

Maisons-Alfort, le 14 mars 2011

Le directeur général

AVIS

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

relatif à une publication rapportant les incidences de cancer chez la souris mâle après administration d'aspartame par l'alimentation et une autre publication sur une étude prospective de cohorte chez des femmes enceintes qui rapporte l'association entre la consommation des boissons gazeuses (carbonatées) contenant des édulcorants et le risque d'accouchement prématuré.

1. RAPPEL DE LA SAISINE

L'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail s'est autosaisie le 24 janvier 2011 pour analyser deux publications scientifiques récentes sur les édulcorants, dont une portant exclusivement sur l'aspartame. La première est une étude de cancérogenèse expérimentale qui rapporte une augmentation de l'incidence de cancers chez la souris mâle consommant une alimentation enrichie en aspartame¹. La seconde est une étude prospective d'une cohorte de femmes enceintes qui rapporte une association entre la consommation des boissons gazeuses (carbonatées) contenant des édulcorants et une augmentation de la fréquence des accouchements prématurés induits^{2,3,4}.

Dans le cadre de la veille permanente qu'elle exerce, l'Anses a examiné ces publications afin de proposer d'éventuelles recommandations aux autorités françaises et/ou de saisir l'Autorité européenne de sécurité des aliments (Efsa), en charge de l'évaluation des additifs alimentaires au niveau européen.

2. METHODE D'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée par un collectif d'experts toxicologues et épidémiologistes sur la base des données présentées dans les publications mentionnées (sans accès aux données brutes) et dont l'avis a été adopté par le CES « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques » consulté le 24 février 2011.

¹ Soffritti M. *et al.*, American Journal of Industrial Medicine 53: 1197-206, 2010.

² Halldorsson TI *et al.*, American Journal of Clinical Nutrition 92: 626-33, 2010.

³ La Vecchia C, suivi de la réponse de TI Halldorsson. American Journal of Clinical Nutrition 92: 1540-1542, 2010.

⁴ Bursey RG., Watson, ML, suivi de la réponse de TI Halldorsson, American Journal of Clinical Nutrition 92: 1278-1280, 2010.

L'argumentaire de l'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail est fondé sur l'avis du CES «Additifs, arômes et auxiliaires technologiques», ainsi que sur la consultation du CES Nutrition et des auditions conduites, notamment auprès de M. Morando Soffritti (auteur principal de l'article sur l'aspartame).

2.1. Publication de Soffritti *et. al.*¹

Cette étude a été réalisée à l'Institut Ramazzini de Bologne. Des souris Swiss réparties en cinq groupes composés de 62 à 122 animaux des 2 sexes ont consommé un aliment supplémenté avec 0, 2000, 8000, 16000, 32000 ppm d'aspartame (pureté rapportée : 98,7 %) ce qui correspond à des doses de l'ordre de 0, 250, 1000, 2000 et 4000 mg/kg poids corporel/jour. Après accouplement, les femelles ont été traitées à partir du 12^{ème} jour de la gestation, jusqu'au sevrage des petits. Les petits ont alors consommé les mêmes régimes jusqu'à la 130^{ème} semaine de leur vie (sacrifice).

Les consommations alimentaire et hydrique ont été mesurées périodiquement. L'évolution du poids corporel de chaque animal a été déterminée chaque semaine pendant 13 semaines puis toutes les 2 semaines jusqu'à la 110^{ème} semaine. Tous les animaux survivants ont été sacrifiés à la 130^{ème} semaine. Une analyse histologique complète portant sur une quarantaine d'organes ou tissus a été réalisée.

L'hypothèse testée était d'évaluer la potentialité de l'aspartame à induire des effets cancérogènes chez la souris.

Les résultats montrent une incidence accrue d'adénomes et de carcinomes hépatocellulaires chez les souris mâles. L'augmentation de l'incidence des adénomes n'est statistiquement significative à aucune des doses. En revanche, l'augmentation d'incidence des carcinomes devient statistiquement significative uniquement à la plus forte dose testée (environ 4000 mg/kg poids corporel par jour). Une augmentation statistiquement significative de l'incidence cumulée d'adénomes et de carcinomes est observée uniquement à la dose intermédiaire (environ 2000 mg/kg poids corporel par jour). Aucune incidence accrue de tumeurs du foie n'a été détecté chez les souris femelles quelle que soit la dose d'aspartame testée.

Une augmentation (à la limite de significativité statistique) de l'incidence combinée de carcinomes bronchiolo-alvéolaires a été observée chez les mâles à la plus forte dose testée (environ 4000 mg/kg poids corporel par jour). Aucune incidence accrue de tumeurs bronchiolo-alvéolaires n'a été détectée chez les souris femelles quelle que soit la dose d'aspartame testée.

Commentaires

Lors de l'audition, l'auteur principal de l'étude a indiqué que l'Institut au sein duquel l'étude a été réalisée a été certifié selon les bonnes pratiques de laboratoire (BPL). Selon l'auteur cette étude a été conduite en respectant l'esprit des exigences BPL mais sans les appliquer strictement. Il est à noter que dans la publication, le statut BPL de l'étude n'est pas précisé.

La méthodologie utilisée dans cette étude apparaît particulière dans la mesure où elle consiste à exposer pendant toute la durée de vie un très grand nombre d'animaux. Elle contraste avec les recommandations préconisées par des instances internationales telles que l'OCDE⁵ et l'ICH⁶, en matière d'expérimentation de cancérogenèse à long terme, selon lesquelles il est préconisé d'exposer des souris adultes (âgées de 5 à 6 semaines) pendant les 2/3 de leur existence, soit 18 mois ou 2 ans. En effet, il est généralement admis qu'au-delà de cette durée, l'état physiologique des animaux se dégrade fortement ce qui biaise les résultats. Par ailleurs, ces recommandations requièrent qu'une durée identique de traitement soit appliquée pour l'ensemble des lots de façon à

⁵ Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OECD). http://www.oecd.org/home/0,3675,fr_2649_201185_1_1_1_1_1_1_1,00.html

⁶ The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). <http://www.ich.org/home.html>

permettre une analyse comparative fiable entre les lésions spontanées (apparaissant dans les lots témoins non exposés) et celles apparaissant dans les lots d'animaux exposés. Cette limitation de la durée de suivi a donc pour objet non seulement de minimiser les biais d'analyse liés à la réduction significative des effectifs en fin d'étude, mais aussi de lever des difficultés d'interprétation pouvant résulter de pathologies liées au vieillissement.

Les auteurs de l'étude sur l'aspartame indiquent dans leur publication que le taux de survie des lots à 130 semaines était inférieur à 10 %, néanmoins les données décrivant l'état général des animaux ne sont pas détaillées. Ces dernières se résument à quelques courbes montrant une nette diminution de la consommation de nourriture au-delà de 88 semaines, aussi bien chez les mâles que chez les femelles. Aucune information sur les pathologies non néoplasiques n'est rapportée.

Compte tenu du caractère édulcorant de la substance, une modification de la consommation de nourriture chez les animaux exposés était probable mais celle-ci ne semble pas avoir été modifiée de manière notable chez les animaux exposés aux plus fortes doses d'aspartame.

Aucune précision n'est donnée sur le déroulement de la gestation des femelles gravides testées, notamment en termes de taille des portées, de leur viabilité à la naissance et pendant la période d'allaitement. Considérant le protocole qui consiste à constituer des lots à partir de séries de couples de parents exposés aux différentes doses testées, le nombre d'animaux suivis en première génération est très différent d'un groupe à l'autre (s'échelonnant entre 117 et 62 animaux).

La méthode d'inventaire des tumeurs utilisée dans l'étude chez la souris est inhabituelle et peu explicite. Sont répertoriées comme tumeurs indépendantes : les tumeurs multiples de type différent survenant dans différents organes, les tumeurs de différents types survenant dans un même organe, les tumeurs de même type dans des organes bilatéraux, les tumeurs du même type survenant au niveau de la peau, du tissu sous-cutané et des glandes mammaires ou au niveau de sites distants constitués par les tissus « diffus » (muscle et os). Ne sont comptabilisés comme évènement unique que les tumeurs multiples du même type survenant dans le même tissu et/ou organe. Le bien fondé de cette méthode d'inventaire des tumeurs n'est pas argumenté dans la publication. L'auteur principal de l'étude a convenu, lors de son audition, que cette méthode d'inventaire est inhabituelle.

Il est aussi noté que, selon les cas, des modèles statistiques différents ont été appliqués sans que le choix ne soit justifié.

Les pathologies tumorales décrites dans l'étude sont essentiellement des adénomes et des carcinomes alors qu'aucune hyperplasie n'a été rapportée (cette forme de lésions représente une étape intermédiaire importante dans la transformation du tissu normal en tissu néoplasique). Selon les informations fournies par l'auteur principal, les lésions hépatocellulaires se développeraient directement en carcinomes ce qui expliquerait l'absence d'hyperplasie dans les organes affectés et expliquerait également, selon lui, l'absence de relation entre l'effet observé et les doses d'aspartame. Une telle hypothèse reste à confirmer. Par ailleurs, l'incidence de tumeurs bénignes, tous types confondus, est plus élevée chez les femelles exposées à l'aspartame que chez les femelles témoins (non exposées à l'aspartame), mais aucune augmentation de l'incidence des tumeurs malignes n'a été observée. Enfin, les auteurs n'avancent aucun argument pour expliquer l'absence de mortalité des mâles traités au plus fortes doses, alors qu'ils présentent une incidence accrue significative de tumeurs. De plus, la publication de Soffritti *et al.* ne comporte aucune donnée d'évaluation des marqueurs d'hépatotoxicité (tels que les taux d'enzymes ASAT/ALAT ou le taux de bilirubine), et sur le poids des organes affectés.

Il faut souligner qu'un taux élevé de tumeurs hépatiques et pulmonaires spontanées est généralement observé chez la lignée de souris utilisée dans cette étude⁷.

⁷ Gopinath C. Spontaneous tumour rates : their use to support rodent bioassays. *Toxicol. Pathol.* 22: 160-164, 1994; Prejean JD. *et al.* Spontaneous tumours in Sprague-Dawley rats and Swiss mice. *Cancer Res.* 33: 2768-2773, 1973.

Dans leurs commentaires les auteurs signalent que les taux de carcinomes hépatocellulaires et de carcinomes bronchiolo-alvéolaires des mâles témoins contemporains (respectivement 5,1 % et 6,0 %) se situent dans la fourchette basse des témoins historiques (respectivement 0 – 26,3 % et 0 – 14,3 %). Les auteurs observent une incidence accrue de tumeurs chez les animaux exposés à l'aspartame qui est 2 à 3 fois plus importante chez les animaux exposés que chez les animaux témoins contemporains. Néanmoins, aucun commentaire n'est apporté sur le taux plus élevé de carcinomes bronchiolo-alvéolaires chez les femelles témoins contemporaines (6,9 %) par comparaison aux femelles témoins historiques (0-2,1%). Une variabilité de ces données est donc vraisemblable.

Enfin, les auteurs suggèrent que l'augmentation de l'incidence des tumeurs hépatocellulaires serait due au métabolisme de l'aspartame qui est partiellement métabolisé en méthanol. Cependant, aucune détermination plasmatique des métabolites d'aspartame (acide aspartique et phénylalanine ou méthanol) n'a été réalisée, ce qui aurait permis de s'assurer qu'une exposition systémique et dose-dépendante des animaux aux métabolites de l'aspartame a effectivement eu lieu. L'absence d'augmentation dans l'incidence de tumeurs hépatocellulaires chez les souris femelles, rapportée par les auteurs dans leur publication, est expliquée par une « résistance liée au sexe » sans en apporter de preuves expérimentales.

2.2. Publication de Halldorsson *et al.*² et éléments complémentaires^{3,4}

Cette publication rapporte les résultats d'une étude conduite au départ chez 91 827 femmes danoises enceintes, recrutées entre 1996-2002 sur la base du volontariat. La participation a été de l'ordre de 35 % des femmes enceintes pendant la période de recrutement ; une comparaison menée avec un échantillon de non participantes ne montre pas de différence majeure de taux de prématurité. Parmi les participantes, 62 374 femmes (68 %) ont répondu à un questionnaire alimentaire permettant de connaître la consommation de boissons. Seules les grossesses uniques (jumeaux exclus) ont été retenues. Parmi les femmes ayant complété le questionnaire (effectif final de 59 334 femmes), on observe une surreprésentation de primipares (qui ont accouché pour la première fois), et des caractéristiques sociales un peu plus favorisées (observation habituelle dans ce type d'étude).

Les consommations des boissons édulcorées ont été recueillies à 25 semaines de grossesse au moyen d'un questionnaire alimentaire classique (FFQ « food-frequency questionnaire) portant sur les consommations des 4 semaines précédentes. Selon les auteurs, le questionnaire comportait des questions sur les différents types de boissons telles que « Combien de verres des boissons suivantes avez-vous consommé au cours des 4 dernières semaines ». L'étude porte sur la consommation de 4 types des boissons : les boissons gazeuses édulcorées, les boissons gazeuses sucrées, les boissons non gazeuses édulcorées et les boissons non gazeuses sucrées.

Les résultats de l'enquête montrent que 67 % des femmes danoises interrogées ne buvaient jamais de boissons gazeuses édulcorées, 29 % en buvaient moins d'un verre par jour et 4 % au moins 1 verre par jour. Pour les boissons non gazeuses édulcorées, 66 % des femmes interrogées n'en buvaient jamais, 21 % en buvaient moins d'un verre par jour et 13 % au moins 1 verre par jour. La consommation des boissons sucrées, gazeuses ou non, était beaucoup plus commune, respectivement 16 % et 36 % des femmes n'en buvaient jamais.

La prématurité a été définie selon les critères de l'Organisation Mondiale de la Santé comme un âge gestationnel (AG) inférieur à 37 semaines d'aménorrhée (soit \leq 36 semaines révolues depuis le premier jour des dernières règles). Le taux global de prématurité dans l'échantillon des femmes étudiées était de 4,6 %, soit une valeur plus faible que celle des données nationales danoises ou françaises à la même période, respectivement de 7 % et 6,3 %⁸ (grossesses gémellaires incluses). Dans l'étude danoise, 33 % des accouchements prématurés étaient provoqués (induits) sur

⁸ Europeristat. European Perinatal Health Report. 2008. <http://www.europeristat.com/>

décision médicale, en raison de complications maternelles ou fœtales, et 67 % étaient spontanés, résultant d'un déclenchement inopiné du travail.

Les résultats de l'étude^{2,3,4} montrent une relation dose-effet statistiquement significative entre la consommation de boissons gazeuses édulcorées et la fréquence des accouchements prématurés. Cette relation provient essentiellement des accouchements prématurés provoqués, et elle est plus forte avec les boissons gazeuses édulcorées qu'avec les boissons non gazeuses édulcorées.

En prenant en compte l'ensemble des boissons édulcorées (gazeuses ou non gazeuses), les résultats restent sensiblement les mêmes : une relation dose-effet avec la prématurité, provenant de la prématurité provoquée, mais moins forte qu'avec les boissons gazeuses édulcorées seules.

Aucune relation n'a été identifiée entre la consommation des boissons sucrées, gazeuses ou non gazeuses, et la prématurité, provoquée ou spontanée.

Commentaires

Cette étude a pris en compte les grands facteurs de risque connus de la prématurité, pour contrôler d'éventuels effets de confusion. Cependant, étant donné que l'augmentation de risque concerne essentiellement la prématurité induite, il aurait été utile de savoir quelles complications étaient à l'origine de la décision d'induction : hypertension de la grossesse, retard de croissance intra-utérin, hémorragies, rupture prématurée des membranes. Une analyse du retard de croissance intra-utérin (faible poids pour l'âge gestationnel) en fonction de la consommation de boissons édulcorées aurait déjà apporté une information supplémentaire. La connaissance de ces complications pourrait fournir des indices sur les mécanismes expliquant les résultats observés.

Le seul mécanisme évoqué par les auteurs est l'exposition à l'aspartame, qui serait présent en quantités plus importantes dans les boissons gazeuses que dans les boissons non gazeuses édulcorées. Ils suggèrent le rôle possible du méthanol, provenant de la dégradation de l'aspartame, et un lien possible avec l'hypertension. Les données ne montrent toutefois pas de modification des résultats après ajustement sur l'hypertension ou la prééclampsie, mais l'information sur l'hypertension et la prééclampsie a été obtenue uniquement auprès des femmes interrogées et ces complications peuvent avoir été sous déclarées.

Pour mieux comprendre la signification des résultats, certains points mériteraient d'être précisés par les auteurs de l'étude danoise :

- la formulation exacte du questionnaire sur la consommation des boissons, et sur les autres sources alimentaires d'édulcorants,
- un descriptif plus détaillé des femmes enquêtées selon leur niveau de consommation des boissons étudiées, notamment les antécédents obstétricaux, les maladies chroniques, les caractéristiques sociales, les comportements préventifs, les comportements alimentaires (en particulier concernant la consommation de produits allégés en sucres et en graisses),
- les causes du déclenchement prématuré de l'accouchement, telles que la notion de retard de croissance intra-utérin (faible poids pour l'âge gestationnel), en fonction du niveau de consommation des boissons étudiées,
- les complications de la grossesse selon les niveaux de consommation des boissons étudiées,
- des analyses sur l'ensemble des aliments sources d'aspartame et/ou autres édulcorants consommés par les femmes interrogées.

Calculs d'exposition

Les niveaux français d'exposition à l'aspartame ont été estimés pour la population des plus forts consommateurs des produits pouvant en contenir ; ce calcul a été fait sur la base des quantités maximales autorisées par la réglementation. Ces estimations sont très inférieures à la DJA, y

compris pour les jeunes diabétiques (21 % de la DJA, soit 8,4 mg/kg poids corporel/jour, d'après les données l'étude française sur les jeunes diabétiques⁹) et pour les femmes enceintes (23 % de la DJA, soit 9,2 mg/kg poids corporel/jour, d'après les données de la cohorte EDEN menée par l'INSERM depuis 2003¹⁰). Chez ces dernières (n=1 594 femmes enceintes), le taux de prématurité observée (<37 semaines) est de 5,4%.

3. CONCLUSIONS

L'Agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, sur la base des informations disponibles dans les publications (sans accès aux données brutes) et ainsi que sur la base des auditions conduites, notamment auprès de M. Morando Soffritti (auteur principal de l'article sur l'aspartame) émet les observations suivantes :

Sur l'étude de Soffritti et al. : l'étude a été conduite chez la souris Swiss, selon un protocole inhabituel non conforme aux lignes directrices internationales établies pour la réalisation de ce type d'études. Il est généralement admis que dans ce type de protocole expérimental l'état physiologique des animaux se dégrade fortement ce qui peut biaiser les résultats et remettre en question les conclusions de cette étude. Par ailleurs, les incidences des tumeurs hépatiques et pulmonaires rapportées dans la présente étude sont caractéristiques et fréquemment observées de manière spontanée dans la lignée des souris étudiée. Les analyses statistiques réalisées ne démontrent pas pour l'aspartame une relation dose – effet. De plus, en raison des incertitudes et des déficiences méthodologiques, il n'est pas possible de caractériser les effets rapportés dans cette étude pour les extrapoler à la situation chez l'homme.

Sur l'étude de Halldorsson et al. : cette étude montre une association positive entre la consommation de boissons édulcorées et le risque d'accouchement prématuré. A ce stade, des liens de causalité n'ont cependant pas été établis. Il s'agit de la première étude publiée sur ce sujet et les mécanismes potentiellement responsables de l'augmentation de l'incidence des accouchements prématurés provoqués n'ont pas été identifiés. Comme mentionné par les auteurs, il conviendrait de conduire de nouvelles études pour infirmer ou confirmer leurs résultats.

Il est rappelé que l'aspartame a fait l'objet de nombreux travaux et publications scientifiques sur le plan toxicologique. La dose journalière admissible (DJA) de l'aspartame a été plusieurs fois revue et confirmée par des agences sanitaires européennes et internationales au cours des dernières années^{11,12,13,14,15}. Ces deux nouvelles publications n'apportent pas de base scientifique suffisante pour justifier une révision de la DJA établie pour l'aspartame (40 mg/kg poids corporel/jour).

⁹ Les données de consommation des jeunes diabétiques proviennent d'une étude française réalisée sur une population de 227 jeunes diabétiques (Garnier-Sagne I., Leblanc J.C., Verger P. Calculation of the intake of three intense sweeteners in young insulin-dependent diabetics. Food Chem. Toxicol. 39, 745 – 749, 2001).

¹⁰ Les données de consommation des femmes enceintes proviennent de la cohorte EDEN, étude menée par l'INSERM depuis 2003 sur une population de 2000 femmes enceintes.

¹¹ Rapport de l'Afssa sur la question d'un éventuel lien entre exposition à l'aspartame et tumeurs du cerveau. Maisons-Alfort 7 mai 2002. Saisine 2000-SA-0249

¹² Opinion of the Scientific Committee on Food : Update on the safety of aspartame. Expressed on 4 December 2002, European Commission. 10 December 2002.

¹³ Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in contact with Food (AFC) on a request from the Commission related to a new-long term carcinogenicity study on aspartame. The EFSA Journal 356:1-44, 2006.

¹⁴ Updated opinion on a request from the European Commission related to the 2nd ERF carcinogenicity study on aspartame, taking into consideration study data submitted by the Ramazzini Foundation in February 2009. The EFSA Journal 1015: 1-18, 2009.

¹⁵ Report of the meetings on aspartame with National Experts. Question number: EFSA-Q-2009-00488. May, 2010.

Dans le cadre de la veille continue qu'ils exercent, les CES examinent régulièrement les nouvelles études produites relatives à l'aspartame ou aux autres édulcorants autorisés en vue le cas échéant de réévaluer les risques qui pourraient y être associés.

Au delà de ces interrogations d'ordre toxicologique, ces questions s'inscrivent dans le cadre d'interrogations récurrentes relatives à l'intérêt des usages ainsi que de la caractérisation des bénéfices et des risques nutritionnels des édulcorants autorisés. Dans ce contexte, l'Anses mettra en place prochainement un groupe de travail chargé d'évaluer les bénéfices et les risques nutritionnels des édulcorants et la nécessité éventuelle d'élaboration de recommandations pour les populations les plus concernées.

Le directeur général

Marc MORTUREUX

MOTS-CLES

Mots clés : aspartame, édulcorant, nouvelles études, souris Swiss, toxicologie, épidémiologie