

Maisons-Alfort, le 16 mars 2010

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à une demande d'autorisation de mise sur le marché d'un nouvel ingrédient alimentaire : bêta-glucanes solubles et insolubles de levure.

LE DIRECTEUR GÉNÉRAL

1. RAPPEL DE LA SAISINE

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 02 février 2010 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes d'une demande d'avis relatif à la demande d'autorisation de mise sur le marché d'un nouvel ingrédient (NI) alimentaire : *bêta*-glucanes solubles et insolubles de levure. Le rapport d'évaluation initial a été rédigé par l'autorité irlandaise de sécurité alimentaire (Food Safety Authority of Ireland, FSAI)

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 le Comité d'experts spécialisés (CES) « Nutrition Humaine » réuni le 25 février 2010 et par le CES « Additifs, arômes, auxiliaires technologiques » par correspondance.

4. ARGUMENTAIRE

L'argumentaire de l'Afssa est fondé sur l'avis du CES « Nutrition Humaine » et du CES « Additifs, arômes, auxiliaires technologiques » dont les éléments sont présentés ci-dessous :

Précision concernant la source du nouvel ingrédient

Le NI est dérivé d'un constituant glucidique primaire (polysaccharide) de la paroi cellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). Cette levure est utilisée depuis longtemps pour la production du pain, de la bière et du vin. L'autorité irlandaise rapporte que le pétitionnaire souhaite obtenir l'autorisation d'utiliser ce NI en tant qu'ingrédient fonctionnel dont les bénéfices potentiels sont l'immunomodulation. Le NI pourrait être intégré dans certaines denrées destinées à une alimentation particulière (DDAP), des boissons, des céréales et des produits laitiers.

Concernant la spécification du nouvel ingrédient

Les *Bêta*-glucanes sont des polysaccharides de masse moléculaire élevée (100-200 kDa) présents dans les membranes cellulaires des levures et des céréales. Ce dossier concerne la commercialisation de *bêta*-glucanes solubles (Wellmune WGP soluble (WGPs)) et insolubles

(BêtaRight WGP (BWGP) et Wellmune WGP Dispersible (WGPD)) isolés à partir de levure de type *S. cerevisiae*. Les *bêta*-glucanes de levure diffèrent de ceux provenant des céréales car ils sont composés d'un mélange de bêta-1,3 et 1,6-glucanes, tandis que ceux provenant des céréales contiennent un mélange de bêta-1,3 et 1,4-glucanes. Les produits insolubles contiennent au moins 70% (BWGP) ou 75% (WGPD) de glucides sous la forme de *bêta*-glucanes et le produit soluble (WGPD) contient au moins 75% de *bêta*-glucanes. Les teneurs du NI en protéines et en lipides sont les suivantes : insoluble >10%, soluble >3,5% et insoluble >20%, soluble >10%, respectivement. L'autorité irlandaise précise qu'aucune spécification n'a été transmise pour le contenu en cadmium et arsenic bien que le certificat d'analyse indique un niveau faible ou non détectable de ces composés. Il est rapporté la présence de composés organiques volatils et plus particulièrement, de méthanol (243 µg/kg), d'éthanol (744 µg/kg), d'isopropanol (44 µg/kg), d'acétone (225 µg/kg) et d'hexane (40 µg/kg). L'autorité irlandaise ajoute qu'étant donné les faibles niveaux d'apport prévus, les teneurs en méthanol et en hexane qui sont les 2 composants les plus pertinents d'un point de vue toxicologique, ne sont pas considérées comme dangereuses.

L'Afssa est en accord avec le FSAI quant à la spécification du nouvel ingrédient.

Concernant les effets du procédé de production appliqué au nouvel ingrédient

Dans le procédé de production, la levure *Saccharomyces cerevisiae* est le matériel de départ dans la production du *bêta*-glucane insoluble. Ce dernier est ensuite purifié et traité pour produire le *bêta*-glucane soluble. L'autorité irlandaise explique que les spécifications du procédé de production ne montrent pas d'effet néfaste sur la qualité et la composition du produit final.

L'Afssa remarque que le procédé appliqué n'est pas susceptible de générer des substances toxiques ou potentiellement dangereuses pour la santé des consommateurs aux doses auxquelles le NI sera potentiellement consommé.

Concernant l'utilisation antérieure de l'organisme utilisé comme nouvel ingrédient

L'autorité irlandaise explique que la levure *Saccharomyces cerevisiae* est consommée sans risque depuis longtemps. Elle est utilisée dans la production de pain, de bière et de vin.

L'Afssa confirme les conclusions du FSAI quant à l'utilisation antérieure de l'organisme utilisé comme NI.

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

L'autorité irlandaise rapporte que le pétitionnaire a l'intention de commercialiser le NI dans un certain nombre de catégories d'aliments et de compléments alimentaires et de DDAP (sauf ceux destinés aux nourrissons et jeunes enfants).

Le niveau d'utilisation prévu pour les compléments alimentaires se situe entre 250 mg et 500 mg, correspondant approximativement à 175 et 375 mg de *bêta*-glucanes de levure.

En tant qu'ingrédient alimentaire ou dans les DDAP, le niveau d'apport proposé par portion est de 200 mg de *bêta*-glucanes correspondant approximativement à 250 mg de BWGP, WGPD et WGPD. Afin d'estimer les niveaux de consommation potentielle de *bêta*-glucanes, l'autorité irlandaise rapporte que le pétitionnaire a utilisé les données britanniques de consommation provenant de l'étude nationale de nutrition et diététique (NDNS). Cependant, cette estimation ne prend pas en compte les DDAP et les compléments alimentaires. Parmi les différents groupes de population, les adolescents présentent la moyenne de consommation (0,8 g/personne/jour) et le niveau de consommation au 97^{ème} percentile (1,94 g/personne/jour) les plus élevés. Mais, rapportée au poids corporel, c'est chez les enfants que l'apport était le plus élevé avec une moyenne de consommation et une consommation au 97^{ème} percentile respectivement de 49 et 105 mg/kg de poids corporel/jour. L'apport le plus élevé au 97^{ème} percentile (1,94 g/personne/jour) correspond approximativement à 9 portions d'aliments contenant des *bêta*-glucanes de levure. En outre, une quantité supplémentaire de *bêta*-glucanes peut être consommée par le biais des aliments pour sportifs (catégorie des DDAP) chez les adolescents.

Cependant, en prenant en compte toutes ces considérations, l'autorité irlandaise rapporte que la consommation du NI ne présente pas de risque.

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

La membrane cellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, qui compte pour approximativement 30% du poids sec de la cellule, est composée majoritairement de polysaccharides (85%) et de protéines (15%). 80% à 90% de ces polysaccharides sont composés de *bêta*-glucanes, ce qui signifie que 15-25% de la cellule sont constitués de *bêta*-glucanes. Ainsi, en raison de la consommation régulière d'aliments produits avec la levure *S. cerevisiae*, tels que le pain, la bière et le vin, la consommation de *bêta*-glucanes est traditionnellement significative. S'ajoutent à cela les *bêta*-glucanes qui se trouvent naturellement dans de nombreux aliments dont certains champignons, les graines de soja ou le céleri.

Concernant les informations d'ordre nutritionnel sur le nouvel ingrédient

Le NI est principalement une source de glucides sous forme de *bêta*-glucanes, avec une proportion relativement basse de protéines et de lipides constituant le reste des macronutriments. L'absorption des *bêta*-glucanes au niveau du tractus gastro-intestinal est très limitée (en raison de la masse moléculaire élevée). L'autorité irlandaise rapporte que le pétitionnaire soutient l'hypothèse selon laquelle la biodisponibilité des minéraux est augmentée par la consommation de fibres telles que les pectines, certaines gommés, ou les *bêta*-glucanes. Les effets des *bêta*-glucanes de levure sur le système gastro-intestinal n'ont pas été étudiés de façon approfondie. Cependant, l'autorité irlandaise rapporte que les quelques études citées montrent des effets bénéfiques possibles sur certains paramètres tels que la cholestérolémie plasmatique, sans effets indésirables apparents.

L'AFSSA ajoute à ces conclusions que les études *in vitro* démontrent la fermentescibilité des fractions de levure enrichies en *bêta*-glucanes insolubles et que les effets « nutritionnels » observés sont fondées sur des études *in vitro* ou *in vivo* chez le rat à des doses très élevées comparativement aux consommations susceptibles d'être atteintes chez l'homme.

Concernant les informations d'ordre microbiologique sur le nouvel ingrédient

L'autorité irlandaise rapporte que les spécifications du produit démontrent un profil microbiologique satisfaisant pour ce NI.

Concernant les informations d'ordre toxicologique sur le nouvel ingrédient

- Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion (ADME)

L'absorption au niveau du tractus gastro-intestinal des glucides indigestibles de masse moléculaire élevée, tels que les *bêta*-glucanes est très limitée. En effet, l'administration intra-gastrique, chez la souris, de WGPD (300 µg/j) marqué par un colorant, entraîne dans les 3 jours l'apparition d'une fluorescence dans le cytoplasme de macrophages situés dans la rate, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse. Chez le rat recevant par gavage 20 mg/kg/j de *bêta*-glucanes solubles de masse moléculaire de 20kDa, pendant 4 jours consécutifs, il est observé après 14 jours des concentrations plasmatiques n'excédant pas 30 ng/ml. Enfin, l'administration par gavage d'une dose de 75 mg/kg/j de WGPD a confirmé la faible absorption des polymères glucidiques (13 ng/mL dans le sérum, après 1 heure) et leur élimination quasi-totale 8 heures après l'administration. Ceci montre que le passage systémique observé est extrêmement faible et sans signification biologique. Ce qu'il advient précisément des *bêta*-glucanes non absorbés n'est pas discuté en détail. Certaines études ont démontré la fermentation des *bêta*-glucanes de levure par la microflore intestinale. Les acides gras à courtes chaînes formés sont vraisemblablement en grande partie absorbés et métabolisés aux niveaux intestinal, hépatique et périphériques.

Selon, l'AFSSA, contrairement à ce qui est avancé par le FSAI, il n'y a aucune preuve d'une excrétion fécale importante des *bêta*-glucanes ingérés. L'ensemble des données de la littérature semblerait indiquer que ces *bêta*-glucanes sont largement

fermentés par la flore colique (McBurney 1991; Nakamura *et al.* 2001a; Nakamura *et al.* 2001b; Yoshida *et al.* 2007).

- Toxicité

L'autorité irlandaise rapporte que les données du pétitionnaire sur la sécurité du NI chez l'animal sont limitées à une étude aigüe orale (gavage utilisant 2000 mg/kg de poids corporel de bêta-glucanes insolubles chez le rat) et quelques études aigües intra-péritonéales ou intraveineuses, ainsi qu'à une étude de 91 jours chez le rat. Bien que les études parentérales soient peu significatives pour l'évaluation des *bêta*-glucanes de levure consommés comme aliment, elles démontrent la faible toxicité des *bêta*-glucanes quand ils sont administrés à fortes doses. L'étude aigüe orale n'a pas montré de toxicité. L'étude de 91 jours testant l'administration de doses répétées de *bêta*-glucanes insolubles a identifié une NOAEL d'approximativement 75 mg de *bêta*-glucanes/kg de poids corporel/jour (plus haut niveau testé). Une étude de 52 semaines testant les *bêta*-glucanes de levure jusqu'à 200 mg/kg de poids corporel/jour dans une formule mélangée incluant des excipients a donné lieu à des effets indésirables de type diarrhée. Cependant, les auteurs notent que ces effets étaient réversibles à l'arrêt du traitement et étaient caractéristiques de l'exposition à certains glucides indigestibles tels que les sucres-alcool, le lactose, le polydextrose et certains amidons modifiés chimiquement.

Le FSAI mentionne que le dossier ne comporte aucune donnée sur la génotoxicité, la carcinogénicité et sur la reproduction. Elle reconnaît que cela ne lui pose pas de problème étant donné le recul existant concernant la consommation associée à ce nouvel ingrédient.

L'Afssa remarque qu'aucune étude de génotoxicité n'a été réalisée mais qu'en revanche des observations d'effets anticlastogènes ont pu être mis en évidence par des tests *in vitro*.

L'Afssa note également que les données du pétitionnaire sur la sécurité du NI chez l'animal proviennent d'une étude en dose unique chez le rat par gavage, par voie intrapéritonéale et intraveineuse ainsi qu'une étude en administration répétée durant 91 j chez le rat (Babicek *et al.* 2007). Une autre étude de 52 semaines chez le rat a également fait l'objet d'une publication (Feletti *et al.* 1992). Ces études ont été réalisées selon les bonnes pratiques de laboratoire (BPL). Aucune toxicité n'est observée jusqu'à 2000 mg/kg de *bêta*-glucanes insolubles en dose unique par gavage. L'étude de 91 jours ne met en évidence aucune différence significative avec les témoins à l'exception d'une baisse dose-dépendante du temps de coagulation visible à partir de 33 mg/kg/j uniquement chez les mâles et réversible. Bien que statistiquement significative (0,01), l'auteur considère ces variations comme comprises dans les valeurs historiques sans en communiquer le détail. L'Afssa souhaite connaître ces valeurs historiques. L'étude de 52 semaines réalisée à partir de *bêta*-glucanes issus de *C. albicans* ne rapporte que l'observation d'hyperplasies réversibles de la muqueuse du colon à 200 mg/kg/j. Le temps de coagulation n'a pas été déterminé dans cette étude. Une NOAEL de 100 mg/kg/j a pu ainsi être définie.

L'Afssa souligne qu'il n'existe aucune marge de sécurité entre la NOAEL prise en compte et la consommation journalière précisée par le pétitionnaire (49 à 105 mg/kg/j).

- Etudes cliniques

L'autorité irlandaise rapporte que le plus haut niveau utilisé dans les études cliniques (15 g/personne/jour de *bêta*-glucanes insolubles de levure) a été consommé pendant 8 semaines par des hommes obèses présentant une hypercholestérolémie. Les effets indésirables observés sont des diarrhées, des flatulences et de l'inconfort gastro-intestinal, ce qui est fréquent lors de la consommation de fibres très fermentescibles. Une autre étude démontre une bonne tolérance, sans effet indésirable apparent, pour une consommation de 500 mg de *bêta*-glucanes insolubles de levure (approximativement 375 mg de *bêta*-glucanes) sur une période de 10 jours. Une seule étude testant l'administration intraveineuse de plus de 2 mg/kg de poids corporel avant une chirurgie de *bêta*-glucanes a montré des effets indésirables mineurs lesquels étaient probablement reliés à l'administration de PGG-glucane. Cependant, le

FSAI conclut à la faible pertinence des études cliniques publiées dans le contexte de l'évaluation de la sécurité alimentaire des bêta-glucanes.

L'Afssa convient qu'aux doses testées et celles préconisées par le pétitionnaire, l'emploi du Ni dans des essais cliniques ne présente pas d'effets toxiques.

- Allergénicité

En dépit du fait que la levure est utilisée de façon courante depuis de nombreuses années, peu de cas de réponses allergiques ont été rapportés. Cependant, des réponses allergiques ont été documentées chez des individus qui ont souffert d'une infection à *Candida*, ou des individus présentant des dermatites atopiques. L'autorité irlandaise rapporte que ces réactions sont généralement associées à une hypersensibilité à l'énolase et/ou au contenu en mannanes des levures plutôt qu'aux *bêta*-glucanes.

L'autorité irlandaise rapporte également les résultats d'un certain nombre d'études qui démontrent que les levures de *bêta*-glucanes peuvent agir comme de puissants adjuvants dans la production d'anticorps et à favoriser l'hypersensibilité retardée chez la souris. Toutefois, comme le mentionne l'autorité irlandaise, la faible teneur en protéines du NI rend peu probable cette capacité adjuvante (de production d'anticorps). Par ailleurs des doses systémiques considérables de *bêta*-glucanes sont nécessaires pour stimuler l'hypersensibilité retardée. Ce risque est donc limité dans le cadre des *bêta*-glucanes alimentaires.

L'Afssa conclut que les données disponibles sur les bêta-glucanes n'indiquent aucun effet indésirable sur la base d'études réalisées selon les BPL. Cependant ces données sont incomplètes par rapport aux exigences réglementaires telles que définies dans le règlement 258/97. En effet, il n'y a pas de données de toxicité sur les fonctions de reproduction et de données de génotoxicité. Néanmoins, l'absence de manifestations particulières d'intolérance malgré la présence de ces dérivés dans certains végétaux largement consommés et leur utilisation dans des pratiques alimentaires très variées hors du champ « novel food », permet de considérer acceptables ces faiblesses réglementaires. Par ailleurs, L'Afssa considère que l'effet observé sur le temps de coagulation dans l'étude de 91 jours chez le rat mériterait d'être confirmé ou infirmé.

5. CONCLUSION

L'autorité irlandaise conclut que la levure *S. cerevisiae* et les *bêta*-glucanes sont utilisés depuis longtemps sans problème de sécurité.

Les consommations estimées calculées par le pétitionnaire se basent sur un scénario maximaliste et sont relativement proches en valeurs des niveaux de sécurité déterminés par le biais d'études chez l'Homme et chez l'animal. Cependant, ce scénario a peu de chance de se réaliser pour les différents groupes de population, en particulier les enfants. De plus, les niveaux de sécurité retenus par le pétitionnaire, lesquels n'ont pas d'effets indésirables, sont les niveaux les plus élevés testés et ne sont donc pas les niveaux supérieurs de sécurité en soi.

Le FSAI ajoute que les effets sur l'immunostimulation des *bêta*-glucanes sont complexes et ne peuvent pas ici être considérés ni comme des facteurs de risque ni bénéfique pour une partie de la population. Considérant le faible niveau d'absorption des *bêta*-glucanes, il est difficile de déterminer si l'adjonction de ce NI aux catégories d'aliments citées, aura des effets immunostimulants. Néanmoins, le FSAI ajoute que, l'information mentionnée sur l'étiquetage pourrait être considérée comme une forme de gestion du risque.

L'autorité irlandaise est satisfaite du dossier du pétitionnaire. Elle n'a pas d'inquiétude quant à l'utilisation des *bêta*-glucanes dans les aliments proposés et dans les quantités prévues.

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments émet un avis réserve basé sur le fait que des effets indésirables (baisse dose-dépendante du temps de coagulation) ont été observé chez le rat mâle à des doses inférieures à la NOAEL proposée et qu'il

n'existe pas de marge de sécurité suffisante entre cette NOAEL et les estimations de consommation estimées par le pétitionnaire. Les valeurs historiques mentionnées dans l'étude de 90 jours doivent être fournies afin que les modifications significatives du paramètre hématologique puissent être interprétées.

Le directeur général

Marc MORTUREUX

MOTS-CLES

BETA-GLUCANES, LEVURE, SACCHAROMYCES CEREVISIAE, IMMUNITE, NOUVEL INGREDIENT.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Babicek K, Cechova I, Simon RR, Harwood M, Cox DJ (2007) Toxicological assessment of a particulate yeast (1,3/1,6)-bêta-D-glucan in rats. *Food Chem Toxicol* **45**, 1719-1730.

Feletti F, De Bernardi di Valserra M, Contos S, Mattaboni P, Germogli R (1992) Chronic toxicity study on a new glucan extracted from *Candida albicans* in rats. *Arzneimittelforschung* **42**, 1363-1367.

McBurney MI (1991) Potential water-holding capacity and short-chain fatty acid production from purified fiber sources in a fecal incubation system. *Nutrition* **7**, 421-424.

Nakamura T, Agata K, Mizutani M, Iino H (2001a) Effects of brewer's yeast cell wall on constipation and defecation in experimentally constipated rats. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**, 774-780.

Nakamura T, Nishida S, Mizutani M, Iino H (2001b) Effects of yogurt supplemented with brewer's yeast cell wall on constipation and intestinal microflora in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **47**, 367-372.

Yoshida Y, Naito E, Ohishi K, Okumura T, Ito M, Sato T, Sawada H (2007) Effect of *Kluyveromyces marxianus* YIT 8292 crude cell wall fraction on serum lipids in normocholesterolemic and mildly hypercholesterolemic subjects. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**, 900-905.