

Maisons-Alfort, le 20 février 2013

Le directeur général

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

en réponse à la consultation de l'Autorité Européenne de sécurité des aliments sur son projet d'avis concernant la ré-évaluation de l'aspartame (E951) en tant qu'additif alimentaire

1. CONTEXTE DE LA SAISINE

En 2011, l'Anses a émis un avis examinant deux nouvelles études portant sur d'éventuels effets sanitaires liés à l'aspartame et l'acésulfame de potassium. Suite à cet avis, l'Anses a mis en place un groupe de travail (GT) chargé d'évaluer les bénéfices et les risques nutritionnels (hors interrogations d'ordre toxicologiques) de l'ensemble des édulcorants intenses dont la fin des travaux est prévue pour décembre 2013. Elle a également estimé nécessaire de poursuivre l'évaluation et a sollicité l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) pour que celle-ci anticipe l'échéance de la réévaluation de la Dose Journalière Admissible (DJA) de l'aspartame initialement prévue en 2020 par le Règlement européen n°257/2010¹.

Le comité d'experts relatif aux additifs alimentaires et aux nutriments de l'EFSA a rendu un avis provisoire relatif à la sécurité d'emploi de l'Aspartame (E951) qui a été mis en consultation publique le 8 janvier 2013.

Les experts scientifiques de l'EFSA se sont fondés sur une analyse large des informations disponibles sur l'aspartame et ses produits de décomposition. Ils ont conclu dans cet avis préliminaire qu'ils ne posaient pas de problème de toxicité pour les consommateurs aux niveaux actuels d'exposition. Pour établir la DJA, l'EFSA a notamment tenu compte des résultats issus d'études à long terme sur des animaux de laboratoire et portant sur la toxicité, la cancérogénicité et les possibles effets nocifs de la phénylalanine (l'un des produits de décomposition de l'aspartame) sur le développement embryo-fœtal. Ce composé est connu pour être toxique à des niveaux élevés de consommation, en particulier pour le développement du fœtus chez les femmes souffrant de la phénylcétonurie (PCU). Le groupe scientifique s'est appuyé sur les données issues de la population phénylcétonurique pour estimer si la DJA est protectrice (hors cas des individus souffrant de phénylcétonurie).

L'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail s'est autosaisie² pour mener à bien une analyse critique de certains points de cet avis.

¹ Règlement (UE) 257/2010 de la Commission du 25 mars 2010 établissant un programme pour la réévaluation des additifs alimentaires autorisés, conformément au règlement (CE) N° 1333/2008 du Parlement européen et du Conseil sur les additifs alimentaires. JO L 80 du 26.3.2010, p. 19–27

² Autosaisine de l'Anses en date du 29 janvier 2013

2. METHODE D'EXPERTISE

Compte tenu des délais restreints pour répondre à la consultation, l'expertise a été réalisée par un groupe d'expertise collective en urgence (GECU) composé d'experts toxicologues, épidémiologistes, spécialistes de la nutrition et des maladies métaboliques. Chaque expert a été mandaté pour expertiser une partie précise de l'avis provisoire de l'EFSA.

L'expertise conduite s'est concentrée tout d'abord sur l'analyse faite par ce rapport des principaux points ayant fait débat au sujet de la sécurité sanitaire de l'aspartame. Elle a ensuite abordé plus spécifiquement les éléments nouveaux de la démarche d'évaluation du risque proposé dans l'avis provisoire.

Les points suivants ont donc été abordés :

- Etudes de toxicologie chroniques et de cancérogénèse ;
- Etudes de toxicologie des métabolites de l'aspartame ;
- Etudes des données épidémiologiques ;
- Etude des effets toxiques de l'aspartame sur la reproduction et le développement et pertinence du modèle de la phénylcétonurie.

Le GECU s'est réuni le 08 février 2013 pour adopter les conclusions présentées dans cet avis, rédigé sur la base des rapports produits par les membres du groupe.

Les remarques de fond sont présentées dans le présent avis. L'annexe précise les remarques faites à l'EFSA via son site internet.

Compte tenu des délais d'instruction offerts par la consultation organisée par l'EFSA et de l'importance du travail de fond réalisé par cet organisme, le GECU ne peut avoir pour ambition de mener une expertise complète de la sécurité sanitaire de l'aspartame, mais a recherché à mettre en lumière certaines interrogations majeures ou a identifié des pistes d'amélioration potentielles qui se font jour à la lecture de l'avis provisoire de l'EFSA.

3. ANALYSES DU GECU

3.1. Etudes épidémiologiques

Le GECU, après étude du rapport provisoire soumis à consultation, n'a pas de commentaires de fond sur l'analyse de l'EFSA. Certaines remarques plus spécifiques sont précisées en annexe.

3.2. Etudes de toxicologie chronique et de cancérogénèse

3.2.1. Documents expertisés

L'expertise du GECU a porté sur un certain nombre d'études « pivots » anciennes ayant conduit à établir l'actuelle DJA et à établir l'autorisation de mise sur le marché. Plusieurs études de cancérogénèse sur l'aspartame ont en effet été réalisées par Searle dont 1 étude chez la souris (E75), 1 chez le rat et 1 étude trans générationnelle chez le rat. Ces 3 études, datant respectivement de 1974, 1975 et 1971, ont porté sur une période de 104 semaines, et ont été réalisées par un prestataire (centre de toxicologie d'Hazleton). Pour ces 3 études les rapports finaux, accessibles sur le site de l'EFSA³, ont pu être examinés par les membres du GECU.

D'autres études de toxicité chronique (réalisées par Searle) ont été expertisées : Une étude réalisée chez le chien (E28 - 1972) et une chez le singe (E32 -1972) qui ont porté sur 106 et 52 semaines, respectivement.

³ <http://www.efsa.europa.eu/en/dataclosed/call/110601.htm>

Une autre étude réalisée sur le rat (réalisée par Ajinomoto) a porté sur une période de 104 semaines. Pour cette étude, le rapport complet n'est pas disponible mais 2 publications en résumé succinctement le protocole et les résultats (Ishii, 1981a et 1981b).

Deux analyses rétrospectives ont ré-évalué les observations faites sur le cerveau. La première a été réalisée par Searle et Hazleton (E87) en 1973, alors que la seconde a consisté en une « peer review » de l'étude d'Ajinomoto par une fondation japonaise (Biosafety Research Center) en 2006.

Enfin, le GECU a également examiné 3 études additionnelles plus récentes. Deux études réalisées par l'institut Ramazzini en 2006 et 2007 ayant porté sur la vie entière des animaux (rat ou souris), et une étude réalisée par le National Toxicology Program (NTP, 2005) qui a étudié le potentiel cancérigène de l'aspartame sur 3 souches de souris transgéniques avec un test de micronoyau sur sang périphérique.

3.2.2. Analyse des études de toxicité et de cancérogénèse

Statut « BPL » des études considérées

Comme il est rappelé dans le document de l'EFSA, les études ayant porté l'autorisation initiale de mise sur le marché de l'aspartame ont été conduites entre 1970 et 1981 ; elles n'ont donc pas été réalisées selon les principes de Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL) puisque ceux-ci n'ont été définis qu'en 1976 (FDA) et 1981 (OCDE). Pour mémoire, les principes BPL ont été instaurés afin de promouvoir l'obtention de données d'essais de qualité en assurant une parfaite traçabilité des résultats et des possibilités de contrôle des données brutes des études. Certaines de ces études ont fait l'objet de fortes controverses évoquant des possibilités d'erreurs ou de fraudes dans les données brutes fournies dans les dossiers. Le GECU considère qu'il n'est pas en mesure de se prononcer sur ces aspects et que ses analyses portent uniquement sur les rapports d'étude étudiés.

Seule l'étude NTP, bien que cela ne soit pas spécifié dans l'abstract, a vraisemblablement été conduite selon les BPL.

Respect des lignes directrices relatives aux études de cancérogénèse

Le nombre d'animaux mis en jeu dans les études Searle (n=40 animaux/sexe/dose) est inférieur au nombre d'animaux recommandé par les lignes directrices actualisées de l'OCDE (fiche 451) qui fixent un nombre minimum de 50 animaux par groupe de dose et par sexe. Ceci a pour conséquence de diminuer la puissance des analyses statistiques réalisées. Dans l'étude E33/34, le nombre d'animaux du groupe femelle traité avec 8 g/kg/j sacrifiés en fin d'étude n'est que de 10, ce qui est très faible pour une étude de cancérogénèse. En revanche, dans l'étude réalisée par Ajinomoto, le nombre d'animaux est plus élevé (n=86/sexe/groupe) pour tenir compte des sacrifices intermédiaires pratiqués à 26 et 52 semaines, ce qui ramène le nombre d'animaux à 60 par groupe de dose et par sexe pour l'étude pivot de 104 semaines.

Les durées d'études (104 semaines) sont en accord avec les lignes directrices en vigueur (fiche OCDE 451). Celles appliquées pour les souris transgéniques (9 mois) sont supérieures à celles habituellement pratiquées (6 mois) avec ces souches d'animaux.

Le nombre d'organes et tissus examinés en histologie de toutes les études est en accord avec les recommandations de la fiche OCDE 451 à l'exception de l'étude réalisée par Ajinomoto pour laquelle aucune précision n'est fournie.

L'aspartame est administré par l'aliment supplémenté et dans chaque étude la quantité de substance réellement ingérée est bien précisée. Cependant, pour les fortes concentrations d'aspartame dans l'aliment, celles-ci ne sont pas précisées dans les rapports. La publication d'Ishii (1981a) mentionne une concentration de 11,2% pour la dose de 4 g/kg/j ce qui est très supérieur à la limite de 5% de la ration totale généralement recommandée (fiche OCDE 451).

Le GECU constate que plusieurs de ces études font référence pour relativiser des différences entre lots d'animaux traités et non traités à des données historiques sans les précisions nécessaires. Le

GECU rappelle que l'origine de ce type de données doit être précisée dans la publication ou le rapport et qu'elles doivent respecter la définition figurant dans les lignes directrices de l'OCDE 451.

Etudes postérieures à l'évaluation initiale

Ces 2 études conduites par l'institut Ramazzini ont fait l'objet d'analyses approfondies (ANSES : 2011, EFSA : 2006, 2009a, 2009b, COC 2006, NTP/EPA 2011) ayant toutes conclu à la non recevabilité des résultats (notamment en raison des protocoles expérimentaux non conformes aux recommandations internationales, protocole laissant les animaux en expérimentation jusqu'à leur mort naturelle, études non réalisées selon les statuts BPL).

L'étude réalisée par le NTP réalisée sur 3 souches de souris transgéniques n'a également mis en évidence aucune incidence accrue de tumeurs chez les animaux traités par rapport aux témoins jusqu'à environ 8 g/kg pc/j.

Autres études chez des non rongeurs

Les résultats de l'étude réalisée chez le singe d'élevage (E32), en raison du trop faible nombre d'animaux mis en jeu, de leur comportement physiologique non homogène, de l'absence de témoins, de la mortalité d'origine non précisée, ne peuvent être retenus. Le seul élément à prendre en compte est la survenue de convulsions chez les animaux traités après trente semaines pour des doses égales ou supérieures à 3000 mg/kg/j. Toutefois la qualité de l'étude ne permet pas une analyse fine de cette manifestation qui pourrait être liée à des concentrations élevées en phénylalanine ou à une infection par des bactéries de type *Shigella* pendant l'étude. En tout état de cause le GECU considère étonnant que cette manifestation de nature préoccupante n'ait pas été ré-examinée ultérieurement dans des conditions expérimentales acceptables.

3.2.3. Conclusions

Le GECU considère qu'il serait préférable de disposer d'études plus récentes conduites selon les lignes directrices de l'OCDE et respectant les principes des BPL afin de statuer. Toutefois, compte tenu de la proximité des études de cancérogénèse avec les protocoles OCDE et de l'existence d'études complémentaires sur les souris transgéniques, il considère, comme les experts de l'EFSA que les études (E75, E33/34, E28 et E70) peuvent être prises en compte dans l'évaluation.

Le GECU signale néanmoins les effets préoccupants (convulsions) observés dans le cadre de l'étude réalisée chez le singe et n'a pas identifié d'études menées ultérieurement dans des conditions expérimentales acceptables permettant de lever ces doutes.

Enfin, le GECU rappelle qu'il ne lui appartient pas de se prononcer sur les controverses relatives à la régularité des résultats de certaines études et que ses analyses portent uniquement sur les rapports d'étude disponibles.

3.3. Etudes de toxicologie de la reproduction

La ré-évaluation conduite par l'EFSA a pris en compte de nouveaux endpoints (embryotoxicité notamment) ainsi que des études additionnelles sur la reproduction et le développement qui n'avaient pas été considérées dans les évaluations précédentes sur l'aspartame. Le GECU, est favorable à cet examen plus large des données sur la reproduction. Le GECU après analyse des données rapportées par l'EFSA dans son rapport provisoire n'a pas de commentaires particuliers sur cette question. Il constate toutefois la diversité des NOAEL qui pourraient être dérivées à partir des études de toxicité de la reproduction et du développement (de 1000 à 4000 mg/kg pc/j).

Le GECU considère qu'il est usuel de préférer aux données animales des données humaines, quand ces dernières sont disponibles et robustes. Les données humaines prises en compte dans le rapport de l'EFSA concernent la toxicité de la phénylalanine et les connaissances développées sur les patients PCU.

Le GECU regrette tout comme les experts de l'EFSA, l'absence de données cinétiques concernant la phénylalanine plasmatique chez les animaux traités avec de l'aspartame, comme marqueur d'exposition pour renforcer les hypothèses permettant de valider l'utilisation des données humaines.

3.4. Etudes de toxicologie des métabolites de l'aspartame hors phénylalanine

Le méthanol, qui représente 10% des métabolites de l'aspartame, est un toxique systémique connu (Humphries *et al.*, 2008). Il est métabolisé en formaldéhyde par deux voies enzymatiques, d'une part par l'action de l'alcool deshydrogénase et, d'autre part par l'action du cytochrome P450 2E1 (CYP2E1). Le formaldéhyde est ensuite métabolisé en acide formique (formate) par l'action de la formaldéhyde deshydrogénase (Jeganathan and Namasivayam 1998). La neurotoxicité du méthanol chez l'homme a été reliée à l'accumulation d'acide formique, l'importance des signes cliniques étant corrélée à la dose (Osterloh *et al.*, 1986). L'acide formique est lui-même métabolisé via une voie dépendante du tetra-hydro-folate (Eells *et al.*, 1982).

L'Homme (comme les autres primates) a une sensibilité particulière à la toxicité du méthanol du fait de sa faible réserve hépatique en folate (Johlin *et al.*, 1987). Chez les primates, le métabolisme du méthanol est responsable d'un stress oxydatif secondaire. De plus, l'acide formique est un inhibiteur du cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) ce qui peut conduire à la formation de formes radicalaires de l'oxygène (Easterbrook *et al.*, 2001).

Le formaldéhyde est à la fois cancérigène et neurotoxique (Lee *et al.*, 1994; Eells *et al.*, 2000). Un double mécanisme toxique par une altération directe de l'ADN et par un processus de stress oxydant peut en conséquence être envisagé. Trocho *et al.* (1998) ont montré *in vitro* que l'aspartame radio-marqué sur la partie méthanol de la molécule formait des adduits stables sur l'ADN et les protéines hépatiques. De même l'administration de méthanol marqué par isotope stable sur cellules montre la formation d'adduits à l'ADN dus à la formation de formaldéhyde (Lu *et al.*, 2010 ; 2012). Cependant, la formation d'adduits du formaldéhyde *in vivo* sur les protéines et les acides nucléiques à partir de l'aspartame reste à prouver (Tephly, 1999).

Lors de la métabolisation du méthanol par le CYP2E1, de nombreux composés radicalaires sont produits et peuvent altérer l'ADN ou les protéines (Seitz et Stickel, 2006). Par ailleurs, l'activité du CYP2E1 peut être induite par le paracétamol, l'éthanol, les produits liés à la consommation de tabac, ou encore des expositions professionnelles et domestiques aux solvants.

Par ailleurs, des études épidémiologiques, ont rapporté des maux de tête (Lipton *et al.*, 1989, Koeler et Glaros, 1989) et des insomnies après consommation d'aspartame, celles-ci peuvent s'accompagner d'altérations dans les concentrations localisées de catécholamines (Coulombe et Sharma 1986). Chez l'animal, des singes nouveau nés traités de façon chronique par de fortes doses d'aspartame (>1g/kg/j) des crises d'épilepsies avaient été observées (JECFA 1980). L'étude E14 (1972), montre chez le rat, une altération des capacités d'apprentissage après 13 semaines d'exposition à fortes doses d'aspartame et de L-Phé. Dans l'étude Beck *et al.* (2002), des rats exposés à 1000 mg/L d'aspartame dans l'eau de boisson montrent une diminution de concentration significative en neuropeptide Y dans le noyau arqué de l'hypothalamus. Chez le rat et le lapin exposés à 2000 mg/kg/j pendant 30 jours des atteintes au niveau ultrastructural décrites comme dégénération sélective dans l'ultrastructure des neurones dans les régions pyramidales de l'hippocampe et ventromédiale de l'hypothalamus (Pucia *et al.*, 2008, 2009). Ces effets pourraient être liés au caractère excitotoxique de l'acide aspartique (Olney *et al.*, 1982 ; Lau *et al.*, 2005 ; Inouye *et al.*, 1973).

Le rapport provisoire de l'EFSA développe les aspects génotoxiques du méthanol. En revanche, le GECU considère que les effets neurologiques potentiels de l'aspartame et de ses métabolites, point important à considérer dans l'évaluation des risques immédiats ou retardés lors d'une exposition fœtale, mériteraient d'être plus détaillés. La multiplicité des substances pouvant être impliquées et des cibles cellulaires, de même que la possibilité de nombreuses interactions doivent également être considérées.

3.5. Etudes des effets toxiques de la phénylalanine sur la reproduction et le développement

3.5.1. Métabolisme de la phénylalanine

La phénylalanine (Phe) est un acide aminé indispensable. Dans l'organisme, la Phe provient du recyclage des protéines corporelles, de l'apport protéique alimentaire et est également un métabolite de l'aspartame.

Les deux utilisations principales dans l'organisme de la Phe sont la synthèse protéique et la synthèse de tyrosine catalysée par la phénylalanine hydroxylase (PAH). Des mutations de cette enzyme hépatique sont à l'origine de la phénylcétonurie (PCU).

Les autres voies métaboliques minoritaires sont les suivantes :

1. La production de phénylpyruvate⁴ : Le phénylpyruvate est éliminé dans les urines ou oxydé en 2-hydroxy-phenylacétate ou phenyl-lactate éliminé dans les urines. Cette voie est activée par les glucocorticoïdes ainsi qu'en réponse à un apport protéique ou en Phe élevé.
2. La production de phényléthylamine sous l'action de la Dopa-décarboxylase. La phényléthylamine est ensuite oxydée⁵ en phénylacétaldéhyde puis en phénylacétate.

Chez l'Homme, le flux (utilisation totale) de phénylalanine est d'environ 46 $\mu\text{mol/kg.h}$ (soit 182 mg/kg.j) dont près de 11% correspondent à l'utilisation de la Phe pour la synthèse de tyrosine (environ 20 mg/kg.j)(Matthews, 2007).

A jeun, les concentrations plasmatiques moyennes en Phe sont de $49 \pm 8 \mu\text{mol/L}$ chez les sujets sains et $77,2 \pm 11,3 \mu\text{mol/L}$ chez les sujets hétérozygotes pour une mutation de la PAH⁶. (Stegink *et al.*, 1991). Par comparaison, les concentrations plasmatiques à jeun sont considérablement plus élevées chez les patients atteints de phénylcétonurie et varient peu entre les périodes postprandiales et post absorptives. En absence de traitement, la concentration plasmatique de Phe est couramment supérieure à 1000 $\mu\text{mole/L}$. La prise en charge diététique des patients vise à maintenir la concentration plasmatique entre 120 et 300 $\mu\text{mole/L}$ entre la naissance et 12 ans, puis de maintenir un régime contrôlé en phénylalanine à vie (HAS, 2011⁷).

3.5.2. Etudes de toxicité de la phénylalanine chez l'animal

Un nombre limité d'études portant sur un éventuel effet toxique de la phénylalanine chez l'animal sont détaillées dans le projet d'avis. La plupart des études sont satellites d'une étude sur l'aspartame et n'utilisent qu'une dose de Phe (cf. encadré ci-dessous).

Rappel des études concernant la toxicité de la phénylalanine analysée dans le rapport provisoire de l'EFSA

- Une étude de Brunner *et al.* chez le rat (Brunner *et al.*, 1979) dans laquelle des femelles ont reçu de la Phe à hauteur de 3% dans l'alimentation avant, pendant et après la gestation (environ 2500 mg/kg/j avant et pendant la gestation, environ 4600 mg/kg/j durant la lactation). Ces animaux sont comparés à des témoins ou des rates recevant de l'aspartame. Les auteurs rapportent une mortalité plus

⁴ Par désamination sous l'action de la L-Amino acid oxydase ou par transamination catalysée par la tyrosine aminotransférase ou la glutamic/oxaloacetic acid transaminase 1.

⁵ Par la monoamine oxydase A ou l'amine oxydase 1.

⁶ Après un repas apportant 42 mg/kg de Phe sous forme protéique (environ 2,9 g par sujet), les concentrations s'élèvent au maximum à $78,1 \pm 11,8$ et $126,0 \pm 21,1 \mu\text{mol/L}$ chez les témoins et hétérozygotes, respectivement (Stegink *et al.*, 1991).

⁷ Protocole national de diagnostic de soin, Phénylcétonurie, Haute Autorité de Santé, 2011

importante dans la descendance des rates recevant la phénylalanine par rapport aux témoins. L'ouverture des yeux chez les nouveau-nés issus des rates recevant la phénylalanine est retardée d'un jour par rapport aux témoins.

- Une autre étude de Holder chez le rat (Holder, 1989) compare des rats témoins et recevant de la phénylalanine (0,45% dans l'eau de boisson) entre le 12^{ème} jour avant conception jusqu'au 38^{ème} jour après la naissance. La consommation estimée de Phe est de 835 mg/kg/j chez les mères et 1795 mg/kg/j chez les ratons après le sevrage. Aucune différence n'est observée entre les groupes témoins et Phe en termes de développement physique et moteur.
- Une étude de toxicologie non publiée fournie par Ajinomoto-Nutrasweet (E49) compare des rates recevant 1800 mg/kg/j de Phe, 1700 mg/kg/j d'acide aspartique (Asp) ou 2100 mg/kg/j de Phe + 1800 mg/kg/j de Asp durant la gestation et la lactation à des rates témoins ou recevant différentes doses d'aspartame. Les résultats montrent une réduction significative du poids chez les rates des groupes Phe et Phe+Asp à J7, J14 et J21 post-partum, en dépit de consommations alimentaires similaires. La taille des portées ne diffère pas entre les groupes témoins et les groupes Phe et Phe+Asp. La survie des ratons à 21 jours est plus faible dans le groupe Phe+Asp (30,7 %) que dans le groupe contrôle (49,5%). L'analyse de l'EFSA souligne la faible survie des ratons dans le groupe témoin rendant les conclusions de l'étude peu robustes.
- Une autre étude non publiée, de toxicité prénatale chez le lapin (E90), a été conduite par gavage, à la dose unique de 820 mg/kg/j de Phe, entre le 6^{ème} et le 18^{ème} jour de gestation. La consommation alimentaire est significativement plus faible dans le groupe Phe par rapport aux témoins (- 40%). L'observation des fœtus au sacrifice des femelles (18^{ème} jour de gestation) montre une augmentation du nombre de résorptions fœtales dans le groupe Phe par rapport aux témoins. Le poids et la longueur des fœtus sont moindres dans le groupe Phe par rapport à ceux du groupe témoin. L'ossification des tarses et métacarpes est également moins importante chez les fœtus du groupe Phe par rapport à ceux du groupe témoins. Des malformations fœtales importantes (hernies ombilicales, omphalocèles) sont significativement plus fréquentes dans le groupe Phe que dans le groupe témoin. Compte tenu de la toxicité observée chez les mères (effet sur le poids corporel), cette étude est difficilement interprétable concernant la toxicité embryonnaire.
- Une revue de Harper (1984) rapporte des retards de croissance chez des rats recevant des doses élevées de Phe.
- Chez le singe rhésus, l'administration de Phe (3000 mg/kg/j) dès la naissance et jusqu'à 3 ans provoque des effets similaires à ceux observés chez des patients atteints de PCU (augmentation de la concentration plasmatique de Phe, élimination urinaire de phénylpyruvate et phénylacétate, crises d'épilepsie, altérations des performances lors de tests d'adaptation évoquant un déficit intellectuel).

Une revue de la littérature non exhaustive met en évidence de nombreuses publications relatives à des études chez le rat et d'autres modèles animaux pour la période 1950-1980 (Annexe 2). La contrainte de temps imposée pour cette expertise n'a pas permis d'obtenir et d'analyser ces publications. Les titres évoquent pour la plupart une réduction de la croissance ou de la synthèse protéique chez des animaux recevant des doses élevées de Phe.

Une étude plus récente de Manabe *et al.* (1993) compare le développement du cerveau chez des fœtus de rat dont la mère reçoit un régime à 10 ou 20% de caséines, supplémenté ou non en Phe (7%). Les auteurs rapportent une réduction importante de la prise alimentaire (- 50%) chez les mères supplémentées en Phe avec une diminution du poids du cerveau des fœtus. La réduction de croissance cérébrale chez les fœtus des groupes supplémentés en Phe est supérieure à celle observée chez des fœtus issus de femelles témoins dont la consommation alimentaire est ajustée sur celle des rates supplémentées en Phe, ce qui suggère un effet propre de la Phe sur le développement cérébral, indépendant de la réduction de prise alimentaire.

L'ensemble de ces travaux suggèrent l'existence d'une toxicité de la Phe sur le développement pré et post natal, pour des doses supérieures ou égales à 800 mg/kg/j chez la femelle gravide et 1800 mg/kg/j chez le nouveau-né. Les effets observés sont principalement un retard de développement, associé à une augmentation de la fréquence des malformations, et une altération du développement cérébral. Ces effets s'expliquent pour partie par une réduction de la prise alimentaire chez la mère supplémentée en Phe à dose élevée, mais aussi par un effet propre de la Phe. Les résultats obtenus chez le lapin sont difficilement interprétables en raison d'une toxicité maternelle avec la Phe, comme avec l'aspartame. Chez l'adulte, les seuls effets rapportés pour des doses équivalentes sont une diminution de la prise alimentaire associée à une réduction du poids.

3.6. Toxicité de la phénylalanine chez l'Homme

Chez l'Homme, les informations disponibles sur la toxicité de Phe dérivent des observations chez les patients atteints de phénylcétonurie. Chez ces patients, les concentrations plasmatiques élevées de Phe à la naissance et pendant l'enfance peuvent conduire en l'absence de prise en charge nutritionnelle adaptée à des atteintes cérébrales irréversibles avec arriération mentale importante (QI < 30), convulsions et troubles importants du comportement (Blau *et al.*, 2010; Mitchell *et al.*, 2011; Giovannini *et al.*, 2012)⁸.

Chez les femmes atteintes de PCU, le contrôle strict des concentrations plasmatiques de Phe durant la grossesse est critique. Une analyse rétrospective sur 196 grossesses chez des mères atteintes de PCU dont 126 sans traitement (Phe plasmatique moyenne = 979 µmol/L) et 70 avec traitement (Phe plasmatique moyenne égale à 572, 310 et 260 µmol/L au 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} trimestres), montre une augmentation des anomalies congénitales conduisant à des séquelles graves dans le groupe non traité. Les anomalies les plus fréquentes concernent le développement du cerveau et de ses dérivés (microcéphalie, malformations faciales, retard intellectuel) ainsi que des malformations cardiaques (Prick *et al.*, 2012). Un retard de développement intra-utérin est également très fréquemment observé chez les enfants nés de mères atteintes de PCU. A l'exception des malformations cardiaques, toutes ces atteintes sont significativement corrélées aux concentrations plasmatiques de Phe durant la grossesse.

3.6.1. Hypothèses relatives au mécanisme d'action toxicologique

Effets des métabolites de la phénylalanine⁹

Un excès de phénylalanine circulante tel que celui observé chez les patients atteints de PCU ou les animaux supplémentés en Phe à très forte dose (> 800 mg/kg/j) est associé à une augmentation de l'excrétion de métabolites tels que le phénylpyruvate, le phénylacétate ou le phényllactate. Cette excrétion signe une augmentation du métabolisme de Phe dans des voies secondaires (transamination, oxydation, décarboxylation) pouvant conduire à la production de composés toxiques.

Quelques études sur la toxicité des métabolites de la Phe

- Toxicité du Phénylacétate (PA) : Chez le raton, l'administration de PA provoque une réduction de 25% de l'épaisseur de la couche moléculaire du cortex cérébelleux avec une diminution du nombre de synapse par neurone (Robain *et al.*, 1983). In vitro, l'ajout de PA à la concentration de 0,6 mM sur des cultures de neurones corticaux provoque une réduction des activités choline-acétyltransférase et glutamate décarboxylase et de la recapture de GABA. Cet effet n'est toutefois pas différent de celui observé en réponse à une dose équivalente de Phe (Swaiman *et al.*, 1984). Une étude de Potemnska *et al.* (1984) suggère que la toxicité neuronale du phénylacétate pourrait être liée à la formation de phénylacétyl-CoA qui est un puissant inhibiteur compétitif de la choline acétyltransférase ($K_i = 3.1 \cdot 10^{-7}$ M). Une étude sur des embryons de souris montre un effet tératogène du PA lorsque ceux-ci sont exposés à de fortes concentrations (> 5 mM) (Denno *et al.*, 1990).
- Toxicité du phénylpyruvate (PP) : L'injection de PP à très forte dose (> 0,5 g/kg) chez des souriceaux induit une hypoglycémie et des atteintes neurocomportementales (Gazit *et al.*, 2003a et 2003b). Les auteurs suggèrent que l'hypoglycémie induite par le PP pourrait être responsable d'une neurotoxicité de ce composé. Une autre étude sur des cultures d'astrocytes humains et murins ne met pas en évidence de cytotoxicité du PP (Oberdoerster *et al.*, 2000).

⁸ Pour prévenir la survenue de ces effets, le NIH recommande le maintien des concentrations plasmatiques en Phe entre 120 et 360 µmol/L entre la naissance et 12 ans et entre 120 et 600 µmol/L au-delà de 12 ans. Il a été montré dans une méta-analyse récente portant sur des enfants jusqu'à 18 ans que toute augmentation de la Phe plasmatique de 100 µmol/L est associée à une perte de QI comprise entre 1,3 et 3,4 points pour des concentrations comprises entre 394 et 750 µmol/L (Waisbren *et al.*, 2007).

⁹ Les hypothèses décrites ci-dessous sont le fruit d'une recherche bibliographique réalisée en plus de celle présentée dans le rapport provisoire de l'EFSA.

- Toxicité de la phényléthylamine (PEA) : De part sa dégradation rapide sous l'action de la monoamine oxydase A et de l'amine oxydase 1, la PEA est un métabolite très minoritaire de la phénylalanine. A la dose de 125-200 mg/kg, la PEA provoque des convulsions chez la souris (Dourish *et al.*, 1983). Une étude sur des embryons de souris montre qu'à forte concentration (1-10 mM), la PEA provoque une létalité embryonnaire et que pour une concentration de 0,1 mM, elle induit des défauts de fermeture du tube neural (Denno *et al.*, 1990). A la dose de 0,5 mM, la PEA inhibe la prolifération d'astrocytes murins ou humains en culture (Oberdoerster *et al.*, 2000).

La toxicité des métabolites de la Phe n'a été observée qu'à des concentrations élevées – équivalentes à celles de Phe – et le plus souvent *in vitro*. En conséquence, l'implication de ces métabolites dans les effets délétères de la Phe observés chez l'animal ou les patients phénylcétonuriques semble peu vraisemblable.

Effets directs de la phénylalanine

Le projet d'avis suggère un effet direct de la phénylalanine lié à une compétition de cet acide aminé avec les gros acides aminés dipolaires (AA°) tels que les acides aminés à chaîne latérale ramifiée (Leu, Ile, Val), la méthionine (Met) et les acides aminés aromatiques (Tyr et Trp).

Plusieurs transporteurs, différant par leurs spécificités, modes de fonctionnement et distributions, sont impliqués dans le transport de la phénylalanine au travers des membranes biologiques.

Transporteurs impliqués dans le transport de la phénylalanine au travers des membranes biologiques

- Les protéines LAT1 (slc7a5) et LAT2 (slc7a8) appartiennent à la famille des transporteurs hétérodimériques s'associant à la protéine 4F2hc pour leur adressage à la membrane plasmique (Verrey *et al.*, 2003). Ces deux protéines catalysent un échange d'acides aminés neutres Na⁺-indépendant, correspondant au système L décrit par Christensen (Christensen *et al.*, 1982). LAT1 est présente dans la barrière hématoencéphalique où elle permet le transport de Phe et des autres AA° au niveau luminal et abluminal, ainsi que dans le placenta (Verrey *et al.*, 2003; Boado *et al.*, 1999). LAT2 est exprimé dans la membrane basolatérale des entérocytes et cellules des tubules rénaux ainsi que dans le placenta (Rossier *et al.*, 1999; Braun *et al.*, 2011). La Phe est l'un des substrats préférentiel de ces deux transporteurs. Il est également important de mentionner que les hormones thyroïdiennes T3 et T4 sont des substrats de LAT1 et LAT2 (Braun *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2007; Ritchie *et al.*, 2001).
- La protéine B0AT1 (slc6a19) est exprimée dans la membrane apicale des entérocytes et cellules de tubules rénaux où elle catalyse un transport Na⁺-dépendant de AA° de la lumière intestinale ou tubulaire vers la cellule correspondant au système B0 (Camargo *et al.*, 2005).
- La protéine TAT1 (slc16a10) est présente dans la membrane basolatérale des cellules intestinale et rénale et des cellules du syncytiotrophoblaste, où elle catalyse spécifiquement l'efflux des acides aminés aromatiques (Ramadan *et al.*, 2006; Cleal *et al.*, 2011).

L'existence d'une compétition entre la Phe et les autres AA° au niveau de la barrière hémato-encéphalique et contribuant aux effets délétères observés chez l'animal en réponse à une supplémentation en Phe à dose élevée ou chez le sujet atteint de PCU en absence de prise en charge nutritionnelle, s'appuie sur les observations suivantes :

- Chez l'Homme, l'administration d'une dose élevée de Phe (100 mg/kg) provoque une réduction significative de la captation par le cerveau de [¹¹C]-aminocyclohexanecarboxylate, un AA° modèle quantifiable par PET-Scan (Shulkin *et al.*, 1995).
- Réciproquement, Pietz *et al.* ont montré par RMN quantitative du proton que chez des patients PCU, la concentration cérébrale de Phe augmente significativement après une charge orale de 100 mg/kg de Phe et que cette augmentation peut être prévenue par l'ingestion d'un mélange d'AA° (Leu, Ile, Val, Met, Tyr, His, Trp à une dose de 150 mg/kg chacun) en 5 prises étalées sur 12 h et commençant 2 h avant la charge de Phe (Pietz *et al.*, 1999).
- S'appuyant sur une mesure des Km pour les transports des différents AA° au niveau de la barrière hémato-encéphalique, Pardridge a proposé que des concentrations plasmatiques en Phe comprises entre 200 et 500 µM sont suffisantes pour affecter significativement le

transport des autres AA° et la synthèse protéique au niveau du cerveau (Pardridge *et al.*, 1998). La diminution de la captation des AA° au niveau de la barrière hémato-encéphalique en réponse à une augmentation de la concentration plasmatique en Phe pourrait expliquer la moindre production de dopamine et sérotonine observée chez le patient atteint de PCU ou dans un modèle murin de PCU (Krause *et al.*, 1985; Pascuci *et al.*, 2002; Pascuci *et al.*, 2008).

A notre connaissance, il n'existe pas d'étude montrant qu'une augmentation de la concentration circulante en Phe telle que celle observée après supplémentation à dose élevée ou chez le patient PCU affecte la mise à disposition des AA° pour le fœtus même si cette hypothèse est vraisemblable au vu des transporteurs impliqués dans le transport des acides aminés au niveau placentaire. Un raisonnement théorique conduirait à conclure à un moindre approvisionnement en AA° du fœtus du fait d'une compétition entre ces acides aminés et la Phe au niveau placentaire, impactant la synthèse protéique et le développement fœtal. Cette compétition pourrait également se répercuter au niveau de la barrière hémato-encéphalique fœtale et affecter le développement cérébral prénatal. Ce raisonnement ne permet cependant pas d'expliquer les malformations observées chez les fœtus ou nouveau-nés de mères ayant des concentrations plasmatiques de Phe élevées en raison d'une PCU ou d'une supplémentation à dose élevée.

Au niveau placentaire et de la barrière hémato encéphalique, il est également possible qu'une concentration plasmatique élevée de Phe puisse impacter le transfert des hormones thyroïdiennes (Taylor *et al.*, 2007). Un déséquilibre thyroïdien est fréquemment observé chez les patients atteints de PCU. Toutefois, l'origine de ce déséquilibre ne peut être attribuée avec certitude à la compétition entre la Phe et la T4 car les patients PCU ont fréquemment des apports insuffisants en sélénium, susceptibles d'affecter le fonctionnement de la thyroïde.

Concernant les effets tératogènes, il semble peu probable que les métabolites de la Phe (phénylacétate, phénylpyruvate, phényléthylamine) y contribuent de façon notable. Les quelques effets tératogènes rapportés pour ces composés n'ont été observés qu'à de très fortes concentrations peu susceptibles d'être atteintes, y compris en cas de PCU.

L'hypothèse d'une compétition entre la Phe et les autres AA° au niveau de transporteurs impliqués dans sa captation au niveau placentaire et de la barrière hématoencéphalique est légitime au vu des connaissances actuelles sur le transport des AA. Cette même question pourrait se poser au niveau de l'absorption intestinale, et mériterait d'être documentée car elle remettrait en cause plus largement l'utilisation du modèle PCU. Au niveau de la barrière hémato-encéphalique, elle est corroborée par des études chez l'Homme et l'animal, et pourrait expliquer les manifestations neurologiques résultant chez l'Homme d'une exposition à des doses élevées de Phe durant la période anténatale et les premières années. Au niveau placentaire, cette compétition est vraisemblable mais non démontrée. Elle pourrait contribuer au retard de croissance intra-utérin mais est insuffisante pour expliquer les effets tératogènes observés.

3.6.2. Conclusions

Les données de la littérature (animal et Homme) suggèrent un possible effet chronique et à dose élevée de la phénylalanine (Phe) sur le développement embryofœtal caractérisé par un retard de développement intra-utérin, des malformations cardiaques et viscérales et des effets neurologiques. Les données sont plus nombreuses et congruentes chez l'Homme que chez l'animal. Chez l'animal, la Phe a montré une toxicité sur le développement à doses élevées, proche de celle observée avec l'aspartame aux plus fortes doses, ce qui plaide pour attribuer un rôle important à la phénylalanine dans les effets repro-toxiques observés, mais il convient de signaler que les données expérimentales sont limitées.

Il apparaît cependant peu probable qu'une compétition entre la Phe et les autres acides aminés soient responsables des effets tératogènes observés chez l'animal. Cette faiblesse du mécanisme d'action avancé est accentuée par le manque de données concernant l'exposition interne en phénylalanine et aux autres métabolites de l'aspartame dans les études animales. L'obtention de ces données permettrait, en effet, de mieux comprendre les

phénomènes de toxicité observés et leurs mécanismes (compétition au niveau hémato-encéphalique, placentaire ou intestinal, synergies).

En conséquence, l'hypothèse de mécanismes de toxicité complémentaires ou de synergies d'action entre différents composés permettant d'expliquer les effets observés chez l'animal, notamment tératogènes, peut être émise.

De ce fait, l'utilisation du modèle PCU, qui repose sur l'hypothèse de la toxicité exclusive de la Phe, même s'il apparaît pertinent, pourrait toutefois s'avérer incomplet compte tenu d'une non prise en compte de l'ensemble des mécanismes toxiques potentiels.

4. CONCLUSIONS DU GECU

Les membres du GECU notent l'importance du travail d'analyse bibliographique et l'originalité de la démarche d'un large appel à contribution adoptée par l'EFSA. Dans le cadre de cette consultation, le GECU a mené une expertise visant à mettre en lumière certaines interrogations ou pistes d'amélioration qui se font jour à la lecture de l'avis provisoire de l'EFSA.

Après analyse du rapport provisoire de l'EFSA, les membres du GECU confirment la crédibilité du mécanisme d'action impliquant la phénylalanine. A lui seul, néanmoins, celui-ci ne peut expliquer l'ensemble des effets toxiques observés, notamment sur le développement prénatal, après administration de l'aspartame chez les animaux.

Des données d'exposition interne aux différents métabolites de l'aspartame dans les études animales permettraient :

- de lever les incertitudes liées aux mécanismes d'actions toxiques potentiels,
- de tester des hypothèses alternatives telle qu'une synergie d'action entre les différents métabolites de l'aspartame,
- et enfin de statuer sur le caractère protecteur des conclusions du modèle PCU.

Dans l'attente des résultats des investigations complémentaires concernant le mode d'action et les synergies potentielles entre métabolites de l'aspartame, il semblerait opportun :

- 1) de retenir les NOAELs dérivées à partir des études de toxicité de la reproduction et du développement.
- 2) Ou, compte tenu de la somme des incertitudes liées aux données disponibles (études épidémiologiques, études de toxicologie, effets potentiels des métabolites...), que le panel considère la pertinence de la prise en compte d'un facteur de sécurité supplémentaire (UF_D^{10}) à ceux classiquement retenus dans l'établissement de la valeur toxicologique de référence. Cela permettrait d'intégrer l'ensemble des données analysées qui, prises isolément n'ont pas été retenues pour l'établissement de la NOAEL, mais qui constituent un faisceau d'informations devant être pris en compte dans l'évaluation du risque.

¹⁰ UF_D : Uncertainty Factor : Regroupe les incertitudes basées sur la confiance accordée aux études de toxicologie et aux effets considérés.

5. CONCLUSIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions du groupe d'expertise collective en urgence.

Le directeur général

Marc MORTUREUX

MOTS-CLES**Aspartame, Avis EFSA****BIBLIOGRAPHIE**

- Beck B, Bulet A, Max JP and Stricker-Krongrad A, Effects of long-term ingestion of aspartame on hypothalamic neuropeptide Y, plasma leptin and body weight gain and composition. *Physiology and Behaviour*, 75, 41-47. 2002.
- Blau N, van Spronsen FJ, Levy HL. Phenylketonuria. *Lancet*. 2010 Oct 23;376:1417-27.
- Boado RJ, Li JY, Nagaya M, Zhang C, Pardridge WM. Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Oct 12;96:12079-84.
- Braun D, Wirth EK, Wohlgemuth F, Reix N, Klein MO, Gruters A, Kohrle J, Schweizer U. Aminoaciduria, but normal thyroid hormone levels and signalling, in mice lacking the amino acid and thyroid hormone transporter *Slc7a8*. *Biochem J*. 2011 Oct 15;439:249-55.
- Brunner RL, Vorhees CV, Kinney L, Butcher RE. Aspartame: assessment of developmental psychotoxicity of a new artificial sweetener. *Neurobehavioral toxicology*. 1979 Spring;1:79-86.
- Camargo SM, Makrides V, Virkki LV, Forster IC, Verrey F. Steady-state kinetic characterization of the mouse B(0)AT1 sodium-dependent neutral amino acid transporter. *Pflugers Arch*. 2005 Nov;451:338-48.
- Christensen HN. Interorgan amino acid nutrition. *Physiol Rev*. 1982;62:1193-233.
- Cleal JK, Glazier JD, Ntani G, Crozier SR, Day PE, Harvey NC, Robinson SM, Cooper C, Godfrey KM, *et al*. Facilitated transporters mediate net efflux of amino acids to the fetus across the basal membrane of the placental syncytiotrophoblast. *J Physiol*. 2011 Feb 15;589:987-97.
- Denno KM, Sadler TW. Phenylalanine and its metabolites induce embryopathies in mouse embryos in culture. *Teratology*. 1990 Nov;42:565-70.
- Dourish CT, Cooper SJ. Pharmacology of beta-phenylethylamine-induced seizures in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1983;7:787-90.
- Easterbrook J, Lu C, Sakai Y, Li APEffects of organic solvents on the activities of cytochrome P450 isoforms, UDP-dependent glucuronyl transferase, and phenol sulfotransferase in human hepatocytes.. *Drug Metab Dispos*. ;29(2):141-4, 2001
- Eells JT, Black KA, Makar AB, Tedford CE, and Tephly TR The regulation of one-carbon oxidation in the rat by nitrous oxide and methionine. *Arch. Biochem. Biophys*. 219 316–326. 1982
- Eells JT, Henry MM, Lewandowski MF, Seme MT and Murray TG Development and characterization of a rodent model of methanol-induced retinal and optic nerve toxicity. *Neurotoxicol. Rev*. 21 321–330. 2000
- Gazit V, Ben-Abraham R, Pick CG, Katz Y. beta-Phenylpyruvate induces long-term neurobehavioral damage and brain necrosis in neonatal mice. *Behav Brain Res*. 2003a Jul 14;143:1-5.
- Gazit V, Ben-Abraham R, Rudin M, Katz Y. Glucose-lowering effect of beta-phenylpyruvate in neonatal mice: a possible mechanism for phenylketonuria-related neurodegenerative changes. *Brain Res Dev Brain Res*. 2003b Mar 14;141:137-40.
- Giovannini M, Verduci E, Salvatici E, Paci S, Riva E. Phenylketonuria: nutritional advances and challenges. *Nutrition & metabolism*. 2012;9:7.
- Holder MD. Effects of perinatal exposure to aspartame on rat pups. *Neurotoxicology and teratology*. 1989 Jan-Feb;11:1-6.
- Humphries P, Pretorius E, Naude H Direct and indirect cellular effects of aspartame on the brain. *Eur J Clin Nutrition* 62: 451–462. 2008
- Inouye M, Murakami U Brain lesions in mouse infants and fetuses induced by monosodium L. aspartate. *Congen Anomal* 13: 235–244. 1973

- Ishii H, Incidence of brain tumors in rats fed aspartame, *Toxicology Letters*, Volume 7(6): 433-37, 1981a
- Ishii H, Koshimizu T, Usami S, Fujimoto T, Toxicity of aspartame and its diketopiperazine for Wistar rats by dietary administration for 104 weeks, *Toxicology*, Volume 21(2):91-94, 1981b
- JECFA, Toxicological evaluation of certain food additives : aspartame, WHO food additive series No 15, Report series No 653, 1980
- Jeganathan PS and Namasivayam A Methanol induced biogenic amine changes in discrete areas of rat brain: Role of simultaneous ethanol administration. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 32 1–1. 1998
- Johlin FC, Fortman CS, Nghiem DD and Tephly TR Studies on the role of folic acid and folate-dependent enzymes in human methanol poisoning. *Mol. Pharmacol.* 31 557–561. 1987
- Krause W, Halminski M, McDonald L, Dembure P, Salvo R, Freides D, Elsas L. Biochemical and neuropsychological effects of elevated plasma phenylalanine in patients with treated phenylketonuria. A model for the study of phenylalanine and brain function in man. *J Clin Invest.* 1985 Jan;75:40-8.
- Koehler SM and Glaros A, The effect of aspartame on migraine headache. *Headache*, 28, 10-14. 1988.
- Lipton RB, Newman LC, Cohen JS and Solomon S., Aspartame as a dietary trigger of headache. *Headache*, 29, 90-92. 1989
- Lu K, Collins LB, Ru H, Bermudez E and Swenberg JA., Distribution of DNA adducts caused by inhaled formaldehyde is consistent with induction of nasal carcinoma but not leukemia. *Toxicological Sciences*, 116, 441–451. 2010
- Lu K, Gul H, Upton PB, Moeller BC and Swenberg JA., Formation of hydroxymethyl DNA adducts in rats orally exposed to stable isotope labeled methanol. *Toxicological Sciences*, 126, 28-38. 2012
- Manabe S, Inui K, Uenishi K. Effect of excess phenylalanine diet during pregnancy on fetal brain growth in rats. *Tokushima J Exp Med.* 1993 Dec;40:125-35.
- Matthews DE. An overview of phenylalanine and tyrosine kinetics in humans. *J Nutr.* 2007 Jun;137:1549S-55S; discussion 73S-75S.
- Mitchell JJ, Trakadis YJ, Scriver CR. Phenylalanine hydroxylase deficiency. *Genet Med.* 2011 Aug;13:697-707.
- Oberdoerster J, Guizzetti M, Costa LG. Effect of phenylalanine and its metabolites on the proliferation and viability of neuronal and astroglial cells: possible relevance in maternal phenylketonuria. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000 Oct;295:295-301.
- Olney JW, Labruyere J and De Gubareff T Brain damage in mice from voluntary ingestion of glutamate and aspartate. *Neurobehav. Toxicol.* 2 125–129. 1980
- Osterloh JD, Pond SM, Grady S and Becker CE Serum formate concentrations in methanol intoxication as a criterion for hemodialysis. *Ann Intern Med.* 104 2000–2003. 1986
- Pardridge WM. Blood-brain barrier carrier-mediated transport and brain metabolism of amino acids. *Neurochem Res.* 1998 May;23:635-44.
- Pascucci T, Andolina D, Ventura R, Puglisi-Allegra S, Cabib S. Reduced availability of brain amines during critical phases of postnatal development in a genetic mouse model of cognitive delay. *Brain Res.* 2008 Jun 27;1217:232-8.
- Pascucci T, Ventura R, Puglisi-Allegra S, Cabib S. Deficits in brain serotonin synthesis in a genetic mouse model of phenylketonuria. *Neuroreport.* 2002 Dec 20;13:2561-4.
- Pietz J, Kreis R, Rupp A, Mayatepek E, Rating D, Boesch C, Bremer HJ. Large neutral amino acids block phenylalanine transport into brain tissue in patients with phenylketonuria. *J Clin Invest.* 1999 Apr;103:1169-78.
- Potempska A, Loo YH, Wisniewski HM. On the possible mechanism of phenylacetate neurotoxicity: inhibition of choline acetyltransferase by phenylacetyl-CoA. *J Neurochem.* 1984 May;42:1499-501.
- Prick BW, Hop WC, Duvekot JJ. Maternal phenylketonuria and hyperphenylalaninemia in pregnancy: pregnancy complications and neonatal sequelae in untreated and treated pregnancies. *Am J Clin Nutr.* 2012 Feb;95:374-82.
- Puică C, Crăciun C, Rusu M, Cristescu M, Borsa M and Roman I., Ultrastructural aspects concerning the hypothalamus-pituitary complex reactivity following chronic administration of aspartame in juvenile rabbits. *Bulletin UASVM, Veterinary Medicine*, 65, 424-429. 2008

- Puică C, Crăcium C, Rusu M, Cristescu M, Borsa M and Roman I,. Ultrastructural aspects concerning the hypothalamus-pituitary complex reactivity following chronic administration of aspartame in juvenile rats. *Studia Universitatis "Vasile Goldiș", Seria Științele Vieții*, 19, 19-24. 2009
- Ramadan T, Camargo SM, Summa V, Hunziker P, Chesnov S, Pos KM, Verrey F. Basolateral aromatic amino acid transporter TAT1 (Slc16a10) functions as an efflux pathway. *J Cell Physiol*. 2006 Mar;206:771-9.
- Ritchie JW, Taylor PM. Role of the System L permease LAT1 in amino acid and iodothyronine transport in placenta. *Biochem J*. 2001 Jun 15;356:719-25.
- Robain O, Wisniewski HM, Loo YH, Wen GY. Experimental phenylketonuria: effect of phenylacetate intoxication on number of synapses in the cerebellar cortex of the rat. *Acta Neuropathol*. 1983;61:313-5.
- Rossier G, Meier C, Bauch C, Summa V, Sordat B, Verrey F, Kuhn LC. LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *J Biol Chem*. 1999;274:34948-54.
- Seitz, H.K., and Stickel, F. Risk factors and mechanisms of hepatocarcinogenesis with special emphasis on alcohol and oxidative stress. *Biological Chemistry* 387 : 349-360. 2006
- Shulkin BL, Betz AL, Koeppe RA, Agranoff BW. Inhibition of neutral amino acid transport across the human blood-brain barrier by phenylalanine. *J Neurochem*. 1995 Mar;64:1252-7.
- Stegink LD, Filer LJ, Jr., Brummel MC, Baker GL, Krause WL, Bell EF, Ziegler EE. Plasma amino acid concentrations and amino acid ratios in normal adults and adults heterozygous for phenylketonuria ingesting a hamburger and milk shake meal. *Am J Clin Nutr*. 1991 Mar;53:670-5.
- Swaiman KF, Wu SR. Phenylalanine and phenylacetate adversely affect developing mammalian brain neurons. *Neurology*. 1984 Sep;34:1246-50.
- Taylor PM, Ritchie JW. Tissue uptake of thyroid hormone by amino acid transporters. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2007 Jun;21:237-51.
- Tephly TR. Comments on the purported generation of formaldehyde and adduct formation from the sweetener aspartame. *Life Sci.*, 65(13), 157-160. 1999
- Trocho C, Pardo R, Rafecas I, Virgili J, Remesar X, Fernandez-Lopez JA, Alemany M. Formaldehyde derived from dietary aspartame binds to tissue components in vivo. *Life Sci.*, , 63(5) 337-349. 1998
- Verrey F. System L: heteromeric exchangers of large, neutral amino acids involved in directional transport. *Pflugers Arch*. 2003 Feb;445:529-33.
- Waisbren SE, Noel K, Fahrbach K, Cella C, Frame D, Dorenbaum A, Levy H. Phenylalanine blood levels and clinical outcomes in phenylketonuria: a systematic literature review and meta-analysis. *Mol Genet Metab*. 2007 Sep-Oct;92:63-70.

ANNEXE 1 – REMARQUES FAITES A L'EFSA VIA LE SITE INTERNET

Les conclusions intermédiaires ainsi que les conclusions du GECU ont été transmises à l'EFSA

Ligne 3036: «Since the events leading to exclusion occurred before the outcome of pregnancy was known, they would not be expected to have given rise to bias». En effet, il n'est pas précisé si les 59 334 personnes incluses dans cette étude diffèrent pour certaines caractéristiques des 91 827 femmes initiales.

Ligne 3069: Plus d'informations devraient être données sur les termes «Not mutually confounded».

Ligne 3079: Suggestion : Ecrire plutôt qu'il n'est pas possible d'identifier un mode clair d'action.

Ligne 3121: Désaccord sur le fait que les deux études rapportées ont été «well designed». En effet, de nombreux biais méthodologiques, précédemment rapportés par l'EFSA ou par l'ANSES, sont des limites à cette étude.

Ligne 3136: Plus d'informations devraient être données concernant la manière dont ont été récoltées les informations.

Ligne 3138: Y a-t-il eu ajustement dans les analyses statistiques présentées ?

Lignes 3167 à 3169: Phrase à clarifier.

Ligne 3397: Une définition de «sensitive to sugar» mériterait d'être donnée.

Ligne 3410: Les limites d'âge mériteraient d'être notées plutôt que «pre-school children and school children».

Ligne 3496: L'âge des enfants pourrait être ajouté.

Lignes 3525 à 3528: Cela ressemble plus à une conclusion qu'à une introduction sur les effets de l'aspartame sur le mal de tête. De plus, les conclusions de ce paragraphe semblent en total désaccord avec ce qui est suggéré à la ligne 3 568.

Ligne 3544: Il serait intéressant de savoir si les différences sont statistiquement significatives.

Ligne 3555: Il est indiqué que 32 sujets ont été inclus dans l'étude. La conclusion en lignes 3 566 et 3 567 est qu'il n'est pas possible de réaliser une conclusion car il y a trop peu de sujets inclus dans cette étude. Or, l'étude rapportée en ligne 3 529 ne comporte que 40 individus et aucune conclusion de ce type n'est rapportée.

Lignes 3577 à 3579: Les données devraient être rapportées d'une manière plus exhaustive et systématique.

Ligne 3585: Il manque peut-être une conclusion à ces effets de l'aspartame en se basant sur l'ensemble des études rapportées dans ces paragraphes.

Lignes 3595 & 3617: On parle d'études in vitro. Or, on devrait se focaliser uniquement sur les études à visée humaine.

Lignes 3600 à 3605: Beaucoup plus de données chiffrées devraient être présentées, que ce soit en ce qui concerne les patients ou en ce qui concerne les résultats.

Ligne 5018 : Il y a un effet toxique direct de la Phé sur le fonctionnement cérébral par de très nombreuses modalités, le texte est très réducteur.

Ligne 5024 : Cela est faux, les mild HPA ont des taux compris entre 180 et 368 $\mu\text{mol/L}$ pour certains pays et entre 180 et 600 $\mu\text{mol/L}$ pour d'autres comme la France. Ce ne sont que les classical PKU, moderate et mild PKU qui ont des taux $> 600 \mu\text{mol/L}$

Ligne 5029 : Les augmentations aiguës ont beaucoup moins d'importance que l'intoxication chronique. La PKU n'est pas une maladie d'urgence.

Ligne 5036 : La littérature à ce sujet est très abondante, et cette phrase ne représente pas la réalité.

Ligne 5038 : Et il est même suggéré par la dernière conférence de consensus NIH de maintenir les adultes $< 360 \mu\text{mol/L}$.

Ligne 5053 : Ce papier est essentiel, le problème, c'est qu'il ne différencie pas les patients entre 394 et 600 et les patients entre 600 et 750, et si tout le monde est d'accord pour

traiter au dessus de 600µmol/L, les seuls papiers qui ont étudié le devenir des patients dont les taux sont entre 360 et 600 µmol/L ont montré que le devenir de ces patients est normal...

- Ligne 5066 : C'est très important, car plus on s'approche des 600 µmol/L, plus la variabilité du taux augmente, et peut être que cela impacte sur le devenir final, le niveau auquel il y a un réel impact est encore en discussion
- Ligne 5177 : Il faut se représenter ce que veut dire 2000 mg/kg quand on parle de nutrition humaine. Les apports de protéines (très au-dessus des apports recommandés) chez l'Homme avoisine les 3 g/kg de poids corporel. La phénylalanine représente au maximum 5% des acides aminés des protéines, ce qui entraînera un apport de phénylalanine de 150 mg par jour et par kg, ce qui est 15 fois inférieur à la dose annoncée. Ce simple calcul montre bien à quel point il est impossible d'aboutir à des apports ne serait-ce qu'approchant la NOAEL.
- Ligne 5204 : Il y a un problème majeur, en prenant comme modèle la PKU pour la toxicité de l'aspartame dans la population générale. Le paramètre toxique dans la PKU est le taux de Phénylalanine qui est élevé dans le sang. Hors, ceci ne peut jamais arriver chez l'individu normal, car l'activité enzymatique de la PAH permet de métaboliser des quantités majeures de phénylalanine. Ceci est démontré, en particulier pendant la grossesse des femmes PKU. En effet, la tolérance en phénylalanine reste identique tout au long de la vie pour un même individu PKU. Pendant la grossesse, la tolérance en phénylalanine augmente drastiquement pendant le troisième trimestre de grossesse quand le foie fœtal devient « enzymatiquement » fonctionnel et l'on voit la tolérance en phénylalanine de la mère (sans pour autant modifier les taux plasmatiques de phénylalanine) augmenter drastiquement, pouvant passer de 300 à plus de 1000 mg par jour. Cela veut dire que le foie fœtal (le poids du fœtus fait alors entre 1 et 3 kg pour la toute fin de grossesse) est capable de métaboliser de 300 à 500 (voire plus) mg/kg/jour de phénylalanine. Il n'y a aucune raison pour que cette capacité métabolique diminue ensuite avec l'âge. En conséquence, le foie est capable de métaboliser, sans modifier les taux plasmatiques de Phé, des quantités considérables de phénylalanine, et le critère des taux de Phé (qui est le critère majeur pour la toxicité dans la PKU) ne pourra jamais être utilisé pour une population d'individus normaux (sans PKU) car le taux plasmatique de Phé n'augmentera jamais. Il faut bien redire ici, que c'est bien le taux plasmatique de Phé qui est délétère dans la PKU et non le niveau d'apport digestif... qui est le seul critère opposable pour la prise d'aspartame chez l'individu non PKU.
- Ligne 2032: souris âgées de 28 j non matures sexuellement
- Ligne 2045: valeurs historiques. Les valeurs Hazleton ne figurent pas dans le rapport et ne peuvent donc être vérifiées.
- Ligne 2065 : L'âge n'est pas précisé dans le rapport. La forte dose était au départ de 6000 puis augmentée progressivement à 8000 mg/kg/j en semaine 44
- Ligne 2072: Nécessité de davantage de précisions sur la mortalité en cours et en fin d'étude, l'évolution de la courbe pondérale sur les différents groupes expérimentaux. Le groupe femelle 8 g ne comporte que 10 animaux en fin d'étude.
- Ligne 2083 : préciser que le pancréas a également fait l'objet d'analyse histologique.
- Lignes 2086-2087-2230 : préciser le taux d'incidence des hyperplasies. Sont-elles significatives ?
- Ligne 2093 : quantifier l'incidence d'élévation des fibroses pancréatiques et préciser qu'elles sont sans traduction histologique puisque le pancréas a été analysé
- Ligne 2156 : Les valeurs historiques d'Hazleton ne sont pas communiquées dans le rapport et ne peuvent donc pas être vérifiées.
- Ligne 2169 : Le tableau 19 est incomplet pour pouvoir être interprété tel quel, il est nécessaire de détailler le nombre d'animaux sacrifiés en fin d'étude mais également de ceux sacrifiés/moribonds ou morts en cours d'étude. L'examen du taux de survie et de la baisse de gain de poids corporel permet de savoir si la forte dose administrée est proche de la MTD. Afin de pouvoir être interprétés isolément, la majorité des tableaux résumant les résultats d'une étude de cancérogénèse précisent : Daily dose (mg/kg/j) Number of animals at start, Died/Sacrificed/Moribund , Terminal sacrifice ; Survival (%) Body weight (%) Food consumption (%).

- Ligne 2193 : rappeler la définition de l'OCDE 451: même centre d'expérimentation, même souche, même durée d'étude et pas plus de 5 ans d'ancienneté.
- Ligne 2196 : « ... JECFA concluded that aspartame did not cause brain tumors in rats (JECFA, 1980). The panel agreed with this conclusion ». Il serait préférable de mettre en avant le fait que les études ne mettent pas en évidence de tumeurs chez les rats.
- Ligne 2203 : souligner l'absence de valeurs détaillées sur la baisse de gain de poids corporel et la consommation alimentaire
- Ligne 2218 : il est vrai que les phénomènes de minéralisation rénale sont assez fréquents chez le rat âgé mais ils devraient survenir avec la même incidence entre les témoins et les traités. Il y a donc un effet-produit s'expliquant probablement par la quantité importante éliminée par voie urinaire
- Ligne 2239 : Cette étude n'apporte rien au problème examiné d'autant que le hamster est une espèce très rarement utilisée dans le cadre des études de cancérogénèse et pour laquelle il n'existe pas de banque de données pertinentes.
- Ligne 2264 : il ne peut s'agir en aucun cas d'une étude de cancérogénèse mais seulement d'une étude de toxicité très longue durée. Elle présente l'avantage de fournir des données sur la toxicité systémique chez un animal non rongeur. Dans ce type d'étude (non rongeur), le nombre d'animaux mis en jeu ne dépasse jamais 5 animaux/sexe/dose (fiche OCDE 409) ce qui exclue tout traitement statistique des résultats. La durée d'étude maximale est de 1 an.
- Ligne 2272 : Dans cette étude le nombre d'animaux est très insuffisant (en général entre 3 et 5)
- Ligne 2290 : préciser qu'il s'agit d'animaux d'élevage et non pas de capture (A l'époque, les singes étaient souvent de capture à l'état sauvage sans la moindre homogénéité physiologique)
- Ligne 2344 : "Other studies carried out at the same time including the aspartame studies" Ceci n'est pas très clair étant donné que l'étude conduite par le NTP sur les études de l'ERF concerne des études conduites entre 1974 et 1993 alors que les études menées sur l'aspartame l'ont été à partir des années 2000.
- Ligne 3736-3742 : Ces valeurs historiques de tumeurs spontanées ne peuvent être exploitées en l'état pour les raisons citées précédemment

ANNEXE 2

- Wretling KA. The availability for growth and the toxicity of L- and D-phenylalanine. *Acta Physiol Scand.* 1952 Jun 6;25:276-85.
- Neame KD. Phenylalanine as inhibitor of transport of amino-acids in brain. *Nature.* 1961 Oct 14;192:173-4.
- Waisman HA, Harlow HF. Experimental Phenylketonuria in Infant Monkeys. *Science (New York, NY).* 1965 Feb 12;147:685-95.
- Dolan G, Godin C. Phenylalanine toxicity in rats. *Can J Biochem.* 1966 Jan;44:143-5.
- O'Brien D, Ibbot FA. Effect of prolonged phenylalanine loading on the free amino-acid and lipid content of the infant monkey brain. *Dev Med Child Neurol.* 1966 Dec;8:724-8.
- Pscheidt GR, Tamimie HS. Brain amines and brain weights in growing chicks: some normal values and effects of feeding excess dietary l-phenylalanine. *Biochem Pharmacol.* 1966 Oct;15:1629-32.
- Klavins JV. Pathology of amino acid excess. VII. Phenylalanine and tyrosine. *Arch Pathol.* 1967 Sep;84:238-50.
- Ryan MF, De Long J, Tuttle JM, Giles CE. Some biochemical consequences of feeding excesses of phenylalanine to rats. *J Ment Defic Res.* 1967 Sep;11:153-68.
- Tamimie HS. Influence of niacin and L-tryptophan on the growth depressive performance of chicks fed high levels of L-phenylalanine and L-methionine. *Life Sci.* 1967 Mar 15;6:587-94.
- Barbato L, Barbato IW, Hamanaka A. The in vivo effect of high levels of phenylalanine on lipids and RNA of the developing rabbit brain. *Brain Res.* 1968 Mar;7:399-406.
- Swaiman KF, Hosfield WB, Wolfe RN, Lemieux B. Influence of high plasma phenylalanine concentration on incorporation of lysine into protein of developing brain. *Neurology.* 1968 Mar;18:300.
- Chase HP, O'Brien D. Effect of excess phenylalanine and of other amino acids on brain development in the infant rat. *Pediatr Res.* 1970 Jan;4:96-102.
- Geison RL, Waisman HA. Effects of excess dietary phenylalanine on composition of cerebral lipids. *J Neurochem.* 1970 Apr;17:469-74.
- Rudolph N, Bethel JJ. Protein synthesis in liver and brain microsomes isolated from rats fed a high phenylalanine diet. *J Nutr.* 1970 Jan;100:21-9.
- Hole K. Arousal defect in L-phenylalanine fed rats. *Dev Psychobiol.* 1972;5:149-56.
- Geison RL, Josephson L. Lipid metabolism in liver and brain in acute hyperphenylalaninemia in rats of different ages. Correlation with tissue phenylalanine and tyrosine levels. *Biol Neonate.* 1974;24:161-86.
- Truscott TC. Effects of phenylalanine and 5-hydroxytryptophan on seizure severity in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 1975 Sep-Oct;3:939-41.