



Maisons-Alfort, le 30 avril 2009

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à une demande d'évaluation du rapport d'évaluation initiale établi par les autorités finlandaises concernant la demande d'autorisation de mise sur le marché d'un nouvel aliment ou d'un ingrédient alimentaire : produit de peptide de sardine

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

Rappel de la saisine :

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le mercredi 25 mars 2009 par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes d'une demande d'évaluation du rapport d'évaluation initiale établi par les autorités finlandaises concernant la demande d'autorisation de mise sur le marché d'un nouvel aliment ou d'un ingrédient alimentaire : produit de peptide de sardine.

Après consultation du Comité d'experts spécialisé « Additifs, Arômes et Auxiliaires Technologiques » le 9 avril 2009 et du Comité d'experts spécialisé « Nutrition Humaine », le 23 avril 2009, l'Afssa rend l'avis suivant :

Contexte réglementaire

Cet avis s'inscrit dans le cadre du règlement 258/97/CE relatif aux nouveaux aliments et nouveaux ingrédients (NI) alimentaires. Ce nouvel ingrédient est classé dans la catégorie E qui regroupe les aliments et ingrédients alimentaires composés de végétaux ou isolés à partir de ceux-ci, sous l'article 1, paragraphe 2. Le pétitionnaire considère que l'objet de cette demande appartient à la classe 2.1. Cette classe comprend les NI complexes qui n'ont pas été génétiquement modifiés et dont la source a déjà été utilisée comme aliment dans la Communauté européenne. Les autorités finlandaises observent à propos de ce classement en 2.1 que bien que les sardines soient utilisées en alimentation humaine, le peptide isolé de la sardine n'a jamais été utilisé. Le nouvel ingrédient a été étudié selon les critères des protocoles I (spécifications), II (effet du procédé de production), III (utilisation antérieure de l'organisme utilisé comme source), IX (niveau de consommation prévu), X (informations fournies par une exposition antérieure du nouvel aliment ou de sa source), XI (informations d'ordre nutritionnel), XII (informations d'ordre microbiologique) et XIII (informations d'ordre toxicologiques) de ladite recommandation.

Le NI est destiné à être ajouté à divers aliments (boissons, laitages, soupes, confiseries) qui sont destinés aux consommateurs souhaitant réduire leur tension artérielle.

L'Afssa rejoint les autorités finlandaises sur le fait que le peptide isolé du muscle de sardine est très différent de l'aliment d'origine, la sardine. Cependant, la classification 2.1 paraît la plus appropriée.

Concernant la spécification du nouvel ingrédient

Le NI est un mélange de peptides purifié, obtenu par hydrolyse enzymatique des protéines du muscle de sardine (*Sardinops sagax*) puis par séparation chromatographique de la fraction désirée. Cette purification conduit à optimiser la concentration d'un dipeptide, la valine-tyrosine (Val-Tyr), considéré comme le principal principe actif par le pétitionnaire.

Selon le pétitionnaire, ce dipeptide possède des propriétés inhibitrices de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et permet de contrôler la tension artérielle.

Le NI est destiné à être ajouté à différents aliments traditionnels. Il sera identifié sur l'étiquette de ces produits en tant que « peptide purifié de sardine » ou « hydrolysats de poisson ».

La composition du NI a été déterminée : il est constitué à plus de 85 % de peptides, dont environ 0,15 % de dipeptide Val-Tyr. Il contient également moins de 8 % d'humidité, des matières minérales (taux de cendres < 10%) et moins de 2 % de sodium. L'ensemble des 200 à 300 di- à penta-peptides qu'il contient n'a pas fait l'objet d'une identification systématique.

Son profil en acides aminés ne diffère que peu de celui de l'hydrolysats de chair de sardine (un produit intermédiaire de transformation dénommé peptide a1000) et selon le pétitionnaire, correspond à celui de la chair de sardine.

Le pétitionnaire a étudié la stabilité du NI dans 3 lots différents. Les échantillons ont été stockés à 25°C, sous vide, dans des sacs en polyéthylène pendant 41 mois. Les analyses ont porté sur l'apparence et la couleur du NI, sa teneur en dipeptide Val-Tyr et l'activité inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine. La composition du NI est constante d'une production à l'autre et stable pendant 41 mois. Toutefois le pétitionnaire déclare que la stabilité des aliments enrichis avec le NI devra être démontrée.

Les analyses du produit en divers métaux lourds (Cu, As, Cd, Hg et Pb) et contaminants (dérivés fluorés, dioxines et PCB, hydrocarbures aromatiques polycycliques, chloropropanols, dérivés bromés retardateurs de flamme, pesticides) ont été réalisées et indiquent des valeurs inférieures à celles fixées par la réglementation (CE n° 1881/2006).

Les autorités finlandaises considèrent que les données de composition du produit sont suffisamment connues.

L'Afssa estime que la caractérisation du NI nécessite la présentation d'un profil chromatographique de l'ensemble des peptides présents.

Par ailleurs, elle considère que l'utilisation des termes « peptide purifié » dans l'étiquetage (« purified sardine peptide ») est inacceptable dans la mesure où elle suggère qu'il s'agit du dipeptide Val-Tyr alors que ce peptide ne représente que 0,15 % du NI qui comporte, au total, selon le pétitionnaire, de 200 à 300 di- à penta-peptides.

Concernant les effets du procédé de production appliqué au nouvel ingrédient

Le procédé de préparation est décrit comme suit. La chair des sardines (*Sardinops sagax*), pêchées au large de la Californie, est congelée puis pulvérisée et chauffée dans l'eau à 95-99 °C pour inhiber l'autolyse. Une hydrolyse enzymatique est ensuite réalisée à pH 9,8 – 10 pendant 15 à 20 h en présence d'une protéase, l'Alcalase® (issue de *Bacillus licheniformis*). Après acidification, le produit est chauffé à 95-99°C pour inactiver la protéase. Après filtration, centrifugation et traitement par charbon actif et terre de diatomée, un produit intermédiaire, le peptide a-1000, est obtenu.

Ce produit est ensuite purifié par chromatographie sur colonne. La fraction d'intérêt qui représente 32 % de l'azote de l'hydrolysats est concentrée, stérilisée et séchée par atomisation afin d'obtenir une poudre, le NI. Selon le pétitionnaire, la purification par chromatographie en phase liquide est de nature à éliminer d'éventuels produits indésirables. Le pétitionnaire indique que tous les produits utilisés sont de qualité alimentaire, et que les règles de la procédure HACCP sont appliquées. Il indique aussi que la quantité d'Alcalase® résiduelle est inférieure à 0,02% dans le produit final.

D'après les données fournies par le pétitionnaire, la composition en acides aminés de la fraction a1000 est globalement comparable à la composition en acides aminés du NI, ce qui signifie que le procédé de purification ne modifie pas sensiblement la composition chimique de l'aliment source du NI. De ce fait, d'après le pétitionnaire, le profil d'acides aminés du NI est proche de celui des protéines de sardine.

L'Afssa comme les autorités finlandaises n'ont pas de remarque sur cet aspect.

Concernant l'historique d'utilisation de l'organisme source du NI

Le pétitionnaire indique que les sardines utilisées comme source du NI sont de l'espèce *Sardinops sagax*. Il rappelle que la sardine est un aliment traditionnel en Europe et que sa consommation est recommandée comme source d'acides gras n-3. La chair de sardine utilisée est produite selon les procédures HACCP.

Les autorités finlandaises considèrent que les informations fournies par le pétitionnaire au sujet de l'utilisation antérieure de l'organisme source du NI sont suffisantes et n'ont pas de remarque sur cet aspect.

*L'Afssa adhère aux conclusions finlandaises et note que les sardines consommées en Europe sont principalement de l'espèce *Sardina pilchardus*.*

Concernant la consommation/niveau d'utilisation prévu du nouvel ingrédient

Le NI est destiné à être ajouté à différents aliments de consommation courante : lait et produits laitiers (yaourts, boissons à base de yaourt, lait fermenté et poudre de lait), soupes, ragoûts et soupes en poudres, boissons (eau aromatisée et boissons, incluant les boissons à base de plantes), confiseries (bonbons et chocolat) et céréales de petit déjeuner. Le taux maximal d'incorporation du NI proposé par le pétitionnaire est de 0,6 g par portion.

À la demande des autorités finlandaises, le pétitionnaire a fourni des compléments d'information sur la stabilité du NI dans différentes matrices alimentaires afin d'évaluer de potentielles interactions. Le pétitionnaire a ainsi étudié la stabilité du NI dans une boisson à base de thé et dans des sodas. En outre, la stabilité a également été étudiée dans un comprimé. Pendant 36 mois de stockage, les critères suivants ont été étudiés : teneur en dipeptide Val-Tyr, activité inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, acidité, couleur, apparence et goût.

Les autorités finlandaises ont considéré ces informations comme suffisantes pour montrer la stabilité du NI dans les aliments vecteurs étudiés.

*L'Afssa souligne que le NI ajouté aux aliments fermentés tels que le yaourt ou le lait fermenté est susceptible d'être modifié par les enzymes bactériennes contenues dans l'aliment vecteur. Ainsi, la stabilité du NI dans chacun de ces vecteurs devrait être étudiée spécifiquement.
Par ailleurs, l'Afssa regrette que le pétitionnaire ne fournisse aucun détail sur les portions d'aliments vecteurs utilisés.*

Le NI doit être ajouté à des aliments destinés aux consommateurs qui souhaitent contrôler leur tension artérielle, et donc seulement destiné à la préparation d'aliments ayant des propriétés fonctionnelles spécifiques et ont un profil nutritionnel favorable. Le pétitionnaire estime que ces aliments se distingueront des aliments de consommation courante correspondants par leur étiquetage qui devra satisfaire à la réglementation de la Communauté Européenne relative aux allégations nutritionnelles et de santé (Règlement CE n° 1924/2006).

Les autorités finlandaises rappellent qu'elles ne peuvent pas se prononcer sur les propriétés fonctionnelles du NI ou sur la composition des aliments auxquels il serait ajouté. Ces aspects doivent faire l'objet d'une évaluation ultérieure sur la base du règlement CE n° 1924/2006 sur les allégations nutritionnelles et de santé.

*Tout comme les autorités finlandaises, l'Afssa souligne qu'elle n'a pas évalué la pertinence des allégations.
L'Afssa approuve la remarque que les autorités finlandaises font plus loin au sujet des groupes à risque, à savoir que comme le NI n'est pas destiné aux*

enfants, son adjonction dans les confiseries et chocolats, particulièrement attractifs pour les enfants, n'est pas souhaitable. Elle émet également les mêmes réserves pour les céréales de petit déjeuner et les sodas. En outre, elle considère que l'adjonction du NI dans les aliments de type produits familiaux (soupes, ragouts) n'est pas compatible avec la cible visée par le NI (les personnes désirant contrôler leur tension artérielle).

Le pétitionnaire a estimé la consommation éventuelle du NI à partir des données de consommation des aliments vecteurs dans les enquêtes alimentaires NDNS (National Diet and Nutrition Survey) réalisées au Royaume-Uni entre 1992 et 2001 dans 4 tranches de la population : les jeunes enfants (1 - 4,5 ans), les grands enfants et les pré-adolescents (4 à 10 ans), les adolescents (11 à 18 ans) et les adultes (16 à 64 ans). Les consommations journalières les plus élevées sont estimées chez les adolescents ; elles sont de 0,9 g en moyenne et de 2,4 g au 97,5^{ème} percentile, ce qui correspond à respectivement, 1,5 et 4 portions dosées à 0,6 g par portion.

Les autorités finlandaises ne font pas de remarque à ce sujet.

Même si le comportement alimentaire est sans doute différent en France et au Royaume-Uni, l'Afssa estime que ces simulations sont acceptables.

Concernant les informations fournies par une exposition humaine antérieure au NI ou à sa source

Concernant l'exposition des consommateurs aux protéines de sardine, le pétitionnaire a estimé un apport quotidien variant de 0,9 à 16,4 g par personne (97,5^{ème} percentile) selon l'âge et le sexe. En comparant par tranche d'âge, l'apport lié à la consommation du NI serait inférieur à l'apport alimentaire normal en peptides issus de la chair des sardines consommées.

Concernant le potentiel allergisant, l'ingrédient est dérivé d'un poisson connu pour induire des réactions allergiques. Le pétitionnaire a évalué le potentiel allergénique de l'ingrédient par deux tests chez le cobaye (anaphylaxie active systémique et anaphylaxie cutanée passive). Ces deux tests sont négatifs. En outre, aucun symptôme d'allergie n'a été noté après exposition d'une durée de 12 à 13 semaines chez l'Homme.

A la demande des autorités finlandaises, le pétitionnaire a fourni des informations sur la composition de l'ingrédient en peptides. Des analyses en chromatographie sur colonne en phase liquide et par spectrométrie de masse ont été fournies. Elles indiquent que le NI ne contient pas de molécule de poids moléculaire supérieur à 870 Da.

Par ailleurs, comme l'impose la Directive 2003/89/EC, l'étiquetage des produits contenant le NI mentionnera la présence de poisson.

Les autorités finlandaises considèrent que les informations fournies par le pétitionnaire sont suffisantes pour évaluer le potentiel allergénique du NI et ne nécessitent pas d'études supplémentaires.

L'Afssa rejoint les autorités finlandaises sur ce point.

Concernant les informations d'ordre nutritionnel sur le nouvel ingrédient

A l'heure actuelle, aucun produit à base de peptides de sardine n'est commercialisé sur le marché commun. Cependant, des hydrolysats protéiques provenant d'autres sources (plantes ou lait) sont commercialisés en tant que source de protéines en Europe. Ils sont utilisés par exemple dans les compléments alimentaires pour sportifs ou certaines préparations destinées aux nourrissons allergiques aux protéines du lait de vache.

Le pétitionnaire décrit ensuite les fonctions biologiques et physiologiques du dipeptide Val-Tyr, notamment son effet inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine.

Les autorités finlandaises évaluent, sur la base des données de consommation estimées en NI et en dipeptide Val-Tyr, les conséquences nutritionnelles de la consommation du NI. Elles estiment qu'un apport de $2,4 \text{ g.j}^{-1}$ du NI, apport estimé du 97^{ème} percentile, représente une quantité minimale au regard des apports protéiques journaliers, qui sont de l'ordre de 56 à 70 g chez l'adulte. Elles considèrent également que les apports en dipeptide Val-Tyr par le biais du NI ont un impact négligeable sur les niveaux d'apport en protéines. Les autorités finlandaises rappellent qu'elles n'ont pas évalué l'effet allégué du produit sur le contrôle de la pression artérielle.

L'Afssa considère également que les 2,4 g du NI correspondent (en équivalent azoté) à moins de 5 % des apports recommandés en protéines (Afssa, 2007). L'enrichissement en dipeptide Val-Tyr (0,15% du NI) lors de sa préparation, n'a qu'un effet très modeste sur la composition du mélange peptidique et ne peut déséquilibrer le profil des apports en acides aminés indispensables. En effet, l'apport maximal estimé du NI (2,4 g) fournit 3,6 mg de dipeptide Val-Tyr, soit environ 1,4 mg de valine et 2,2 mg de tyrosine. Cet apport de valine représente, chez l'adulte, moins de 2 pour 1000 des besoins (environ 1 g.j^{-1}) et 0,3 pour 1000 de la consommation moyenne (Afssa, 2007). L'apport de tyrosine correspondant à l'ingestion de 2,4 g de NI représente 0,8 pour 1000 de sa consommation moyenne (Afssa, 2007).

Concernant les informations d'ordre microbiologique sur le nouvel ingrédient

Selon le pétitionnaire, le procédé de fabrication implique une étape de stérilisation, ce qui minimise la présence et la croissance des contaminants microbiologiques dans le NI. Le pétitionnaire présente des résultats d'analyse quantitative, sur 5 lots différents, de bactéries aérobies, colibactères, levures et moisissures, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* et *Salmonella*.

Les autorités finlandaises considèrent que l'étape de stérilisation garantit une présence et une croissance de microorganismes minimales. De plus, le NI présente une faible activité en eau, ce qui empêche la croissance de microorganismes pendant le stockage. Les autorités finlandaises rapportent que la plupart des résultats d'analyses microbiologiques réalisées sont en dessous de la limite de détection. Parmi les bactéries pathogènes, le pétitionnaire a analysé les *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* et *Escherichia coli*. Les autorités finlandaises soulignent qu'aucune analyse de bactéries sporulées n'a été réalisée. Elles concluent que le risque microbiologique du NI est minimale si celui-ci est produit suivant les bonnes pratiques d'hygiène et selon la méthode décrite dans le dossier.

Ce point ne soulève pas de remarque particulière de l'Afssa.

Concernant les informations d'ordre toxicologique sur le nouvel ingrédient

Etudes de métabolisme :

Le pétitionnaire se base sur des données de la littérature sur le métabolisme général des peptides pour considérer qu'une large proportion de peptides du NI est hydrolysée en acides aminés avant d'être absorbée, mais que certains di- et tripeptides peuvent résister à l'hydrolyse et passer dans la circulation générale. En outre, ces peptides sont captés par différents organes comme le muscle, le foie et les reins.

Le pétitionnaire fournit également des données sur la biodisponibilité du dipeptide Val-Tyr chez la souris et le rat qui montrent que ce peptide résiste en partie à l'hydrolyse par les protéases gastro-intestinales et passe dans la circulation générale. Chez la souris hypertendue, l'administration du dipeptide multiplie par 8 le taux plasmatique basal de ce composé ($T_{1/2}$ élimination = 3 heures).

Deux études ont été réalisées chez l'Homme : l'une chez 5 hommes normotendus, l'autre chez 12 hommes hypertendus, qui ont consommé une fraction purifiée de peptides de

sardine contenant le dipeptide Val-Tyr. Ce produit, dont le développement a abouti à l'élaboration du NI, est considéré par le pétitionnaire comme similaire au NI. Ces études montrent que l'ingestion de dipeptide Val-Tyr provoque une augmentation liée à la dose (x 6 à 12) de son taux sanguin et de son aire sous la courbe de base. Le pétitionnaire réalise, pour la 1^{ère} étude, une estimation du taux d'absorption du dipeptide Val-Tyr qui varie entre 0,006 et 0,014 % de la dose ingérée.

Une étude chez le rat indique que le dipeptide Val-Tyr est distribué rapidement et s'accumule dans plusieurs tissus (reins, poumons, foie...).

Enfin, considérant que l'absorption des peptides alimentaires est mal connue chez les jeunes enfants, le pétitionnaire précise que la consommation du NI n'est pas recommandée dans cette population.

Les autorités finlandaises considèrent que les études réalisées avec le dipeptide Val-Tyr montrent que seule une faible quantité du peptide est absorbée de manière intacte, mais que la concentration plasmatique de ce peptide augmente significativement après ingestion. Le dipeptide disparaît rapidement des organes principaux tels que le foie, les reins, le cœur et les poumons.

Les autorités finlandaises soulignent que les études de toxicocinétique n'ont pas été réalisées avec le NI qui contient moins de 0,2 % de dipeptide Val-Tyr. Cependant, elles reconnaissent que les peptides du NI suivent les mécanismes classiques de digestion des protéines.

Ce point ne soulève pas de remarque particulière de l'Afssa.

Essais de toxicité

En se basant sur la similitude de composition, en acide aminé notamment, entre le NI (85% de peptides, 0% de lipides, 2% de Na) et le peptide a-1000, un produit intermédiaire de transformation (80% de peptides, 10% de lipides, 10% de Na), le pétitionnaire a réalisé des essais toxicologiques soit avec l'un, soit avec l'autre. En effet, il considère que les études de toxicité réalisées avec le produit intermédiaire peuvent être utilisées pour évaluer la sécurité du produit final.

Toxicité aiguë

La toxicité aiguë du produit intermédiaire de transformation (peptide a1000) a été étudiée chez le rat mâle. Les rats étaient divisés en deux groupes :

- un groupe test recevant une dose unique de 10000 mg.kg⁻¹ de poids corporel de produit intermédiaire de transformation ;
- un groupe contrôle recevant de l'eau.

Les rats ont été observés et pesés 1, 3 et 7 jours après l'administration orale du produit. Au 7^{ème} jour, les animaux ont été sacrifiés afin de réaliser une évaluation macroscopique des organes majeurs.

Le taux de mortalité avant sacrifice était nul. Aucune modification clinique n'a été observée au cours de cette étude.

Toxicité sub-aiguë :

Une étude de toxicité sub-aiguë a été réalisée durant 28 jours chez le rat Sprague Dawley (6 mâles et 6 femelles par dose) par voie orale (gavage) aux doses de 0, 1250, 2500 et 5000 mg.kg⁻¹ de poids corporel de produit intermédiaire de transformation (peptide a1000). Outre les examens hématologiques, biochimiques et macroscopiques, un nombre limité d'organes a été pesé et fixé dans le formol : organes du tractus digestif, pancréas, poumons, cœur, foie, rate et reins. Seuls les organes des rats traités par la forte dose (5000 mg.kg⁻¹ de poids corporel) présentant des modifications à l'examen macroscopique, ainsi que les organes correspondant des rats témoins, ont été soumis à un examen histopathologique.

Le traitement n'a pas eu d'effet sur le poids corporel, les apports alimentaires ingérés, les paramètres hématologiques, biochimiques sanguins et urinaires. Les poids des organes sont normaux sauf une augmentation significative du poids (absolu et relatif) des reins à la plus forte dose (5000 mg.kg⁻¹ de poids corporel). L'examen histopathologique des reins (le seul

examen histologique présenté par le pétitionnaire) n'a pas révélé de différence entre les rats témoins et ceux ayant ingéré 5000 mg.kg^{-1} de poids corporel du peptide a1000. Le pétitionnaire définit une NOAEL supérieure à 5000 mg.kg^{-1} de poids corporel.

Génotoxicité :

La toxicité du NI a été étudiée *in vitro* sur 4 souches de *Salmonella typhimurium* et une souche d'*Escherichia coli* en utilisant le test de mutagénicité de Ames. Le test est négatif pour des concentrations de NI inférieures ou égales à $5000 \mu\text{g}$ par boîte. Ce test est également négatif pour le dipeptide Val-Tyr.

Le potentiel clastogène du NI a été évalué dans le test des micronoyaux sur moelle osseuse de souris mâles aux doses de 0, 250, 500, 1000 et 2000 mg.kg^{-1} de poids corporel. Deux administrations par voie orale ont été réalisées à 24h d'intervalle. Le prélèvement de moelle osseuse est effectué 24h après la deuxième administration. Le NI n'a pas montré de potentiel clastogène. Aux deux plus fortes doses, il diminue de 20% le rapport PCE/NCE (érythrocytes polychromatophiles/érythrocytes normochromatophiles), ce qui indique une cytotoxicité. Le dipeptide Val-Tyr a été testé dans les mêmes conditions : le test est également négatif avec le même effet cytotoxique sur les cellules de la moelle osseuse.

Les autorités finlandaises considèrent que ces études de toxicité sont complètes et suffisantes pour montrer que le risque toxicologique est très faible. Elles soulignent que les tests de toxicité subchronique (90 jours) et chronique ainsi que les tests de carcinogénicité (ou cancérogenèse) n'ont pas été réalisés mais ne sont pas requis pour ce type de produit.

L'Afssa estime que le NI composé essentiellement de peptides est trop éloigné de la chair de sardine pour que l'on puisse s'appuyer sur l'antériorité de consommation de l'aliment source pour évaluer la sécurité du NI. De plus, le profil peptidique du NI n'est pas décrit. Or certains peptides peuvent avoir des effets biologiques qu'il conviendrait d'évaluer. De ce fait, l'Afssa estime donc qu'une étude de toxicité chronique (de 90 jours par exemple) est souhaitable.

En effet, l'arbre de décision de la recommandation européenne 97/618 prévoit soit la comparaison à un produit traditionnel homologue pour faciliter l'évaluation toxicologique ainsi que la remise d'informations sur la présence ou non de nouveaux toxiques ou sur les variations des taux de toxiques existants, soit des informations à partir d'une gamme d'études toxicologiques appropriées pour s'assurer de la sécurité du NI dans les conditions d'utilisation prévues et l'étude de l'éventualité d'allergies.

De plus, l'Afssa considère que l'étude de toxicité de 28 jours chez le rat n'est pas recevable. En effet, seuls les organes présentant des modifications à l'examen macroscopique ont été soumis à un examen histopathologique. Par ailleurs, les médicaments inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine sont soupçonnés d'interférer avec la spermatogenèse et la mobilité des spermatozoïdes (Ratnasooriya WD et al., 1990 ; Placzek R et al., 1988 ; Saha L et al., 2000 ; Okeahialam BN et al. 2006). Comme le pétitionnaire revendique une activité inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine pour son NI, il n'est pas acceptable que l'examen histopathologique des testicules n'ait pas été réalisé au cours de cette étude. De manière plus générale, le faible nombre d'organes ayant fait l'objet d'une étude histopathologique (le cerveau n'a notamment pas été étudié) ne permet pas de fixer une NOAEL. Ce manque d'information est d'autant plus limitant que le pétitionnaire ne fournit pas d'étude de toxicité sur 90 jours ou d'étude à plus long terme.

*Concernant la génotoxicité, le pétitionnaire considère que l'ingrédient n'est ni mutagène *in vitro*, ni clastogène *in vivo*. L'Afssa considère que les études de génotoxicité sont acceptables bien qu'un test *in vitro* de mutagénicité sur cellule de mammifère soit recommandé. Cependant, suite aux effets cytotoxiques sur la moelle osseuse observés chez la souris consommant 1000 et 2000 mg.kg^{-1} de poids corporel de NI, le pétitionnaire observe qu'aucun effet hématologique n'a été relevé dans l'étude de 28 jours chez le rat avec le produit intermédiaire, peptide a1000.*

L'Afssa remarque néanmoins que le composé utilisé est différent du NI (le produit intermédiaire est notamment moins concentré en dipeptide Val-Tyr qui est responsable de cet effet) et que dans l'étude de 28 jours, on ne dispose pas de frottis de moelle osseuse.

L'Afssa demande donc, afin de déterminer une NOAEL, de disposer au minimum des résultats des examens histopathologiques des organes fixés pour les rats témoins et traités par la forte dose dans cette étude. En outre, considérant le nombre limité d'organes examinés par rapport aux exigences des lignes directrices de l'OCDE et aux effets possibles du NI sur les testicules et sur la moelle osseuse, il est souhaitable de disposer d'une nouvelle étude de toxicité (par exemple une étude de toxicité de 90 jours chez le rat) conforme aux lignes directrices et réalisée selon les bonnes pratiques de laboratoire, sur le NI tel qu'il est commercialisé.

Etudes cliniques chez l'Homme :

Huit essais cliniques sont rapportés chez l'Homme avec le NI (dans 5 des 8 études) ou un produit obtenu également après hydrolyse de chair de sardine par protéase alcaline puis purification et dont le développement a abouti à l'élaboration du NI et considéré par le pétitionnaire comme similaire au NI.

Deux essais sont effectués à dose unique (1,5 ; 3 et 6 g) chez 9 personnes. Les autres essais concernent des administrations répétées :

- à 1,5 et 4 g.j⁻¹ chez 22 et 17 individus pendant 4 semaines ;
- à 1,5 g.j⁻¹ chez 25 individus pendant 2 semaines ;
- à 0,5 g.j⁻¹ chez 31, 55 et 44 individus pendant 12 et 13 semaines.

Ces études ont été conduites sur des sujets normotendus ou hypertendus. Outre les effets sur la tension artérielle ou le rythme cardiaque, des dosages hématologiques et biochimiques sanguins et urinaires et les effets cliniques ou effets secondaires éventuels ont été enregistrés.

Mis à part les effets sur la tension artérielle observés uniquement chez les sujets hypertendus, les différents traitements ne provoquent pas d'effets secondaires ou de modification des autres paramètres observés. Dans deux études (2 semaines à 1,5 g.j⁻¹ et 13 semaines à 0,5 g.j⁻¹), on peut observer chez les sujets consommant le NI, une diminution significative des paramètres hématologiques liés aux globules rouges, mais qui restent dans les limites des valeurs normales.

Les autorités finlandaises n'ont pas de remarque à ce sujet

L'Afssa souligne que dans deux études, une diminution des paramètres hématologiques liés aux globules rouges, qui restent néanmoins dans les limites des valeurs normales, a été observée chez certains sujets. Cet effet secondaire renforce la nécessité de mieux étudier les effets hématologiques du NI évoqués au regard des données du test de génotoxicité chez la souris.

Groupes à risque :

Du fait que le NI a le même mode d'action que les inhibiteurs médicamenteux de l'enzyme de conversion de l'angiotensine qui ne doivent pas être utilisés pendant la grossesse, le pétitionnaire indique que son produit doit être contre-indiqué pendant la grossesse et la lactation.

Les autorités finlandaises soulignent que le pétitionnaire propose d'ajouter le NI dans les chocolats et les confiseries. Etant donné que le NI n'est pas destiné aux enfants, elles émettent des réserves quant à l'adjonction du NI dans ces produits particulièrement attractifs pour les enfants.

L'Afssa approuve la contre indication proposée par le pétitionnaire à l'égard des femmes enceintes et allaitantes.

Elle rejoint les autorités finlandaises quant à leurs réserves sur l'utilisation du NI dans les confiseries et chocolats. Elle rappelle qu'elle émet également des réserves pour les céréales de petit déjeuner, les sodas et les aliments de type produits

familiaux (soupes, ragouts) qui ne sont pas compatibles avec la cible visée par le NI (les personnes désirant contrôler leur tension artérielle).

Interactions médicamenteuses potentielles :

Le pétitionnaire a recherché d'éventuelles interactions entre le dipeptide Val-Tyr et un médicament inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine chez le rat. Les animaux ont reçu le peptide seul, le médicament seul ou conjointement le peptide et le médicament. Administrés individuellement, le peptide comme le médicament diminuent la pression artérielle, mais cette réduction n'est pas observée après administration conjointe du peptide et du médicament. Dans d'autres études *in vivo* et *in vitro*, le pétitionnaire montre que le dipeptide est un inhibiteur de l'absorption du médicament. Cependant, il s'appuie sur le fait que l'apport du dipeptide par le NI est minime par rapport à l'apport protéique total et sur l'historique de consommation de la sardine pour considérer que le risque d'interactions entre le NI et les médicaments inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine est négligeable, d'autant plus qu'il est recommandé de prendre ces médicaments une heure avant le repas car la présence d'aliments dans le tube digestif diminue leur absorption de 30 à 40 %.

Si, comme le pétitionnaire l'indique, le dipeptide Val-Tyr possède des propriétés inhibitrices de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et permet de contrôler la tension artérielle (ce qui a priori relève d'une activité médicamenteuse plutôt qu'alimentaire), l'Afssa estime que devraient être pris en compte les risques d'interactions avec le potassium, le lithium, les antidiabétiques et plus largement un suivi de la fonction rénale et de la formule sanguine.

Conclusions

Les autorités finlandaises considèrent que le pétitionnaire a fourni les données suffisantes sur le NI afin qu'il soit mis sur le marché dans le lait et les produits laitiers, les soupes, ragouts et soupes en poudre, certaines boissons et les céréales de petit déjeuner. Les autorités finlandaises considèrent néanmoins inappropriée la proposition du pétitionnaire d'ajouter le NI dans les confiseries et chocolats, étant donné que le NI n'est pas destiné aux enfants.

Le pétitionnaire indique que le NI sera ajouté en tant qu'ingrédient fonctionnel aux aliments les plus sains de leur catégorie. Les autorités finlandaises soulignent qu'elles n'ont évalué ni les propriétés fonctionnelles du NI ni la composition des aliments auquel le NI doit être ajouté. Ces deux points feront l'objet d'une autre évaluation suivant le règlement européen 1924/2006 sur les allégations nutritionnelles et de santé.

L'Afssa considère que :

- *l'expression « peptide purifié » dans l'étiquetage (« purified sardine peptide ») est inacceptable dans la mesure où elle suggère qu'il s'agit du dipeptide Val-Tyr alors que ce peptide ne représente que 0,15 % du NI ;*
- *la caractérisation du NI nécessite la présentation d'un profil chromatographique de l'ensemble des peptides du NI ;*
- *l'adjonction du NI dans les aliments fermentés devrait faire l'objet d'une étude de stabilité dans la mesure où le NI est susceptible d'être modifié par les enzymes bactériennes contenues dans l'aliment vecteur ;*
- *la taille des portions d'aliments vecteurs envisagés par le pétitionnaire devrait être décrite ;*
- *certains vecteurs envisagés de type plats familiaux (soupes, ragouts) ou ceux attractifs pour les enfants (confiseries, chocolat, céréales de petit-déjeuner, sodas) ne sont pas compatibles avec une utilisation ciblée du NI ;*
- *l'étude toxicologique de 28 jours présentée par le pétitionnaire n'est pas suffisante pour déterminer une NOAEL au regard du fait qu'elle n'a pas été réalisée avec le NI et que seuls les reins ont été examinés en histologie. En outre, considérant le nombre limité d'organes prélevés par rapport aux exigences des lignes directrices*

de l'OCDE et aux potentialités délétères du NI sur les testicules et sur la moelle osseuse, il serait préférable de disposer d'une nouvelle étude de toxicité (par exemple une étude de toxicité de 90 jours chez le rat) conforme aux lignes directrices et réalisée selon les bonnes pratiques de laboratoire, avec le NI.

L'Afssa estime par ailleurs que le positionnement revendiqué par le NI (peptides inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine – contrôle de la tension artérielle), relève d'une activité médicamenteuse plutôt qu'alimentaire et nécessite de prendre en compte les interactions et préconisations de suivi médical évoqués pour les médicaments relevant de cette classe pharmacologique.

Ainsi, l'Afssa estime que les données ne sont pas suffisantes pour démontrer la sécurité de consommation du NI.

Référence :

Afssa, Apport en protéines : consommation, qualité, besoins et recommandations, 2007.

<http://www.afssa.fr/Documents/NUT-Sy-Proteines.pdf>

Okeahialam BN, Amadi K, Ameh AS. Effect of lisinopril, an angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor on spermatogenesis in rats. Arch Androl. 2006;52(3):209-13.

Placzek R, Krassnigg F, Schill WB. Effect of ace-inhibitors, calmodulin antagonists, acetylcholine receptor blocking, and alpha receptor blocking agents on motility of human sperm. Arch Androl. 1988;21(1):1-10.

Ratnasooriya WD, Jayawardena KG, Wadsworth RM. Effects of enalapril on human sperm motility. Contraception. 1990;41(2):213-9.

Saha L, Garg SK, Bhargava VK, Mazumdar S. Role of angiotensin-converting enzyme inhibitor, lisinopril, on spermatozoal functions in rats. Methods Find Exp Clin Pharmacol. 2000;22(3):159-62.

Mots clés : .acides aminés, novel food, poisson, allergie, hypertension

**La Directrice Générale
Pascale BRIAND**