : le nombre total de bactéries aérobies doit être inférieur à  $10^3$  ufc/g<sup>2</sup> de NI, le nombre de moisissures inférieur à  $10^2$  ufc/g, et *E. coli* ne doit pas être détecté. Le pétitionnaire fournit les résultats d'analyse de 3 lots de production indépendants.

<sup>1</sup> Règlement (CE) n° 629/2008 de la Commission du 2 juillet 2008 modifiant le règlement (CE) n° 1881/2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires

<sup>2</sup> Unité formant colonie

Des tests de stabilité ont également été réalisés avec le produit, placé pendant un an dans des sachets de polyéthylène, eux-mêmes placés dans des sachets d'aluminium scellés sous vide, et sous deux conditions :

- à  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  et à  $60 \pm 5\%$  d'humidité relative ;
- à  $5 \pm 3^\circ\text{C}$ .

Sur la base des résultats d'analyses présentés, le pétitionnaire indique que les tests ne mettent pas en évidence de modification notable de la composition du NI.

La stabilité du NI a également été testée au sein d'un comprimé contenant des vitamines et des excipients communément utilisés dans des compléments alimentaires. D'après les résultats d'analyse présentés par le pétitionnaire, la quantité d'acide MTHF sous forme de sel de glucosamine introduit dans le comprimé est de  $434\ \mu\text{g}/\text{comprimé}$ . Elle est de  $416\ \mu\text{g}/\text{comprimé}$  après 1 an.

Le pétitionnaire propose ainsi une durée de conservation de 12 mois à une température maximale de  $25^\circ\text{C}$ .

*Les autorités irlandaises notent que les données de composition fournies pour les trois lots de production sont conformes aux spécifications.*

**Le CES AAAT est en accord avec l'appréciation des autorités irlandaises et observe que les spécifications des trois lots de production correspondent à celles proposées par le pétitionnaire et sont acceptables. Les spécifications chimiques ont été déterminées selon des méthodes analytiques validées, incluant les descriptifs sur les paramètres considérés (spécificité, limites de détection et quantification, linéarité et répétabilité). Les diastéréoisomères 6S de l'acide 5-méthyltétrahydrofolique ont été aussi caractérisés.**

**Le CES « Nutrition humaine » note que le tableau de composition du comprimé de vitamines et minéraux dans lequel la stabilité du NI a été testée est ambigu. En effet, il indique que le comprimé contient  $800\ \mu\text{g}$  de NI et  $400\ \mu\text{g}$  d'acide folique, ce qui est en contradiction avec les  $400\ \mu\text{g}$  de NI indiqués par le pétitionnaire.**

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

Le NI, acide (6S)-5-méthyltétrahydrofolique sel de glucosamine, est synthétisé à partir d'acide folique et de glucosamine par une série de réaction chimiques.

La production commence par la conversion de l'acide folique en acide méthyltétrahydrofolique par réduction puis méthylation. Le mélange racémique obtenu subit alors plusieurs étapes de purification par cristallisation jusqu'à l'obtention de l'isomère 6S de l'acide MTHF. L'étape suivante consiste en une salinisation avec la glucosamine. Le NI subit enfin soit une lyophilisation, soit une précipitation par l'éthanol.

Des contrôles sont effectués pour s'assurer de la qualité et de la pureté des produits intermédiaires formés.

*Ce point ne soulève pas de remarque de la part des autorités irlandaises.*

**Le CES AAAT estime que le procédé de production du NI n'induit pas de changement de la structure chimique par rapport aux structures des composants du NI, qui individuellement sont utilisés comme compléments alimentaires. Concernant l'éthanol, les analyses des résidus qui ont été faites montrent que sur 3 lots différents la concentration de ce solvant est toujours inférieure à la limite proposée (0,5 %).**

**Ce point ne soulève pas de remarque du CES « Nutrition humaine ».**

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

Le pétitionnaire indique que le NI ne provient pas d'un organisme mais qu'il est obtenu à partir de substances chimiques. En conséquence, cette section n'est pas applicable au NI.

*Ce point ne soulève pas de remarque de la part des autorités irlandaises.*

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

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

Le pétitionnaire présente le NI comme une nouvelle forme d'apport de folates destinée à être utilisée dans les compléments alimentaires. La directive 2002/46/CE, modifiée par la directive 2006/37/CE fixe la liste des formes d'apports de folates autorisées dans les compléments alimentaires. Le pétitionnaire indique que l'acide MTHF sous forme de sel de glucosamine dans le NI est identique à l'acide MTHF sous forme de sel de calcium déjà autorisé par la réglementation.

Le NI étant destiné à se substituer à d'autres formes d'apports de folates, le pétitionnaire estime qu'il n'est pas susceptible de modifier les apports en folates totaux de la population. Il indique en outre que les compléments alimentaires sont disponibles pour tous les groupes de population.

Le pétitionnaire a considéré le niveau supérieur tolérable fixé à 1 mg/j de folates pour les adultes par l'Efsa (2006<sup>3</sup>) et a estimé sur cette base que le niveau maximal de consommation de NI devrait être de 1,8 mg/jour, ce qui correspondrait à 1 mg/jour de folates et à 0,8 mg/jour de glucosamine. Le pétitionnaire estime que l'apport maximal de glucosamine ainsi prévu ne présente pas de risque, car il est très inférieur à la quantité de 750 mg/jour considérée par l'Efsa (2009)<sup>4</sup> comme ne présentant pas de risque pour le consommateur.

*Ce point ne soulève pas de remarque de la part des autorités irlandaises.*

**Le CES AAAT observe que l'utilisation du NI dans les compléments alimentaires, à raison de 1,8 mg/jour, correspond aussi au « Tolerable Upper Intake Level » pour le folate établi aux Etats-Unis pour la population adulte<sup>5</sup>.**

**Le CES « Nutrition Humaine » rappelle que la directive européenne 2002/46/CE<sup>6</sup> prévoit que les quantités maximales de vitamines et de minéraux présentes dans les compléments alimentaires soient fixées en fonction de la portion journalière recommandée par le fabricant en tenant compte des éléments suivants :**

- les limites supérieures de sécurité établies pour les vitamines et les minéraux après une évaluation scientifique des risques fondée sur des données scientifiques généralement admises, compte tenu, le cas échéant, de la différence des niveaux de sensibilité de différents groupes de consommateurs;
- les apports en vitamines et en minéraux provenant d'autres sources alimentaires (c'est-à-dire les aliments courants et les aliments enrichis).

**La limite de sécurité fixée par le SCF de 1 mg/j a été établie pour l'acide folique (acide ptéroylglutamique, PGA), forme synthétique autorisée de vitamine B9 pour l'enrichissement**

<sup>3</sup> EFSA, 2006 Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals Scientific Committee on Food - Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies - 2006

<sup>4</sup> EFSA, 2009. European Food Safety Authority. Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies on a request from the European Commission on the safety of glucosamine hydrochloride from *Aspergillus niger* as food ingredient. The EFSA Journal (2009) 1099, 1-19.

<sup>5</sup> <http://ods.od.nih.gov/factsheets/folate/>

<sup>6</sup> Directive 2002/46/CE du Parlement européen et du Conseil du 10 juin 2002 relative au rapprochement des législations des Etats membres concernant les compléments alimentaires

et l'incorporation dans les compléments alimentaires. Aucune limite de sécurité n'a été établie pour les folates présents naturellement dans les aliments<sup>7</sup>.

Afin de fixer les quantités maximales de de vitamine B9 d'origine synthétique dans les compléments alimentaires, il convient donc de tenir compte des apports par l'alimentation enrichie.

L'apport supplémentaire en vitamine B9 par les aliments enrichis est actuellement une réalité dans l'alimentation courante (céréales pour petit déjeuner par exemple).

L'Efsa, en 2004<sup>8</sup>, pour l'évaluation d'une nouvelle forme synthétique d'apport de vitamine B9, a considéré que la limite de sécurité de 1 mg/jour établie pour l'acide folique (PGA) pouvait s'appliquer au 5-MTHF sous forme de sel de calcium. Dans le cadre de la présente évaluation, le CES « Nutrition humaine » a considéré que cette limite pouvait être appliquée aux apports cumulés de folates d'origine synthétique, c'est-à-dire l'acide ptéroylglutamique, le 5-MTHF sous forme de sel de calcium et le 5-MTHF sous forme de sel de glucosamine.

Ainsi, le CES « Nutrition humaine » estime que le niveau maximal de consommation du NI envisagé par le pétitionnaire, correspondant à un apport de 1 mg/j de vitamine B9 d'origine synthétique, n'est pas compatible avec la limite de sécurité de 1 mg/j dès lors qu'un individu consomme par ailleurs des aliments enrichis. En outre, cette dose est supérieure aux limites de sécurité établies chez l'enfant et l'adolescent (égales respectivement à 200 µg/j, 300 µg/j, 400 µg/j, 600 µg/j et 800 µg/j pour les 1 à 3 ans, 4 à 6 ans, 7 à 10 ans, 11 à 14 ans et 15 à 17 ans).

Le CES « Nutrition humaine » rappelle que les apports nutritionnels conseillés en folates pour les adultes sont de 330 µg/j pour l'homme, 300 µg/j pour la femme. Les apports en France sont estimés à 289 µg/j en moyenne et à 466 µg/j pour le 95<sup>ème</sup> percentile (Afssa, 2009<sup>9</sup>).

Le CES « Nutrition humaine » rappelle enfin que la réglementation française<sup>10</sup> prévoit une dose journalière maximale de folates dans les compléments alimentaires de 200 µg/j.

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

Le pétitionnaire rappelle que l'acide MTHF, sous forme de sel de calcium, est une forme d'apport autorisée de folates. Par ailleurs, la glucosamine possède un historique d'utilisation dans les compléments alimentaires au sein de la communauté européenne et n'est pas considérée comme un nouvel aliment pour ce type d'utilisation. Ainsi, les deux substances qui forment le NI sous forme de sel sont autorisées dans les compléments alimentaires. Toutefois, le pétitionnaire note que la combinaison de ces deux substances peut être considérée comme donnant lieu à un nouvel ingrédient.

<sup>7</sup> Les folates sont des composés qui ont une action similaire à l'acide ptéroylglutamique. Les folates regroupent des composés naturellement présents dans les aliments ainsi que des formes d'apport synthétiques. Les formes synthétiques autorisées sont définies dans le règlement 1925/2006 concernant l'adjonction de vitamines, de minéraux et de certaines autres substances aux denrées alimentaires et la directive 2002/46/CE relative au rapprochement des législations des États membres concernant les compléments alimentaires. L'intitulé les regroupant a été modifié dans ces deux textes et elles figurent désormais non plus sous le terme « acide folique » mais sous le terme « folates » (Règlement (CE) N° 1170/2009 de la Commission du 30 novembre 2009 modifiant la directive 2002/46/CE du Parlement européen et du Conseil et le règlement (CE) n° 1925/2006 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne la liste des vitamines et minéraux et celle de leurs formes, qui peuvent être ajoutés aux denrées alimentaires, y compris les compléments alimentaires ; Directive 2006/37/CE de la commission du 30 mars 2006 modifiant l'annexe II de la directive 2002/46/CE du Parlement européen et du Conseil afin d'y inscrire certaines substances)

<sup>8</sup> Efsa, 2004 Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to Calcium L-Methylfolate

<sup>9</sup> Afssa, 2009 – Etude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires 2 (INCA 2) (2006-2007) - Rapport

<sup>10</sup> Arrêté du 9 mai 2006 relatif aux nutriments pouvant être employés dans la fabrication des compléments alimentaires.

*Ce point ne soulève pas de remarque de la part des autorités irlandaises.*

**Ce point ne soulève pas de remarque du CES « Nutrition humaine ».**

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

Le pétitionnaire indique que le NI contient une forme de folates déjà autorisée dans la fabrication des compléments alimentaires. Il présente en outre les résultats d'une étude randomisée en dispositif croisé réalisée chez 23 hommes et femmes adultes. Les sujets ont reçu par voie orale un comprimé contenant 400 µg d'acide MTHF, soit sous forme de sel de calcium, soit sous forme de sel de glucosamine. Les comprimés contenaient également 400 µg d'acide folique. La quantité totale de folates ingérée était la même dans les deux groupes. L'objectif de l'étude était de comparer la biodisponibilité des 2 formes d'apport de folates. Des échantillons de sang ont été prélevés au cours des 12 h suivant l'ingestion du comprimé afin de suivre la concentration sanguine de folates (et déterminer les paramètres suivants : pic et heure de concentration sanguine maximale, aire sous la courbe, etc.). Le pétitionnaire conclut à l'absence de différence dans la biodisponibilité de l'acide MTHF sous forme de sel de calcium ou de glucosamine, et donc à l'équivalence nutritionnelle entre ces deux formes d'apports.

Le pétitionnaire note par ailleurs que la glucosamine utilisée dans la fabrication du NI répond aux mêmes spécifications que celle utilisée dans les compléments alimentaires. Elle est donc nutritionnellement équivalente, bien que la quantité de glucosamine susceptible d'être apportée par le NI soit très inférieure aux quantités présentes dans les compléments alimentaires. Le pétitionnaire souligne que le NI n'est toutefois pas destiné à être une source de glucosamine mais de folates.

D'un point de vue nutritionnel, le pétitionnaire estime ainsi que le NI peut être considéré comme équivalent à des substances autorisées dans les compléments alimentaires, à savoir l'acide MTHF et la glucosamine.

*Ce point ne soulève pas de remarque de la part des autorités irlandaises.*

**Le CES « Nutrition humaine » ne note pas de différence significative de biodisponibilité de l'acide MTHF, qu'il soit sous forme de sel de glucosamine ou de sel de calcium. Il note que la biodisponibilité du sel de calcium est elle-même comparable à celle de l'acide folique (PGA) (Pietrzik 2010)<sup>11</sup>.**

**Le CES « Nutrition humaine » rappelle par ailleurs qu'un statut nutritionnel satisfaisant en folates pour les femmes en tout début de grossesse est déterminant pour la prévention des anomalies de fermeture du tube neural.**

**En outre, il souligne que la correction de l'anémie et des anomalies hématologiques chez des sujets carencés en vitamine B12 par un apport en vitamine B9 entrave le diagnostic de la carence, et ainsi augmente la probabilité d'une atteinte neurologique avec un risque de séquelles irréversibles.**

**Le CES « Nutrition humaine » souhaite enfin évoquer les résultats différents de récentes publications montrant soit une réduction soit une augmentation du risque de cancer en situation d'apport élevé en vitamine B9 (acide folique et/ou folates ; Migheli et Migliore, 2012<sup>12</sup> ; Wien et al., 2012<sup>13</sup> ; Stolzenberg et al, 2006<sup>14</sup>). Les effets de la supplémentation en folates observés dans ces études pourraient dépendre de plusieurs facteurs tels que la**

<sup>11</sup> Pietrzik K, Bailey L, Shane B. Folic acid and L-5-methyltetrahydrofolate: comparison of clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics. Clin Pharmacokinet. 2010 Aug;49(8):535-48

<sup>12</sup> Migheli F, Migliore L. Epigenetics of colorectal cancer. Clin Genet. 2012 Apr;81(4):312-8

<sup>13</sup> Wien TN, Pike E, Wisløff T, Staff A, Smeland S, Klemp M. Cancer risk with folic acid supplements: a systematic review and meta-analysis. BMJ Open. 2012 Jan 12;2(1)

<sup>14</sup> Stolzenberg-Solomon RZ, Chang SC, Leitzmann MF, Johnson KA, Johnson C, Buys SS, Hoover RN, Ziegler RG. Folate intake, alcohol use, and postmenopausal breast cancer risk in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. Am J Clin Nutr. 2006 Apr;83(4):895-904

durée d'administration, la dose administrée, le statut initial en folates, le tissu considéré, la présence de lésions pré-cancéreuses ou le stade tumoral, ainsi que les polymorphismes des gènes du métabolisme des folates. En 2009, le groupe de travail Esco (Efsa, 2009<sup>15</sup>) sur l'évaluation des risques et des bénéfices d'un enrichissement de l'alimentation en acide folique a jugé que les données disponibles sur les relations entre acide folique et cancer étaient insuffisantes pour permettre une analyse du risque complète.

Le CES « Nutrition humaine » souligne ainsi la nécessité d'identifier les groupes de population susceptibles de bénéficier d'une supplémentation en folates sans risque avéré, ainsi que les groupes pour lesquels il n'est pas possible à ce jour d'affirmer l'innocuité d'une supplémentation par voie d'enrichissement ou de compléments alimentaires. Il rappelle par ailleurs que pour tout enrichissement en vitamine B9, une mention spéciale devrait attirer l'attention sur la nécessité que le statut en vitamine B12 soit assuré (Afssa, 2009<sup>16</sup>).

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

Le NI étant un produit de synthèse chimique, le pétitionnaire estime que le procédé de production n'est pas susceptible d'induire une contamination microbiologique. Il rappelle que des contrôles réguliers selon les spécifications proposées (cf. I) sont mis en place afin de vérifier la qualité microbiologique du NI.

*Ce point ne soulève pas de remarque de la part des autorités irlandaises.*

**Ce point ne soulève pas de remarque du CES « Nutrition humaine ».**

### 3.8. Informations d'ordre allergique sur le NI

Compte tenu qu'il n'a pas été rapporté d'hypersensibilité pour les folates, incluant l'acide MTHF et que le NI est un produit de synthèse chimique ne contenant pas de protéines, le CES AAAT estime le risque allergique comme faible. Un risque d'hypersensibilité à l'acide folique a été rapporté chez certaines personnes, pour lesquelles la prise d'acide folique est contre-indiquée, mais selon les informations du pétitionnaire, l'acide folique n'est pas détectable dans le NI.

Par rapport à la glucosamine, le CES AAAT observe que cette substance est produite au cours du métabolisme normal chez l'Homme et chez l'animal et que sa production endogène est estimée entre 4 et 20 grammes/jour (ce qui rend négligeables les possibles effets de la quantité apportée par le NI).

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

*Absorption* : Le sel de glucosamine du MTHF est dissocié au niveau gastrique à un pH acide, conduisant à la libération des deux parties constituantes, la glucosamine et l'acide MTHF (forme active des folates). L'absorption des composants du NI (absorption entre 70-80 % chez l'animal) est réalisée, par des transporteurs, essentiellement au niveau de l'intestin grêle. Chez le volontaire sain, l'absorption serait de l'ordre de 51 à 54 % (FDA 1998<sup>17</sup>).

Une étude de bioéquivalence chez l'Homme ayant pour objectif de comparer la biodisponibilité du NI à celle du sel de calcium MTHF, montre que les paramètres pharmacocinétiques (pic (C<sub>max</sub>) et heure (t<sub>max</sub>) de concentration sanguine maximale, aire sous la courbe (Area Under the

<sup>15</sup> Efsa - ESCO Report on Analysis of Risks and Benefits of Fortification of Food with Folic Acid - 2009

<sup>16</sup> Afssa – Avis de l'agence française de sécurité sanitaire des aliments du 3 juillet 2009 relatif à l'évaluation des teneurs en vitamines et minéraux des denrées enrichies et des compléments alimentaires : synthèse – 2009

<sup>17</sup> Department of Health & Human Services. 1998. Dockets management branch. Food and Drug Administration. 5630 Fishers Lane, Room 1061, Rockville, MD 20852, USA.

La FDA a évalué l'acide 5-méthyltétrahydrofolique et non son sel de glucosamine.

Curve, AUC) et demi-vie d'élimination du sel de glucosamine) sont similaires à ceux du sel de calcium. Ces valeurs ont été déterminées par la mesure des concentrations sériques de folate pendant 12 heures après l'administration d'une dose de 400 µg de chacun des sels chez 24 volontaires sains selon une méthodologie de « cross over » (dispositif croisé), c'est-à-dire dans laquelle chaque volontaire a reçu les deux sels de MTHF. La période entre la prise des deux doses était de 10 jours.

**Distribution :** Le MTHF est transporté pour 5 à 80 % sous forme liée aux protéines plasmatiques (essentiellement à l'albumine). Le pic de concentration plasmatique (Cmax) est observé entre 2 et 4 heures après administration chez l'homme volontaire sain et la demi-vie plasmatique est de  $1,7 \pm 0,3$  heure (FDA, 1998).

**Métabolisme :** Le MTHF est métabolisé au cours de la synthèse des purines et pyrimidines. Il est stocké dans les cellules sous forme de poly-glutamates (FDA, 1998).

**Élimination :** Le MTHF et ses métabolites sont éliminés essentiellement par voie urinaire. La forme non transformée du MTHF serait d'environ 20 %. Chez le volontaire sain recevant 15 mg de MTHF par voie intramusculaire, 49 % de la substance administrée sont retrouvés dans les urines après 24 heures (FDA, 1998).

### 3.9.1 Toxicologie génique *in vitro*

La FDA<sup>18</sup> et l'agence néozélandaise FSANZ<sup>19</sup> ont effectué, respectivement en 1998 et 2008, une revue de la toxicité de l'acide 5-méthyltétrahydrofolique racémique et du (6S)-5-méthyltétrahydrofolique, en concluant que les essais de génotoxicité conduits ne montraient pas d'effets.

- Tests réalisés avec le NI :

Le pétitionnaire a produit trois études de génotoxicité *in vitro* conduites spécifiquement avec le NI, qui sont analysées ci-après, afin de démontrer l'innocuité du NI et des impuretés résultant du procédé de fabrication. La recherche d'un potentiel mutagène génique a été réalisée par deux études *in vitro* : un test bactérien de type Ames et un test de mutations sur cellules de lymphome de souris. Le pouvoir mutagène chromosomique a été évalué par la recherche des aberrations chromosomiques *in vitro*. Ces trois études ont été conduites par le même laboratoire dans les conditions « Bonnes Pratiques de Laboratoire » (BPL) (BPL italiennes et de la FDA), des lignes directrices OCDE, de la directive 2004/10/CE et sous assurance qualité.

#### Recherche des mutations géniques par test de mutation réverse sur bactéries

Ce test d'Ames, conduit selon les lignes directrices OCDE n°471, ICH S2 A et CEE Directive du Conseil 2000/32, a été pratiqué sur 4 souches de *Salmonella typhimurium* (TA 98 et TA 1537 pour les mutations par *frame shift*, TA 100 et TA 1535 pour les substitutions de paires de bases) et la souche *Escherichia coli* WP2 *uvra* (substitutions de bases).

Après un essai préliminaire sur 5 doses (dose maximale = 5000 µg/boîte) démontrant l'absence de cytotoxicité à toutes ces doses, 2 séries expérimentales distinctes (série I et série II, la série II se différenciant par l'ajout d'un stade de préincubation) ont été réalisées, avec et sans activation métabolique (par la fraction microsomale S9 mix), avec 5 doses : 313, 625, 1250, 2500 et 5000 µg (sans cytotoxicité aux fortes doses) et en présence de témoins négatifs et positifs.

**Résultats :** sur les cinq souches et pour tous les essais, avec et sans activation, les résultats ne montrent pas d'augmentation du nombre des colonies de révertants. La validité expérimentale des essais a été démontrée avec les témoins positifs.

<sup>18</sup> Department of Health & Human Services. 1998. Dockets management branch. Food and Drug Administration. 5630 Fishers Lane, Room 1061, Rockville, MD 20852, USA.

<sup>19</sup> Food Standards Australia New Zealand. 2008. Final assessment report. Application A566, L-5-methyltetrahydrofolate, calcium as a permitted vitamin form of folate.

*Conclusions de l'étude* : dans les conditions expérimentales utilisées, le NI n'induit pas de mutation réverse chez *Salmonella typhimurium* et *Escherichia coli*.

**Le CES AAAT considère que ce test est recevable et permet de démontrer l'absence d'effet mutagène du NI sur des cellules bactériennes dans les conditions de l'essai.**

Test de mutation génique *in vitro* sur cellules de lymphome de souris L5178Y TK<sup>+/−</sup>

Cette recherche de mutation en « avant » sur le locus TK, avec et sans activation (par le S9 mix), repose sur l'identification de colonies L5178Y devenues par mutation résistantes à la trifluorothymidine (TFT), analogue toxique de la thymidine. La TFT est transformée par une enzyme de phosphorylation, la thymidine kinase (TK), en nucléosides létaux pour les cellules TK compétentes (TK<sup>+</sup>). Les cellules TK<sup>+/−</sup>, devenues par mutation TK-déficientes (TK<sup>−</sup>), ne peuvent pas transformer la TFT, survivent et se multiplient.

Un essai préliminaire de recherche de dose, jusqu'à la dose maximum de 5000 µg/mL, a démontré l'absence de cytotoxicité pour un traitement de trois heures quelle que soit la dose essayée, avec ou sans activation métabolique. Une cytotoxicité sévère a été trouvée aux doses de 5000 et 2500 µg/mL pour un traitement de 24 heures, en absence de S9 et en conséquence ces doses n'ont pas été retenues pour le test de mutation génique. La validité expérimentale a été démontrée avec les témoins positifs.

*Résultats* : aucune augmentation de la fréquence des mutations n'a été observée dans ces essais dans les autres doses testées, en présence ou en absence d'activation métabolique.

*Conclusions de l'étude* : dans les conditions expérimentales utilisées, le NI n'induit pas de mutation dans les cellules L5178Y de lymphome de souris, en présence ou en absence d'activation métabolique.

**Le CES AAAT considère que ce test est recevable et permet de démontrer l'absence d'effet mutagène du NI sur des cellules de mammifère dans les conditions de l'essai.**

Recherche *in vitro* des aberrations chromosomiques sur cellules ovariennes V79 de hamster chinois

Cette recherche d'un éventuel potentiel mutagène chromosomique du NI et de ses impuretés a été conduite selon les lignes directrices OCDE (n°473, 1997) et CE n°440/2008.

Huit doses ont été envisagées : 39, 78, 156, 313, 625, 1250, 2500 et 5000 µg/mL (en solution dans l'eau ppi). Finalement, deux séries expérimentales distinctes ont été réalisées (en duplicat), après élimination des doses conduisant à une toxicité cellulaire importante :

- Série I : 3 heures de traitement des cultures, préparation des métaphases (étalement) à 20 heures (env. 1,5 cycle cellulaire). Sans activation métabolique deux doses ont été éliminées (5000 et 2500 µg/mL) en raison d'une importante cytotoxicité, avec activation métabolique aucune toxicité cellulaire n'a été rapportée quelle que soit la dose.
- Série II : traitement continu des cultures jusqu'à la récolte des cellules (20 heures), uniquement sans activation métabolique.

Dans tous les cas, 100 métaphases par culture ont été examinées pour la recherche des mutations chromosomiques. Les témoins négatifs et positifs employés étaient respectivement la mitomycine-C et la cyclophosphamide.

*Résultats* : une légère augmentation, non-statistiquement significative, du nombre des cellules présentant des aberrations chromosomiques a été rapportée pour la série I sans activation métabolique uniquement à la dose maximum testée (1250 µg/mL). A cette dose, le nombre des cellules viables diminue de 18 % par rapport aux cultures témoins. Dans tous les autres cas, il n'y a pas d'augmentation du nombre de cellules présentant des aberrations chromosomiques. La validité de l'essai a été démontrée avec les témoins positifs.

*Conclusions de l'étude :* dans les conditions expérimentales utilisées, le NI n'induit pas d'augmentation des aberrations chromosomiques dans les cellules ovariennes S79 de hamster chinois.

**Le CES AAAT considère que ce test est recevable et permet de démontrer l'absence d'effet d'aberration chromosomique du NI sur des cellules de mammifère dans les conditions de l'essai.**

### 3.9.2 Toxicologie *in vivo*

- Concernant le MTHF :

Les résultats des études de toxicologie rapportés dans l'évaluation du FSANZ (2008) chez le rat avec le 6S-5-MTHF par voie orale sont regroupés dans le tableau suivant :

Etudes	Espèces	Voies d'exposition	Doses & durées d'exposition	Résultats
Aiguë	Rat (Wistar) HsdCpb :WU	Orale	2000 mg/kg p.c./jour & une seule dose	LD <sub>50</sub> > 2000 mg/kg p.c./jour
Sub-chronique	Rat Hanlbn :WIST	Orale	0, 25, 100, 400 mg/kg p.c./jour & 13 semaines	Aucun effet indésirable identifié. NOEL = 400 mg/kg p.c./jour
Toxicité sur le développement	Rat (Wistar) HsdCpb :WU	Orale	0, 100, 300, 1000 mg/kg p.c./jour & jours 5 au 19 de la gestation	Aucun effet sur les femelles, fétus ou sur le développement de fétus. NOEL = 1000 mg/kg p.c./jour

- Concernant la glucosamine :

L'Efsa a évalué en 2009 la sécurité du sel d'hydrochlorure de glucosamine extraite d'*Aspergillus niger* et a défini une NOAEL<sup>20</sup> de 2130 mg/kg p.c./jour pour la glucosamine (sans sa base) à partir d'une étude de 52 semaines chez le rat (souche non précisée). Sur la base de cette NOAEL une marge de sécurité supérieure à 213 000 peut être estimée compte tenu de la consommation de 0,8 mg de glucosamine (0,01 mg/kg p.c./jour) provenant du NI. Ce facteur de sécurité est relatif car la glucosamine est produite naturellement dans l'organisme.

Concernant la glucosamine, la revue d'Anderson et al. (2005) a rapporté une absence de toxicité pour une administration journalière par voie orale de glucosamine à des doses comprises entre 194 et 2700 mg /kg p.c./jour, sur la base d'une évaluation de 17 études dans différentes espèces animales (souris, rat, lapin, chien et cheval). Les durées de traitement dans ces études ont varié de 12 à 365 jours.

### 3.9.3 Etudes chez l'Homme

- Concernant le MTHF :

Chez l'Homme, des doses orales (thérapeutiques) respectives de 17 mg/jour de 6S-5-MTHF et 15 mg/j d'acide folique ont été administrées chez 50 patients hommes et femmes âgés de 65 ans en moyenne (sous hémodialyse) pendant 4 mois sans effets indésirables (Bostom et al., 2000)<sup>21</sup>.

<sup>20</sup> NOAEL : No Observed Adverse Effect Level

<sup>21</sup> Bostom AG, Shemin D, Bagley P, Massy ZA, Zanabli A, Christopher K, Spiegel P, Jacques PF, Dworkin L, Selhub J, 2000. Controlled comparison of L-5-methyltetrahydrofolate versus folic acid for treatment of hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients. *Circulation* 101: 2829-32.

- Concernant la glucosamine :

L'évaluation de l'Efsa de 2009 mentionne 37 études chez l'Homme, incluant 3783 patients traités avec de la glucosamine pendant des périodes allant de 12 jours à trois ans, à la dose la plus communément administrée de 1500 mg/jour ou à une dose élevée de 2 656 mg/jour. De façon générale, ces études ne rapportent pas d'effets indésirables suite à l'ingestion de glucosamine hormis des symptômes tels que constipation, diarrhée, nausées, inconfort abdominal (Efsa, 2009). Par ailleurs, l'Efsa ne rapporte pas d'effets indésirables après revue de 16 études ayant mesuré les fonctions hépatiques, rénales et les paramètres hématologiques et cardiovasculaires chez l'Homme (Efsa, 2009). Une étude à long terme chez l'Homme ne rapporte pas d'effets indésirables après administration par voie orale de 1500 mg de glucosamine par jour (25 mg/kg p.c./jour) pendant 6 mois (Clegg et al., 2006)<sup>22</sup>.

L'Efsa a porté une attention particulière aux effets de l'ingestion de glucosamine sur le métabolisme du glucose dans son évaluation de 2009. L'Efsa a considéré que l'ingestion de glucosamine à des doses quotidiennes de 1500 mg, chez le diabétique ou chez les personnes présentant une intolérance au glucose, nécessitait un avis médical. Toutefois, dans le cas présent compte tenu de l'exposition très limitée (0,8 mg) à la glucosamine provenant de la consommation du NI, qui est plus de 1800 fois inférieure à la dose de 1500 mg, les marges d'exposition calculées permettent d'estimer ces risques comme limités pour ces populations.

*Les autorités irlandaises estiment que la pureté du NI est supérieure à 97 % et que les impuretés présentes sont constituées de sous-produits des folates formés pendant la production du NI ou résultant de la dégradation du folate. Le NI se dissocie complètement dans ses constituants individuels dans l'estomac, le THMF et la glucosamine, pour lesquels des niveaux acceptables ont déjà été établis. L'exposition maximale journalière de folates provenant de la consommation du NI est de 1 mg, alors qu'elle est de 0,8 mg pour la glucosamine, ces niveaux restent dans les limites acceptables établies par des comités d'experts. La sécurité du sel de calcium de l'acide THMF a été évaluée par l'Efsa et le JECFA et le pétitionnaire argumente d'une manière acceptable qu'étant donnée la similitude chimique avec le NI, il est raisonnable de faire certains rapprochements sur la sécurité du NI sans avoir besoin de données toxicologiques exhaustives. Nonobstant, le pétitionnaire a fourni les résultats de trois études de toxicité génique in vitro réalisées avec le NI, qui montrent l'absence de potentiel génotoxique. Ces résultats appuient l'argumentaire du pétitionnaire sur le fait qu'aucune impureté formée pendant la fabrication du NI, y compris celles qui n'auraient pas été détectées dans les analyses conduites avec le NI, ne présente de risque toxicologique. Il est attendu que le NI ne présente pas de risque allergique en raison de la pureté des produits chimiques de départ et du procédé de fabrication utilisé, et parce que la glucosamine utilisée comme matériau de départ provient d'une source autre que de crustacés.*

**Le CES AAAT considère que l'ensemble des études permettent d'identifier chez le rat une NOAEL pour l'acide MTHF de 400 mg/kg p.c./jour à partir d'une étude de toxicité sub-chronique ainsi qu'une NOAEL de 1000 mg/kg p.c./jour à partir d'une étude de toxicité sur le développement. Ces doses sont les doses les plus fortes testées. De même le CES AAAT considère que ces études permettent d'identifier une NOAEL de 2130 mg/kg p.c./jour pour la glucosamine dans une étude de 52 semaines chez le rat.**

**Le CES AAAT estime en outre que les tests de toxicité génique réalisés avec le NI ne montrent pas de potentiel génotoxique. Les résultats négatifs de ces études sont, par ailleurs, similaires à ceux rapportés dans l'évaluation du FSANZ (2008). Le CES AAAT note que l'administration pendant 4 mois des doses orales de 17 mg/jour de l'acide TMHF à des patients hommes et femmes âgés de 65 ans en moyenne, n'a pas rapporté d'effets indésirables (Bostom et al., 2000).**

**Concernant le TMHF, prenant en compte la NOAEL de 400 mg TMHF /kg p.c./jour identifiée chez le rat et un apport maximal journalier de 1 mg/jour proposé pour le NI (équivalent à environ 0,02 mg/kg p.c./jour), le CES AAAT a pu estimer un facteur de sécurité d'environ 20 000.**

<sup>22</sup> Clegg et al., 2006. Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis. N Engl J Med 354:795-808.

Concernant la glucosamine, prenant en compte la NOAEL de 2130 mg glucosamine/kg p.c./jour identifiée dans une étude chez le rat et un apport maximal journalier de 0,8 mg/jour proposé pour le NI (équivalent à environ 0,01 mg/kg p.c./jour), le CES AAAT a pu estimer un facteur de sécurité d'environ 213 000.

Sur la base des facteurs de sécurité calculés pour l'acide MTHF et pour la glucosamine, le CES AAAT estime que l'emploi du NI ne présente pas de risque sanitaire d'un point de vue toxicologique.

### 3.10. Conclusions

#### Conclusions du pétitionnaire :

Le pétitionnaire indique que le NI est clairement défini, que son procédé de production permet l'obtention d'une pureté satisfaisante. Le NI contient de l'acide MTHF, identique à celui contenu dans le sel de calcium d'acide MTHF déjà autorisé comme forme d'apport de folates pour les compléments alimentaires. Les spécifications et la pureté du NI sont conformes aux spécifications établies pour l'acide MTHF sous forme de sel de calcium (JECFA, 2005). L'utilisation de glucosamine a été considérée comme ne présentant pas de risque par l'Efsa jusqu'à 750 mg/j (2009). La biodisponibilité de l'acide MTHF sous forme de glucosamine est identique à celle de l'acide MTHF. Pour conclure, le pétitionnaire estime que le NI ne présente pas de risque dans les conditions de production et d'utilisation proposées.

#### Conclusions des autorités irlandaises

*Les données présentées par le pétitionnaire ne soulèvent pas d'inquiétudes relatives à la sécurité du NI de la part des autorités irlandaises. Celles-ci estiment que le NI remplit les critères du règlement 258/97 requis pour la mise sur le marché d'un nouvel ingrédient.*

#### Conclusions des CES :

**Le CES AAAT rejoint les conclusions des autorités irlandaises sur les aspects toxicologiques du NI.**

**Le CES « Nutrition humaine » note que la biodisponibilité des folates apportés par le NI est similaire à celle du MTHF sous forme de sel de calcium, déjà autorisée par la réglementation. Si les données présentées ne soulèvent pas d'inquiétudes du CES « Nutrition humaine » quant à la forme d'apport proposée, le CES estime en revanche que le niveau maximal d'emploi du NI envisagé par le pétitionnaire, correspondant à un apport de 1 mg/j de folates d'origine synthétique, n'est pas compatible avec la limite de sécurité de 1 mg/j chez l'adulte dès lors qu'un individu consomme par ailleurs des aliments (courants ou diététiques) qui ont été enrichis en vitamine B9. Cette dose est également supérieure aux limites de sécurité établies chez l'enfant et l'adolescent.**

**Enfin, le CES « Nutrition humaine » souligne la nécessité d'identifier les groupes de population pour lesquels une supplémentation en folates par les compléments alimentaires peut présenter un bénéfice, sans risque avéré, ainsi que les groupes pour lesquels une telle supplémentation peut présenter un risque.**

#### **4. CONCLUSION ET RECOMMANDATION DE L'AGENCE**

L'Agence adopte les conclusions des CES « Nutrition humaine » et « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques (AAAT) ». Les données présentées ne soulèvent pas d'inquiétudes quant à la forme d'apport de folates proposée par le pétitionnaire. Toutefois, d'un point de vue nutritionnel, l'Agence s'interroge sur la dose d'emploi maximale du NI envisagée par le pétitionnaire, qui entraînerait un dépassement de la limite de sécurité de 1mg/jour fixée par l'Efsa, chez les adultes qui consommeraient par ailleurs des aliments enrichis en vitamine B9. Par ailleurs, compte tenu du dépassement de la limite de sécurité même en l'absence de consommation d'aliments enrichis, l'Agence est défavorable à l'emploi du NI pour les enfants et les adolescents à la dose proposée.

**Le directeur général**

**Marc MORTUREUX**

#### **MOTS-CLES**

*Nouvel aliment, acide méthyltétrahydrofolique, folates, acide folique, glucosamine, compléments alimentaires*