



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

relatif à la demande d'évaluation du rapport d'évaluation initiale des autorités allemandes concernant la mise sur le marché d'un nouvel ingrédient alimentaire : vitamine K₂, ou ménaquinone, synthétique

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

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

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

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

Ses avis sont rendus publics.

1. RAPPEL DE LA SAISINE

L'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) a été saisie le jeudi 1^{er} décembre 2011 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (Dgccrf) d'une demande d'évaluation du rapport d'évaluation initiale des autorités allemandes concernant la mise sur le marché d'un nouvel ingrédient alimentaire : vitamine K₂, ou ménaquinone, synthétique.

2. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

La présente saisine a pour objet l'évaluation de l'avis des autorités allemandes concernant une demande de mise sur le marché d'une forme synthétique de la vitamine K₂ dans le cadre du règlement (CE) n° 258/97 relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients alimentaires. Le dossier a été initialement soumis au BVL (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Federal Office for Consumer Protection and Food Safety) le 3 décembre 2010, puis au BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung, Federal Institute for Risk Assessment). Un complément d'information demandé par le BfR a été adressé le 8 août 2011 par le pétitionnaire.

La vitamine K₂ issue d'un processus biotechnologique de fermentation du soja par le *Bacillus subtilis natto* est autorisée comme nouvel ingrédient alimentaire ; ce produit a reçu un avis positif en 2008 par l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) et une autorisation en avril 2009 par la Commission européenne comme nouvel ingrédient, à l'exception des enfants. Ce produit est actuellement commercialisé sur le marché européen. Un statut GRAS - Generally Recognized As Safe - est aussi notifié par l'Agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA). L'avis de l'EFSA n'a pas évalué les bénéfices nutritionnels de la vitamine K₂.

Le pétitionnaire sollicite une autorisation de mise sur le marché d'une forme synthétique de la vitamine K₂ qui consiste essentiellement en la forme tout *trans* de la ménaquinone-7 ; l'objectif est la commercialisation sous une forme pure, pour des activités analytiques uniquement. Le pétitionnaire postule également pour des ingrédients dérivés de cette ménaquinone-7 à utiliser dans des formulations alimentaires sous forme de poudre ou d'huile végétale. La teneur en ménaquinone-7 dans ces ingrédients ne dépasse pas 0,2%.

Dans la mesure où la ménaquinone-7 est une substance chimique synthétique qui n'était pas consommée avant le 15 mai 1997 en tant qu'aliment dans l'Union européenne, le BVL a défini le produit, conformément à l'Article 1(2)(c) du règlement (CE) n° 258/97, comme faisant partie des « aliments et ingrédients alimentaires présentant une structure moléculaire primaire nouvelle ou délibérément modifiée ». En outre, selon les recommandations 97/618/EC de la Commission, le produit appartient à la classe 1 : « produits chimiques purs ou mélanges simples issus de sources non génétiquement modifiées ».

3. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

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

L'expertise collective a été réalisée par les Comités d'experts spécialisés (CES) « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques (AAAT) » et « Nutrition humaine (NUT) », consultés par correspondance en raison des courts délais de réponse impartis, sur la base des rapports initiaux rédigés par des rapporteurs appartenant à ces comités.

4. ANALYSE ET CONCLUSION DU CES

I. Spécifications du NI

Le terme « vitamine K » regroupe un ensemble de substances liposolubles possédant toutes le noyau 2-méthyl-1-4-naphtoquinone. Les formes les mieux connues sont (i) la vitamine K₁ ou phylloquinone d'origine végétale, (ii) les vitamines K₂ ou ménaquinones (MK_n) d'origine animale (bactériennes). Ces molécules sont caractérisées par des chaînes latérales lipophiles en position 3 de la structure en anneau 2-méthyl-1-4-naphtoquinone. La chaîne latérale de la phylloquinone est insaturée et de longueur fixe, tandis que celle des ménaquinones est insaturée et de longueur variable. Plus spécifiquement, les ménaquinones sont des dérivés prénylés. Ainsi la ménaquinone-7 contient 7 unités isoprène (chacune contenant 5 atomes de carbone).

La ménaquinone-7 produite par le pétitionnaire contient la forme tout *trans* de la MK-7, une des formes les plus actives de la vitamine K₂ naturelle (produite par fermentation).

La vitamine K est nécessaire à la coagulation sanguine et à l'activation de protéines impliquées dans la construction de l'os et l'inhibition de la calcification vasculaire. La vitamine K (K₁ comme K₂) est un cofacteur de γ -glutamyl carboxylase (carboxylation de l'acide glutamique, Gla), ces Gla étant des sites de fixation du calcium qui sont essentiels à l'activité des protéines qui les portent. Toutefois, la longueur de la chaîne, de nature aliphatique, lui confère une plus grande lipophilie que la forme K₁ et lui procure une biodisponibilité différente avec une demi-vie plus longue. Les spécifications de la vitamine K₂ sont détaillées dans la publication de Pucaj *et al.* (2011) ci-dessous :

Nom chimique	(tout-E)-2(3,7,11,15,19,23,27-heptaméthyl-2,6,10,14,18,22,26-octacosahéptaényl)-3-méthyl-1,4-naphthalénone
Synonymes	Vitamine MK-7, ménaquinone 7, vitamine K2 (35), MK-7
Numéro CAS	2124-57-4
Formule chimique	C ₄₆ H ₆₄ O ₂
Masse moléculaire	649 g/mol
Apparence	Poudre jaune
Odeur	Sans
Température de fusion	54 °C
Température d'ébullition	720,1 °C à 760 mm Hg
Température flash	254,9 °C
Densité	0,961 g/cm ³
Solubilité	Insoluble dans l'eau
Pureté	≤ 95 % all- <i>trans</i> MK-7

Les analyses de pureté ont été réalisées sur 3 lots différents. Le composé final est identifié par méthodes infrarouge (IR), et RMN du proton et du carbone, ainsi que par HPLC pour évaluer la quantité totale de MK-7. La proportion d'isomères *cis* est inférieure à 5%. Les quantités de contaminants inorganiques (métaux) et d'impuretés organiques (MK-4, MK-5 et dérivés de ménaquinone) sont conformes aux normes de spécification du produit.

Les analyses d'identification (IR, RMN, étude visuelle), le dosage de la vitamine K (HPLC), la recherche d'impuretés organiques (HPLC) et d'isomères *cis* (HPLC UV) sont pratiqués en interne. Les références des méthodes analytiques ne sont pas indiquées ; toutefois, les caractéristiques des dosages sont fournies. En ce qui concerne le dosage de la vitamine K₂, il ne semble pas exister de norme, toutefois le pétitionnaire a utilisé la technique HPLC, conformément à l'usage dans la littérature (Koivu-Tikkanen *et al*, 2000 ; Bhandari *et al*, 2010 ; Guide technique d'accréditation LAB GTA 25 « Analyses physico-chimiques en vue de la détermination de la composition, des critères de qualité et technologiques, et de l'étiquetage nutritionnel dans l'alimentation humaine et animale », 2010).

La détection des résidus de solvant, du contenu hydrique et des contaminants inorganiques est sous-traitée à des laboratoires accrédités. Les solvants résiduels (diéther, acétonitrile, acétate d'éthyl, dichlorométhane, hexane et tétrahydrofurane) sont présents à des concentrations inférieures à 0,1% (m/m) et les métaux à des concentrations inférieures à 0,01%.

Aucun des produits ou solutions utilisés pour la synthèse ne provient d'OGM.

Les autorités allemandes estiment que le dossier est satisfaisant et que le NI respecte les normes de qualité. Elles reprochent néanmoins le fait que le laboratoire ne semble pas être accrédité pour l'analyse de la vitamine K₂.

Les CES NUT et AAAT estiment également que la composition finale du produit est conforme aux spécifications et aux normes de qualité. Le CES NUT regrette que les analyses n'aient été pratiquées que sur trois lots, et surtout sur des lots qui correspondent en outre à des productions quantitativement modestes. En effet, les quantités de résidus de solvant et les impuretés inorganiques tendent à augmenter lorsque les quantités synthétisées sont plus importantes (comme l'indique le tableau dans le dossier fourni par le pétitionnaire).

II. Effet du procédé de production appliqué au NI

Le protocole de production est basé sur des procédures classiques (et publiées) de synthèse de vitamines liposolubles. La synthèse se fait à partir d'une vitamine K₃ commerciale et de géranol, suivant un brevet datant de 1982. La production est conforme à une qualité pharmaceutique certifiée (Bonnes Pratiques de Fabrication des médicaments à usage humain ou current Good Manufacturing Practices for drugs) et fait l'objet d'une analyse des dangers et des points critiques pour leur maîtrise (HACCP). Toutes les étapes de la production sont contrôlées. La recherche de substances indésirables est pratiquée à chaque stade.

Le pétitionnaire fournit les résultats de tests de stabilité sur un lot, à court et moyen terme, et indique que les études de longue durée sont toujours en cours. Il ressort que la molécule de

synthèse est stable lorsqu'elle est stockée 24 heures dans une solution tampon à pH 4. En revanche, elle est très instable si elle est exposée 24 heures en présence d'H₂O₂ à 10%, un oxydant puissant. La forme cristalline est également stable après conservation pendant 7 jours à température ambiante, alors qu'une dégradation de 30% est observée si elle est maintenue en solution dans de l'acétate d'éthyle. En ce qui concerne les tests à 3 et 6 mois à différentes températures (5°C, 25°C et 40°C), la quantité de vitamine K dans le mélange diminue à 6 mois à 40°C au profit d'autres composés qualifiés d'impuretés.

Les ingrédients dérivés sont formulés sous forme de poudre inerte (cellulose microcristalline, gomme arabique ou dextrans) ou d'huile végétale (huile de tournesol, huile de maïs, huile de noix de coco ou huile de palme). Seules des poudres et huiles de qualité alimentaire approuvée sont utilisées. Par conséquent, la sécurité des ingrédients dérivés est liée à celle de la molécule de synthèse et des solvants utilisés pour la dilution.

Les ingrédients dérivés sont fabriqués en conformité avec la législation européenne basée sur les procédures HACCP et les règlements (CE) n°178/2002, (CE) n°852/2004, ainsi que la directive (CE) n°93/43/EC. Ils sont formulés pour contenir 0,2% de vitamine K₂ synthétique. Toutefois, il est possible de modifier cette teneur pour des applications spécifiques. Pour fabriquer la forme huileuse, la molécule de synthèse est dissoute dans l'huile ; pour utiliser le nouvel ingrédient à l'état de poudre, une dissolution préalable dans de l'huile végétale est nécessaire, sans aucun ajout d'additifs ou de solvants. La fabrication et la conservation se font à l'abri de la lumière.

Sur les 2 types de formulation, une analyse du contenu en MK-7 *trans*, impuretés et métaux lourds, ainsi qu'une étude microbiologique sont pratiquées. Au final, la quantité de métaux est inférieure à 1 ppm et celle de solvants résiduels inférieure à 12 ppm. Le procédé de fabrication n'altère pas la MK-7 et n'introduit pas de nouvelles impuretés.

En ce qui concerne la stabilité des ingrédients dérivés, la formulation testée est stable pendant 6 mois, après conservation à l'abri de la lumière, à 5°C ou 25°C. De même que pour la molécule de synthèse, une augmentation du taux d'impuretés est observée à 40°C.

Les autorités allemandes estiment que les résultats sont conformes aux données de spécification du produit. Compte-tenu de la photosensibilité, elles recommandent que des mesures appropriées soient prises pour protéger la molécule (et donc les ingrédients dérivés). Elles requièrent également que les tests de stabilité soient prolongés.

Le CES NUT note que la molécule de synthèse et les ingrédients dérivés sont stables pendant 6 mois à l'abri de la lumière, qu'ils soient stockés à 5°C ou à 25°C, et demande au pétitionnaire de définir précisément la durée de vie du produit lorsque ses analyses complémentaires à long terme seront disponibles. Le comité s'étonne que des tests de congélation/décongélation ne soient pas prévus par le pétitionnaire.

III. Utilisation antérieure de l'organisme utilisé comme source de NI

La molécule de synthèse et ses ingrédients dérivés n'ont pas d'historique de consommation en Europe. Le pétitionnaire se réfère donc à la forme naturelle MK-7 retrouvée dans les denrées alimentaires. En fait, les sociétés occidentales ont des apports alimentaires plus élevés en phylloquinone, la ménaquinone étant essentiellement consommée au Japon.

La vitamine K₂ étant d'origine microbiologique, les aliments fermentés ou aliments d'origine animale (surtout si les animaux ont été alimentés avec de la nourriture contenant de la vitamine K) constituent les principales sources (Schurgers *et al*, 2000 ; Shearer *et al*, 2000 ; Elder *et al*, 2006 ; Vermeer *et al*, 1998) :

Aliment	Concentration (µg/100 g)
Natto	1103
Fromage cheddar	10
Viande (foie de bovin)	1,0 à 10
Mozzarella	3,6
Œufs	7
Lait entier	1
Yaourt	1

Le pétitionnaire se réfère donc au principe d'équivalence avec la MK-7 et au fait que les denrées alimentaires sont susceptibles d'apporter de la MK-7.

En outre, il mentionne la réglementation européenne régissant la supplémentation de denrées alimentaires et de compléments alimentaires en vitamines, ainsi que les documents publiés par l'EFSA autorisant la supplémentation en MK-7 dans les aliments et compléments alimentaires, que ce soit pour des usages nutritionnels particuliers ou pour la population générale.

Une comparaison est également faite avec la forme naturelle de la ménaquinone commercialisée depuis 2005 sur le marché européen (la vitamine K₂ de synthèse est utilisée avec l'huile de tournesol pour ce test). Une équivalence est démontrée, aussi bien sur le plan de l'identité moléculaire que pour la stabilité des composés.

Les autorités allemandes estiment les informations suffisantes au regard des évaluations précédentes avec la forme naturelle de la vitamine K.

Les CES AAAT et NUT estiment que ce point ne pose pas de problème, d'après les informations disponibles.

IX. Consommation et niveau d'utilisation prévus

Le pétitionnaire ne fournit pas de documentation détaillée sur cet aspect, ni de simulation d'exposition. Il se positionne effectivement par rapport à la MK-7 naturelle, en préconisant une dose quotidienne de 45 µg/j pour la population adulte, telle qu'elle a été acceptée par l'EFSA en 2008.

Les autorités allemandes considèrent que les informations fournies par le pétitionnaire sont suffisantes et n'expriment pas d'objection sur ce point.

Les apports nutritionnels conseillés en vitamine K pour la population française sont de 10 µg/j pour le nouveau-né et l'enfant et de 65 µg/j pour les adolescents (16-19 ans). Un apport de 45 µg/j est préconisé pour les adultes et de 70 µg/j pour les personnes âgées après 75 ans (Guillaumont, 2001). Il est admis qu'un repas normal peut fournir 300 à 400 µg de vitamine K (biodisponible à hauteur de 10 %).

D'après l'avis de l'EFSA, il ressort que les doses moyennes estimées de MK-7, basées sur des hypothèses prudentes et résultant de l'utilisation préconisée par l'industriel commercialisant la vitamine K₂ naturelle, varient entre 36 µg/j (femmes adultes) et 54 µg/j (adolescents masculins). En ce qui concerne les niveaux de consommation élevés, ils sont compris entre 75 µg/j (enfants) et 115 µg/j (adolescents de sexe masculin) ; le 97,5^{ème} percentile le plus élevé est observé chez les enfants à 5,4 µg/kg poids corporel/j.

La National Academy of Sciences (Institute of Medicine Food and Nutrition Board) a signalé en 2001 des niveaux de consommation de vitamine K de 340 à 370 µg/j (5,7 à 6,2 µg/kg poids corporel pour un adulte de 60 kg).

D'autre part, selon le dernier avis de l'Afssa (2007), bien qu'une limite de sécurité (upper tolerable level) ne puisse être définie pour la population générale, la prévalence élevée de sujets suivant un traitement anticoagulant par anti-vitamine K (AVK) justifie une extrême prudence quant à l'enrichissement des aliments courants en vitamine K. Le CES NUT avait donc rejeté la possibilité d'un enrichissement des aliments courants en vitamine K car il fait courir un risque très difficilement maîtrisable chez les individus sous AVK. Par ailleurs, le CES fixe la dose maximale à 25 µg/j pour les compléments alimentaires, cette dose n'apparaissant pas entraîner de risque pour la population sous AVK, et rejette l'utilisation de doses supérieures, même encadrées par un étiquetage qui dissuaderait les personnes sous AVK de consommer ces compléments alimentaires.

Ce point de vue est conforté par une publication récente qui analyse l'impact de la consommation de vitamine K, dans le cas de traitements sous AVK (Holmes *et al*, 2012), selon laquelle une supplémentation quotidienne de 25 µg de MK-7 peut interférer avec la stabilité d'antagonistes de la vitamine K.

Le CES NUT considère qu'il est difficile de conclure sur la base des éléments fournis. Il souhaite obtenir des informations plus précises quant aux populations ciblées et aux doses respectives préconisées, ainsi que sur la durée de consommation prévue.

Le CES NUT estime que la dose de 45 µg/j préconisée par le pétitionnaire doit être revue en cohérence avec le dernier avis rendu par l'Afssa relatif à la vitamine K (saisine 2007-SA-0315) compte-tenu des personnes sous traitement anticoagulant anti-vitamine K.

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

Les autorités allemandes estiment les informations suffisantes au regard de l'exposition humaine antérieure à la vitamine K₂.

Ce point n'appelle pas de remarques des CES AAAT et NUT.

XI. Informations d'ordre nutritionnel sur le NI

Le pétitionnaire indique que la molécule de synthèse ne contient pas de calories. La valeur énergétique des ingrédients dérivés dépend donc de la formulation. Ainsi, la formule à base d'huile de tournesol correspond à 884 kcal/100 g, et est considérée comme équivalente à la forme naturelle de vitamine K₂ commercialisée, qui véhicule 900 kcal/100 g.

En ce qui concerne les effets biologiques, le pétitionnaire a montré, dans le cadre de l'étude clinique décrite ci-dessous (au chapitre biodisponibilité), une augmentation des concentrations plasmatiques en ostéocalcine carboxylée, après 6 semaines de supplémentation en MK-7 synthétique. Ce résultat est cohérent avec les travaux de Forli *et al.* (2010) qui observent une amélioration de la densité minérale osseuse après un an de supplémentation en vitamine K₂, à la même dose, chez des patients transplantés cardiaques ou pulmonaires.

Les autorités allemandes considèrent que la molécule de synthèse est équivalente d'un point de vue nutritionnel avec la forme naturelle de vitamine K₂ produite par fermentation.

Le CES NUT n'a pas de remarque particulière sur ce point.

XII. Informations d'ordre microbiologique sur le NI

En ce qui concerne les contaminants d'origine microbienne, les conditions de la synthèse chimique sont incompatibles avec tout développement bactérien, comme en témoigne le test microbiologique (qui détecte moins de 1 CFU/g).

Ce point n'appelle pas de remarques des CES AAAT et NUT.

XIII. Informations d'ordre toxicologique sur le NI

- Chez l'animal :

Le pétitionnaire a conduit des études de toxicologie sur la base des recommandations OCDE. Une première étude d'exposition aiguë à une dose unique (2000 mg/kg) chez la souris ne révèle pas d'effet toxique pendant les 14 jours d'observation. Les informations toxicologiques concernant la vitamine K₂ ont été publiées en 2011. La première étude, aiguë (OCDE ligne directrice 425), montre que la vitamine K₂ synthétique présente une DL₅₀ supérieure à 2000 mg/kg poids corporel (p.c.) chez la souris en dose unique administrée par gavage avec 14 jours de suivi.

La seconde étude, subchronique par administration répétée par gavage pendant 90 jours suivie de 4 semaines sans gavage chez le rat Sprague Dawley (mâles et femelles, 10/groupe, doses de 2,5, 5 et 10 mg/kg p.c./j), permet de définir une DSEIO (dose sans effet indésirable observé) par Pucaj et ses collaborateurs pour la vitamine K₂ (administrée sous la forme ménaquinone MK-7 dans de l'huile de tournesol alimentaire) de 10 mg/kg p.c./j, soit la plus forte dose testée. Les interrogations soulevées par le BVL ainsi que par les auteurs de la publication concernaient le temps de coagulation significativement augmenté dans les 2 groupes de rats femelles traitées aux doses intermédiaire et supérieure. L'élévation de ce paramètre de coagulation a été attribuée à 2 individus pour la dose intermédiaire et à un seul pour la dose supérieure, qui présentaient des temps de

coagulation particulièrement élevés. Par ailleurs, l'augmentation du temps de coagulation est en contradiction avec le mécanisme d'action de la vitamine K₂ et pour ces raisons, les données sur ces quelques animaux ont été jugées inconsistantes et ont donc été écartées par les auteurs et par les évaluateurs.

Dans son avis de 2008, l'Autorité européenne de sécurité des aliments, sur la base de données disponibles à cette époque sur la vitamine K₂, avait identifié une DMEIO (dose minimale ayant un effet indésirable observé) de 20 mg/kg p.c./jour pour la forme MK-4 de la vitamine K₂ synthétique (EFSA, 2008). Cette DMEIO reposait sur le fait que les temps de coagulation prothrombine (PT time) ont été diminués dans tous les groupes de rats Fisher 344 (20/groupe/sexe) traités par la vitamine K₂ naturelle dans une étude d'un an au cours de laquelle des doses équivalentes à 0, 20, 100 et 500 mg vitamine K₂ (MK4) avaient été administrées. L'EFSA a précisé dans son avis que des données sur les formes MK-6 et MK-7 de la vitamine K₂ n'étaient pas disponibles mais l'EFSA a considéré qu'étant donnée la similarité dans le métabolisme de toutes les formes de vitamine K, des études disponibles avec les formes MK-4 pouvaient être utilisées pour l'évaluation des autres formes.

Les données de la nouvelle publication de Pucaj et de ses collaborateurs indiquent que les taux de prothrombine observés après l'ingestion de vitamine K₂ synthétique sous forme MK-7 ne sont pas significativement différents dans les groupes de rats mâles et femelles traités pendant 90 jours avec des doses de 0, 2,5, 5 et 10 mg de vitamine K₂ forme MK-7, ni après 30 jours de récupération. Ces résultats permettent d'identifier une DSEIO de 10 mg/kg p.c./jour pour la forme MK-7 de la vitamine K₂.

- Chez l'Homme :

Le métabolisme et la distribution des formes de vitamines K sont connus. Trois formes principales sont circulantes, la forme K₁ et les formes MK-4 et MK-7.

Chez l'Homme, les résultats d'une étude randomisée en simple insu selon un dispositif croisé (c'est-à-dire que chaque volontaire a reçu 2 vitamines K₂, l'une sous la forme synthétique objet de la demande et l'autre sous la forme naturelle commercialisée issue d'un procédé de fermentation, pendant 2 périodes séparées entre elles par une période d'épuration dite « washout ») ont été fournis par le pétitionnaire pour démontrer l'équivalence de la vitamine K₂ synthétique avec la vitamine K₂ naturelle commercialisée. La première partie de l'étude clinique est une étude de bioéquivalence des deux formes de vitamine K₂ administrées chez 16 volontaires sains à la dose de 180 µg sous la forme de 4 capsules contenant chacune 45 µg de l'une ou l'autre forme de vitamine K₂ dissoute dans de l'huile de soja. L'AUC (area under the curve), C_{max}, T_{max} et t_{1/2} ont été mesurés dans le plasma des volontaires au cours des 72 h après ingestion. Les résultats ont montré une variation dans les valeurs individuelles mesurées mais n'ont pas montré de différence significative dans la moyenne des valeurs entre la forme synthétique et la forme naturelle commercialisée de vitamine K₂. Les valeurs moyennes d'AUC après 48h et 72h ont été, respectivement, de 65 et 95 ng/h/mL pour la forme synthétique, et de 74 et 104 ng/h/mL pour la forme naturelle commercialisée. Etant donné que ces valeurs sont retournées à la normale au cours de 72h, la demi-vie n'a pas pu être calculée.

La seconde partie est une étude de 6 semaines contrôlée (placebo) de l'effet dose pour un collectif de 43 volontaires sains répartis dans 5 groupes : 3 groupes reçoivent la vitamine K₂ synthétique à des doses de 45, 90 et 180 µg/jour. Un quatrième groupe de volontaires reçoit le même apport (groupe 90 µg/jour) de vitamine K₂ naturelle commercialisée et un dernier groupe le placebo. Selon les résultats disponibles dans le dossier sous la forme d'un graphique, la concentration plasmatique de vitamine K₂ synthétique déterminée au cours des 6 mesures (1, 4, 8, 22, 36 et 43 jours après administration) augmente avec la dose et elle est plus élevée que dans le groupe placebo. Un effet dose est observé clairement pour la forme synthétique pendant 36 jours de mesure, la différence s'estompant entre les plus fortes doses après 43 jours. Il peut également être déduit de ce graphique que les concentrations plasmatiques des formes synthétique et naturelle commercialisées de vitamine K₂, administrées à des doses équivalentes (90 µg/jour), ne diffèrent

pas notablement au cours de 6 semaines d'administration. Cependant, les données présentées dans le dossier ne précisent pas les écarts-types, ni la signification statistique, et il n'est donc pas possible d'apprécier pleinement les changements constatés.

Par conséquent, le pétitionnaire ne décèle pas de différence significative entre les 2 molécules, ni sur le plan de la biodisponibilité, ni sur les taux circulants après une consommation pendant 6 semaines. Le pétitionnaire conclut à la démonstration de la bioéquivalence entre les 2 vitamines testées, naturelle et synthétique.

D'autre part, il faut noter que, comparativement à la phylloquinone, la vitamine K₂ s'accumule de façon préférentielle dans les tissus périphériques (Thijssen *et al*, 1996), avec des teneurs particulièrement élevées dans le cerveau, l'aorte, le pancréas, les graisses, et plus faibles dans le foie (Okano *et al*, 2008). Les mécanismes de transport peuvent, en partie, expliquer cette différence de concentration tissulaire (Sato *et al*, 2002). Bien que les deux composés soient absorbés par l'iléon et le jéjunum, la vitamine K₁ est incorporée dans les lipoprotéines riches en triglycérides et délivrée au niveau hépatique, tandis que la vitamine K₂ est transportée par les LDL et les HDL, jusqu'à d'autres organes cibles (Schurgers *et al*, 2002). Ceci se traduit par des taux circulants de ménaquinone 10 fois supérieurs, par rapport à ceux de vitamine K₁, après ingestion de doses équimoléculaires (Schurgers *et al*, 2000). De fait, Schurgers *et al*. (2007) ont comparé l'absorption de phylloquinone pharmaceutique (phytonadione) avec la MK-7 du natto. Un pic sérique est observé à 4 heures pour les 2 molécules. Toutefois, la concentration plasmatique cumulée atteinte par MK-7 est 8 fois supérieure à celle de la phytonadione et la MK-7 a une demi-vie de 72 heures (contre 1-2 heures pour la vitamine K₁), ce qui contribue à une meilleure stabilité des taux circulants.

Les autorités allemandes concluent à l'absence de toxicité de la vitamine K₂ synthétique.

Le CES AAAT est en accord avec les autorités allemandes. Du point de vue des résultats des études toxicologiques, compte tenu des niveaux de consommation estimés au 97,5^{ème} percentile compris entre 75 µg/j (2,5 µg/kg p.c./jour pour un enfant de 30 kg) et 115 µg/j (2,6 µg/kg p.c./jour pour un adolescent de 45 kg), les marges de sécurité par rapport à la DSEIO de 10 mg/kg p.c./jour identifiée dans l'étude de 90 jours chez le rat sont de l'ordre de 4000.

Le CES NUT estime que l'étude de biodisponibilité conduite chez l'Homme permet de démontrer une bioéquivalence de la forme synthétique avec la forme naturelle MK-7. Il remarque que le pétitionnaire n'a pas testé la formulation des ingrédients dérivés. Comme les conditions de l'étude clinique correspondent à la forme huileuse, il est difficile de se prononcer sur l'équivalence de la poudre sur le plan de la biodisponibilité, sachant que la fabrication de la formulation implique une étape de dissolution en milieu lipidique. Le CES NUT précise qu'il a été démontré que l'absorption de la vitamine K est améliorée en présence de graisses (Gijsbers *et al*, 1996 ; Uematsu *et al*, 1996).

Par ailleurs, le CES NUT estime qu'il n'y a pas de risque allergique. En effet, aucune protéine ou substance allergénique ou pouvant générer des intolérances n'est ajoutée lors de la fabrication.

Conclusions générales des autorités allemandes :

Les autorités allemandes estiment que le pétitionnaire a démontré la sécurité de la vitamine K₂ synthétique et des ingrédients dérivés. Elles formulent un avis positif concernant l'utilisation de ces produits en tant que nouvel ingrédient au sens du règlement (CE) n° 258/97.

Conclusions générales du CES AAAT

Le CES AAAT est en accord avec l'évaluation des autorités allemandes sur la sécurité de la vitamine K₂ synthétique, sous forme de ménaquinone-7. Il estime que l'équivalence entre les formes naturelle et synthétique de la vitamine K₂, ménaquinone-7, a été démontrée de manière satisfaisante.

Conclusions générales du CES NUT :

Le dossier est constitué sur la base d'une démonstration d'une équivalence avec la forme naturelle, la ménaquinone-7, qui a obtenu une autorisation de mise sur le marché après l'avis de l'EFSA.

En ce qui concerne la spécification du produit, le CES NUT ne formule pas de remarque spécifique, excepté sur la durée des études de stabilité jugée trop courte (6 mois).

L'étude de biodisponibilité permet de conclure également à une équivalence. Quant à l'historique de consommation, les données fournies par le pétitionnaire sont convaincantes.

En revanche, la dose d'utilisation préconisée par le pétitionnaire de 45 µg/j chez l'adulte dépasse la dose de 25 µg/j qui avait été établie pour l'enrichissement des compléments alimentaires en vitamine K dans le dernier avis de l'AFSSA (saisine 2007-SA-0315). Le CES NUT souhaite rappeler qu'au-delà de cette dose des interactions sont possibles avec les traitements anticoagulants, ce qui exige une extrême vigilance quant à la consommation de vitamine K. En outre, la population ciblée n'est pas indiquée dans les documents fournis. Ainsi, il n'est pas précisé si une utilisation est prévue chez l'enfant.

En conclusion, le CES NUT émet un avis favorable sur ce dossier sous réserve de ne pas dépasser la dose journalière maximale de 25 µg pour l'enrichissement des compléments alimentaires en vitamines K et d'apporter des réponses aux remarques formulées (en particulier sur la durée de vie du produit et la population cible).

De plus, le CES NUT recommande un étiquetage précisant que la consommation du complément alimentaire doit être précédée de l'avis d'un professionnel de santé et que les personnes sous traitement anticoagulant anti-vitamine K (AVK) doivent en informer leur médecin traitant.

5. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Anses adopte les conclusions du CES « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques » et du CES « Nutrition humaine ». L'Anses émet un avis favorable sur ce dossier sous réserve d'un étiquetage précis afin d'assurer que les personnes sous traitement anticoagulant anti-vitamine K ne dépassent pas la dose journalière maximale de 25 µg tel que recommandé dans son avis 2007-SA-0315.

Le directeur général

Marc MORTUREUX

MOTS-CLES

NOUVEL INGREDIENT; VITAMINE K2 ; MENAQUINONE, SYNTHETIQUE

BIBLIOGRAPHIE

Afssa, Saisine 2007-SA-0315. Avis du CES Nutrition humaine relatif à l'évaluation des teneurs en vitamines et minéraux des denrées enrichies et des compléments alimentaires : vitamine K.

Analyses physico-chimiques en vue de la détermination de la composition, des critères de qualité et technologiques, et de l'étiquetage nutritionnel dans l'alimentation humaine et animale (LAB GTA 25 / 61). Section Laboratoires – Accréditation n° 1-0703. Date de prise d'effet : 1er mars 2011. LAB Form 16 – Rév. 05 – Avril 2010 Page 1/7 (Norme NF EN ISO/CEI 17025 v2005).

Bhandari SD, de Souza A, Mehta D, Krishnan K (2010). A HPLC method for analysis of vitamin K2 (menaquinone-7) in ingredients and dietary supplements. 34th National Nutrient Databank Conference Prairie to Plate: Exploring Food and Nutrient Database Frontiers 12-14 July 2010, Grand Forks, North Dakota.

Brugé F, Bacchetti T, Principi F, Littarru GP, Tiano L (2011). Olive oil supplemented with menaquinone-7 significantly affects osteocalcin carboxylation. *Br J Nutr* 106, 1058-62.

Commission Regulation (EC) No 1170/2009 amending Directive 2002/46/EC of the European Parliament and of the council and Regulation (EC) No 1925/2006 of the European Parliament and of the council as regards the list of vitamin and minerals and their forms that can be added to foods, including food supplements-Annex II. And Commission Regulation (EC) No 953/2009 of 13 October 2009 on substances that may be added for specific nutritional purposes in foods for particular nutritional uses (PARNUTS)-Annex.

Coxam V, Davicco MJ, Wauquier F & Wittrant Y (2009). Vitamine K et physiologie osseuse. *Cahiers Nutr Diét* 44, 163-72.

EFSA Journal (2008). Vitamin K2 added for nutritional purposes in foods for particular nutritional uses, food supplements and foods intended for the general population- and- vitamin K2 as a source of vitamin K added for nutritional purposes to foodstuff, in the context of Regulation (EC) No 258/97, 822, 1-31.

EFSA panel on dietetic products Nutrition and Allergies (NDA). Scientific opinion on the substantiation of health claims related to vitamin K and maintenance of bone (ID 123, 127, 128 and 2879), blood coagulation (ID 124 and 126) and function of the heart and blood vessels (ID 124, 125 and 2880) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006 on request from the European Commission, 7. EFSA; 2009. p. 1228.

Elder SJ, Haytowitz DB, Howe J, Peterson JW, Booth SL (2006). Vitamin K contents of meat, dairy, and fast food in the U.S. diet. *J Agric Food Chem* 54, 463-7.

Forli L, Bollerslev J, Simonsen S, Isaksen GA, Kvamsdal KE, Godang K, Gadeholt G, Pripp AH, Bjortuft O (2010). Dietary vitamin K2 supplement improves bone status after lung and heart transplantation. *Transplantation* 89, 458-64.

Gijsbers BLMG, Siong K & Vermeer C (1996). Effect of food composition on vitamin K absorption in human volunteers. *Br J Nutr* 76, 223-9.

Guillaumont M (2001). Vitamines liposolubles : Vitamine K. Dans : Apports nutritionnels conseillés pour la population française (Martin A, ed), pp 244-248, Tec & Doc, Londres-Paris-New York.

Holmes MV, Hunt BJ, Shearer MJ (2012). The role of dietary vitamin K in the management of oral vitamin K antagonists. *Blood Rev* 26, 1-14.

Koivu-Tikkanen TJ, Ollilainen V, Piironen VI (2000). Determination of phylloquinone and menaquinones in animal products with fluorescence detection after postcolumn reduction with metallic zinc. *J Agric Food Chem* 48, 6325-31.

NAS, National Academy of Sciences, Institute of Medicine Food and Nutrition Board, 2001. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. Available at <http://fnic.nal.usda.gov/nal-displayindex>. pp. 162-196.

Official Journal of the European Union, 2009. Commission Decision of 22 April 2009 authorising the placing on the market of Vitamin K2 (menaquinone) from *Bacillus subtilis natto* as a novel food ingredient under Regulation (EC) N° 258/97 of the Parliament and of the Council.

Okano T, Shimomura Y, Yamane M, Suhara Y, Kamao M, Sugiura M, Nakagawa K (2008). Conversion of phylloquinone (vitamin K1) into menaquinone-4 (vitamin K2) in mice: two possible routes for menaquinone-4 accumulation in cerebra of mice. *J Biol Chem* 283, 11270-9.

Presse N, Shatenstein B, Kergoat MJ, Ferland G (2008). Low vitamin K intakes in community-dwelling elders at an early stage of Alzheimer's disease. *J Am Diet Assoc* 108, 2095-9.

Pucaj K, Rasmussen H, Møller M, Preston T (2011). Safety and toxicological evaluation of a synthetic vitamin K2, menaquinone-7. *Toxicol Mech Methods* 21, 520-32.

Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council (2009/345/EC). Official Journal of the European Union, 24.04.2009, L 105/16.

Sato T, Ohtani Y, Yamada Y, Saitoh S, Harada H (2002). Difference in the metabolism of vitamin K between liver and bone in vitamin K-deficient rats. *Br J Nutr* 87, 307-14.

Schurgers LJ, Vermeer C (2002). Differential lipoprotein transport pathways of K-vitamins in healthy subjects. *Biochim Biophys Acta* 1570, 27-32.

Schurgers LJ, Vermeer C (2000). Determination of phylloquinone and menaquinones in food. effect of food matrix on circulating vitamin K concentrations. *Haemostasis* 30, 298-307.

Schurgers LJ, Teunissen KJ, Hamulyák K, Knapen MH, Vik H, Vermeer C (2007). Vitamin K-containing dietary supplements: comparison of synthetic vitamin K1 and natto-derived menaquinone-7. *Blood* 109, 3279-83.

Shearer MJ, Bolton-Smith C (2000). The U.K. food database for vitamin K and why we need it. *Food Chem* 68, 213-8.

Thijssen HH, Drittij-Reijnders MJ (1996). Vitamin K status in human tissues: tissue-specific accumulation of phylloquinone and menaquinone-4. *Br J Nutr* 75, 121-7.

Uematsu T, Nagashima S, Niwa M, Kohno K, Sassa T, Ishii M, Tomono Y, Yamato C, Kanamaru M (1996). Effect of dietary fat content on oral bioavailability of menatetrenone in humans. *J Pharm Sci* 85, 1012-6.

Vermeer C, Knapen MH, Schurgers LJ (1998). Vitamin k and metabolic bone disease. *J Clin Pathol* 51, 424-6.

Westenfeld R, Krueger T, Schlieper G, Cranenburg EC, Magdeleyns EJ, Heidenreich S, Holzmann S, Vermeer C, Jahnen-Dechent W, Ketteler M, Floege J, Schurgers LJ (2011). Effect of vitamin K(2) supplementation on functional vitamin K deficiency in hemodialysis patients: a randomized trial. *Am J Kidney Dis* Dec 9.