



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

relatif à l'évaluation du rapport d'évaluation initiale des autorités britanniques concernant la mise sur le marché d'un nouvel ingrédient alimentaire : dihydrocapsiate 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 et 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 a été saisie le 27 avril 2011 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (Dgccrf) d'une demande d'avis relatif à l'évaluation du rapport d'évaluation initiale des autorités britanniques concernant la mise sur le marché d'un nouvel ingrédient alimentaire : dihydrocapsiate synthétique.

2. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Le dihydrocapsiate (DHC) appartient à la famille des capsinoïdes et est naturellement présent dans certaines espèces de piments et de poivrons. Toutefois, la teneur de ces végétaux en DHC est basse. Le pétitionnaire a ainsi développé un procédé permettant de produire du DHC synthétique. Ce nouvel ingrédient (NI) est produit à partir de la réaction d'estérification de l'alcool vanillique (VOH) et de l'acide 8-méthyl nonanoïque (MNA).

Le dihydrocapsiate synthétique a fait l'objet d'une demande de mise sur le marché auprès des autorités britanniques au titre du Règlement CE n°258/97 relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients alimentaires. Le rapport d'évaluation initiale établi par les autorités britanniques est soumis à l'Anses pour observations ou objections éventuelles.

Le NI est destiné à être utilisé dans une large gamme d'aliments. Dans son dossier, le pétitionnaire indique que le NI est susceptible d'augmenter la dépense énergétique et l'oxydation lipidique. Il indique par ailleurs que le NI apporte la sensation de fraîcheur associée au piment, sans la saveur piquante de celui-ci (induite par les capsaïcinoïdes).

Le pétitionnaire considère que le NI appartient à la classe 1.2 définie dans la Recommandation 97/618 de la Commission européenne regroupant les substances simples chimiquement définies ou des mélanges de celles-ci, ne provenant pas de végétaux, d'animaux ou de micro-organismes génétiquement modifiés, et dont la source n'a jamais été utilisée comme aliment dans la Communauté.

D'après le tableau II de la recommandation 97/618, les informations requises pour les NI de la classe 1.2 sont les suivantes :

- I. Spécification du NI
- II. Effet du procédé de production appliqué au NI
- III. Utilisation antérieure de l'organisme utilisé comme source de NI
- IX. Consommation/Niveau d'utilisation prévu
- XI. Informations d'ordre nutritionnel sur le NI
- XII. Informations d'ordre microbiologique sur le NI
- XIII. Informations d'ordre toxicologique sur le NI

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) « Nutrition humaine » (CES pilote, réuni le 26 mai 2011), « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques » (consulté par correspondance en raison des courts délais de réponse impartis) et « Biotechnologie » (réuni le 19 mai 2011), sur la base de rapports initiaux rédigés par 5 rapporteurs.

4. ANALYSE ET CONCLUSION DES CES

I. Spécification du NI

La formule chimique du DHC est $C_{18}H_{28}O_4$ et sa dénomination selon la nomenclature chimique est (4-hydroxy-3-méthoxybenzyle) 8-méthylnonanoate. Le NI se présente sous la forme d'un liquide visqueux, incolore à jaune pâle. Il est insoluble dans l'eau et soluble dans l'éthanol et l'hexane.

Selon les spécifications indiquées par le pétitionnaire, le NI doit contenir un minimum de 94 % de DHC, un maximum de 1 % d'alcool vanillique (VOH) et de 7 % d'acide 8-méthyl nonanoïque (MNA) (réactifs de synthèse) et un maximum de 2 % de substances apparentées de synthèse (co-produits, impuretés, etc.). Le NI doit contenir moins de 5 mg/kg de n-hexane (solvant résiduel), et moins de 1 mg/kg de chacun des composés suivants : arsenic, cadmium, plomb ; magnésium¹, cuivre¹.

Le pétitionnaire fournit les résultats d'analyse de 7 lots de NI produits dans une installation pilote (du même type que l'installation qui sera utilisée pour la production commerciale du NI, mais à échelle réduite). Il indique que ces résultats permettent de montrer que le procédé de fabrication et le produit obtenu sont hautement reproductibles, et que le NI est conforme aux spécifications. Le DHC représente 93,5 à 95,7 % du NI. Les résidus de réactifs (VOH et MNA), de solvant (n-hexane) et les teneurs en substances apparentées de synthèse sont conformes aux spécifications. Le pétitionnaire a identifié quatre principaux co-produits de la réaction - vanillyl 6-bromohexanoate, vanillyl décanoate, vanillyl dihydrocapsiate et diacyl ester - qui représentent de 77 à 91 % des substances apparentées de synthèse.

¹ métaux lourds potentiellement rémanents suite à un traitement par un sel, catalyseur, etc. au cours de la fabrication

Ce point ne soulève pas de remarque particulière de la part du comité britannique.

Le CES NUT note que seule la présence des deux derniers réactifs (VOH et MNA) utilisés dans le procédé de synthèse est recherchée dans le produit fini et non pas les impuretés liées à leur origine. Toutefois, les spécifications de pureté sont élevées pour ces deux réactifs (> 98,8 % pour le VOH et > 98 % pour le MNA). De plus, l'étape d'extraction par le n-hexane permet de purifier le DHC, particulièrement lipophile par rapport aux réactifs et à certaines substances apparentées de synthèse. Il ne semble donc pas nécessaire de rechercher dans le produit fini de potentielles impuretés associées aux réactifs.

En accord avec le comité britannique, le CES NUT estime que les spécifications proposées par le pétitionnaire et les contrôles réalisés sont satisfaisants et permettent de garantir un produit de qualité correcte et constante.

II. Effet du procédé de production appliqué au NI

Le dihydrocapsiate (DHC) est produit par estérification de l'alcool vanillique (V-OH) et de l'acide 8-méthylnonanoïque (MNA) sous l'action d'une lipase immobilisée sur support inerte. Le DHC est ensuite purifié pour aboutir au NI.

La lipase utilisée est une préparation enzymatique issue d'une souche d'*Aspergillus niger* génétiquement modifiée (DB) contenant le gène codant la lipase de *Candida antarctica*. Elle est autorisée en France dans les industries des huiles alimentaires pour l'hydrolyse des triglycérides afin de permettre une inter-estérification.

L'enzyme est éliminée par les étapes de purification.

Le pétitionnaire présente par ailleurs les résultats de tests de stabilité. Ils montrent que le NI, stocké jusqu'à 2 ans dans des sacs d'aluminium placés dans des containers scellés à 5 ou - 20 ° C, est stable. Le pétitionnaire propose ainsi une durée de conservation du NI d'au moins 12 mois.

Ce point ne soulève pas de remarque particulière de la part du comité britannique.

Le CES « Biotechnologie » est en accord avec les conclusions du comité britannique.

Le CES NUT souligne que le NI semble stable jusqu'à 2 ans dans les conditions testées par le pétitionnaire, qui devraient figurer sur l'étiquetage du NI. Le CES NUT note par ailleurs que la stabilité du NI dans les aliments dans lesquels il sera incorporé n'est pas connue et que celle-ci devra faire l'objet d'études spécifiques.

Le CES AAAT note pour sa part que les tests portant sur la stabilité du NI, réalisées entre 5°C et - 20°C ne rapportent pas de changements sur les caractéristiques organoleptiques et physico-chimiques. Toutefois, le CES AAAT remarque que parmi les produits visés par la demande, certains devraient subir des traitements à des températures supérieures à 5 °C. Le CES AAAT estime en conséquence que la stabilité thermique du NI devrait également être testée à des températures représentatives de celles des conditions de fabrication des produits visés par la demande.

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

Dans cette partie, le pétitionnaire calcule les quantités de DHC susceptibles d'être apportées par la consommation de poivrons, piments, et de leurs produits dérivés (épices, sauces, etc.). Le pétitionnaire rappelle que la recommandation 97/918 de la Commission européenne relative aux nouveaux aliments et nouveaux ingrédients requiert des informations sur l'organisme utilisé comme source du NI. Par ailleurs, les éléments présentés permettent d'apporter des « *informations fournies par une exposition humaine antérieure au NI ou à sa source* », bien que ce point (X) ne soit pas requis pour un NI de la classe 1.2.

Sur la base des données de dosage de DHC disponibles dans la littérature d'une part, d'extrapolations à partir du dosage d'autres capsinoïdes ou de capsinoïdes totaux d'autre part, le pétitionnaire détermine une concentration moyenne de 19 mg/kg et une concentration de DHC au 97,5^{ème} percentile de 68 mg/kg dans les piments et poivrons.

En croisant ces données avec les données de consommation apparente moyenne de piments et poivrons fournies par la FAO pour 157 pays, le pétitionnaire en déduit des apports moyens en DHC pouvant aller jusqu'à 5-16 mg/j (soit 0,07 à 0,27 mg/kg poids corporel (pc)/j) dans certains pays de l'Europe de l'Est.

Les estimations des apports sont également calculées pour la population britannique sur la base des données de consommation issues du *National Dietary and Nutrition Survey* (NDNS). L'apport de DHC est estimé à 0,01 mg/kg pc/j au 97,5^{ème} percentile, le niveau d'apport maximal étant estimé à 0,06 mg/kg pc/j.

Le comité britannique ne s'est pas prononcé sur ces données.

Ce point ne soulève pas de remarques de la part du CES NUT.

IX. Consommation/Niveau d'utilisation prévu

Le pétitionnaire indique qu'il prévoit de produire le NI pour son utilisation en tant qu'ingrédient dans une large gamme de produits incluant des produits de boulangerie, des boissons, des confiseries, des céréales, des substituts de repas, des desserts glacés, des yaourts, des repas surgelés, des soupes, des édulcorants et des assaisonnements. Le pétitionnaire ne produira pas lui-même les produits contenant du DHC mais commercialisera le DHC en tant qu'ingrédient. Dans ce contexte, il ne dispose pas d'informations spécifiques relatives à la formulation des produits susceptibles d'en contenir. En conséquence, le pétitionnaire demande une autorisation d'utilisation du NI à un niveau qui fournirait 3 mg de DHC par portion de produit consommé. La concentration de DHC dans le produit dépend donc des portions déterminées.

Pour estimer les niveaux de consommation, le pétitionnaire développe plusieurs approches. Il raisonne selon une hypothèse maximaliste selon laquelle tous les produits ciblés disponibles sur le marché (produits de boulangerie, boissons, confiseries, céréales, repas surgelés, soupes, substituts de repas, desserts glacés, yaourts, édulcorants, assaisonnements, etc.) seraient enrichis en DHC.

La première approche consiste à déterminer les concentrations susceptibles d'être introduites dans les aliments potentiellement enrichis en DHC, sur la base des portions moyennes déterminées pour chaque aliment. Ces estimations de concentrations sont ensuite croisées avec les données de consommations disponibles pour les différents produits : 1) pour la population britannique (UK National Dietary and Nutrition Survey (NDNS)) ; 2) pour des pays européens (Efsa, 2008).

La deuxième approche a été développée compte tenu des incertitudes de la première approche liées à la détermination des portions moyennes d'aliments. Le pétitionnaire a considéré que chaque occasion de consommation d'un produit susceptible d'être enrichi en DHC conduit à un apport de 3 mg. L'apport total en DHC reflète donc le nombre d'occasions de consommations de produits enrichis.

Le pétitionnaire a simulé les apports moyens en DHC via l'ensemble des aliments en additionnant les apports moyens de chaque catégorie d'aliments susceptibles d'être enrichis (en incluant les non consommateurs). Pour les apports aux percentiles élevés, il a estimé que cette approche n'était pas valable car les gros consommateurs ne sont pas nécessairement les mêmes pour les différentes catégories d'aliments enrichis. Ainsi, les niveaux d'apports élevés ont été estimés en additionnant le 95^{ème} percentile pour chaque catégorie d'aliment à l'apport moyen provenant du reste de l'alimentation.

Le pétitionnaire souligne que les résultats des deux approches sont concordants. Considérant les données de consommations du Royaume-Uni et de différents pays européens, il obtient les estimations d'apports suivantes :

- Chez l'adulte :
 - o les apports moyens en DHC ne sont pas susceptibles de dépasser 25 mg/j, soit 0,4 mg/kg pc/j ;

- les apports élevés ne sont pas susceptibles de dépasser 40 mg/j, soit 0,7 mg/kg pc/j.
- Chez l'enfant :
 - les apports moyens en DHC ne sont pas susceptibles de dépasser 15 mg/j, soit 1 mg/kg pc/j ;
 - les apports élevés ne sont pas susceptibles de dépasser 30 mg/j, soit 2 mg/kg pc/j.

Le pétitionnaire précise que les apports de DHC naturellement présent dans l'alimentation (cf. III.) ne sont pas susceptibles de contribuer de façon significative à l'apport total en DHC et qu'ils n'ont donc pas été intégrés dans ces calculs.

Le comité britannique a consulté les spécialistes de l'exposition alimentaire de la Food Standards Agency, qui ont estimé que l'utilisation par le pétitionnaire des données de consommation de la NDNS et de la base de données de l'Efsa était acceptable.

Comme souligné par le pétitionnaire, le comité britannique note par ailleurs que la détermination du niveau de NI à introduire dans les aliments sur la base d'une quantité de NI à atteindre pour une portion consommée constitue une approche déjà utilisée dans une demande de mise sur le marché d'un nouvel ingrédient ; cette approche n'avait pas soulevé d'objections. Ainsi, ce point n'a pas soulevé de questions supplémentaires de la part du comité britannique.

Le CES NUT estime que la méthode de simulation des apports élevés nécessite d'être détaillée.

XI. Informations d'ordre nutritionnel sur le NI

Le pétitionnaire indique que le DHC synthétique est identique au DHC naturellement présent dans les piments et les poivrons. Il peut donc être considéré comme nutritionnellement équivalent. Selon le pétitionnaire, sa valeur nutritionnelle est négligeable.

Le comité britannique a demandé des compléments d'information quant au but de l'ajout de DHC aux aliments.

Le pétitionnaire a indiqué que la consommation de piment peut entraîner une sensation de fraîcheur et de bien-être chez les consommateurs. L'ajout de DHC est ainsi destiné à procurer cette même sensation, sans la saveur piquante associée au piment.

Le pétitionnaire a ajouté par ailleurs que le DHC était susceptible d'induire une augmentation de la dépense énergétique, *via* une augmentation de la thermogénèse dans les tissus adipeux résultant d'une stimulation par le système nerveux sympathique. Il souligne toutefois que cet effet reste controversé et fait encore l'objet de recherches.

Le comité britannique indique être dubitatif quant à la finalité de l'ajout de DHC aux aliments. Il souligne toutefois que ce point ne relève pas de l'évaluation de la sécurité.

Le CES NUT estime que la finalité de l'ajout du DHC aux aliments en tant qu'ingrédient nécessite d'être clarifiée : le pétitionnaire évoque en effet d'une part un effet rafraîchissant et une sensation de bien-être, d'autre part un effet sur la bêta-oxydation lipidique.

XII. Informations d'ordre microbiologique sur le NI

Le pétitionnaire rappelle que le NI est produit par synthèse chimique dans des bonnes pratiques d'hygiène et qu'il est conservé à basse température dans des sacs scellés. Il estime ainsi que le risque de contamination microbienne est infime. Les résultats d'analyses de 4 lots de production sont présentés. Le compte total de bactéries aérobies est inférieur à 3000 UFC²/g, le compte de levures/moisissures est inférieur à 100 UFC/g et tous les lots sont négatifs pour la présence de coliformes.

² UFC : unité formant colonie

Ce point ne soulève pas de remarque de la part du comité britannique.

Il ne soulève pas non plus de remarques de la part du CES NUT.

XIII. Informations d'ordre toxicologique sur le NI

a. Biodisponibilité/Devenir métabolique du DHC

Le pétitionnaire présente les résultats d'une étude pharmacocinétique réalisée chez le rat mâle recevant par gavage 10 mg de DHC radiomarqué (Bernard et al., 2010). L'ingestion du DHC montre un rapide métabolisme de celui-ci en alcool vanillique, en acide vanillique et en acide 8-méthyl nonanoïque : les deux premiers sont alors rapidement éliminés sous forme de dérivés glucuronides et sulfates. Le DHC n'est pas détecté dans le plasma 15 minutes après son ingestion, la radioactivité détectée correspondant à des métabolites de son hydrolyse. L'excrétion de la radioactivité dans la bile, l'urine et les fèces, ainsi que sa distribution dans les tissus sont également mesurées, respectivement jusqu'à 48 h et 24 h après l'ingestion. Selon le pétitionnaire, cette étude montre que les radioactivités les plus élevées sont mesurées dans les principaux organes impliqués dans l'absorption, le métabolisme et l'excrétion, c'est-à-dire le tube digestif, le foie et les reins ; le DHC est hydrolysé dans l'intestin, et ses métabolites sont rapidement absorbés et conjugués dans le foie, puis majoritairement éliminés par les reins dans l'urine. Finalement, compte tenu de la demi-vie courte du DHC, de l'absorption rapide et des niveaux élevés d'excrétion de ses métabolites, le pétitionnaire estime qu'une accumulation de DHC dans les organes est peu probable.

Le pétitionnaire présente également les résultats d'études réalisées avec un extrait de poivron doux (« CH-19 sweet ») contenant 7,5 % de capsinoïdes (DHC, capsiate, nordihydrocapsiate) dont 20 % de DHC (Shirai et al., 2010). Chez le rat, les capsinoïdes ne sont pas détectés dans le sang portal après leur ingestion aux doses de 10 ou 100 mg/kg, dont 2 ou 20 mg de DHC/kg (dosages réalisés à 5, 15 et 30 minutes et 1, 2, et 4 h) tandis qu'à 30 minutes, de l'alcool vanillique, métabolite commun aux trois capsinoïdes, est détecté. Ceci suggère une hydrolyse rapide des capsinoïdes. Dans une étude chez l'Homme, on ne détecte pas de capsinoïdes ni d'alcool vanillique (VOH) dans le sang après l'ingestion de 15 ou 30 mg de capsinoïdes, dont 3,96 ou 7,92 mg de DHC (dosages à 15 et 30 minutes, 1, 2, 4, 8, et 24 h) (Bernard et al., 2008). Le pétitionnaire déduit de ces résultats un métabolisme rapide des capsinoïdes dans le tractus intestinal. Il indique que l'alcool vanillique localisé dans la veine porte est conjugué dans le foie pour donner les formes glucuronées et sulfatées de cet alcool. La recherche d'un potentiel effet inhibiteur des capsinoïdes sur les oxydases à fonction mixte du cytochrome CYP3A4 est négative (Takanohashi et al., 2010).

En ce qui concerne le risque d'accumulation de DHC dans le tissu adipeux ou dans le cerveau, le pétitionnaire reprend les résultats des études précédemment citées. Il rappelle que le DHC est métabolisé complètement, d'abord en VOH et MNA ; le VOH est majoritairement conjugué en glucuronate ou sulfate, une faible partie étant oxydée en acide vanillique. Dans l'étude de Bernard et al. (2010) réalisée chez le rat, la radioactivité mesurée dans les tissus correspond aux métabolites du VOH. Aucune radioactivité n'est détectée dans le cerveau 24 h après l'ingestion de DHC radiomarqué. On détecte encore de la radioactivité dans le tissu adipeux (blanc et brun) 24 h après l'ingestion de DHC mais son niveau diminue au fil du temps, parallèlement à la radioactivité plasmatique. Le pic plasmatique de radioactivité est observé 40 minutes après l'ingestion. L'excrétion totale après 72 h est de 98,1% (78,2 % *via* l'urine, 19,4 % *via* les fèces et 0,5 % *via* l'air expiré). La radioactivité résiduelle de la carcasse correspond à 4 % à 72 h. Le pétitionnaire indique que le métabolisme du MNA n'a pas été étudié compte tenu de la position du marqueur radioactif sur le DHC. Toutefois, il souligne qu'il s'agit d'un acide gras à chaîne moyenne, subissant probablement une β -oxydation mitochondriale ou péroxysomale.

b. Etudes de toxicologie

Le pétitionnaire a conduit un nombre élevé d'études réalisées *in vitro* ou chez l'animal qui ont été publiées dans la littérature scientifique. Certaines sont réalisées avec le DHC synthétique produit à échelle commerciale par le pétitionnaire, d'autres avec du DHC produit en laboratoire, d'autres avec l'extrait de poivron doux « CH-19 sweet » contenant 7,5 % de capsinoïdes, dont 20 % de DHC. Il s'agit d'études de toxicité par administration unique (rat et souris), d'études de toxicité par administrations répétées de 13 et 26 semaines chez le rat, d'études de toxicité vis-à-vis de la reproduction (étude rat 2 générations, toxicité embryofœtale chez le rat et le lapin), d'études de génotoxicité (études de mutagenicité *in vitro* ; test du micronoyau chez la souris, essai de mutation génétique chez le rat et test de comètes chez le rat).

Sur la base des études conduites avec le DHC produit à échelle commerciale (Watanabee et al., 2008a ; Kodoma et al., 2010 ; Bernard et al., 2008a ; Watanabee et al., 2008 b), le pétitionnaire conclut à une toxicité aiguë faible du DHC (> 5000 mg/kg pc/j), à une bonne tolérance lors d'administrations répétées sur des durées de 13 à 26 semaines, au caractère non tératogénique et non mutagénique ou clastogénique du DHC. Le pétitionnaire conclut à une NOAEL³ de 1000 mg/kg poids corporel (pc)/j. Il indique que les seules modifications significatives ont été observées dans les études de toxicité subaiguës et subchroniques chez le rat, dans lesquelles des augmentations du poids du foie et des reins sont constatées dans le groupe recevant la dose de 1000 mg/kg pc/j. Il indique que ces modifications ne sont toutefois pas associées à des modifications histopathologiques. Le pétitionnaire note par ailleurs des modifications de l'alanine transaminase (ALAT), mais indique qu'elles restent dans les limites normales observées pour les rats de chaque sexe de ces tranches d'âge. Le pétitionnaire indique qu'une hypertrophie hépatocellulaire est observée chez deux rats recevant la plus forte dose (1000 mg/kg pc/j) dans l'étude de 13 semaines mais que cette pathologie n'est pas observée dans l'étude de 26 semaines. Ainsi, il a considéré que les études par administrations répétées de 13 et 26 semaines ne mettaient pas en évidence d'effet toxique, conduisant à une NOAEL de 1000 mg/kg pc/j.

En ce qui concerne les études réalisées avec le DHC produit en laboratoire (Kodama et al., 2008a ; Bernard et al., 2008b), le pétitionnaire estime que l'étude de 13 semaines réalisée chez le rat confirme la NOAEL de 1000 mg/kg pc/j. Il indique par ailleurs que le test d'Ames et le test de recherche d'aberrations chromosomiques sont positifs en l'absence de système d'activation métabolique (- S9) et négatifs en sa présence. En ce qui concerne l'étude de clastogénicité, le pétitionnaire conclut que le test est négatif bien qu'une altération de l'ADN soit constatée à la dose de 2000 mg/kg pc/j. Le pétitionnaire estime que cette altération n'est toutefois pas attribuable au traitement.

En ce qui concerne les études réalisées avec l'extrait de poivron doux « CH-19 sweet » (Kodama et al., 2008b ; Bernard et al., 2008c ; Kodama et al., 2008c ; Watanabe et al., 2008c ;), le pétitionnaire note que les doses de DHC administrées sont plus faibles que dans les études précédentes. Il indique que les résultats montrent l'absence de tératogénicité, génotoxicité ou de toxicité vis-à-vis de la reproduction. Il indique qu'une augmentation du poids du foie et des enzymes hépatiques (ALAT, ASAT, LDH⁴) est constatée chez environ 25 % des mâles recevant la plus forte dose testée dans l'étude de 26 semaines.

c. Etudes réalisées chez l'Homme

Le pétitionnaire présente les résultats de deux études réalisées chez l'Homme. Dans la première étude, 34 participants reçoivent à jeun 3 mg/j ou 12 mg/j de DHC sous forme de capsules pendant 8 jours. Dans la deuxième étude, 70 participants reçoivent une boisson contenant 0 (groupe placebo), 3, ou 9 mg de DHC pendant 4 semaines. Le pétitionnaire indique que les effets indésirables sporadiques rapportés par les participants dans les deux études (torticolis, élévation du cholestérol sanguin, élévation de l'urée sanguine, constipation, bradycardie, diarrhée, etc.) concernent rarement plus d'un participant pour un effet donné et qu'ils ne sont pas dose-

³ NOAEL : no observed adverse effect level

⁴ ALAT : alanine aminotransférase; ASAT : aspartate aminotransférase; LDH : lactic acid déshydrogénase

dépendants. Par ailleurs, les incidences sont similaires dans les groupes recevant la dose basse, la dose élevée ou le placebo. Le pétitionnaire estime que les variations mineures de pression artérielle observées ponctuellement chez des individus recevant du DHC dans ces deux études sont peu susceptibles d'être liées au traitement puisque une augmentation est observée dans une et une diminution dans l'autre.

Le comité britannique a examiné les rapports détaillés des deux études en ce qui concerne les modifications de pression artérielle et estime, en accord avec le pétitionnaire, qu'elles ne soulèvent pas d'inquiétude.

Le comité britannique a par ailleurs demandé des informations complémentaires concernant les effets du DHC ou de ses métabolites. Le comité britannique s'interrogeait en particulier sur 1) les interactions de ces composés avec les récepteurs vanilloïdes du tube digestif (cavité buccale et intestin) et 2) sur leurs éventuels effets neurologiques ou cardiovasculaires.

En réponse à la première interrogation, le pétitionnaire explique que le DHC interagit avec les récepteurs TRPV-1 (transient receptor potential vanilloid subfamily member 1). Le récepteur TRPV-1 est un canal ionique susceptible d'être activé par différents *stimuli* exogènes ou endogènes, comme une température supérieure à 43 °C ou comme la capsaïcine⁵. Les récepteurs TRPV-1 sont présents dans la bouche et dans le tractus intestinal, ainsi que dans les neurones de la nociception du système nerveux périphérique mais aussi dans d'autres tissus comme ceux du système nerveux central. Les récepteurs TRPV-1 sont notamment impliqués dans la transmission et la modulation de la douleur.

Dans la bouche, le pétitionnaire indique que les récepteurs TRPV-1 peuvent être activés par la capsaïcine et les capsinoïdes ; cependant, le potentiel d'interaction de la capsaïcine avec son récepteur serait plus élevé.

Dans le tractus digestif, les récepteurs TRPV-1 constituent les terminaisons nerveuses périphériques des neurones sensitifs primaires comme le nerf vague.

Compte tenu de l'hydrolyse rapide du DHC dans le tractus digestif, le pétitionnaire indique qu'il n'atteint pas la circulation sanguine. Il estime que les deux métabolites du DHC (VOH et MNA), qui sont absorbés, ne sont pas susceptibles d'avoir une activité significative ni d'agir avec les récepteurs TRPV-1.

Pour répondre aux interrogations du comité britannique sur les éventuels effets cardiovasculaires du DHC, le pétitionnaire s'appuie sur plusieurs études réalisées chez l'Homme. La première montre qu'une dose unique de 30 mg de capsinoïdes (dont environ 8 mg de DHC) est sans effet sur la pression artérielle et le rythme cardiaque. La deuxième (Shin et Moritani, 2008) montre que l'ingestion de 150 mg de capsaïcine⁶ une heure avant un exercice physique est sans effet sur l'activité du système nerveux autonome et l'activité électrique cardiaque chez des individus obèses. Une autre étude (Bernard et al., 2008 d) montre l'absence d'effet de l'ingestion de 30 mg de capsinoïdes (dont environ 8 mg de DHC) sur les niveaux sanguins et urinaires de catécholamines (adrénaline et noradrénaline) mesurés 15 et 30 minutes après l'ingestion, puis à plusieurs reprises au cours des 24 heures suivant l'ingestion.

En ce qui concerne les interrogations du comité britannique sur les éventuels effets neurologiques du DHC, le pétitionnaire indique que le DHC exerce uniquement des effets sensoriels locaux *via* les récepteurs TRPV-1 situés le long du tube digestif. Toutefois, le pétitionnaire indique que l'activation locale des récepteurs TRPV-1 par du DHC est susceptible d'agir sur les récepteurs du système nerveux sympathique du tissu adipeux blanc et brun *via* la stimulation du nerf vague afférent et du système nerveux sympathique, mais pas sur le cœur.

⁵ La capsaïcine est un amide du groupe des capsainoïdes extrêmement piquant, présent dans certaines espèces de piments et de poivrons

⁶ le pétitionnaire estime que ces résultats peuvent être pris en compte pour l'évaluation de la sécurité du DHC, la capsaïcine et le DHC ayant le même récepteur TRPV-1.

Conclusion du comité britannique sur les informations d'ordre toxicologique

Le comité britannique note que le pétitionnaire dérive des études de toxicité réalisées chez l'animal une NOAEL de 1000 mg/kg pc. Il estime qu'une NOAEL de 300 mg/kg pc serait plus appropriée, mais souligne qu'une grande marge de sécurité persiste entre la dose de 300 mg/kg pc et les estimations de consommation chez l'homme.

Le comité britannique indique ne pas avoir d'inquiétude quant à l'innocuité du DHC. En revanche, le comité britannique a demandé des compléments d'informations quant à l'absence d'activité des métabolites du DHC (VOH et MNA) mentionnée par le pétitionnaire.

En réponse à cette demande, le pétitionnaire a indiqué que ces deux substances sont utilisées en alimentation et qu'aucune référence dans la littérature n'indique d'activité pharmacologique. Par ailleurs, le pétitionnaire rappelle le long historique d'exposition à ces métabolites *via* la consommation de piments, et pour le VOH, de vanille. Ces données, combinées à l'absence d'effets dans les études réalisées avec du DHC chez l'animal et chez l'homme, sont en faveur de l'absence d'effets pharmacologiques de ces métabolites.

Au final, le comité britannique estime que la réponse du pétitionnaire est satisfaisante.

En ce qui concerne les données de biodisponibilité et le devenir métabolique du NI :

Les CES NUT et AAAT estiment que du fait de la rapide métabolisation du DHC en alcool vanillique, puis en acide vanillique d'une part, et en MNA d'autre part dans le tractus digestif, il est peu probable que le DHC puisse s'accumuler dans l'organisme et cibler les récepteurs TRPV-1 en dehors de ceux présents le long du tractus digestif, notamment ceux du système nerveux central. Toutefois, les récepteurs TRPV-1 (transient receptor potential vanilloid subfamily member 1) sont activés par différents stimuli, notamment des dérivés appartenant à la famille des vanilloïdes (pour revue Luo et al., 2011). Les données disponibles ne permettent pas de déterminer si ces récepteurs sont susceptibles d'être stimulés par les métabolites du DHC apporté aux doses envisagées par le pétitionnaire. De plus, aucune étude de neurotoxicité n'a été réalisée.

Par ailleurs, le CES NUT souligne que le MNA est un acide gras à chaîne courte mais ramifié et à nombre impair de carbones dans la chaîne carbonée. Ce type d'acide gras n'est pas synthétisé par l'organisme humain. Leur synthèse est d'origine bactérienne. Ainsi, ils sont susceptibles d'être présents uniquement à l'état de traces dans les produits fermentés ou dans les produits animaux issus des ruminants (métabolisation par les bactéries du rumen). Du fait du nombre impair d'atomes de carbone dans la chaîne carbonée et de la 2-méthylation de l'acide nonanoïque, le CES NUT s'interroge sur la capacité des cellules humaines à bêta-oxyder le MNA, notamment lorsque la quantité à métaboliser est élevée.

En ce qui concerne les études de toxicité :

Le CES AAAT note que les études de toxicité expérimentale réalisées sont nombreuses et recevables car conduites selon des lignes directrices japonaises sur les additifs alimentaires et sous bonnes pratiques de laboratoire (BPL) pour la plupart.

En ce qui concerne la toxicité par administrations répétées, des effets toxiques hépatiques liés à la substance ont été observés à la dose de 1000 mg/kg p.c./jour, effets qui ont été plus marqués avec l'extrait naturel. Dans le cas du DHC synthétique, ces effets sont modérés et apparemment réversibles ; néanmoins le CES AAAT estime qu'ils ne peuvent être ignorés et propose de retenir une NOAEL de 300 mg/kg pc/j. Au vu des rapports d'études disponibles, le CES AAAT estime que le DHC n'apparaît pas présenter de risques toxiques sur la reproduction chez les deux espèces considérées (rat et lapin).

Les données de génotoxicité présentent des résultats contradictoires. L'ambiguïté sur le potentiel d'induire des aberrations chromosomiques *in vitro* sur des cellules CHL/IU peut être levée par les résultats négatifs des tests *in vivo* du micronucleus chez la souris.

Cependant, concernant la recherche des mutations géniques *in vitro*, le CES AAAT estime que les résultats de ces tests réalisés avec des extraits naturels de CH 19 Sweet et le DHC synthétique, dans des conditions correctes (contrôles usuels, témoins positifs et négatifs, essais de confirmation), ont démontré que, dans ces conditions expérimentales, les extraits naturels de CH 19 Sweet et le DHC synthétique induisent des mutations géniques sur *Salmonella tiphymurium* souche TA 100. Cette souche révèle les mutations par substitution de paires de bases.

En ce qui concerne les études réalisées chez l'Homme :

Le CES NUT souligne que les 2 études réalisées chez l'homme sont de courte durée, d'effectif limité et testent des doses 3 fois plus basses que les doses maximales susceptibles d'être ingérées d'après les simulations du pétitionnaire. Ces études révèlent des effets sporadiques, non dose-dépendants, apparaissant aléatoirement dans les groupes placebo et expérimentaux.

Par ailleurs le CES NUT regrette qu'aucune étude n'ait été réalisée chez les enfants alors qu'ils sont susceptibles de consommer le DHC à des doses pouvant aller jusqu'à 2 mg/kg pc/j, ce qui correspond à 2 fois les doses susceptibles d'être ingérées chez l'adulte d'après les simulations présentées par le pétitionnaire.

XIV. Allergénicité et étiquetage

Le pétitionnaire mentionne que les piments peuvent provoquer des allergies mais souligne que rien n'indique que le DHC en est à l'origine.

Par ailleurs, le NI n'étant pas extrait d'une plante, la seule source potentielle de protéine serait la lipase utilisée dans le procédé de production. Celle-ci est immobilisée sur support inerte. Le fournisseur de l'enzyme a réalisé des tests montrant que l'enzyme n'est pas relarguée dans des conditions normales d'utilisation.

Finalement, il estime peu probable que le DHC ou le procédé de fabrication entraîne une allergie au NI.

Ce point ne soulève pas de remarques de la part du comité britannique.

Le CES NUT estime que le NI, du fait des contrôles qu'il doit satisfaire au cours du procédé de fabrication, n'est pas susceptible de présenter de risque allergique (cf. I. spécifications du NI).

Conclusions des CES

Les CES NUT et AAAT considèrent qu'il n'est pas possible en l'état de conclure à l'innocuité du NI aux doses susceptibles d'être apportées dans les conditions d'emploi proposées par le pétitionnaire, compte tenu :

- du manque de données sur la capacité des cellules humaines à bêta-oxyder le MNA, notamment lorsque la quantité à métaboliser est élevée ;
- des interrogations relatives à l'effet des dérivés vanilloïdes sur les récepteurs TRPV-1, notamment du système nerveux central ;
- des résultats positifs *in vitro* de la recherche des mutations géniques par test bactérien de mutation reverse avec *Salmonella tiphymurium* souche TA 100 ;
- de l'insuffisance méthodologique des études chez l'Homme (durée, effectif, dose) ;
- de l'absence d'étude chez l'enfant chez qui les doses susceptibles d'être ingérées sont 2 fois plus élevées par kg de poids corporel que celles chez l'adulte.

Le CES NUT estime que les spécifications du NI sont satisfaisantes et note que les résultats d'analyses présentés sont conformes à ces spécifications. Le CES « Biotechnologie » conclut que le procédé de production du NI ne génère pas de risque sanitaire pour le

consommateur dans les conditions présentées. Les CES NUT et AAAT estiment que la stabilité du NI est assurée pendant deux ans dans les conditions testées par le pétitionnaire mais qu'elle ne saurait être extrapolée aux diverses matrices des produits finis dans lesquels le NI est susceptible d'être incorporé.

Le CES NUT souhaiterait une description précise des méthodes de simulation des apports de DHC pour les plus forts consommateurs du NI ainsi que des clarifications quant à la finalité de l'ajout du DHC aux aliments. Il rappelle par ailleurs que la présente évaluation ne porte pas sur les éventuels effets bénéfiques du NI, susceptibles d'être revendiqués, qui devront faire l'objet d'évaluations spécifiques.

5. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Anses adopte les conclusions des CES Biotechnologie, AAAT et NUT.

Le directeur général

Marc MORTUREUX

MOTS-CLES

Novel food ; capsinoïdes, DHC, alcool vanillique, acide vanillique, 8-méthyl-nonanoate, piment, poivron, beta-oxydation, TRPV-1, effet rafraîchissant, nociception.

BIBLIOGRAPHIE

Bernard BK, Watanabe E, Kodama T, Tsubuku S, Otabe A, Ikeya M, Matsuoka T, Masuyama T. Studies of the toxicological potential of capsinoids: IX. Teratology studies of dihydrocapsiate in rats and rabbits. *Int J Toxicol.* 2008a;27 Suppl 3:119-36.

Bernard BK, Watanabe E, Kodama T, Tsubuku S, Otabe A, Nakajima M, Masumori S, Shimada S, Tanaka J, Masuyama T. Studies of the toxicological potential of capsinoids: V. Genotoxicity studies of dihydrocapsiate. *Int J Toxicol.* 2008b;27 Suppl 3:59-72

Bernard BK, Watanabe E, Kodama T, Tsubuku S, Otabe A, Katsumata Y, Matsuoka T, Masuyama T. Studies of the toxicological potential of capsinoids: IV. Teratology studies of CH-19 Sweet extract in rats and rabbits. *Int J Toxicol.* 2008c;27 Suppl 3:41-57.

Bernard BK, Tsubuku S, Kayahara T, Maeda K, Hamada M, Nakamura T, Shirai Y, Nakayama A, Ueno S, Mihara R. Studies of the toxicological potential of capsinoids: X. Safety assessment and pharmacokinetics of capsinoids in healthy male volunteers after a single oral ingestion of CH-19 Sweet extract. *Int J Toxicol* 2008 d; 27 Suppl 3: 137-47.

Bernard BK, Watanabe E, Kodama T, Tsubuku S, Otabe A, Katsumata Y, Matsuoka T, Masuyama T. Studies of the toxicological potential of capsinoids: IV. Teratology studies of CH-19 Sweet extract in rats and rabbits. *Int J Toxicol*. 2008c;27 Suppl 3:41-57.

Bernard, B.K., Ubukata K., Mihara R., Sato Y., Nemoto H., (2010) Studies of the Toxicological Potential of Capsinoids: XI. Pharmacokinetic and Tissue Distribution Study of ¹⁴C-Dihydrocapsiate (a Capsinoid) and Metabolites in Rats. *Int. J. Toxicol*. 29: Suppl 1, 3S-14S

Kodama T, Masuyama T, Kayahara T, Tsubuku S, Ohishi T, Wagner BM, Bernard BK. Studies of the toxicological potential of capsinoids XIV: a 26-week gavage toxicity study of dihydrocapsiate in rats. *Int J Toxicol*. 2010 Mar;29(2 Suppl):27S-54S.

Kodama T, Watanabe E, Tsubuku S, Otabe A, Mochizuki M, Masuyama T, Bernard BK. Studies of the toxicological potential of capsinoids: VII. A 13-week toxicity study of dihydrocapsiate in rats. *Int J Toxicol*. 2008 a;27 Suppl 3:79-100.

Kodama T, Watanabe E, Masuyama T, Tsubuku S, Otabe A, Mochizuki M, Bernard BK. Studies of the toxicological potential of capsinoids: II. A 26-week daily gavage dosing toxicity study of CH-19 Sweet extract in rats. *Int J Toxicol*. 2008 b;27 Suppl 3:11-27.

Kodama T, Watanabe E, Masuyama T, Tsubuku S, Otabe A, Katsumata Y, Bernard BK. Studies of the toxicological potential of capsinoids: III. A two-generation reproduction study of CH-19 Sweet extract in rats. *Int J Toxicol*. 2008 c;27 Suppl 3:29-39

Efsa (2008) Concise European consumption database
<http://www.efsa.europa.eu/en/datex/datexfooddb.htm>

Shin K.O., and Moritani T., Capsaicin supplementation fails to modulate autonomic and cardiac electrophysiologic activity during exercise in the obese: with variance of UCP2 and UCP3 polymorphism. (2008) 7, 365-370.

Shirai Y., Ueno S., Nakayama A., Ikeuchi K., Ubukata K., Mihara R., Bernard B. K. Studies of the toxicological potential of capsinoids, XII: pharmacokinetic study of capsinoid-containing CH-19 Sweet extract in rats. *Int J Toxicol* 2010 ; 29 Suppl 1, 15-21.

Takanohashi T., Isaka M., Ubukata K., Mihara R., Bernard B. K. Studies of the toxicological potential of capsinoids, XIII: inhibitory effects of capsaicin and capsinoids on cytochrome P450 3A4 in human liver microsomes. *Int J Toxicol* 2010 ; 29 Suppl 1, 22-26.

Watanabe E, Kodama T, Masuyama T, Tsubuku S, Otabe A, Mochizuki M, Bernard BK. Studies of the toxicological potential of capsinoids: VIII. A 13-week toxicity study of commercial-grade dihydrocapsiate in rats. *Int J Toxicol*. 2008a;27 Suppl 3:101-18.

Watanabe E, Kodama T, Masuyama T, Tsubuku S, Nakajima M, Bernard BK. Studies of the toxicological potential of capsinoids: VI. Single-dose toxicity study and micronucleus test of commercial-grade dihydrocapsiate. *Int J Toxicol*. 2008b;27 Suppl 3:73-7.

Watanabe E, Kodama T, Masuyama T, Tsubuku S, Otabe A, Mochizuki M, Nakajima M, Masumori S, Bernard BK. (b) Studies of the toxicological potential of capsinoids: I. Single-dose toxicity study and genotoxicity studies of CH-19 Sweet extract. *Int J Toxicol*. 2008c;27 Suppl 3:1-9.