

Maisons-Alfort, le 10 avril 2001

Le Directeur Général

AVIS

Saisine n° 2000-SA-0250

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif aux compléments d'information fournis en réponse aux questions des Etats-membres sur le rapport d'évaluation initiale réalisé par le Royaume-Uni au sujet d'un nouvel ingrédient, le tréhalose

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 17 octobre 2000, par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes d'une demande d'avis relative au rapport d'évaluation initiale réalisé par le Royaume-Uni au sujet d'un nouvel ingrédient, le tréhalose.

Après consultation des comités d'experts spécialisés, « Nutrition humaine » le 15 novembre 2000, « Biotechnologie » le 23 novembre 2000 et « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques » le 5 décembre 2000, l'Afssa a rendu un avis le 11 décembre 2000 comportant une demande de compléments d'information.

L'Afssa a été saisie, le 12 mars 2001, par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes d'une demande d'avis sur les compléments d'information, fournis par le pétitionnaire en réponse aux questions des Etats-membres.

Après consultation des Comités d'experts spécialisés « Nutrition humaine » le 27 mars 2001, « Biotechnologie » le 4 avril 2001 et « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques » le 3 avril 2001, l'Afssa émet l'avis suivant :

Considérant l'avis de l'Afssa, du 11 décembre 2000, relatif au rapport d'évaluation initiale réalisé par le Royaume-Uni sur le sujet concerné ;

Considérant que le tréhalose est un diholoside non réducteur constitué de deux molécules de glucose liées par une liaison α -1-1' glucosidique, naturellement présent dans l'hémolymphe des insectes et en petites quantités dans certains champignons, dans les levures (et vraisemblablement dans le pain et les boissons fermentées) et dans le miel ;

Considérant que le pétitionnaire présente le dossier comme relatif à un nouveau procédé de fabrication d'un ingrédient déjà autorisé ; considérant que le Royaume-Uni a donné en 1991 une autorisation pour l'utilisation du tréhalose (obtenu selon un procédé différent de celui qui fait l'objet de la demande) pour la stabilisation de certains aliments pendant les procédés de séchage et de réhydratation (lait en poudre, soupe sèche) et pour un usage alimentaire ; considérant que cette autorisation semble n'avoir été suivie d'aucune utilisation (il n'en est pas fait mention dans le rapport d'évaluation) ;

Considérant que les compléments d'information demandés par l'Afssa dans son avis du 11 décembre 2000 sont rappelés ci-dessous, suivi des commentaires du comité concerné sur la réponse du pétitionnaire :

1. Fournir des études toxicologiques appropriées démontrant l'innocuité des enzymes CGTase de *Bacillus stearothermophilus*, MTTase et MTSase d'*Arthrobacter ramosus*, ainsi que celle des souches bactériennes d'*Arthrobacter ramosus* et de *Pseudomonas amyloclavata*.

Considérant que la réponse apportée pour démontrer l'innocuité de la CGTase repose, d'une part sur l'innocuité du micro-organisme producteur (*B. stearothermophilus*), micro-organisme de classe 1, considéré comme non pathogène, d'autre part sur l'analogie de séquence entre la CGTase de *B. stearothermophilus* et celle de *B. circulans*, enzyme considérée comme sûre pour la production de β -cyclodextrine¹ ; considérant toutefois qu'un gage absolu de cette innocuité serait de démontrer la stricte identité de ces deux séquences enzymatiques ; considérant que le pétitionnaire démontre l'innocuité de l'isoamylase de *Pseudomonas amyloclavata*, par un essai de mutagenèse *in vitro* (test de Ames) et une étude de toxicité répétée par voie orale pendant 90 jours ;

Considérant en revanche que les tests de toxicité réalisés sur les enzymes MTSase et MTTase (test de Ames, test de toxicité aiguë chez le rat) ne sont pas suffisants pour démontrer l'innocuité de ces deux enzymes ; considérant que le test de toxicité aiguë chez la souris ne permet pas de démontrer l'innocuité de la souche de *Pseudomonas amyloclavata* ; considérant de plus que le pétitionnaire n'apporte pas d'élément complémentaire permettant d'évaluer l'innocuité de *Arthrobacter ramosus*, producteur des enzymes MTTase et MTSase ;

Considérant que, compte tenu de l'innocuité démontrée du tréhalose, produit fini, si une autorisation devait être donnée pour la mise sur le marché du tréhalose fabriqué par ce système enzymatique, elle ne devrait pas présager des utilisations ultérieures des micro-organismes et des enzymes impliqués, pour lesquels l'évaluation est insuffisante ;

2. Compléter les spécifications du tréhalose suivantes : aspect, coloration, limite en arsenic, pH en solution. Indiquer une limite maximale pour les substances glycosidiques pour un produit de pureté commerciale, avec mention de la méthode de quantification validée. Fournir des analyses de lot pour la totalité des spécifications de contrôle retenues. Fournir des informations concernant l'hygroscopicité de la forme dihydrate du tréhalose. Présenter les résultats comparatifs des analyses physico-chimiques permettant de justifier l'analogie du tréhalose obtenu selon les deux procédés de fabrication.

Considérant que le pétitionnaire n'a pas fourni les résultats d'une analyse de lot conforme à la monographie du tréhalose mais une compilation de résultats permettant de répondre aux questions posées sur les spécifications de contrôle retenues.

¹ enzyme autorisée par l'arrêté du 24 mars 1993 relatif à l'emploi de la β -cyclodextrine comme auxiliaire technologique

Considérant que le pétitionnaire indique qu'il est précisé dans le dossier de base que le taux d'hygroscopicité de la forme dihydrate est faible, et que, dans ce cas le test de perte à dessiccation avec une limite de 1,5 % est suffisant. Sur les 20 lots commerciaux récents, la valeur de la perte à dessiccation varie de 0,04 % à 0,1 % ; considérant que la réponse est recevable ;

Considérant que la réponse fournie par le pétitionnaire relative aux résultats comparatifs des analyses physico-chimiques permettant de justifier l'analogie du tréhalose obtenu selon les deux procédés de fabrication, n'est pas recevable ; considérant que le Merck Index indique que le point de fusion du tréhalose dihydrate, est compris entre 96,5°C et 97,5°C ; considérant que le pétitionnaire indique une valeur unique de 97°C pour le procédé enzymatique et d'autres valeurs pour le procédé à partir de levure : 99°C à 99,5°C selon un article paru en 1935 ; 102,5°C selon un article paru en 1925 ; considérant que le pétitionnaire indique que le pouvoir rotatoire est de +199° pour le procédé enzymatique et de +179°C pour le procédé à partir de levure selon un article paru en 1950 ; de +185° selon un article paru en 1935 et de +199° selon un article paru en 1925 ; considérant que le pétitionnaire justifie la différence de résultats par la différence de pureté du Tréhalose, qu'il aurait été plus judicieux de réaliser une comparaison expérimentale de la pureté du produit obtenu selon les deux procédés de fabrication.

Considérant que l'analogie exacte entre les deux procédés de fabrication du tréhalose n'est argumentée que par des données bibliographiques qui ne sont pas convaincantes.

Considérant qu'il n'a pas été fourni la validation de la méthode de dosage du tréhalose et de ses impuretés permettant d'apprécier la justification de la norme en tréhalose (> 98 %) alors que 20 lots commerciaux récents montrent un titre supérieur à 99,3 %.

Considérant qu'il n'a pas été retenu de limite en substances glycosidiques totales alors que ces substances, sur 20 lots commerciaux récents, peuvent apparaître jusqu'à environ 0,8 % avec un titre en tréhalose supérieur à 99,3 %, ce pourcentage pouvant augmenter avec un titre de 98 %.

3. Fournir les résultats de recherche de bactéries sporulées, activités enzymatiques résiduelles, présence de protéines enzymatiques dénaturées ;

Considérant que le pétitionnaire indique que la préparation issue de *Bacillus* est filtrée sur 0,22 µm ; considérant que ceci devrait garantir l'absence de spores dans la préparation ; considérant qu'il n'est pas précisé la méthode qui sera retenue pour la filtration à l'échelle industrielle ;

Considérant qu'il est démontré l'absence d'activité enzymatique résiduelle dans la préparation (tests ELISA), et probablement l'absence d'enzymes dénaturées ;

Considérant que le dosage des protéines réalisé après minéralisation, par la méthode de KJELDAHL, indique des résultats de l'ordre de 70-80 mg / kg ; considérant que cette teneur est élevée ; et qu'il n'est pas indiqué la nature chimique des composés dosés ;

4. Intégrer dans le rapport d'évaluation, les études de toxicité répétée sur 14 jours chez la souris et chez le chien.

Considérant que la réponse du pétitionnaire est satisfaisante ;

5. Fournir des comparaisons (bibliographique ou expérimentale), avec des quantités isomoléculaires de maltose pour vérifier si les effets observés dans les essais de tolérance clinique sont dus à une charge (ou une surcharge) physiologique de glucose ou de tréhalose non digéré.

Considérant que le pétitionnaire apporte des résultats d'études complémentaires indiquant que le tréhalose augmente moins la glycémie que le maltose ou le glucose ; considérant qu'il semble que le tréhalose soit hydrolysé moins vite que le maltose et donc moins rapidement biodisponible ; Considérant que le tréhalose est un sucre, dont l'indice glycémique est inférieur à celui du glucose, et qu'il est probablement moins bien assimilé que les autres glucides ; qu'il est responsable d'un certain degré d'appel d'eau dans la lumière intestinale et de fermentation colique ; considérant cependant que le risque d'inconfort intestinal paraît négligeable ; considérant que ces deux essais cliniques nouveaux, bien que limités par le nombre de patients, apportent des renseignements convaincants ;

6. Fournir des renseignements précis sur les utilisations envisagées du tréhalose (boissons etc....), permettant de valider les estimations de consommation et d'exposition pour les pays européens.

En cas de dépassement des doses testées dans les essais cliniques fournis dans le présent dossier, il conviendrait de présenter des essais cliniques supplémentaires pour démontrer la tolérance aux doses envisagées.

Considérant que l'argumentaire avancé par le pétitionnaire sur la tolérance digestive d'une part et sur la rareté de la déficience en tréhalase par rapport à celle en lactase d'autre part est convaincant ;

7. Faire figurer la mention « le tréhalose contient du glucose » sur l'étiquetage, apportant ainsi une information claire et compréhensible pour le consommateur en général et pour le diabétique en particulier.

Considérant que le pétitionnaire suggère que la dose de tréhalose figure dans la déclaration du contenu global en sucres ainsi que dans la liste des ingrédients glucidiques ; considérant que cette proposition est inacceptable alors que la proposition de mentionner sur l'étiquetage « tréhalose contient du glucose », retenue aussi par d'autres pays de la communauté européenne, fournit l'information utile au consommateur en général et au diabétique en particulier.

Considérant que le tréhalose est un diholoside se transformant en deux molécules de glucose après absorption ; que c'est un sucre rare dont l'appellation est peu parlante ; qu'il est important que le consommateur diabétique puisse identifier les composants sucrés pour les quantifier dans sa ration quotidienne, car il peut être confondu avec un édulcorant et donc négligé dans la ration glucidique ;

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime que les compléments d'information fournis par le pétitionnaire apportent des éléments de réponse convaincants quant à la tolérance digestive du tréhalose.

Néanmoins, l'Afssa estime que les compléments d'information restent insuffisants sur les deux points essentiels suivants :

1. préciser la méthode retenue pour la filtration de bactéries sporulées à l'échelle industrielles et indiquer la nature chimique des composés (70-80 mg/kg) dosés par la méthode de KJELDAHL.
2. faire nécessairement figurer sur l'étiquetage la mention « le tréhalose contient du glucose », apportant ainsi une information claire et compréhensible pour le consommateur en général et pour le diabétique en particulier.

Les compléments d'information fournis ne permettent pas en outre de répondre aux observations formulées sur :

3. l'innocuité des enzymes MTTase et MTSase produites par *A. ramosus*, et des souches d'*A. ramosus*, et *P. amyloclavata*.
4. la validité de la méthode de dosage du tréhalose et de ses impuretés permettant d'apprécier la justification de la norme en tréhalose (>98%) alors que 20 lots commerciaux récents montrent un titre supérieur à 99,3% ; l'indication d'une limite en substances glycosidiques totales ; la démonstration convaincante de l'analogie exacte entre les deux procédés de fabrication du tréhalose.