

## **AVIS**

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

**relatif à l'évaluation du rapport d'évaluation initiale des autorités belges concernant  
la mise sur le marché d'un nouvel ingrédient alimentaire : extrait de son de blé**

#### **1. RAPPEL DE LA SAISINE**

L'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail a été saisie le jeudi 10 février 2011 par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes d'une demande d'avis relatif à l'évaluation du rapport d'évaluation initiale des autorités belges (Conseil Supérieur de la Santé) concernant la mise sur le marché d'un nouvel ingrédient alimentaire : extrait de son de blé.

#### **2. CONTEXTE**

Cet avis s'inscrit dans le cadre du règlement 258/97/CE relatif aux nouveaux aliments et nouveaux ingrédients alimentaires. L'objet de cette demande appartient à la classe 2.1, soit un nouvel ingrédient complexe issu de sources non génétiquement modifiées, ayant déjà été utilisé comme aliment dans la communauté.

#### **3. METHODE D'EXPERTISE**

L'expertise collective a été réalisée par les Comités d'experts spécialisés (CES) « Biotechnologie » réuni le 17 mars 2011, le CES « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques » réuni le 24 mars 2011 et le CES « Nutrition humaine » réuni le 31 mars 2011.

#### **4. ARGUMENTAIRE**

L'argumentaire de l'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail est fondé sur l'avis des Comités d'experts spécialisés « Nutrition humaine », « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques » et « Biotechnologie » dont les éléments sont présentés ci-dessous :

##### **4.1. Spécification du nouvel ingrédient**

Le nouvel ingrédient (NI) est un extrait de son de blé sous la forme d'une poudre blanche. Le NI est enrichi en oligosaccharides de type arabinoxylyanes (AXOS). Sur 94 % de matière sèche, au moins 90% est constitué de poly- et oligosaccharides, dont au minimum 70% d'AXOS et 10 à 14 % de  $\beta$ -glucanes. Les protéines et les cendres représentent au maximum 2% de la matière sèche, l'autre

constituant principal est l'acide férulique lié aux l'AXOS qui représente 1% à 3% du NI. Le degré de polymérisation des AXOS doit être compris entre 3 et 8.

Les arabinoxylanes sont les hémicelluloses les plus répandues dans les parois végétales des grains de céréales, incluant le blé. Les AXOS sont des mélanges d'arabinoxyloligosaccharides et de xylo-oligosaccharides (XOS), qui contiennent des monomères de D-xylose unis par des liaisons  $\beta$ -1,4 avec des unités  $\alpha$ -L-arabinose en position O-2 et/ou O-3. Les acides glucuronique et férulique sont également des substitués présents sur les AXOS. Selon les résultats du pétitionnaire repris par le CSS belge, les résidus xylose sont monosubstitués à un taux d'environ 9 % et di-substitué (O-2 et O-3) à un taux d'environ 5%.

Les  $\beta$ -glucanes sont la seconde classe d'hémicelluloses (environ 12,6%) dans le NI. Les résidus sont composés de deux à trois molécules de glucose unies par des liaisons  $\beta$ -1,4 et/ou  $\beta$ -1,3. Le degré de polymérisation moyen supérieure ou égale à 3.

Afin d'analyser la variation de la composition du produit, cinq lots ont été testés. La teneur en AXOS était de l'ordre de 75%, le pétitionnaire s'accorde une marge d'erreur en mentionnant « au moins 70% d'AXOS (/matière sèche du NI) », en raison de possibles variabilités de la matière première. Des résidus de gluten ont été trouvés, pouvant atteindre 0,5%. Le pétitionnaire assure la transparence en mentionnant que le NI contient du gluten et des composés dérivés des protéines de blé susceptibles d'induire des réactions d'intolérance ou d'allergie au gluten.

La qualité microbiologique du NI a été testée et aucune présence anormalement élevée n'a été détectée pour les levures, les champignons, les coliformes, les salmonelles, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* et *Clostridium botulinum*.

L'analyse des teneurs en mycotoxines, métaux lourds, résidus de pesticides, et composés néoformés (par traitement à la chaleur : furfural, 5-hydroxyméthylfurfural, acrylamide) dans cinq lots ne révèlent aucune anomalie. Le Conseil Supérieur de la Santé (CSS) ajoute que des données supplémentaires ont montré que des contaminants hydrophobes associés à des fractions non solubles sont éliminés au cours du fractionnement. Les contaminants restants tels que les métaux lourds, sont principalement retirés par un procédé d'échange d'ions. Les phytates et les produits d'hydrolyse de l'acide phytique sont également éliminés lors du procédé de production.

La teneur en sodium se situe entre 0,09 et 0,5 %.

*Le CSS considère que les méthodes de détermination de la composition du NI sont adaptées et décrites en détails.*

***Les analyses conduites sur cinq échantillons n'ont pas montré de niveaux qui dépasseraient les limites maximales autorisées dans le règlement 1881/2006/EC. L'Anses observe que pour le moment, ce règlement ne fixe aucune limite maximale pour les mycotoxines HT-2 et T-2, bien que cela soit prévu.***

#### 4.2. Effets du procédé de production appliqué au nouvel ingrédient

Le NI est produit à partir de son de blé soumis à des étapes d'hydrolyse enzymatique, de lavages et de purifications successives puis de concentration et de séchage. Le procédé commence par l'hydrolyse de l'amidon présent dans le son de blé sous l'action d'une  $\alpha$ -amylase. En milieu hydrique, les hémicelluloses insolubles dans l'eau sont dépolymérisées par une activité xylanase afin de libérer en solution des AXOS. Les AXOS sont purifiés par chromatographie échangeuse d'ions, concentrés puis séchés pour obtenir le NI.

Les préparations enzymatiques ( $\alpha$ -amylase et xylanase) mises en œuvre ne sont pas spécifiées par le pétitionnaire. Les différentes étapes du procédé de production conduisent à une absence d'activités résiduelles dans le NI pour ces deux enzymes.

*Le CSS considère que ces procédés et traitements sont d'usage courant. Les produits utilisés sont de qualité alimentaire. Les enzymes employées le sont également dans d'autres applications comme la brasserie.*

***L'Anses estime que les données fournies dans le dossier sont insuffisantes pour permettre une évaluation de la sécurité des enzymes au regard des éléments scientifiques demandés pour une autorisation d'emploi par l'Anses<sup>1</sup>.***

Un plan HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) pour la production de l'AXOS a été mis en place, avec une attention particulière portée sur la présence de micro-organismes dans le produit final, le pré-traitement, l'utilisation et la régénération des échangeurs d'ions, les conditions de pasteurisation, la présence de corps étrangers dans le produit durant la filtration, et la croissance des bactéries après emballage. La stabilité durant le stockage a également été étudiée. Une étude d'une durée de 18 mois après la production n'a montré aucune modification microbiologique ni dégradation des poly- et oligosaccharides.

*Le CSS explique qu'en ce qui concerne la stabilité du produit dans une matrice alimentaire l'analyse a été faite avec une boisson gazeuse. Aucune hydrolyse des  $\beta$ -glucanes n'a été observée dans cette matrice qui a un pH de 4.*

Les protéines restantes dans le NI sont de nature peptidique de petite taille (di-peptides à penta-peptides avec un pic à 200-400 Daltons). Le pétitionnaire considère que le risque de réactions allergiques provoquées par ce type de petits peptides est limité, mais il reconnaît que les traces de gluten et des composés dérivés des protéines de blé présentent un risque d'hypersensibilité et de réactions allergiques. Ce risque fera l'objet d'une information aux consommateurs.

***L'Anses est en accord avec les conclusions du CSS.***

### **4.3. Utilisation antérieure de l'organisme utilisé comme nouvel ingrédient**

Le son de blé utilisé dans la fabrication du NI n'est pas issu d'un blé génétiquement modifié. Il a été utilisé depuis de nombreuses années comme un ingrédient dans de nombreux aliments (par exemple, les céréales de petit-déjeuner) et dans l'alimentation animale.

*Selon le CSS, le risque potentiel encouru suite à la consommation d'extrait de son de blé est similaire, sinon moindre, à celui associé avec la consommation du son de blé.*

***L'Anses n'a pas de réserve concernant les informations fournies sur l'utilisation antérieure du son de blé utilisé comme source de NI.***

### **4.4. Consommation/niveau d'utilisation prévue du nouvel ingrédient**

L'extrait de son de blé a pour vocation à être ajouté à certains aliments en tant qu'ingrédient prébiotique et contribuer à une augmentation de l'apport en fibres. Plusieurs scénarios ont été élaborés par le pétitionnaire avec une consommation allant de 1 à 3 g d'extrait de son de blé par portion, ce qui correspond à un apport de 0,8 à 2,4 g d'AXOS par portion. Les aliments concernés sont les boissons non alcoolisées, les céréales « prêtes à consommer » (céréales pour petit-déjeuner et barres de céréales), les produits laitiers et autres aliments à base de lait, la bière et les produits dérivés, la viande et les produits dérivés.

Le NI n'est pas destiné à être ajouté aux aliments pour bébés. Le pétitionnaire indique qu'il n'a pas l'intention de commercialiser le NI en tant que complément alimentaire ou en tant qu'ingrédient

---

<sup>1</sup> Guide pour la constitution d'un dossier relatif à l'emploi de préparations enzymatiques destinées à l'alimentation humaine (septembre 2003)

dans les compléments alimentaires. Il ne souhaite pas non plus ajouter le NI dans le pain en raison du coût de l'ingrédient.

Le CSS explique que les niveaux de consommation ont été déterminés par l'EFSA en utilisant une base de données disposant de données de consommation dans 16 pays de l'Union européenne. L'exposition moyenne par l'alimentation est comprise entre 3 et 9 g de NI par personne et par jour, avec une valeur médiane de 6 g/personne/jour.

L'exposition est considérée comme maximale lorsque les critères suivants sont remplis :

- le NI est ajouté à cinq catégories d'aliments ;
- le NI est ajouté à chaque catégorie à la concentration maximale ;
- les consommateurs ayant des apports moyens et élevés consomment ces produits simultanément sur une base régulière.

Cette simulation montre une exposition moyenne sur le long-terme de 9 g/personne/jour. La valeur maximale pour des niveaux élevés de consommation sur une courte période est de 29 g/personne/jour.

Mise à part une augmentation du contenu en fibres, le NI ne devrait pas altérer la valeur nutritionnelle des produits alimentaires. Le NI peut représenter une alternative à d'autres ingrédients polysaccharidiques non digestibles actuellement ajoutés dans les produits alimentaires (principalement l'inuline, les fructo-oligosaccharides, le polydextrose, et les maltodextrines résistantes).

Le pétitionnaire considère que le NI peut avoir un effet différent des autres fibres et ne peut donc pas être considéré comme un remplaçant des fibres naturelles de l'alimentation mais comme un complément. Le NI peut être utilisé comme une source secondaire de fibres comme le sont l'inuline et les fructo-oligosaccharides dans les aliments transformés.

Le NI ne devrait pas être consommé par les individus allergiques au blé ou ayant une intolérance au gluten. Ceci doit être clairement indiqué sur l'emballage des produits qui contiennent le NI.

***L'Anses confirme les conclusions du CSS quant aux simulations des consommations de NI et ajoute que la présence de gluten ou dérivés de protéines de blé devra être mentionnée sur l'étiquetage.***

#### **4.5. Informations fournies par une exposition humaine antérieure au nouvel ingrédient ou à sa source**

En fonction du modèle utilisé, la consommation moyenne de son de blé provenant du pain complet varie de 47 g/jour/consommateur en Turquie à 9 g/jour/consommateur au Royaume-Uni avec une valeur médiane de 16 g/jour/consommateur et 31 g/jour/consommateur pour le 95<sup>ème</sup> percentile. Dans cette simulation, il est considéré que le pain consommé en Europe est principalement fabriqué à base de farine de blé. Le CSS rapporte que dans un document complémentaire le pétitionnaire justifie l'utilisation du pain complet comme vecteur principal d'apport de son en Europe.

En ce qui concerne les autres sources de son de blé, le pétitionnaire ajoute que les données ne sont disponibles que pour le Royaume-Uni. Outre le pain complet, les céréales de petit-déjeuner au blé complet et les biscuits contribuent à l'apport en son de blé.

La moyenne et le 95<sup>ème</sup> percentile des consommations d'arabinoxylanes provenant des céréales raffinées dans l'Union européenne sont estimées entre 3 (fourchette de 0,9 à 3,6) et 5,6 (fourchette de 2,5 à 7,2) g/jour/consommateur respectivement. En ce qui concerne la consommation de céréales complètes, les valeurs respectives sont de 10,2 et 19,2 g/jour/consommateur. Ces arabinoxylanes constituent une source indirecte d'AXOS, puisqu'ils sont partiellement convertis en AXOS durant la digestion microbienne.

Il est estimé que 60% des arabinoxylyanes consommés sont fermentés par le microbiote intestinal. Les propriétés physico-chimiques sont un déterminant majeur pour cette fermentation. Les arabinoxylyanes hydrosolubles sont plus facilement fermentés que les insolubles. Les liaisons avec l'acide férulique sont aussi importantes pour la biodisponibilité des arabinoxylyanes. Ce composé est l'acide hydroxycinnaminique qui est lié aux chaînes latérales d'arabinose par des liaisons ester. Il constitue environ 1,5% des AXOS. Selon le CSS, les études dans la littérature montrent que le prétraitement avec une xylanase augmente l'effet prébiotique des arabinoxylyanes. Cependant, peu d'informations sont disponibles en ce qui concerne les variations interindividuelles de capacités de fermentation.

De plus, une estimation de la consommation d'AXOS et des arabinoxylyanes de faible poids moléculaire dans différents pays d'Europe montre un apport variant de 7 à 26 g/j. Le NI contribuerait à la consommation des arabinoxylyanes de faible poids moléculaire.

*Le CSS considère que les apports estimés du NI ne devraient pas poser de problèmes nutritionnels, étant donné que l'apport actuel en fibre est inférieur aux recommandations et qu'aucune valeur limite de consommation de fibres n'a été suggérée.*

***L'Anses est en accord avec les conclusions du CSS.***

#### **4.6. Informations d'ordre nutritionnel sur le nouvel ingrédient**

Le NI est destiné à améliorer la couverture des besoins en fibres d'un individu. Le NI contient 70% de fibres et 25% de glucides. 80% de la fraction glucidique provient du xylobiose, un disaccharide qui n'est pas hydrolysé par les enzymes du système digestif humain.

Les arabinoxylyanes, les AXOS, XOS et les  $\beta$ -glucanes ne sont pas hydrolysés par les enzymes du système digestif humain et sont donc fermentés par le microbiote colique, ce qui permet la multiplication sélective de bactéries considérées comme favorables (bifidobactéries), dans le côlon. Les principaux produits de la fermentation microbienne sont des acides gras à chaîne courte et des gaz.

Le NI est aussi une source d'acide férulique qui peut avoir un effet antioxydant chez l'Homme. Le NI est proposé en complément et non en remplacement des fibres naturelles de l'alimentation. Le pétitionnaire propose des taux d'incorporations de 1 à 3 g par portion. Le pétitionnaire déduit des études qu'un apport de 3 g/j pour les enfants et de 5 g/j pour les adultes est suffisant. Le pétitionnaire est informé que ses allégations font l'objet d'une réglementation sur la nutrition et les allégations santé (N° 1924/2006).

Les études montrent que les AXOS n'ont pas d'effet sur le transit, la digestibilité des protéines ou des lipides. Ceci est le résultat d'une faible viscosité intrinsèque, un faible potentiel osmotique et une activité de l'eau intermédiaire (entre les fructo-oligosaccharides et l'inuline). Aucune baisse significative de l'absorption des vitamines (vitamine A et acide folique) ou des minéraux n'a été observée. Le contenu en phytates (inférieur à la limite de détection de 0,1%) est trop faible pour avoir un impact sur l'absorption des minéraux et éléments traces.

Les études *in vitro*, chez l'animal et les études cliniques montrent que la biodisponibilité des AXOS dans le NI est plus élevée que dans les arabinoxylyanes classiques, mais identique aux arabinoxylyanes de faible poids moléculaire que l'on retrouve dans les produits alimentaires. Les arabinoxylyanes présents dans le malt, le blé germé et la bière ont probablement la même biodisponibilité que les AXOS du NI car ils sont formés par hydrolyse des arabinoxylyanes des parois végétales par une endoxylyanase. Ainsi, le poids moléculaire, le degré de substitution par l'arabinose et le degré de réticulation sont des facteurs importants.

Le CSS rapporte que le dossier du pétitionnaire contient peu d'informations sur les effets des  $\beta$ -glucanes. Le pétitionnaire a calculé la valeur énergétique du produit sur la base de 4 kcal/g de

xylobiose. Un nouveau calcul basé sur 2 kcal/g de xylobiose donne une valeur énergétique de 203 kcal/g.

***L'Anses considère que les informations fournies ne suggèrent pas d'effet délétère du NI sur le transit intestinal et la biodisponibilité des nutriments. Par ailleurs la biodisponibilité des AXOS du NI est probablement semblable à celle des AXOS présents naturellement dans des produits ou ingrédients alimentaires tels que le malt, le blé germé ou la bière.***

#### 4.7. Informations d'ordre microbiologique sur le nouvel ingrédient

La qualité microbiologique du NI a été testée et aucune teneur anormalement élevée n'a été détectée pour les levures, les champignons, les coliformes, les salmonelles, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* et *Clostridium botulinum*.

#### 4.8. Informations d'ordre toxicologique sur le nouvel ingrédient

##### Etudes de toxicologie expérimentale :

- a) Recherche des mutations géniques *in vitro* par test bactérien de mutation reverse (AMES avec ou sans activation)

Les études sont certifiées Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL). Elles ont été réalisées en 2009, sous assurance qualité, conformément aux lignes directrices de l'OCDE (471, addendum 1997), de l'EPA (1998), ICH (Guidances S2A 1995 et S2B 1997), et aux BPL hongroises. Les souches bactériennes sur lesquelles le produit a été testé sont des auxotrophes histidine-dépendantes : *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537. Le produit a également été testé sur *Escherichia coli* WP2uvrA. Le produit a été testé en solution aqueuse tamponnée.

Les témoins négatifs (non-traités) et les témoins positifs (2-AA/DMSO, NPD/DMSO, MMS/ED, azoture de Na/ED, 9-aminoacidine/ED, 4-nitro- 1,2 phénylène diamine/DMSO), avec ou sans activation, ont été réalisés concomitamment avec les essais.

L'étude considérée inclut un test préliminaire de solubilité, un test préliminaire de choix des doses (*dose range finding*, avec TA98 et TA100), et deux tests de mutation, avec et sans activation ( $\pm$  S9 mix) : un test initial et un test de confirmation (avec pré-incubation). Les essais sont réalisés en triplicats. Le système métabolique d'activation externe est préparé selon la méthode Ames (fraction S9 d'homogénat de foie de rats traités par inducteurs enzymatiques + cofacteurs).

Les valeurs historiques du laboratoire (1999-2007) des taux de mutations spontanées sont prises en compte pour l'interprétation des résultats. Pour le test initial comme pour le test de confirmation, aucun signe de cytotoxicité ( $\pm$  activation) n'est rapporté. Une augmentation minimale du nombre de colonies de revertants (sans signification biologique) et dans les limites des valeurs des témoins historiques est rapportée sans relation dose-effet.

Pour les tests de mutation, 7 concentrations ont été testées, de 5 à 5000  $\mu\text{g}$  par boîte. Les valeurs les plus élevées du facteur de mutation sont, respectivement, pour le test initial et pour le test de confirmation, de 1,82 et 1,87, pour 500  $\mu\text{g}$ /boîte.

Le rapport conclut donc, à l'absence d'une augmentation biologiquement significative du nombre de colonies de revertants sur 5 souches bactériennes ( $\pm$  activation) et à l'absence de relation dose-effet. Le rapport conclut également que l'extrait de son de blé testé ne présente pas d'activité mutagénique par substitution de bases (*frameshift*) dans le génome des souches utilisées.

- b) Recherche des mutations chromosomiques *in vitro* par test d'aberration chromosomique sur cellules somatiques de mammifères

Les études sont certifiées BPL. Elles ont été réalisées en 2009, sous assurance qualité, conformément aux lignes directrices de l'OCDE (473, addendum 1997), EPA (1998), ICH (Guidances S2A 1996 et S2B 1997).

Les cellules utilisées sont les cellules V79 et les cellules d'hamster chinois. Le système métabolique d'activation externe est préparé selon Ames (1975), Maron (1983) et Natarajan (1976) : (fraction S9 d'homogénat de foies de rats traités par inducteurs enzymatiques + cofacteurs + sels minéraux).

L'étude considérée inclut une étude de cytotoxicité préliminaire ( $\pm$  activation), et deux expérimentations indépendantes (A et B, chacune en duplicats), avec l'analyse des métaphases, afin de rechercher les effets clastogènes, sur au moins 200 cellules pour chaque groupe expérimental.

Les concentrations testées vont de 1250 à 5000  $\mu\text{g/mL}$ , avec ou sans activation, pour l'expérimentation A, de 156 à 2500  $\mu\text{g/mL}$  (sans activation) et 625 à 5000  $\mu\text{g/mL}$  (avec activation) pour l'expérimentation B. Les durées d'exposition des cultures (à 37°C) sont de 3 h pour l'expérimentation A et de 20 h (sans activation) ou 3 h (avec activation) pour l'expérimentation B. Les prélèvements des cellules sont effectués après 20 h (expérimentation A,  $\sim 1,5$  cycle cellulaire) ou 28 h (expérimentation B,  $\sim 2$  cycles).

Les critères de validation des essais et de traitement des résultats sont indiqués dans le rapport d'étude, de même que les méthodes de préparation et de lecture en aveugle des plaques. Les valeurs historiques du laboratoire sont prises en compte pour l'interprétation des résultats.

La cytotoxicité aux concentrations les plus élevées est considérée comme adéquate (taux de réduction de la survie cellulaire  $> 50\%$ ). L'extrait de son examiné n'induit pas d'augmentation du nombre de cellules présentant des aberrations chromosomiques, même aux concentrations les plus élevées, avec ou sans activation. Il n'est pas observé de différence statistique entre les cultures exposées et témoins ( $< 5\%$  d'aberrations chromosomiques). Les résultats de l'expérimentation B confirment ceux de l'expérimentation A, même en cas d'exposition prolongée (20 h).

Le pétitionnaire conclut que l'extrait de son de blé, testé jusqu'à des concentrations cytotoxiques, avec ou sans activation, n'induit pas de modifications structurales dans les cellules pulmonaires de hamster chinois, et qu'en conséquence, le NI n'est pas clastogène.

***L'Anses estime que l'étude de recherche d'un éventuel potentiel mutagénique par un test classique (Ames et coll., 1975, Maron et Ames, 1983 etc.) et l'étude cytogénétique de clastogénèse ont été réalisées récemment selon les recommandations internationales. L'étude d'Ames (bactérien) a été effectuée sur 5 des souches habituelles, avec ou sans activation, en absence de signes de cytotoxicité, l'étude de cytogénicité a été effectuée sur une lignée cellulaire, classique, stable au plan de la morphologie et du caryotype, apte à la mise en évidence de faibles modifications du génome. Les résultats, tels qu'ils sont fournis par le pétitionnaire, permettent de considérer que l'extrait de son de blé ne montre pas d'activités mutagénique ou cytogénique in vitro. Un test de clastogénèse in vivo (par ex. micronucleus ou encore une recherche des anomalies chromosomiques dans les cellules de moelle osseuse) aurait pu être conduit en sus de l'essai in vitro. Néanmoins, compte tenu de la qualité apparente des tests pratiqués et de l'absence d'ambiguïté de leurs résultats, il peut être considéré que l'extrait testé n'est pas mutagène.***

c) Toxicité par administrations répétées

*Etude de 14 jours chez le Rat (voie orale)*

Cette étude pilote a été réalisée en 2008 sur l'extrait de son de blé fourni par le pétitionnaire, incorporé dans le régime des rats. C'est une étude de palatabilité, de tolérance et de détermination du panel de doses (*dose range finding*), en vue d'une étude de 90 jours chez la même espèce. Cet essai d'orientation ne suit pas les BPL, mais est construit selon les recommandations pour ce type

d'étude en vue des études 90 jours chez les rongeurs décrites par les lignes directrices de l'OCDE (n°408, 1998).

Trois groupes de 10 rats Wistar (5M + 5F) ont été utilisés : 1 groupe témoin et 2 groupes exposés, dont le régime comporte respectivement 0, 5 et 10 % d'extrait de son. (10%, maximum incorporable, correspondent à environ 6900 mg/kg de poids corporel/j. Les animaux sont surveillés classiquement (clinique, évolution de la masse corporelle, consommation d'aliments). Un bilan biologique a été effectué avant le sacrifice, suivi d'une étude anatomo-pathologique (macroscopique et histologique). Aucune mortalité n'a été rapportée pendant la durée de l'étude.

Le produit administré est bien toléré, palatable, n'induit aucun signe clinique ou manifestation toxique aux 2 doses administrées. L'augmentation significative de la masse du contenu du caecum est liée à la dose et est la conséquence physiologique de la consommation de substances fermentescibles non digestibles. Bien qu'aucun effet indésirable ne soit observé à la dose de 10 %, la dose de 7,5 % (soit environ 5000 mg/kg de poids corporel /j) est retenue comme maximum pour l'étude de 90 jours.

#### *Etude de 90 jours chez le Rat (voie orale)*

Cette étude principale de toxicité à court terme a été réalisée en 2009 sur le NI qui était incorporé dans le régime. Elle a été conduite sous assurance qualité, conformément aux lignes directrices de l'OCDE (n°408, 1998) et selon les BPL hongroise et britannique.

Six lots de 20 rats Wistar (10M+10F) ont été constitués : 3 lots témoins (dont 2 avec fibres, inuline ou son de blé) et 3 lots exposés : 0,3, 1,5 et 7,5% d'extrait de son de blé incorporés dans le régime standard. Les animaux ont été surveillés classiquement (suivi clinique et comportemental, mesure et évolution de la masse corporelle, consommation d'aliments solides et boisson, etc.). Le bilan biologique comporte l'hématologie et la biologie clinique (urine (dernière semaine) et sang au moment du sacrifice). Tous les animaux ont été autopsiés en vue de l'étude anatomo-pathologique macroscopique et histologique (microscopie optique). L'histologie a été pratiquée pour les groupes témoins 1 et 3 et les groupes traités 5 et 6, ainsi que pour les reins des groupes 2 (témoins) et 4 (exposition dose basse).

L'administration quotidienne pendant 90 jours n'a affecté ni l'évolution corporelle ni la consommation alimentaire. Elle n'a pas entraîné d'effets indésirables aux plans clinique et comportemental (réaction aux stimuli, activité physique). Aucun effet lié au traitement au plan de la biologie clinique n'a été observé. Les résultats des groupes exposés (4, 5, 6) sont similaires à ceux des groupes témoins avec fibres (2, 3), montrant les modifications d'électrolytes (légère augmentation d'ions Ca, K, P) et l'amélioration de l'homéostasie hépatique, habituellement liées aux glucides non digestibles et fermentescibles.

Le traitement n'a induit, au plan de la masse des organes, que l'augmentation de la masse caecale pour les groupes 2 (témoins inuline) et les groupes exposés au NI. Cette augmentation est liée à la dose. Elle est statistiquement significative et concerne la masse moyenne absolue et relative du caecum rempli (attribué à l'effet glucides solubles non-digestibles mais fermentescibles) pour les groupes exposés (groupes 4, 5, 6) et le groupe témoin 2 (inuline). L'augmentation va de 25 % (chez les femelles du groupe 4) à 139 % (mâles du groupe 6).

Au plan de l'anatomo-pathologie, il est observé une hypertrophie minime, bilatérale, des tubules rénaux corticaux pour les animaux du groupe 6 (exposés à la plus forte dose), sans modification dégénérative ni d'augmentation du poids de l'organe. Le rapport d'étude ne considère pas cette observation comme un effet indésirable, mais l'explique comme une réponse physiologique d'adaptation à la présence de l'extrait de son dans le régime. Cette dernière est liée probablement à l'augmentation des électrolytes (notamment le calcium).

Le rapport d'étude conclut à l'absence de tout effet indésirable et fixe, dans ces conditions expérimentales, à une dose sans effet indésirable observé (DSEIO) de 7,5 % de l'extrait de son

dans le régime (plus forte dose testée), soit, pour les 2 sexes confondus, 4354 mg/kg poids corporel/jour.

***L'Anses estime que cette étude de toxicité par administrations répétées, récente, conduite selon les BPL et conformément aux lignes directrices de l'OCDE, est méthodologiquement recevable et ne révèle pas de toxicité. La constitution de plusieurs groupes témoins permet de prendre en compte les effets directement liés aux fibres. En l'absence de constatations histologiques autres que la minime hypertrophie tubulaire, la DSEIO de 4354 mg/kg poids corporel/jour pour cette étude de 90 jours proposée dans le rapport d'étude est acceptable. Par ailleurs, cette DSEIO doit être mise en regard de la consommation moyenne sur le long terme attendue chez l'Homme qui serait d'environ 30 fois inférieure (9 g/jour, équivalent à 150 mg/kg poids corporel/jour pour une personne de 60 kg) selon les estimations du pétitionnaire.***

Etudes nutritionnelles :

La toxicité du NI a été comparée au son de blé. Six études chez l'Homme faites avec du son de blé n'ont révélé aucun effet négatif à l'exception d'un cas (une femme prenant des antidépresseurs), pour lequel la consommation de 160-200 g/j avait causé une obstruction intestinale.

Quatre études de tolérance avec les préparations « extrait de son de blé » et « extrait de son de blé-AXOS » concernent les populations suivantes :

- les adultes sains : un dispositif croisé, double aveugle contre placebo (pas de NI) sur 57 sujets adultes sains (18-83 ans) avec des doses de 2x1,5 g de NI/j ou 2x5 g de NI/j, pendant 3 semaines avec des périodes de wash-out de 2 semaines entre les périodes de traitement. Aucune différence dans les analyses sanguines n'a été enregistrée. Des symptômes de flatulence (légèrement à modérément inconfortable) ont été enregistrés mais aucun symptôme sévère n'a été observé. Le NI est « raisonnablement » bien toléré jusqu'à une dose de 10g/jour dans la population étudiée ;
- les adolescents : un dispositif croisé, double aveugle contre placebo (pas de NI) sur 29 adolescents (8-12 ans) avec une dose de 2x2,5 g NI/j, pendant 3 semaines avec une période de wash-out de 2 semaines. Aucune différence entre le NI et le placebo n'a été observée sur les analyses sanguines et aucun symptôme gastro-intestinal n'a été signalé. La tolérance au NI a été assez bonne jusqu'à une dose de 5 g/j dans le groupe d'adolescents testé ;
- les adultes sains : dispositif croisé contre placebo (13,9 g de maltodextrines) sur 20 adultes avec une dose de 13,9 g de NI/j apportant 10 g/j d'AXOS pendant 3 semaines avec un wash-out de 4 semaines. Les préparations étaient consommées au sein d'un jus d'orange. Aucune différence entre le NI et le placebo n'a été observée sur les analyses sanguines. Des symptômes de flatulence (légèrement à modérément inconfortable) ont été enregistrés mais aucun symptôme sévère n'a été observé ;
- les adultes sains : deux dispositifs croisés similaires en cross-over sur 13 et 11 adultes sains. Des AXOS (doses de 2x2,5 g/j dans la première étude et 2x1,1 g/j dans la seconde, soit 2x4,35 g de préparation et 2x1,95 g/j de préparation.) ont été comparés avec une préparation de fructo-oligosaccharides-inuline (FOS-IN) contenant autant d'oligosaccharides que la préparation d'AXOS. Le principal effet observé a été l'augmentation de flatulences par rapport à la période précédent la consommation des oligosaccharides mais aucune différence n'a été mise en évidence entre FOS-IN et AXOS.

En référence à l'apport de 5 g/j chez l'adulte proposé, le pétitionnaire déclare qu'il n'a pas d'impact, ou un impact seulement temporaire, sur les flatulences. Comme l'extrait de son de blé est un mélange de plusieurs groupes de produit, il peut théoriquement y avoir un effet cumulé sur les flatulences. Cependant les études cliniques n'ont pas mis en évidence cet effet.

Le CSS rapporte que le pétitionnaire explique qu'il n'a pas étudié les individus souffrant d'un métabolisme anormal de l'insuline car il ne compte pas cibler cette population dans la commercialisation du NI. Les apports d'eau augmentés décrits dans certaines des études

présentées par le pétitionnaire sont probablement dus à la capacité des fibres à retenir l'eau ; ils sont retrouvés avec d'autres fibres.

Le CSS a également demandé au pétitionnaire la raison pour laquelle le produit testé, dans une des études, contenait 3,5 % de résidus de protéines de au lieu de 2 %. Le pétitionnaire a répondu que ceci était dû au fait qu'à cette époque la technique de chromatographie échangeuse d'ions n'avait pas atteint son niveau optimum, ce qui entraînait une augmentation des résidus.

## 5. CONCLUSION

L'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail considère que compte tenu de la qualité des tests pratiqués *in vitro* et de l'absence d'ambiguïté de leurs résultats, que l'extrait de son de blé testé n'est pas mutagène. En l'absence de constatations histologiques autres qu'une minime hypertrophie tubulaire, la dose sans effet indésirable observé (DSEIO) de 4354 mg/kg poids corporel/jour proposée dans le rapport pour l'étude de 90 jours chez le rat d'étude est acceptable.

En ce qui concerne le procédé de production du NI, l'Anses observe que les deux préparations enzymatiques utilisées (une  $\alpha$ -amylase et une xylanase) ne sont pas clairement identifiées. Les éléments présents dans ce dossier ne sont pas suffisants pour se prononcer sur leur sécurité au regard des éléments scientifiques demandés pour une autorisation d'emploi par l'Anses.

L'Anses considère que les informations fournies ne suggèrent pas d'effet délétère du NI sur le transit intestinal et la biodisponibilité des nutriments.

L'Anses confirme les conclusions du Conseil Supérieur de la Santé aux doses 3 g/j pour les enfants et de 5 g/j pour les adultes et appuie sa remarque quant à la nécessité d'indiquer la présence de gluten ou dérivés de protéines de blé sur l'étiquetage des produits contenant le NI.

**Le directeur général**

**Marc MORTUREUX**

## MOTS-CLES

**Mots clés** : fibres, nouvel ingrédient, son de blé, gluten, arabinoxylanes.