

Maisons-Alfort, le 22 novembre 2004

AVIS

**de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments
sur le dossier de demande d'autorisation pour une période de dix ans
d'un nouvel additif de la catégorie des additifs sensoriels et du groupe
des colorants à base de *Phaffia rhodozyma* riche en astaxanthine destiné
aux truites et saumons**

Par courrier reçu le 17 juin 2004, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 16 juin 2004 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes, d'une demande d'avis sur le dossier de demande d'autorisation pour une période de dix ans d'un nouvel additif de la catégorie des additifs sensoriels et du groupe des colorants à base de *Phaffia rhodozyma* riche en astaxanthine destiné aux truites et aux saumons.

Ce dossier entre dans le cadre de la directive 70/524/CEE modifiée et doit être établi selon les lignes directrices fixées par la directive 2001/79/CE modifiée.

Après consultation du Comité d'experts spécialisé « Alimentation animale », réuni le 18 octobre 2004, l'Afssa rend l'avis suivant.

Section I : Résumé des données du dossier

L'additif est constitué d'une souche de levures *Phaffia rhodozyma* (ATCC SD-5340) contenant 10 000 ppm d'astaxanthine et d'un antioxydant (0,5 % d'acide ascorbique). L'effet revendiqué pour cet additif est la pigmentation de la chair de la truite et du saumon. Il est recommandé à la dose maximale de 100 mg d'astaxanthine par kilogramme d'aliment pour ces deux espèces.

La plupart des données contenues dans le dossier ont été obtenues à partir d'un autre additif, dont le mode de production n'est pas rapporté, constitué d'une souche de *Phaffia rhodozyma* dont la référence (N° ATCC) n'est pas précisée. Cet additif contient 8 000 ppm d'astaxanthine et un autre antioxydant (0,4 % d'éthoxyquine). Il est actuellement commercialisé hors de l'Union européenne (Etats-Unis, Chili, Canada et Japon).

Section II : Identité, caractéristiques et conditions d'emploi de l'additif – Méthodes de contrôle

L'additif est globalement bien défini mais toutefois certaines insuffisances sur l'identité, la spécification de la substance active, le procédé de fabrication, les éléments toxiques, la stabilité et les méthodes de contrôle ont été relevées.

Section III : Etudes concernant l'efficacité de l'additif

Dix essais d'efficacité sont présentés dans le dossier. Cinq de ces essais concernent des données bibliographiques correspondant à des études réalisées avec un produit concurrent (issu de *Phaffia rhodozyma* ATCC 74219) ou d'autres souches de *Phaffia rhodozyma* ou encore avec de l'astaxanthine de synthèse. Ils ne sont pas recevables dans le cadre de la démonstration de l'efficacité du produit issu de la souche *Phaffia rhodozyma* (ATCC SD-5340) sur la pigmentation de la chair de la truite et du saumon Atlantique.

Les cinq autres essais ont été réalisés avec l'additif commercialisé hors de l'Union européenne, analogue à celui qui fait l'objet de la demande mais qui présente une concentration moins élevée en astaxanthine et est protégé par un anti-oxydant différent. L'homologie de ce produit avec l'additif objet de la demande n'est pas argumentée, notamment en ce qui concerne la nature de la souche, la nature du

traitement enzymatique subi par les levures et conséquemment le degré de biodisponibilité de l'astaxanthine. Les données brutes individuelles de ces essais ne sont pas fournies.

Ces études n'étant pas recevables, il n'est pas possible de conclure quant à l'efficacité de l'additif.

Section IV : Etudes concernant la sécurité d'emploi de l'additif

Etudes sur les espèces cibles

Un essai de tolérance a été conduit pendant un an chez le saumon avec l'additif commercialisé hors de l'Union européenne (cf. section III) à la dose de 0, 80, 400 et 800 mg d'astaxanthine par kilogramme d'aliment. Aucun effet défavorable sur les performances zootechniques (poids, longueur et indice de consommation), aucune modification des paramètres sanguins et aucune lésion anatomo-pathologique macroscopique et microscopique du saumon n'ont été notés. La marge de sécurité pour cet additif est d'un facteur d'au moins 8.

Trois essais de tolérance ont été menés chez la truite arc-en-ciel, avec le même additif que celui utilisé pour le saumon, avec un apport inférieur à l'apport maximum indiqué (67 mg/kg vs. 100 mg/kg). Ces essais ne sont donc pas recevables et ne permettent pas d'établir un facteur de sécurité pour cette espèce.

Etudes microbiologiques

L'additif commercialisé hors de l'Union européenne (cf. section III) n'a montré d'activité antibactérienne pour aucune des souches bactériennes testées appartenant à des espèces présentes dans l'environnement ou digestives ou pathogènes pour les poissons à l'exception de l'espèce *Vibrio salmonicida*. Les concentrations minimales inhibitrices d'astaxanthine ou d'additif objet de la demande étaient pour cette espèce de 50 ou 100 ppm, ce qui correspond à la dose présente dans l'aliment (100 mg/kg).

Etude du métabolisme et des résidus

La composition en isomères géométriques et optiques de l'astaxanthine de *Phaffia rhodozyma* ATCC SD-5340 est très similaire à celle produite par la souche ATCC 74219 qui a fait l'objet d'une évaluation par le Comité Scientifique de la Nutrition Animale¹. Il est donc possible de conclure, en ce qui concerne l'astaxanthine ayant pour origine ces deux sources, mais également l'astaxanthine de synthèse : i) que l'absorption est élevée chez le poisson mais variable (17 à 97 %) en fonction de différents facteurs tels l'espèce et la composition de l'aliment, ii) que l'astaxanthine est métabolisée (réduction des groupements oxo) en idoxanthine, adonixanthine et zéaxanthine, iii) que chez la truite et le saumon, plus de 95 % des pigments déposés dans la chair sont constitués d'astaxanthine, avec des quantités mineures d'idoxanthine et de zéaxanthine.

Etudes sur les animaux de laboratoire

Les essais de toxicité ont été réalisés selon les bonnes pratiques de laboratoire avec, dans la plupart des cas, l'additif commercialisé hors de l'Union européenne (cf. section III).

Les études présentées sont incomplètes et ne permettent de conclure qu'à l'absence de potentiel mutagène de l'additif. Dans l'hypothèse où le pétitionnaire démontrerait l'équivalence des deux souches de *Phaffia rhodozyma* (ATCC SD 5340 et celle productrice de l'additif commercialisé hors de l'Union européenne), la nature différente de l'antioxydant utilisé (0,44 % d'éthoxyquine pour l'additif commercialisé hors de l'Union européenne et 0,5 % d'acide ascorbique pour celui faisant l'objet de la demande) n'est pas à même de remettre en cause les conclusions de ces essais.

En l'absence d'un dossier toxicologique complet, il n'est donc pas possible de déterminer une concentration sans effet observé pour cet additif.

¹ Report of the Scientific Committee for Animal Nutrition on the use of astaxanthin-rich *Phaffia rhodozyma* in feedingstuffs for salmon and trout, 2001.

Evaluation de la sécurité pour le consommateur humain

Bien qu'aucune dose journalière acceptable ne soit actuellement établie pour l'astaxanthine, il peut être considéré que l'exposition du consommateur à l'astaxanthine et à ses métabolites par l'entremise de la consommation de poisson est qualitativement la même, que l'origine de l'astaxanthine dans l'alimentation animale soit naturelle, synthétique ou produite par les deux souches de *Phaffia rhodozyma* considérées. Dans la mesure où un degré déterminé (et donc limité) de pigmentation est recherché dans la chair des salmonidés, les différentes sources d'astaxanthine doivent être considérées comme substitutives. Dès lors l'exposition du consommateur à l'astaxanthine et ses métabolites doit rester qualitativement et quantitativement la même, et les risques potentiels similaires en nature et intensité.

Bien que l'additif objet de la demande ne soit pas utilisé en tant que biomasse dans l'alimentation animale mais exclusivement comme vecteur d'astaxanthine à raison d'un maximum de 1 % dans l'aliment complet (sur la base d'une teneur de 1 % d'astaxanthine), il convient d'évaluer les risques potentiels associés à la présence éventuelle dans cet additif, de substances toxiques issues de la production de *Phaffia rhodozyma*. Si l'absence de génotoxicité est démontrée et un essai limite de toxicité subchronique chez le rat s'avère négatif pour une dose très élevée de l'additif, il manque une seconde étude de toxicité subaiguë chez une deuxième espèce n'appartenant pas à l'ordre des rongeurs pour pouvoir conclure de façon définitive, hormis pour ce qui concerne l'astaxanthine, quant à l'innocuité de l'additif.

Evaluation de la sécurité pour le manipulateur

Les résultats des différentes études indiquent que l'additif commercialisé hors de l'Union européenne possède un faible potentiel à générer des poussières, est non irritant pour la peau et les yeux chez le Lapin et légèrement sensibilisant pour la peau chez le Cobaye.

Le pétitionnaire préconise le port de vêtements de protection, de gants et de lunettes de protection mais ne propose pas de phrase de risque.

Impact environnemental

L'astaxanthine est une substance naturelle présente dans l'environnement et dans de nombreux organismes aquatiques (plancton, algues, krill, crustacés, poissons...). Deux voies de contamination de l'environnement aquatique sont prévisibles, lors de l'utilisation de l'additif : contamination directe par la nourriture non consommée et excrétion par les fèces. L'astaxanthine étant insoluble, elle se retrouve donc dans les sédiments. L'absence d'informations supplémentaires sur la biodégradabilité et la toxicité de l'additif pour les organismes sédimentaires ne permet pas de conclure sur son impact environnemental.

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments considère que les éléments scientifiques fournis par le dossier de demande d'autorisation pour une période de dix ans d'un nouvel additif de la catégorie des additifs sensoriels et du groupe des colorants à base de *Phaffia rhodozyma* riche en astaxanthine destiné aux truites et aux saumons appellent les remarques suivantes :

Le pétitionnaire doit démontrer l'équivalence entre les deux souches de *Phaffia rhodozyma* (ATTC SD 5340 et celle productrice de l'additif commercialisé hors de l'Union européenne) pour que les essais réalisés avec l'additif commercialisé hors de l'Union européenne puissent être pris en compte dans l'évaluation de l'additif, objet de la demande.

Section II : Identité, caractéristiques et conditions d'emploi de l'additif – Méthodes de contrôle

Concernant les spécifications

Les intervalles d'acceptation définis dans les spécifications sont trop larges. Il convient d'augmenter la teneur minimale garantie en astaxanthine (actuellement de 9000 ppm), et la teneur minimale en acide ascorbique (actuellement 0,1 %). Il convient également d'abaisser la teneur maximale en eau (actuellement de 8 %).

Procédé de fabrication

- Préciser les différences dans les procédés de production de l'additif destiné à être commercialisé au niveau européen et celui commercialisé aux Etats-Unis, Chili, Canada et Japon (référence de la souche *etc.*, justification de la différence de teneur en astaxanthine, *etc.*) afin qu'il soit possible d'évaluer dans quelle mesure les résultats obtenus avec le deuxième additif sont transposables au premier.
- Fournir le certificat de dépôt de la souche à l'ATCC.
- Indiquer la composition de l'ingrédient "sheftone" et de l'anti-mousse "Mazu DF 204".
- Indiquer la nature des enzymes utilisées.
- Indiquer la température de séchage de l'additif. Prouver l'inactivation des enzymes par une méthode plus sensible ou justifier leur inactivation par un traitement thermique adapté.

Éléments toxiques

Fournir les rapports d'analyse pour le plomb, le cadmium, le mercure et l'arsenic.

Durée de stockage de l'additif

La durée de stockage indiquée, "Au moins 12 mois à une température ≤ 4 °C", doit être remplacée par "Au plus 12 mois à une température ≤ 4 °C".

Stabilité et homogénéité lors de la fabrication et du stockage des aliments

Les résultats obtenus en fabrications pilotes doivent être confirmés en fabrications industrielles.

Conditions d'utilisation

- L'étiquetage de l'additif doit mentionner son éventuelle incompatibilité avec quels prémélanges.
- Indiquer un âge minimal pour les poissons.

Dosage de l'astaxanthine dans les aliments

Les conditions d'extraction décrites ne peuvent pas s'appliquer aux aliments et doivent être modifiées (prise d'essai augmentée, *etc.*). La composition du standard d'astaxanthine (teneur en différents isomères géométriques) devrait être connue.

Dosage de l'astaxanthine dans les muscles de poisson

Fournir la méthode. La composition du standard d'astaxanthine (teneur en différents isomères géométriques) devrait être connue.

Section III : Etudes concernant l'efficacité de l'additif

La prise en compte des études d'efficacité portant sur l'homologue de l'additif utilisé hors de l'Union européenne suppose : i) la démonstration de l'identité de la souche et des processus de fermentation et de traitement pour les deux formes de l'additif, ii) la fourniture des données brutes.

Section IV : Etudes concernant la sécurité d'emploi de l'additif

Etudes sur les espèces cibles

Réaliser un essai de tolérance de l'additif chez la truite à 10 fois la dose maximale indiquée.

Etudes microbiologiques

Déterminer des concentrations minimales inhibitrices de l'additif vis-à-vis d'autres espèces de *Vibrio* considérées comme non pathogènes et fréquemment présentes dans les eaux.

Etudes sur les animaux de laboratoire

Les essais suivants doivent être fournis :

- une étude de toxicité subaiguë (90 jours) par voie orale de l'additif chez une espèce animale n'appartenant pas à l'ordre des Rongeurs,
- une étude sur deux générations de la toxicité de l'additif sur la reproduction,
- les études de la tératogénicité de l'additif sur au moins deux espèces.

Impact environnemental

Réaliser des études de biodégradabilité et de toxicité de l'additif pour les organismes sédimentaires.

Martin HIRSCH