

Maisons-Alfort, le 14 juin 2004

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments concernant une autorisation provisoire d'emploi du pullulan en tant qu'additif alimentaire en alimentation humaine dans le cadre de l'article 5 de la directive 89/107/CEE

Par courrier reçu le 6 août 2003, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 1^{er} août 2003 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes d'une demande d'avis sur l'autorisation provisoire d'emploi du pullulan en tant qu'additif alimentaire en alimentation humaine dans le cadre de l'article 5 de la directive 89/107/CEE.

Après consultation des Comités d'experts spécialisés « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques », réuni le 3 février 2004, et « Microbiologie », en date du 8 mars 2004, l'Afssa émet l'avis suivant.

Sur les aspects technologiques

Considérant que le pullulan (PI 20) est un polymère de glucose de masse moléculaire moyenne (Mw) compris entre 362 000 et 480 000 daltons (D) avec une masse moléculaire moyenne en nombre (Mn) comprise entre 100 000 et 200 000 D, formé d'unités de maltotrioses [2 unités glucose polymérisées par liaisons α (1? 4) liées entre elles par une liaison α (1? 6)] avec des unités de maltotétraoses occasionnelles ;

Considérant que le PI 20 est produit à partir de la souche de moisissure, *Aureobasidium pullulans*, champignon ubiquitaire reconnu comme non pathogène ;

Considérant, bien que certaines souches d'*Aureobasidium pullulans* peuvent être productrices d'une mycotoxine, l'aureobasidine A, que la souche décrite dans le dossier pour la production de PI 20 est non toxigène et non génétiquement modifiée ;

Considérant que cette souche a été testée pour l'activité mycotoxinogène de l'aureobasidine A et pour la production d'autres mycotoxines d'intérêt (aflatoxines, zéaralénone, sterigmatocystine et ochratoxine) et, que tous ces tests se sont révélés négatifs ;

Considérant en conséquence que la souche utilisée pour la production du PI 20 ne constitue pas un danger sanitaire dans le cadre de la production de ce polysaccharide ;

Considérant par ailleurs, que l'étape de purification sur colonne échangeuse d'ions, incluse dans le procédé de fabrication du PI 20, est de nature à garantir l'absence de mycotoxines dans le produit final ;

Considérant que la demande d'autorisation concerne son emploi dans l'enrobage des comprimés, tablettes, dragées, pilules, dans la confection de feuilles utilisées comme rafraîchisseur d'haleine et en tant que substitut de la gélatine dans la production des gélules dures et molles ; que cette utilisation de PI 20 est demandée en *Quantum Satis* ;

Considérant que l'aptitude du pullulan générique à former des films biodégradables a fait l'objet de travaux de recherche et que ces films biodégradables semblent présenter les caractéristiques requises pour une bonne préservation des produits alimentaires enrobés : résistance thermomécanique, imperméabilité aux gaz¹ ;

Considérant néanmoins que l'absence de propriétés thermogélifiantes réversibles ne permet pas d'attribuer au PI 20 le qualificatif de substitut de la gélatine ;

Sur les aspects pharmacocinétiques

Considérant que des données pharmacocinétiques *in vivo* n'étaient pas disponibles dans le dossier ;

Considérant que des études *in vitro* sur la digestibilité du PI 20 ont montré qu'il résistait à l'hydrolyse par un suc gastrique artificiel (16,7 mM HCl-KCl à pH 2,0) ; qu'il était partiellement hydrolysé en produits de poids moléculaire plus faible (Mw 70 000-130 000 D) par l'amylase salivaire humaine, par l'amylase pancréatique porcine et par les enzymes de l'intestin grêle de rat, avec dans ce dernier cas, une formation de glucose d'environ 6 %² ;

Considérant que des études *in vitro* sur la digestibilité du pullulan PI 10 (Mn 100 000 D) ont montré qu'il était lentement hydrolysé par un système enzymatique, validé chez l'homme, composé d' α -amylase et d'amyloglucosidase³ ;

Considérant que des études *in vitro* sur la fermentation du pullulan PI 5 (Mn 50 000 D) par une microflore fécale humaine ont montré qu'il était complètement métabolisé en acides gras à chaînes courtes après 8 heures d'incubation² ;

Considérant que ces résultats suggèrent que le PI 20 est peu hydrolysé dans l'estomac et l'intestin grêle et que la majeure partie du PI 20 ingéré parvient dans le côlon sans être métabolisée ni absorbée ;

Sur les aspects toxicologiques

Etudes de toxicité générique :

Considérant que les études toxicologiques *in vitro* disponibles dans le dossier (test d'Ames, DNA rec assay, et test d'aberrations chromosomiques sur des cellules ovariennes d'hamster chinois), bien que ne mettant pas en évidence d'effet génotoxique pour le pullulan générique, sont anciennes et que pour certaines, le protocole et les résultats n'ont pas été détaillés ;

Considérant que l'étude toxicologique *in vivo* disponible (test du micronoyau chez la souris) est difficilement exploitable dans la mesure où le protocole de l'essai et les résultats obtenus ne sont pas détaillés, que l'essai a été conduit sur un seul sexe et qu'un seul prélèvement de la moelle osseuse a été effectué (24 heures après l'administration) ; que dans cet essai, d'après les auteurs, une dose unique de pullulan générique administrée par voie intrapéritonéale (i.p.), de 1 800 mg/kg poids corporel (p.c.) ou 4 doses de 1 000 mg/kg p.c. (i.p.) en 24 heures n'ont pas augmenté la fréquence des érythrocytes micronucléés dans la moelle osseuse par rapport aux animaux témoins ;

Etudes de toxicité sub-aiguë :

Considérant qu'une étude de toxicité de 4 et 9 semaines chez le rat aux doses de 5 à 40 % de pullulan générique dans l'aliment, disponible dans le dossier, a montré une hypertrophie de l'intestin et de l'estomac à partir de la concentration la plus faible testée de 5 % (2 500 mg/kg p.c./jour) et de l'ensemble du tractus gastro-intestinal (estomac, cæcum et intestins) pour des concentrations supérieures ou égales à 20 % (10 000 mg/kg p.c./jour) ;

¹ Diab *et al. J. Sci. Food Agric* : **81**: 988-1000, 2001.

² Okada, K *et al. J. Jpn. Soc. Nutr. Food. Sci.* **43**: 23-19, 1990.

³ Wolf, B.W. *et al. J.Nutr.* **133**: 1051-1055, 2003.

Etudes de toxicité chronique et cancérogène :

Considérant qu'une étude de toxicité de 14 mois chez le rat aux concentrations allant de 1,5 à 10 % de pullulan générique dans l'aliment (1 000, 3 000 et 6 000 mg/kg p.c./jour en fin d'essai), disponible dans le dossier, a montré une hypertrophie du cæcum chez les femelles (pas de données disponibles chez les mâles) à la dose de 6 000 mg/kg p.c. par jour ;

Considérant que cette hypertrophie du cæcum était associée à la fermentation par la flore bactérienne intestinale du pullulan non absorbé⁴ ;

Considérant que dans cette même étude, l'évolution pondérale des rats mâles a été ralentie aux doses de 1 000 et 6 000 mg/kg p.c. par jour ; qu'aucun autre effet du traitement n'a été rapporté sur les paramètres hématologiques et de biologie clinique, sur le poids ou la structure microscopique des organes, dans les conditions de l'essai ;

Considérant que cette étude, initialement planifiée pour une durée de 24 mois, a été écourtée en raison d'une mortalité élevée des animaux par pneumonie, sans rapport avec le traitement et que dans ce cas, la fixation d'une dose sans effet pour le pullulan générique est rendue difficile du fait du faible nombre d'animaux encore vivants en fin d'étude ;

Considérant qu'aucune étude de toxicité de la reproduction n'était disponible dans le dossier ;

Considérant qu'aucune étude de cancérogène n'était disponible dans le dossier ;

Considérant, néanmoins, que d'après la nature chimique du PI 20 (semblable aux amylopectines), la survenue d'éventuels effets cancérogènes ou sur la reproduction paraît très peu probable ;

Etudes chez l'homme :

Considérant qu'une dose de 50 grammes par individu d'un pullulan PI 10 provoque une augmentation de la glycémie dans des proportions moindres que des doses équivalentes de maltodextrine, ainsi que des symptômes d'inconfort abdominal³ ;

Considérant qu'une dose de 10 grammes par individu et par jour pendant 14 jours d'un pullulan PI 5 a un effet sur l'équilibre de la flore intestinale (augmentation des *Bifidobacteria* et diminution des *Bacteroides*)⁵ ;

Considérant que ces deux derniers effets sont classiques des fibres alimentaires peu digestibles ;

Considérant ainsi qu'au regard de l'exposition attendue au PI 20, inférieure à 1 gramme par jour pour l'adulte et inférieure à 0,1 g par jour pour l'enfant, calculée par le pétitionnaire en fonction des utilisations demandées et des doses proposées, il est peu probable que ces effets se manifestent ;

Sur les aspects d'utilisations existantes

Considérant que le pullulan générique est utilisé au Japon depuis 1976, qu'il a obtenu le statut GRAS (Generally recognised as safe) aux USA et que les polymères de glucose contenant des liaisons α (1 \rightarrow 4) et α (1 \rightarrow 6) sont présents dans l'alimentation humaine,

Conclusion

L'Afssa estime que les données présentées concernant l'additif alimentaire pullulan PI 20 ne mettent pas en évidence de risque sanitaire pour le consommateur aux doses revendiquées par le pétitionnaire, au regard des doses auxquelles des effets chez l'homme et chez l'animal ont été identifiés.

⁴ Kimoto, T., Shibuya, T., Shiobara, S. *Food and Chemical Toxicology* **35**: 323-329, 1997.

⁵ Yoneyama M. *et al. Denpun Kagaku (Starch Science)* **37(3)**: 123-127, 1990.

L'Afssa précise qu'il n'a pas été possible d'estimer une dose journalière admissible (DJA) spécifique pour le PI 20 dans la mesure où les études toxicologiques expérimentales réalisées sont anciennes et pour certaines sont constituées essentiellement des courts résumés d'articles originaux en langue japonaise, n'ont pas été conduites selon les protocoles d'essai récents reconnus (ex. ceux de l'Organisation de coopération et de développement économiques), ne sont pas spécifiques du PI 20 et en conséquence ont été considérées comme incomplètes. Pour ces raisons, le dossier présenté ne répond pas pleinement aux lignes directrices européennes pour l'évaluation d'un additif alimentaire⁶.

En outre, en l'absence de données précises de consommation de compléments alimentaires par la population française (consommation de comprimés, gélules, etc), il n'a pas pu être procédé à une évaluation théorique de l'exposition qui confirmerait les calculs présentés par le pétitionnaire.

L'Afssa observe également qu'il conviendrait que les méthodes analytiques mises en oeuvre pour la caractérisation du PI 20 dans les applications envisagées soient mieux décrites et validées.

Martin HIRSCH

⁶ Guidance on submissions for food additive evaluations by the Scientific committee on food. July 2001.