

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 : taxifoline
issue de bois du mélèze de Dahurie (*Larix gmelinii*)

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 (Anses) a été saisie le 30 septembre 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 : taxifoline issue de bois du mélèze de Dahurie (*Larix gmelinii*).

2. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

La demande concerne un extrait enrichi en di-hydroquercétine (DHQ) appelé taxifoline, flavonoïde de type flavanone, extrait du bois du mélèze de Dahurie (*Larix gmelinii*). Le dossier de demande précise que la taxifoline est également présente dans d'autres arbres comme le pin maritime, source à partir de laquelle d'autres produits ont été élaborés, comme le pycnogénol qui contient de faibles quantités de taxifoline. Selon le dossier de demande, le NI est disponible depuis 15 à 20 ans sur le marché russe et aux Etats-Unis en tant qu'additif alimentaire pour ses propriétés antioxydantes. Le NI est destiné à être utilisé en tant qu'ingrédient alimentaire et le pétitionnaire revendique des effets bénéfiques en lien avec des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires.

Le NI contenant de la taxifoline a fait l'objet d'une demande de mise sur le marché auprès des autorités britanniques (FSA) 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 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

génétiqnement modifiés, et dont la source n'a jamais été utilisée comme aliment dans la Communauté européenne ». 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

Les autorités britanniques mettent en cause cette proposition de classement, considérant que la taxifoline n'a pas été utilisée antérieurement comme aliment dans la Communauté européenne. Les autorités britanniques considèrent plus approprié de classer le NI dans la classe 2 (nouveaux aliments complexes issus de sources non génétiquement modifiées).

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) « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques (AAAT) » et « Nutrition humaine (NUT) » (consultés par correspondance en raison des courts délais de réponse impartis), sur la base des rapports initiaux rédigés par des rapporteurs appartenant à ces comités.

4. ANALYSE ET CONCLUSION DES CES

I. Spécifications du NI

Le nouvel ingrédient est une poudre cristallisée obtenue par cristallisation d'eaux-mères d'extraction hydroalcoolique (éthanol 80%) de sciure de souches de *Larix gmelinii* sauvage.

Le NI est composé principalement (pour plus de 90%) de taxifoline (poids sec). La taxifoline, flavonoïde de couleur blanche à jaune-pâle, est décrite comme soluble dans l'eau chaude, l'éthanol et l'acétate d'éthyle. Sa solubilité dépend de la température et de la concentration d'éthanol. Son nom chimique est le (2R,3R)-2-(3,4-dihydroxyphényl)-2,3-dihydro-3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one. Selon le dossier de demande, la taxifoline est constituée des deux stéréoisomères, mais majoritairement la *trans*-dihydroquercétine. Les numéros CAS associés dans le dossier à ce composé sont : 480-18-2. Les numéros suivants pour cette molécule sont obsolètes : 5117-01-1 ; 5323-70-6 ; 17654-26-1 ; 20254-28-8 ; 24198-96-7 ; 28929-10-4 ; 98006-93-0.

Le pétitionnaire a pleinement conscience que la composition de l'extrait obtenu de *Larix gmelinii* peut varier en fonction de l'habitat, des conditions climatiques et des saisons. Le pétitionnaire a fourni les résultats d'analyse sur 5 lots du NI au total. Les teneurs en taxifoline obtenues dans ces lots ont été comprises entre 92,2 et 92,6 %.

Certains flavonoïdes faisant partie de l'extrait ont été également dosés mais la méthode utilisée n'est pas décrite précisément. Seuls quelques articles relatifs à des méthodes générales de dosage ont été fournis. Le protocole d'analyse n'est pas détaillé, notamment en ce qui concerne la préparation de l'échantillon (quel solvant ?) et la méthode HPLC utilisée (par exemple : quelle proportion des solvants A et B ? quelle élution en gradient ou isocratique ? le signal lors du conditionnement de la colonne a-t-il été enregistré ?). En outre, aucun chromatogramme n'est

disponible. De façon générale, il apparaît des biais dans la méthode de dosage, qui quoiqu'acceptables d'un point de vue analytique, peuvent fausser l'évaluation de la teneur réelle en impuretés. On note notamment que dans cette méthode la longueur d'onde est 290 nm, ce qui ne permet pas la détection de composés n'absorbant pas à cette longueur d'onde (néanmoins, l'origine cristallisée du produit suggère par exemple l'absence de glucides et/ou de lipides), et que la quantification des flavonoïdes se fait par normalisation interne.

Les autres flavonoïdes identifiés dans l'extrait sont : le flavanol dihydrokaempférol ou aromadendrine (2,5-3,22 %), la flavanone ériodictyol (0,12-0,26%), le flavanol quercétine (0,28-0,49 %), la flavanone naringénine (0,19-0,31%), le flavanol kaempférol (0,02-0,11 %) et la flavanone pinocembrine (0,02-0,16 %).

La somme de ces composés dosés avoisine les 96,0-96,7 % de matière sèche, le reste des composés dans l'extrait, environ 3 à 4 % (le pétitionnaire indique 2,8 % sans expliciter son calcul), n'a pas été identifié. Il convient d'évaluer la possibilité que ces impuretés contiennent des substances nocives et de s'assurer de l'innocuité de ces impuretés, même si elles sont en quantités faibles (elles représentent 4 mg pour la prise de 100 mg de taxifoline). Le pétitionnaire mentionne la présence de traces de saponosides, et invoque leur innocuité.

Au final, il reste une incertitude sur la nature des impuretés et une imprécision quant à leur teneur.

Les autorités britanniques ont sollicité des précisions concernant ces composés non identifiés et le pétitionnaire a répondu, que selon leur analyse bibliographique, les aliments à base de plantes contiennent une large variété de flavonoïdes, « qui normalement n'ont pas été associés à des effets toxicologiques significatifs ».

Les autorités britanniques ont considéré que les spécifications définies pour le produit par le pétitionnaire sont adéquates. Les autorités britanniques ont également accepté l'argument du pétitionnaire selon lequel la présence de flavonoïdes non identifiés dans le NI ne suscite pas de préoccupation sanitaire. Par ailleurs, les autorités britanniques ont accepté d'augmenter la spécification en taxifoline de 88 % à 90 % de matière sèche, en accord avec les spécifications définies par la Fédération russe. Enfin, les autorités britanniques ont accepté l'argument du pétitionnaire selon lequel le matériel de départ du NI n'avait pas été traité avec des herbicides ou des pesticides, et ont en conséquence indiqué qu'il n'y avait pas d'objection à ne pas demander de contrôles des résidus de pesticides, autres que ceux exigés par la Fédération russe.

Le CES NUT considère que les spécifications du produit fini sont satisfaisantes en l'état et que la requête de la FSA de spécifier 90% de taxifoline au lieu de 88% peut être reprise.

Le CES NUT estime que tous ces composés (flavonoïdes mineurs et saponines) sont communément présents, en faible quantité (<0,5%), dans les produits végétaux de notre alimentation.

Le CES NUT estime que la présence de mycotoxines paraît peu probable au vu du procédé de production (notamment, en raison de l'absence de délai significatif entre le broyage et l'extraction). La possibilité de contamination fongique sur les souches semble peu probable également puisque, d'une part, ces souches proviennent de bois de bûcheronnage qui est donc sain, et d'autre part, si une contamination fongique apparaissait (dans l'éventualité où les souches n'étaient pas collectées rapidement après la coupe des arbres), elle serait essentiellement externe et éliminée lors de l'examen des souches avant broyage.

En revanche, le CES NUT note que le dossier du pétitionnaire mentionne un contrôle de radionucléides sans préciser la mesure et les spécifications correspondantes, et suggère de vérifier que ce contrôle est réalisé de façon systématique pour tous les lots.

Le CES AAAT remarque que la taxifoline se caractérise par l'absence de double liaison en 2,3 et par la présence de 2 centres d'asymétrie. Il est donc théoriquement possible que quatre énantiomères de taxifoline soient présents dans le NI. Le CES NUT précise que chez les flavanones naturelles, si quatre isomères sont théoriquement possibles, la quasi totalité des composés connus à ce jour sont 2R, 3R. La biogenèse de ces composés étant enzymatique, elle favorise un seul diastéréoisomère. Le pétitionnaire décrit la forme *trans* de configuration 2R, 3R mais le CES AAAT précise qu'aucune vérification chimique n'a

réellement été faite sur le NI pour identifier d'autres énantiomères de taxifoline. Or, il est connu que le métabolisme des énantiomères ainsi que leur activité biologique/toxicité peut varier en fonction de l'énantiomère considéré.

Le CES AAAT remarque que la bibliographie disponible, la plupart en langue russe, ne permet pas de définir de manière exhaustive la composition du NI extrait du genre *Larix gmelinii*. Il a été rapporté que les extraits de *Larix gmelinii* et de *Larix sibirica* contiennent du larixidinol, du larixinol, du larisinol et un trimère, le triflarixinol¹. Cependant, peu de données biologiques sont disponibles sur ces composés qui présentent aussi des propriétés antioxydantes semblables à celle de la taxifoline. Les extraits de l'espèce *Larix* peuvent contenir également d'autres composés tels que des diterpènes, triterpènes, des composés volatils et des polysaccharides de type arabinogalactanes. Ces composés peuvent être extraits par l'eau et l'éthanol.

Le CES AAAT considère ainsi que les spécifications du NI couvrent correctement 96 % des composants. Cependant, le CES estime nécessaire que les composés présents dans les 3 à 4 % restants soient mieux identifiés et apparaissent dans ces spécifications.

Concernant la présence éventuelle de résidus d'herbicides ou de pesticides dans le NI, le CES AAAT rappelle que ce type de produits ainsi que les résidus tolérables dans les aliments font l'objet d'une abondante réglementation européenne².

II. Effet du procédé de production appliqué au NI

Le dossier précise que le NI est synthétisé à partir de l'écorce de l'arbre *L. gmelinii*. Pour l'obtenir, l'écorce est séchée (40-50°C) afin d'avoir un taux d'humidité de 20-25 %, puis broyée. Une extraction est alors réalisée par une solution éthanolique aqueuse de 75-85 % sous une température de 45-50°C. La taxifoline est très soluble dans l'éthanol mais peu dans l'eau, sa solubilité dans l'eau augmentant quand elle est chauffée (0,3 % à 40°C). L'éthanol est ensuite évaporé et la phase aqueuse est alors refroidie à 20-25 °C pour éliminer les composés résineux qui auraient été extraits. L'extrait aqueux obtenu est ensuite évaporé et cristallisé. Selon le pétitionnaire, il contient un minimum de 90% de taxifoline et un taux d'humidité de 10 % au maximum. Les solvants utilisés (éthanol, eau désionisée) sont dits respecter les Directives européennes.

Il apparaît qu'une partie de l'éthanol utilisé provient d'un recyclage, cependant une démarche de traçabilité de ce recyclage de solvant est prévue.

La stabilité du NI a été évaluée dans des conditions de test accélérées de stockage, le pétitionnaire concluant que le NI est stable pendant des durées allant jusqu'à 5 ans dans des conditions « normales » de stockage (c'est-à-dire température supérieure à 4 °C, 40-60 % d'humidité, zone ventilée et à l'abri des rayonnements ultraviolet).

Les autorités britanniques ont estimé que les contrôles de qualité réalisés dans les lots individuels étaient appropriés. Toutefois, les autorités britanniques ont remarqué qu'aucune date limite de conservation n'a été proposée par le pétitionnaire pour le NI, qu'aucune limite supérieure de température lors du stockage n'avait été précisée et que sa stabilité n'avait pas été testée lorsque le NI était incorporé dans les denrées de destination.

Le CES AAAT note que certains composés flavonoïdes (de type spiroflavonoïdes) sont des composés qui présentent une certaine instabilité dans des solvants alcooliques comme le méthanol quand ils sont légèrement acidifiés. Les spiroflavonoïdes sont des molécules identifiées structurellement depuis 1985 et sont des dimères de flavanone-flavanol reliés par leurs carbones C3-C8'. Ils sont principalement retrouvés chez les Gymnospermes.

¹ Fedorova T, Ivanova S, et al. 2010. Spiroflavonoid compounds : structure elucidation and distribution in nature. Russian Journal of Bioorganic Chemistry 36: 793-801.

² Council directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market; regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin, amending Council directive 91/414/EEC.

Le CES AAAT adhère aux remarques formulées par les autorités britanniques sur la nécessité de définir une date limite de conservation pour le NI.

Le CES NUT adhère aux remarques formulées par les autorités britanniques sur la nécessité de préciser la température maximale de stockage, la stabilité de l'extrait au sein de matrices alimentaires (ce point étant très important pour un ingrédient alimentaire). Le CES NUT souhaite également des précisions sur les contrôles de qualité (en particulier, il conviendrait de savoir quels sont les paramètres retenus pour l'évaluation et si tous les lots sont concernés). Par ailleurs, le CES NUT estime que les caractéristiques de la solution éthanolique aqueuse (% d'éthanol) et la température du procédé d'extraction doivent être clarifiés entre le dossier du pétitionnaire et l'appendice technique d2.

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

Selon le pétitionnaire, un nombre très limité d'espèces *Larix* sont utilisées comme aliments. *Larix occidentalis*, *Larix rossiea* et *Larix lacricinia* ont été recensées par le pétitionnaire comme ayant des applications, comme source d'arabinogalactane utilisé dans des compléments alimentaires, pour ses caractéristiques gélifiantes ou en médecine traditionnelle.

Les autorités britanniques notent qu'il n'existe pas d'indication suggérant que Larix gmelinii soit utilisé comme aliment. Les autorités britanniques concluent que les espèces Larix sont très peu utilisées comme aliment et que les produits issus de certaines espèces Larix, décrites par le pétitionnaire, n'ont pas de ressemblance avec la taxifoline objet de la demande.

Le CES NUT précise que le nom donné par le pétitionnaire est celui mentionné dans la base de données ARS³, tandis que les autres bases de données lui donnent le nom de *Larix gmelinii* (Rupr.) Kuzen. Ce détail ne porte pas à conséquence pour l'évaluation du NI.

En revanche, il existe au moins 6 variétés recensées de cette espèce. Ce ne sont pas des synonymes, contrairement à ce qu'indique le pétitionnaire dans son dossier. En outre, le pétitionnaire mentionne que les souches sont collectées par « des personnes expérimentées », qui reconnaissent l'espèce « sans doute possible », ce qui est difficilement vérifiable. Le risque de confusion avec une autre espèce n'est donc pas exclu. Étant donné le biotope particulier en question (taïga sibérienne, climat continental froid) dont la flore est particulière, il apparaît difficile d'évaluer la probabilité de confusion avec une autre espèce, et le cas échéant avec quelle espèce. Par conséquent, si l'extrait d'une autre espèce de mélèze ne s'avère pas significativement différent de celui de *Larix gmelinii* avec la méthode de dosage utilisée, la confusion peut passer inaperçue. Le CES NUT estime néanmoins ce cas peu probable.

Le CES AAAT et le CES NUT adhèrent aux remarques formulées par les autorités britanniques. Le CES NUT précise que peu de produits dérivés du mélèze ont jusqu'à présent été utilisés dans le domaine de l'alimentation et qu'aucun d'entre eux ne concernait la taxifoline.

IX. Consommation et niveau d'utilisation prévus

Tel que proposé par le pétitionnaire, le NI serait utilisé dans une grande variété de denrées alimentaires. Les quantités utilisées seraient ajustées en fonction du contenu en matière grasse de ces denrées. Les autorités britanniques remarquent que le pétitionnaire n'explique pas en détail comment les niveaux de consommation ont été estimés, mais le pétitionnaire fournit des calculs « d'estimations maximalistes » et « réalistes ».

³ USDA ARS GRIN (<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?21487>)

Les autorités britanniques ont considéré que les calculs proposés n'étaient pas satisfaisants, cependant, elles ont estimé, étant donné que les estimations maximalistes réalisées aboutissaient à des expositions inférieures à la « DJA » proposée par le pétitionnaire, qu'il n'était pas nécessaire de réaliser des estimations plus détaillées.

Les consommations moyennes du NI simulées par le pétitionnaire pour la population adulte sont de 65 mg/jour (0,9 mg/kg poids corporel (pc)/jour), alors qu'au 97,5^{ème} percentile elles sont de 130 mg/jour (1,9 mg/kg pc/jour). Des consommations rapportées à la masse corporelle simulées séparément pour des enfants de tranches d'âges différentes (1,5 à 4,5 ans - 4 à 10 ans - 10 à 18 ans) aboutissent à des valeurs supérieures à celles des adultes. En moyenne, les consommations potentielles ont été estimées entre 1,2 et 2,2 mg/kg pc/jour, et elles se situeraient entre 2,4 et 4,3 mg/kg pc/jour au 97,5^{ème} percentile de consommation.

Les autorités britanniques ont remarqué que ces estimations n'incluaient pas l'utilisation du NI comme complément alimentaire ou dans des aliments à des fins nutritionnels particulières (PARNUTS), mais elles ont estimé que la consommation du NI aux niveaux maximaux recommandés restait inférieure à la « DJA pour l'adulte ». Par ailleurs, les autorités britanniques ont accepté qu'en dépit des approximations du pétitionnaire dans les calculs d'exposition, ceux-ci étaient surestimés et qu'il n'était donc pas nécessaire d'affiner les estimations pour démontrer la sécurité sanitaire du NI.

Le CES NUT précise que l'addition du NI dans les denrées alimentaires incluant les compléments alimentaires peut conduire à des ingestions massives du NI (chez les sportifs notamment), de façon concomitante avec d'autres substances médicamenteuses. L'interaction avec les médicaments n'est pas abordée. Cependant, la taxifoline appartient à la même classe chimique que la naringénine, qui est réputée interagir avec des substances médicamenteuses. Le CES NUT estime que ce point mériterait d'être instruit par une revue ciblée de la littérature.

Le CES AAAT estime que le pétitionnaire doit préciser les éléments nécessaires pour le calcul de l'exposition pour le consommateur européen (notamment les usages, les denrées visées, les données de consommation utilisées, le mode de calcul de l'exposition au NI).

X. Informations fournies par une exposition humaine antérieure au NI ou à sa source

Les autorités britanniques reconnaissent les éléments apportés sur la présence naturelle de taxifoline dans des produits végétaux de consommation courante (huile d'olive, oignons rouges, agrumes), mais il faut noter que dans ces aliments la taxifoline est en faible quantité.

La taxifoline est déjà largement utilisée avec l'allégation « antioxydant alimentaire » (compléments alimentaires (25 à 100 mg/j), boissons, barres aux fruits) sur les marchés russe, suisse et américain.

Le pétitionnaire mentionne qu'il n'a été informé d'aucune notification d'effets indésirables liés à son produit.

Le CES NUT émet des réserves sur ce point en considérant l'absence d'informations sur un système de nutrivigilance dans la Fédération russe.

XI. Informations d'ordre nutritionnel sur le NI

Les autorités britanniques estiment que les bénéfiques nutritionnels liés à la taxifoline qui ressortent des études présentées relèvent davantage d'allégations santé et que ces allégations ne peuvent pas être évaluées dans le cadre du règlement novel food.

Le CES NUT adhère à cette conclusion et précise que les allégations santé relèvent du règlement (CE) n°1924/2006 du parlement européen et du conseil du 20 décembre 2006 concernant les allégations nutritionnelles et de santé portant sur les denrées alimentaires.

XII. Informations d'ordre microbiologique sur le NI

Le pétitionnaire mentionne que le produit final a été testé pour confirmer l'absence de micro-organismes pathogènes en accord avec la Pharmacopée européenne. Le pétitionnaire définit des spécifications microbiologiques pour le NI et montre les résultats de l'analyse de 5 lots qui sont en accord avec ces spécifications.

Les autorités britanniques conviennent que le procédé de fabrication du NI ne soulève pas de problèmes microbiologiques et que les spécifications microbiologiques du NI permettent d'assurer qu'il ne contient pas de pathogènes. Seule la présence éventuelle de mycotoxines est évoquée. Sur un lot, l'absence de mycotoxine a été vérifiée. Cependant les autorités britanniques demandent à ce que des contrôles soient effectués au cours de la production (levures, moisissures, mycotoxines).

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

XIII. Informations d'ordre toxicologique sur le NI

a. Biodisponibilité/Devenir métabolique

- Chez l'animal

Le dossier mentionne que chez le lapin, la biodisponibilité de la taxifoline en présence de lipides est plus élevée d'environ 36 % que sous une forme comprimé.

Une étude pharmacocinétique a été conduite avec la taxifoline chez des rats, d'une part après injection intraveineuse de doses uniques de 1, 3, 10 et 30 mg/kg p.c. et d'autre part après adjonction dans le régime de doses uniques de 50 et 500 mg/kg p.c. Des analyses par HPLC sur le plasma des animaux ont détecté seulement des traces de taxifoline après administration orale⁴. Les autorités britanniques mentionnent une biodisponibilité de la taxifoline calculée à partir de cette étude d'environ 0,2 %.

Une autre étude (non disponible dans le dossier) conduite chez 8 rats mâles montre, selon le rapport des autorités britanniques, une rapide absorption de la taxifoline, avec un pic de concentration plasmatique après 30 minutes et des valeurs non détectables dans le plasma après 8 heures. Les autorités britanniques mentionnent la conclusion des auteurs de l'étude qui proposent une biodisponibilité de la taxifoline d'environ 23 %⁵.

Aucune étude avec molécule radio-marquée n'a été fournie. Les autorités britanniques, se référant à la publication précédente, rapportent que la taxifoline a été détectée dans le plasma, le foie, les reins, la rate, le cerveau, les muscles, les poumons et le cœur (sans préciser les concentrations rencontrées).

La taxifoline est transformée en un métabolite méthylé (3' ou 4' O-méthyltaxifoline) chez le rat⁴. Chez deux volontaires, une étude datant de 1950 montrerait (étude non disponible) la présence d'acides hydroxyphénylacétiques (dans l'urine ou dans le plasma ?) après ingestion de 2 g de taxifoline.

Les autorités britanniques mentionnent que Seredin et al (2007, étude non disponible⁵) rapportent qu'environ 8 % des doses administrées de taxifoline se retrouvent dans l'urine de rats après 24 h, mais qu'après 48 h aucune trace n'a été détectée dans l'urine ou les fèces, suggérant une absorption complète de la taxifoline.

⁴ Voskoboinikova IV et al. 1993. Experimental pharmacokinetics of biologically active plant phenolic compounds. III. Pharmacokinetics of dihydroquercetin. *Phytotherapy Research* 7, 208-210.

⁵ Seredin SB et al. 2007. Preclinical investigation of pharmacokinetics of dihydroquercetin. Report. SU NII. Moscow.

- Chez l'homme

La portée des études est limitée par le fait qu'aucune ne prend en compte la biodisponibilité et le métabolisme des flavonoïdes (Manach et al, 2004⁶). Il est maintenant établi que l'absorption des flavonoïdes se fait essentiellement au niveau de l'intestin grêle (pour les aglycones et les glucosides) et au niveau du côlon (formes glycosides), que leur taux d'absorption est faible et que les flavonoïdes qui sont reconnus par l'organisme comme des xénobiotiques induisent les systèmes endogènes de détoxification. Cela se traduit par une importante activité de conjugaison au niveau intestinal et hépatique vis-à-vis des flavonoïdes absorbés, qui aboutit à la production de dérivés glucuronidés, sulfatés et méthylés, ensuite retrouvés dans la circulation. En raison de cette forte activité des systèmes de conjugaison, les formes aglycones sont très minoritaires dans le plasma voire même en général totalement absentes. Les métabolites conjugués de flavonoïdes circulent dans le sang liés à l'albumine, atteignent les tissus cibles et sont ensuite éliminés par voie urinaire et/ou parfois biliaire selon la structure des molécules. A noter que globalement pour un flavonoïde apporté par l'alimentation, la concentration totale de ses métabolites dans le plasma est de l'ordre du μM , voire bien inférieure (Manach et al, 2005⁷).

b. Etudes de toxicité aiguë

Les autorités britanniques indiquent des DL_{50} supérieures à 560 et 580 mg/kg chez le rat et la souris par voie intra-péritonéale ou intragastrique. D'autres études conduites avec de la taxifoline extraite de sources différentes indiquent des valeurs de DL_{50} de 1200 mg/kg par voie intra-péritonéale.

c. Etude de toxicité sub-chronique

Les données présentées dans le dossier de demande font état d'études de durée de 7 à 20 jours, pour des doses ingérées de 10 à 15 g/kg pc qui n'indiqueraient aucun effet indésirable. Des examens biologiques et histologiques pratiqués sur 9 tissus ou organes n'auraient pas montré de modifications⁸.

d. Etude de toxicité chronique

Les autorités britanniques mentionnent des études menées pendant 6 mois chez le rat et le chien avec la taxifoline⁹ (publication non disponible). Les autorités britanniques rapportent que selon ces publications aucun effet n'est observé chez le rat recevant des doses de taxifoline de 150 et 1500 mg/kg/jour. Quelques changements leucocytaires et thrombocytaires sont observés mais selon le rapport ils restent dans les variations normales. Les examens biochimiques n'auraient pas montré d'effets toxiques au niveau du foie, des reins et du système cardiovasculaire. Chez le chien recevant 190 mg/kg/j de taxifoline aucun effet visible n'aurait été détecté sur le comportement, l'électrocardiogramme et le système nerveux central. De même, les examens hématologiques n'auraient pas montré d'atteinte sur les paramètres sanguins et la moelle osseuse.

Les autorités britanniques mentionnent deux autres études d'une durée de 226 ou 249 jours chez le rat albinos et datant de 1957 qui n'auraient pas montré d'effets indésirables.

e. Etude de toxicité sur le développement

Les autorités britanniques décrivent une étude de 90 jours chez la ratte gestante (de J1 à J19 de la gestation) recevant par voie intra péritonéale 75 et 1500 mg/kg de taxifoline. Cette étude ne montrerait pas d'effets sur la gestation ni sur la période post-natale. Il est à noter que, selon les autorités britanniques, cette étude a été reprise de façon résumée dans la publication de

⁶ Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jimenez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79, 727-747.

⁷ Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans: I-A review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 81, 230S-242S.

⁸ Dorovskikn VA, Celuyko SS. 2008. Toxicity study: Dated the 10th of June 2008 Nà. 429. Amur State Medical Academy. "Ametis" JSC.

⁹ Shkarenkov AA et al. 1998. Preclinical toxicological study of diquertin. *Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry (Voprosy Biologicheskoi, Meditsinskoi i Farmatsevticheskoi Khimii)* 3, 36-39.

Dorovskikh et Celuylo (2008) selon le rapport d'évaluation, mais comme indiqué précédemment cette publication n'est pas disponible dans le dossier. Il n'est rapporté aucun effet sur les nouveaux-nés (développement et croissance) ni sur les examens histologiques (cœur, foie, rate, reins, estomac, intestin). Quelques effets mineurs (non précisés) sont rapportés mais ils resteraient dans les limites des variations physiologiques. Il est conclu à l'absence d'effet sur le développement.

Les autorités britanniques décrivent une autre étude dans laquelle 75 rattes gestantes ont reçu des doses de 75 et 1500 mg/kg pc de taxifoline par injection intraveineuse pendant 19 jours. Dans la même publication est rapportée une autre étude sur la reproduction conduite avec la taxifoline chez des rats mâles et femelles. Aucun effet n'aurait été rapporté sur les fonctions de la reproduction.

D'autres études conduites avec la taxifoline provenant d'autres sources naturelles montreraient qu'aucun effet sur le récepteur estrogène n'est observé sur l'utérus de rat ainsi que sur culture cellulaire.

f. Etude de génotoxicité

Concernant la recherche d'éventuelles mutations géniques, le rapport des autorités britanniques indique que la taxifoline (dihydroquercétine), extraite d'autres sources naturelles, sur un test d'Ames (souches non précisées), conduit à des résultats négatifs. Ceci peut être rapproché de travaux (qui ne sont pas cités dans le rapport britannique) publiés en 1977¹⁰ selon lesquels la dihydroquercétine n'aurait pas révélé d'effets toxiques sur un test d'Ames réalisé avec quatre souches de *Salmonella typhimurium* (TA 1535, TA 100, TA 1538 et TA98) avec des doses de 50, 250, 1000 et 2500 µg par boîte.

Les autorités britanniques indiquent que la taxifoline n'a pas entraîné d'effet sur l'induction de micronoyaux chez la souris à la dose de 1500 mg/kg pc, ni sur un test des comètes chez la souris pratiqué sur les cellules du sang, du foie, et du côlon.

g. Evaluation du risque lié à l'utilisation du NI

Les autorités britanniques estiment que suffisamment d'études ont été conduites avec le NI ou avec des produits comparables leur permettant de s'assurer que le NI ne présente pas de risque pour les consommateurs aux niveaux proposés par le pétitionnaire (à savoir 15 mg/kg de poids corporel/jour). Les autorités britanniques ont remarqué que ces études ont été conduites selon des bonnes pratiques de laboratoire (BPL) dans la Fédération russe.

Le CES AAAT considère que le statut BPL revendiqué par le demandeur, qui est sous les normes russes, ne peut pas être apprécié par rapport aux exigences européennes. Il en résulte que les protocoles des études réalisées, comme celles faites en 1957 d'une durée de 226 et 249 jours chez le rat albinos, ne peuvent pas être vérifiés. Par ailleurs, le produit testé a été administré en sus de l'aliment jusqu'à une dose de 1 %, sans que ne soient précisées les quantités ingérées réellement par l'animal.

En termes généraux, le CES AAAT n'a pas eu accès aux références bibliographiques. Une revue souvent référencée dans le dossier de demande, qui est sensée rapporter les résultats des études de toxicité aiguës, chroniques (chez le rat et le chien), d'embryotoxicité et de génotoxicité, n'a pas été incluse dans le dossier de demande et ne comporterait apparemment que quatre pages. Dans ces conditions, il est impossible au CES AAAT d'analyser le détail de ces études.

Le CES AAAT considère que le rapport du pétitionnaire manque de précision sur les résultats des études toxicologiques référencées. Souvent, il est indiqué des changements ou des fluctuations dans les paramètres mesurés, sans préciser s'il s'agit d'augmentations ou de diminutions. Il est aussi indiqué que ces changements ne sont pas liés au traitement

¹⁰ Bjeldanes LF, Chang GW. Mutagenic activity of quercetin and related compounds. 1977. Science 197, 577-578.

car ils resteraient dans les valeurs physiologiques normales (par rapport à l'historique du laboratoire), mais sans être comparés aux valeurs physiologiques des animaux témoins des études respectives. Les examens histologiques réalisés dans ces études ne sont pas détaillés et ne comportent pas suffisamment d'organes ou de tissus ayant été examinés selon les protocoles internationaux (ex. OECD). En outre, la biodisponibilité réelle de la taxifoline est très incertaine car des valeurs chez le rat entre 0,17 ou 17 % sont mentionnées dans le rapport.

Concernant les résultats disponibles sur la génotoxicité, seuls quelques résultats sont cités dans le rapport des autorités britanniques. Le CES AAAT conclut que, sans détail sur les protocoles utilisés dans les publications, la génotoxicité du NI ne semble pas avoir été étudiée de manière approfondie. Selon une autre publication¹¹, identifiée par le CES dans la littérature scientifique et non citée dans le rapport britannique, la taxifoline, contrairement à la quercétine ou au kaempferol ne serait pas génotoxique *in vitro*. Toutefois, le CES AAAT considère qu'il serait souhaitable qu'une investigation plus poussée sur la génotoxicité du NI soit menée.

Concernant les études de toxicité sur la reproduction, celles-ci ne permettent pas d'évaluer les risques pour le consommateur. Il est fait mention d'une étude de 90 jours (ratte gestante) incluant une phase de reproduction. Les observations anatomopathologiques rapportées ne correspondent pas à ce qui est demandé dans une telle étude par les lignes directrices internationales (ex. OECD). A partir des éléments fournis dans le dossier, il n'est pas possible de savoir quels paramètres spécifiques de la reproduction, et notamment sur la fertilité, ont été mesurés. D'ailleurs, même la voie d'administration n'a pas été précisée. La deuxième étude d'embryotoxicité réalisée par voie intra-péritonéale n'indique pas quels ont été les critères retenus pour l'observation des fœtus, notamment au plan viscéral et squelettique. Il est seulement mentionné qu'il n'y a pas d'augmentation des hydronéphroses ni des hémorragies sans justifier le choix de ces deux critères en particulier. La voie d'administration dans cette étude (intra-péritonéale) ne correspondant pas à celle du consommateur du NI, les résultats de ces études ne peuvent pas être extrapolés à une exposition par voie orale.

Le CES NUT mentionne également le fait que les études disponibles chez l'Homme (conduites sur un effectif supérieur à 500 patients) et présentées par le pétitionnaire n'ont pas fait l'objet de publications dans des revues internationales. En particulier, de nombreux effets liés à la consommation de taxifoline sont rapportés dans le dossier du pétitionnaire sans indication sur le schéma expérimental de l'essai clinique ni sur les conditions et techniques de mesure des critères d'évaluation. D'autre part, le CES NUT indique que toutes les études de supplémentation n'ont pas excédé 12 semaines et qu'aucune d'entre elles n'a porté sur des sujets sains. L'extrapolation à l'ensemble de la population générale ainsi que les risques de toxicité à long terme ne sont donc pas évalués.

h. Concernant l'allergénicité:

Les autorités britanniques précisent que, bien qu'il n'ait pas été confirmé expérimentalement que des traces de protéines soient présentes dans le NI, le pétitionnaire note qu'il est peu probable que le procédé de production permette la présence de protéines dans le produit fini. Cependant, le pétitionnaire reconnaît qu'étant donné que des cas d'allergie ont été associés au pollen de bouleau, il ne peut pas être exclu que des cas d'allergie au pollen de mélèze soient identifiés. Mais le pétitionnaire insiste sur le fait que le procédé de production « paraît capable » d'écarter la présence de pollen non dénaturé dans le produit final.

Les autorités britanniques considèrent qu'il est peu probable que la taxifoline puisse présenter un risque allergique pour le consommateur.

¹¹ Jurado J et al. 1991. Study on the mutagenicity activity of 13 bioflavonoids with the Salmonella ara test. *Mutagenesis* 6, 289-295.

Les CES AAAT et NUT sont en accord avec les autorités britanniques sur le fait qu'il est peu probable que la taxifoline en elle-même puisse présenter un potentiel allergisant. Toutefois, concernant l'extrait proposé comme NI, les CES recommandent de vérifier expérimentalement l'absence de protéines ou de pollen de mélèze dans le NI afin de lever le doute ou le cas échéant mentionner le risque allergique sur l'étiquetage.

Conclusions générales des autorités britanniques :

Les autorités britanniques considèrent acceptable l'utilisation du NI pour les usages proposés en tant que NI, à condition que les spécifications proposées par le pétitionnaire soient respectées et que les contrôles de qualité décrits par le pétitionnaire dans le dossier de demande soient réalisés.

Conclusions générales du CES NUT :

Le CES NUT est en accord avec la majorité des conclusions et des remarques des autorités britanniques, détaillées dans l'avis, mais émet des réserves. Il n'y a pas eu de tests de stabilité du NI dans les matrices alimentaires. L'interaction avec des substances médicamenteuses n'a pas été étudiée. Le CES NUT souhaite également des précisions sur les contrôles de qualité (et les spécifications correspondantes), les caractéristiques de la solution éthanolique aqueuse et la température du procédé d'extraction.

Le CES NUT souligne que les risques de toxicité du NI associés à une consommation à long terme chez l'Homme ne sont pas écartés.

Conclusions générales du CES AAAT

Le CES AAAT considère, en l'absence de transmission des principales publications, que les résultats d'études toxicologiques présentés dans le dossier de demande ne sont pas suffisamment précis pour conclure sur la sécurité sanitaire du NI.

L'approche d'évaluation complémentaire proposée par le pétitionnaire dans le dossier de demande, c'est-à-dire d'évaluer individuellement les familles de composés les plus abondantes dans l'extrait pour tirer une conclusion sur la sécurité sanitaire du NI, n'est pas acceptable pour ce type de composé.

Le CES AAAT observe que les résultats de la littérature suggèrent que la composition des extraits de l'espèce *Larix* dépendra fortement de la source considérée. Les publications sur la biodisponibilité des composants d'extraits des plantes, comme les polyphénols et les flavonoïdes, suggèrent que leur biodisponibilité est fortement influencée par les sources ainsi que par les formes actives qui les composent¹². Or, la biodisponibilité de composés dans les extraits des plantes influence évidemment leur toxicité dans les études réalisées chez l'animal.

Compte tenu du fait que le NI serait incorporé dans un grand nombre de denrées et du fait que ses composés réactifs peuvent présenter des synergies ou des antagonismes entre eux, le CES AAAT considère qu'il est nécessaire d'effectuer au minimum une étude toxicologique de 90 jours chez l'animal avec le NI objet de la demande, en respectant les spécifications chimiques définies pour le NI qui sera mis sur le marché et en appliquant les lignes directrices reconnues pour la réalisation de ce type d'étude toxicologique (ex. OCDE). Le

¹² Williamson G, Manach C. 2005. Bioavailability and bioefficiency of polyphenols in humans. II; Review of 93 intervention trials. *Am J Clin Nutr* 81, 243S-255S ; Scalbert A, Williamson G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130, 2073S-2085S.

CES AAAT remarque aussi que la législation européenne sur les nouveaux ingrédients prévoit la réalisation d'études de mutagénicité avec le nouvel ingrédient, s'il est impossible d'établir une équivalence substantielle avec un produit classique correspondant¹³.

En conclusion, pour les raisons évoquées dans son avis, le CES AAAT est en désaccord avec les conclusions générales émises par les autorités britanniques.

5. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Anses adopte les conclusions du CES « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques » et du CES « Nutrition humaine ».

Compte tenu des conclusions de l'évaluation toxicologique du NI, l'Anses considère que l'évaluation des risques relative à l'exposition du NI ne peut pas être réalisée à ce stade.

L'Anses fait aussi remarquer que si le NI devait faire l'objet de revendications technologiques en tant qu'antioxydant¹⁴, il devrait être évalué en accord avec les dispositions européennes en vigueur sur l'autorisation des additifs alimentaires¹⁵.

Le directeur général

Marc MORTUREUX

MOTS-CLES

NOUVEL INGRIDIENT; TAXIFOLINE ; LARIX GMELINII ; EXTRAIT MELEZE

¹³ Recommandation de la Commission, du 29 juillet 1997 concernant les aspects scientifiques relatifs à la présentation des informations requises pour étayer des demandes d'autorisation de mise sur le marché de nouveaux aliments et de nouveaux ingrédients alimentaires et l'établissement des rapports d'évaluation initiale au titre du règlement (CE) n° 258/97 du Parlement européen et du Conseil. JO L 253 du 16.09.1997.

¹⁴ Tjukavkina NA, Rulenko IA, Kolesnik YA. 1997. Dihydroquercetin – A new antioxidant and biologically active food supplement. Voprosy Pitaniia (seul résumé disponible). 6, 12-15.

¹⁵ Règlement (CE) N° 133/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 sur les additifs alimentaires. L 354/16, 31.12.2008.