

AVIS

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

relatif à une « demande d'autorisation de mise sur le marché d'un nouvel ingrédient alimentaire : huile riche en DHA-EPA issue de la micro-algue *Schizochytrium sp.* »

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 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.

L'Anses a été saisie le 20 décembre 2011 par la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes pour la réalisation de l'expertise suivante : demande d'autorisation de mise sur le marché d'un nouvel ingrédient alimentaire : huile riche en DHA-EPA issue de la micro-algue *Schizochytrium sp.*

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Cette saisine s'inscrit dans le cadre du règlement 258/97/CE relatif aux nouveaux aliments et nouveaux ingrédients (NI) alimentaires. L'objet de cette demande appartient à la classe 2.1, soit un NI complexe issu de sources non génétiquement modifiées, ayant déjà été utilisé comme aliment dans la communauté.

D'après le tableau II du document de Recommandations (97/618/CE), les informations requises pour les NI de la classe 2.1 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 prévus
- X. Informations fournies par une exposition humaine au NI ou à sa source
- XI. Informations d'ordre nutritionnel sur le NI
- XII. Informations d'ordre microbiologique sur le NI
- XIII. Informations d'ordre toxicologique sur le NI

Dans le cadre de la procédure d'évaluation des nouveaux aliments, le pétitionnaire a déjà soumis deux dossiers pour une huile issue de la micro-algue *Schizochytrium sp.* : le 1^{er} en 2001 pour la

mise sur le marché d'une huile riche en acide docosahexaénoïque DHA¹ (appelée dans cet avis DHA-S), le second en 2008 pour une extension de son utilisation². L'huile faisant l'objet de la présente demande diffère de l'huile précédemment autorisée par sa teneur élevée à la fois en EPA (acide eicosapentaénoïque, C20 :5 n-3) et en DHA. Le pétitionnaire propose qu'elle soit incorporée dans les mêmes aliments vecteurs que l'huile DHA-S, en modifiant toutefois légèrement les niveaux d'incorporation afin de suivre les recommandations de l'EFSA en termes d'apports en EPA et DHA (Efsa, 2010).

2. 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 le(s) comité(s) d'experts spécialisé(s) (CES) « Nutrition humaine (NUT) » (CES pilote) et « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques (AAAT) », sur la base de 4 rapports initiaux rédigés par 4 rapporteurs.

L'unité d'évaluation des risques biologiques dans les aliments a évalué par expertise interne les parties du dossier relatives à son domaine de compétence.

Les travaux ont été discutés puis l'avis validé par correspondance par les CES NUT et AAAT en raison des courts délais de réponse impartis.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DES CES

3.1 Spécification du NI

Le pétitionnaire propose une spécification pour les composés suivants : acidité, indice de peroxydes, humidité et volatilité, fraction insaponifiable, acides gras *trans*, EPA et DHA. Les acides gras *trans* ne doivent pas dépasser 1 % du NI, alors que le DHA et l'EPA doivent représenter respectivement au minimum 22,5 et 10 % du NI. Le pétitionnaire décrit également les résultats d'analyses de 3 lots de fabrication du NI, conformes aux spécifications. Dans ces 3 lots, le pourcentage de DHA et d'EPA rapporté à la somme des acides gras est stable et largement supérieure à la spécification (40,6 % des acides gras en moyenne sur les 3 lots pour le DHA et 19,3 % pour l'EPA). Le pétitionnaire précise que cela permet de mélanger le NI à des huiles végétales pour que le mélange obtenu se rapproche des huiles de poissons, ceci afin de permettre une substitution directe des huiles de poissons par le NI dans les recettes.

Concernant le profil d'acides gras, le pourcentage de l'acide palmitique est comparable à celui de l'EPA (20,6 %). La comparaison avec l'huile DHA-S montre que le NI présente un profil d'acides gras différent même si le DHA reste constant. Les variations les plus importantes concernent une augmentation de l'EPA (x19) et de l'acide oléique (x2) ainsi qu'une diminution de l'acide myristique (x4). L'ensemble des stérols (cholestérol, cholestanol, phytostérols et phytostanols) représente 0,77 % (poids/poids) du NI. Le pétitionnaire indique que les acides gras et les stérols présents dans le NI sont communément retrouvés dans les aliments d'origine animale ou végétale.

Le pétitionnaire fournit également sur ces 3 lots des analyses des résidus de solvant, de certains métaux lourds (cuivre, fer, mercure et plomb), d'arsenic, de la teneur en protéines, du profil d'acides gras ainsi que de celui des stérols. Le pétitionnaire apporte également des résultats d'analyses de contaminants : dioxines (dioxines et PCB de type dioxine), hydrocarbures aromatiques

¹ Décision de la Commission du 5 juin 2003 autorisant la mise sur le marché d'une huile extraite de la micro-algue *Schizochytrium sp.* à teneur élevée en DHA (acide docosahexaénoïque) en tant que nouvel ingrédient alimentaire, en application du règlement (CE) n°258/97 du Parlement européen et du Conseil (2003/427/CE)

² Décision de la Commission du 22 octobre 2009 concernant l'extension des usages de l'huile d'algue extraite de la micro-algue *Schizochytrium sp.* en tant que nouvel ingrédient alimentaire en application du règlement (CE) n° 258/97 du Parlement européen et du Conseil (2009/778/CE)

polycycliques, résidus de pesticides et acrylamides. Le pétitionnaire souligne le fait que leur teneur est inférieure aux limites réglementaires (sauf pour l'acrylamide pour laquelle il n'existe pas de limite réglementaire). Il précise de plus que les méthodes d'analyses utilisées sont des méthodes normalisées et/ou publiées.

Le Comité sur les nouveaux aliments de la FSA estime que la composition du NI ne soulève pas d'inquiétude quant à la sécurité de sa consommation.

Les CES « Nutrition humaine » et « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques » sont en accord avec le comité de la FSA sur le fait que la composition du NI est satisfaisante.

Dans son avis sur l'huile DHA-S (Afssa, 2008), l'Afssa soulignait que « cette huile n'apporte pas d'EPA et ne pourrait se substituer, à elle seule, aux huiles de poissons qui renferment les deux acides gras d'intérêt nutritionnel, EPA et DHA ». Le NI, de par son profil d'acides gras proche de celui des huiles de poisson, peut être considéré comme une alternative pour favoriser des niveaux d'apport proches des apports nutritionnels conseillés (ANC) en EPA et DHA.

Les CES « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques » et « Nutrition humaine » estiment qu'il conviendrait d'inclure une mesure complémentaire d'oxydation lipidique, telle que l'indice d'anisidine et/ou des mesures de composés volatils (propanal), afin de s'assurer que l'huile n'est pas significativement oxydée lors du raffinage ou de son stockage. Un niveau faible en valeur de peroxyde n'exclut pas une oxydation importante de l'huile lors de ces étapes. Ils considèrent de ce fait que le niveau de peroxydation de l'aliment enrichi avec le NI doit être contrôlé régulièrement. Par ailleurs, devraient être précisées la nature et les quantités d'antioxydants présents dans le produit final.

Ils rappellent en outre, que la législation française prévoit que les huiles comestibles, telles que les huiles végétales, « ne doivent pas présenter des teneurs en composés polaires ou en polymères de triglycérides supérieures respectivement à 25 % et 14 % ». Les huiles ne satisfaisant pas à ces dispositions sont réputées impropres à la consommation humaine³.

3.2 Effet du procédé de production appliqué au NI

Le NI est produit à partir de fermentation d'algues cultivées *in vitro* avec un protocole identique à celui de l'huile DHA-S. L'extraction est réalisée soit à partir du milieu de culture soit à partir d'algues séchées après réhydratation. L'huile ainsi obtenue est séchée et purifiée de manière semblable à celle utilisée par les producteurs d'huiles végétales. Un ajout d'antioxydants est d'abord pratiqué, suivi d'un chauffage, d'un ajustement du pH et d'une homogénéisation avant obtention de l'huile. Le pétitionnaire assure appliquer une démarche HACCP à tous les stades de la production avec un suivi des points critiques et un enregistrement des contrôles qualité, ce qui lui permet d'assurer la conformité des lots de NI avec les spécifications annoncées.

*Le Comité sur les nouveaux aliments de la FSA note que le procédé de production est proche de celui utilisé pour l'huile DHA-S de *Schizochytrium sp.*, sauf dans l'étape d'extraction de l'huile où l'hexane est remplacé par l'alcool isopropylique. Il estime que ce point ne soulève pas d'inquiétude.*

³ Décret n°2008-184 du 26 février 2008 portant application du code de la consommation en ce qui concerne les graisses et huiles comestibles. JO 28 février 2008.

Ce point n'appelle pas de commentaire particulier de la part du CES « Nutrition humaine ».

Le CES « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques » estime que le fait que les procédés utilisés soient des procédés courants dans le domaine huilier et similaires à ceux utilisés pour l'obtention de l'huile DHA-S, hormis le remplacement de l'hexane par l'alcool isopropylique, et qu'une démarche HACCP soit présente au sein de l'entreprise peut constituer des éléments positifs, et le CES rejoint ainsi l'avis du comité sur les nouveaux aliments de la FSA.

3.3 Utilisation antérieure de l'organisme utilisé comme source du NI

La micro-algue utilisée pour la production du NI appartient au genre *Schizochytrium*. Elle a été sélectionnée par le pétitionnaire pour sa capacité à produire de l'EPA. La souche produite n'a pas été génétiquement modifiée. Les améliorations de productivité ont été obtenues par optimisation du procédé de fermentation.

Le pétitionnaire présente une revue générale de la production des toxines de l'algue, basée sur des études publiées ou non, indiquant qu'aucun composé toxique ou aucune association avec des composés toxiques n'a été décrit pour l'ordre des Thraustochytrides, auquel appartient *Schizochytrium*. Le pétitionnaire souligne que la plupart des composés toxiques produits par des micro-algues le sont par les algues bleu-vertes ou dinoflagellées, qui appartiennent à un règne différent de celui des *Schizochytrium*. Deux composés toxiques, l'acide domoïque et la prymnésine, sont connus pour être produits dans le règne des Chromista auquel les *Schizochytrium* appartiennent. Cependant, ces toxines sont majoritairement produites par les espèces de deux genres (*Pseudonitzschia* et *Prymnesium*) qui appartiennent respectivement à une classe (Prymnesiophyceae) et un phylum différents des Thraustochytrides. Des analyses supplémentaires menées par le pétitionnaire confirment que ni l'acide domoïque ni la prymnésine ne sont pas produits par *Schizochytrium sp.*

*Le Comité sur les nouveaux aliments de la FSA considère que *Schizochytrium sp* a été utilisée précédemment pour produire l'huile DHA-S et que, bien que le NI soit produit à partir d'un membre nouvellement caractérisé du genre *Schizochytrium*, ce point ne soulève pas d'inquiétude car aucune production de toxine n'a été rapportée pour les membres de la classe à laquelle appartient le genre *Schizochytrium*. Le Comité considère également que les résultats des analyses menées par le pétitionnaire confirment l'absence d'acide domoïque et de prymnésine, apportant une assurance supplémentaire à cet égard.*

Ce point n'appelle pas de commentaire particulier de la part de l'Unité d'évaluation des risques biologiques dans les aliments.

3.4 Consommation/niveau d'utilisation prévu du NI et informations fournies par une exposition humaine antérieure au NI ou à sa source

Le pétitionnaire propose que son NI soit incorporé dans les mêmes vecteurs que ceux autorisés pour l'huile DHA-S ainsi que dans les biscuits (200 mg/100g), les huiles de cuisson (360 mg/100g) et les compléments alimentaires destinés aux femmes enceintes et allaitantes (450 mg/jour). Ces vecteurs sont listés dans le **Tableau 1**. Cependant, il propose certaines modifications dans les quantités apportées. Il indique que ces modifications sont relativement mineures et tiennent compte du récent avis de l'Efsa relatif aux valeurs de référence pour les lipides. Cet avis conclut qu'il y a une relation entre les apports en AGPI n-3 (EPA et DHA) à hauteur de 250 mg/j et la santé cardiovasculaire (Efsa, 2010). Il indique que sa proposition d'incorporer le NI dans des compléments alimentaires destinés aux femmes enceintes et allaitantes, répond aux recommandations d'un certain nombre d'agences sanitaires nationales et de l'Autorité européenne (Efsa).

Tableau 1 : Aliments vecteurs et niveaux d'incorporation de l'huile DHA-S et du NI

Usage alimentaire	Huile DHA-S	NI
Produits laitiers à l'exception de boissons à base de lait	200 mg/100g ; 600 mg/100g pour le fromage	Inchangé
Succédanés de produits laitiers à l'exception de boissons	200 mg/100g ; 600 mg/100g pour les substituts de produits fromagers	Inchangé
Matières grasses à tartiner, sauces et assaisonnement	600 mg/100g	Inchangé
Céréales de petit déjeuner	500 mg/100g	Inchangé
Aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales à l'exclusion des préparations pour nourrissons et de suite	Selon les besoins nutritionnels particuliers des personnes auxquelles ils sont destinés	Inchangé
Denrées alimentaires destinées à être utilisées dans les régimes hypocaloriques destinés à la perte de poids	200 mg/substitut de repas	250 mg/substitut de repas
Produits de boulangerie (pain et petits pains)	200 mg/100g	Inchangé
Biscuits (cookies)	Non inclus	200 mg/100g
Huiles de cuisson	Non inclus	360 mg/100g
Barres diététiques	500 mg/100g	inchangé
Boissons non alcoolisées (y compris boissons lactées)	60 mg/100g	80 mg/100g
Compléments alimentaires	200 mg/100g	250 mg/jour
Compléments alimentaires pour les femmes enceintes et allaitantes	Non inclus	450 mg/jour

3.5 Apports estimés

Le pétitionnaire a estimé l'impact de l'enrichissement des aliments par son NI sur les niveaux d'apports en EPA + DHA en se basant sur les données de consommation britannique de la FSA. Les estimations ont été réalisées pour l'ensemble de la population ainsi que pour les consommateurs d'au moins un des produits susceptibles d'être enrichis en NI (appelés « consommateurs »). Le pétitionnaire estime que cette méthode est maximaliste, du fait que tous les produits de chaque catégorie contiennent le niveau maximal de NI autorisé.

Le résultat de cette analyse indique que les apports les plus élevés se rapportent aux adolescents « consommateurs » et s'élèvent à 0,88 g/j pour les apports moyens et à 1,72 g/j d'EPA+DHA pour les apports au 97,5^{ème} percentile. Chez l'homme adulte « consommateur », les apports moyens s'élèvent à 0,77 g/j et les apports au 97,5^{ème} percentile à 1,65 g/j. D'une manière générale, les niveaux d'apport des « consommateurs » ne diffèrent pas de ceux de la population générale, car 94 à 99 % des individus selon les classes d'âge consomment au moins un des produits susceptibles d'être enrichis en NI.

Le pétitionnaire estime que les compléments alimentaires sont consommés comme une alternative aux aliments enrichis et donc ne sont pas susceptibles d'avoir un impact significatif sur les niveaux d'apports estimés ci-dessus. De ce fait, ils ne sont pas pris en compte dans cette estimation.

Le Comité sur les nouveaux aliments de la FSA considère que les modifications de niveaux d'incorporation proposées par le pétitionnaire n'induisent pas d'augmentation notable des niveaux d'apport dans la population générale. Il note que la forte dose proposée pour les compléments alimentaires destinés aux femmes enceintes et allaitantes est en accord avec le récent avis de l'Efsa sur les allégations relatives aux AGPI n-3.

Le CES « Nutrition humaine » considère que le niveau d'apport maximal estimé est inférieur à celui observé dans certaines fractions de la population fortes consommatrices de poisson (2,8 g/j) (Bemrah et al. 2008). Toutefois, il regrette que ces estimations d'apports ne prennent pas en compte le niveau d'exposition basal et la consommation de compléments alimentaires riches en EPA/DHA, qui varie énormément selon le niveau de consommation des produits de la mer, notamment. Dans une population forte consommatrice de poissons, la consommation de produits enrichis pourrait entraîner des niveaux d'apport en EPA/DHA très élevés, dont les effets à long terme sont inconnus à ce jour. Comme l'indiquait l'Afssa dans son avis relatif à l'huile DHA-S (Saisine 2008-SA-0316), des apports très élevés en DHA pourraient être néfastes au regard des phénomènes de peroxydation qui peuvent avoir lieu notamment au sein des aliments. Ces phénomènes sont d'intensité variable, notamment du fait de la composition de la matrice alimentaire, du mode de cuisson ou du stockage (Afssa, 2003). Ainsi, des composés d'oxydation des AGPI n-3 ont été identifiés dans différents aliments et compléments alimentaires (Surh et al., 2007 ; Michalski et al., 2010 ; Halvorsen et Blomhoff, 2011). Or, des interrogations subsistent sur les risques liés à l'ingestion de produits d'oxydation des AGPI n-3 (Turner et al., 2006 ; Eritsland, 2000 ; Mesa et al. 2004), les aldéhydes issus de l'oxydation des lipides, 4-hydroxy-hexenal (4-HHE) et 4-oxo-2-hexenal notamment, possédant des effets biologiques divers (Kasai et Kasai, 2008 ; Long et Picklo, 2010 ; Pillon et al, 2011). Chez l'Homme sain, une forte consommation de DHA (1,6 g/j) entraîne une augmentation des concentrations plasmatiques de 4-HHE (Calzada et al. 2010).

Le CES « Nutrition humaine » souligne qu'il n'est pas fait mention d'étude de stabilité du NI dans les différentes matrices alimentaires proposées, notamment dans celles qui subissent des procédés thermiques telles que les biscuits ou les huiles de cuisson.

Il estime que les incertitudes liées aux niveaux d'apport élevés en AGPI n-3 à longue chaîne sont encore plus grandes pour les enfants, pour lesquels les études sont moins nombreuses.

Le CES « Nutrition humaine » estime toutefois que cette problématique n'est pas propre au NI mais similaire à tout ingrédient riche en AGPI n-3 et qu'un étiquetage approprié du NI sur les aliments enrichis devrait éviter que les populations fortes consommatrices de produits de la mer consomment des aliments enrichis en EPA et DHA.

Le CES « Nutrition humaine » considère que la dose proposée pour les compléments alimentaires destinés aux femmes enceintes et allaitantes est proche des ANC pour cette catégorie de la population, qui s'élèvent à 500 mg/jour d'EPA+DHA, tout comme les ANC pour la population générale (Anses, 2010). Il indique qu'il est probable que la somme des apports en EPA et DHA par l'alimentation courante et par les compléments alimentaires pour

femmes enceintes et allaitantes, soit supérieure aux ANC et souligne que, d'une manière générale, dépasser les ANC ne présente pas d'intérêt.

3.6 Information d'ordre nutritionnel sur le NI

Le pétitionnaire se réfère de nouveau à l'argumentaire développé pour justifier les modifications des niveaux d'enrichissement dans les aliments vecteurs, ainsi qu'à l'autorisation de mise sur le marché⁴ d'une huile riche en EPA+DHA issue de krill de l'Antarctique (*Euphausia superba*). Cette dernière est autorisée dans une liste de vecteurs similaire à celle autorisée pour l'huile DHA-S. Le pétitionnaire compare également le profil d'acides gras du NI et de nombreuses huiles telles que l'huile de krill, de saumon ou de foie de morue.

Le Comité sur les nouveaux aliments de la FSA estime que les informations nutritionnelles fournies par le pétitionnaire sont adéquates et que le profil nutritionnel non lipidique des produits alimentaires contenant le NI ne devrait pas être significativement différent de ceux des produits enrichis en huile de poisson. Le Comité note également que le profil d'acide gras du NI est comparable à celui des huiles de poisson, et de ce fait ne soulève pas d'inquiétude sur sa sécurité. Il indique enfin que le pétitionnaire n'évoque pas la charge calorique apportée par le NI, mais que, comme il est presque entièrement composé de triglycérides, la valeur calorique de 9 kcal/g peut être utilisée pour l'étiquetage nutritionnel.

Ce point n'appelle pas de commentaire particulier du CES « Nutrition humaine ».

3.7 Information d'ordre microbiologique sur le NI

Le pétitionnaire note que le NI est une matière grasse exclusivement lipidique avec une faible activité de l'eau, ne permettant pas la croissance de microorganismes, que ceux-ci proviennent de l'organisme source ou d'une contamination extérieure. De plus, le pétitionnaire fournit une spécification pour la présence de microorganismes (levures, moisissures, Coliformes, *Escherichia coli*, *Staphylococcus coagulase+*, *Salmonella*) ainsi que des résultats d'analyse sur 3 lots individuels, chacun d'eux étant inférieur aux spécifications.

Le Comité sur les nouveaux aliments de la FSA accepte les données fournies par le pétitionnaire bien qu'il se soit interrogé sur la possibilité d'une contamination par les Cyanobactéries. Cette crainte a été écartée par le contrôle qualité et par la confirmation par le pétitionnaire que le procédé de fabrication a lieu en l'absence de lumière, dans des conditions axéniques (culture pure d'un seul micro-organisme). Le Comité estime ces mesures suffisantes pour garantir que le risque de contamination par les cyanobactéries n'était pas supérieur à celui des procédés de fermentation utilisés dans la production alimentaire.

Ce point n'appelle pas de commentaire particulier de la part de l'Unité d'évaluation des risques biologiques dans les aliments.

⁴ Décision de la Commission du 12 octobre 2009 autorisant la mise sur le marché d'un extrait lipidique de krill de l'Antarctique *Euphausia superba* en tant que nouvel ingrédient alimentaire en application du règlement (CE) n° 258/97 du Parlement européen et du Conseil (2009/752/CE)

3.8 Information d'ordre toxicologique sur le NI

Le pétitionnaire rappelle que le produit traditionnel homologue du NI, l'huile de poisson, est largement utilisé dans les compléments alimentaires et dans les aliments enrichis, au sein de l'Union européenne et sans restriction. Le pétitionnaire souligne l'absence de toxine algale et la grande similarité entre le NI et l'huile de micro-algue riche uniquement en DHA, mise précédemment sur le marché par le pétitionnaire, signifiant que les études toxicologiques menées sur l'huile de micro-algue riche uniquement en DHA peuvent être pertinentes pour l'analyse de la toxicité du NI.

Etude d'orientation (range finding) de 14 jours

Administration du produit testé (huile de *Schizochytrium sp.*) dans le régime (stabilité dans le temps contrôlée). L'essai, réalisé en 2010, a été conduit selon les lignes directrices OCDE 407 et US Red Book 2000 et 2003.

Cent rats Sprague Dawley (Hsd : SD), 50 mâles et 50 femelles, âgés de 7 à 8 semaines, répartis en 5 groupes de 10 mâles et 10 femelles, dont 2 groupes témoins. Groupe 1 : régime de base, groupe 2 : huile de poisson, groupe 3 : 1 % NI (correspondant à 833 mg NI/kg poids corporel (p.c.)/jour, groupe 4 : 3 % NI (2500 mg NI/kg p.c./jour) et groupe 5 : 6 % (5000 mg NI/kg p.c./jour). La teneur lipidique totale du régime a été ajustée à 10,2 % pour les groupes 2, 3, 4 et 5 avec ajout d'huile de maïs pour les groupes 3 et 4. Les paramètres classiques ont été suivis : mortalité, consommations, évolution pondérale, biochimie, hématologie, coagulation, anatomo-pathologie exploratoire, etc.

Les résultats ne montrent pas d'effets liés au traitement, sauf une augmentation du poids absolu et relatif du foie par comparaison au groupe 1 (témoins régime de base). Cet effet est non spécifique et il est retrouvé également chez les animaux du groupe 2 (huile de poisson). Cette augmentation était prévisible et s'expliquerait par la forte teneur en lipides du régime et la composition particulière en acides gras de l'huile algale.

La conclusion est que les rats peuvent supporter une dose de 5000 mg NI/kg p.c./jour (6 %) sans présenter d'effets indésirables.

Le CES « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques » considère cette étude recevable. Le nombre d'animaux est pertinent et les correspondances entre les concentrations de l'huile dans le régime et la dose par kg de poids corporel ont été vérifiées.

Etude de toxicité sub-chronique de 90 jours

Administration du produit testé (huile de *Schizochytrium sp.*), dans le régime (stabilité dans le temps contrôlée, ainsi que celles du DHA- et de l'EPA). L'essai a été conduit en 2010, selon les lignes directrices de l'OCDE 408 et de l'US Red Book 2000 et 2003. L'étude a été conduite sous assurance qualité.

Cent rats Sprague Dawley (Hsd : SD), 50 mâles et 50 femelles, âgés de 7 à 8 semaines, répartis en 5 groupes de 10 mâles et 10 femelles, dont 2 groupes témoins, groupe 1 : régime de base, groupe 2 : huile de poisson. Trois groupes supplémentaires d'animaux ont été exposés à 0,5 % (groupe 3), 1,5 % (groupe 4) et 5 % (groupe 5) de NI incorporé de façon homogène dans le régime. Les dosages correspondent à 357, 1071 et 3571 mg NI/kg p.c./jour. La teneur lipidique totale du régime a été ajustée à 9,2 % pour les groupes 2, 3, 4 et 5 avec de l'huile de maïs ajoutée pour les groupes 3 et 4.

Les paramètres classiques ont été suivis : mortalité, niveau de consommation de régime, évolution pondérale, biochimie, hématologie, coagulation, anatomo-pathologie macroscopique sur tous les animaux et histologique sur une sélection d'organes pour les groupes 1 et 5, ainsi qu'un contrôle ophtalmologique (jour 90 vs jour 0) et une évaluation neurologique à la semaine 13. Cette dernière consistait en une batterie d'observations fonctionnelles (FOB) et activité motrice (MA). Une approche toxicocinétique a également été réalisée dans le plasma, le foie et le cerveau de tous les animaux.

Les résultats ne montrent pas de mortalité augmentée, ni d'anomalies liées à l'administration du produit (observations cliniques, biochimie, hématologie, coagulation, ophtalmologie, neurologie). Ont été observées des diminutions significatives des poids corporels et de la prise de poids chez les mâles et les femelles dans la dernière partie de l'étude, de même que la diminution de la consommation chez les mâles et les femelles du groupe 3, mais celles-ci ont été attribuées par les

auteurs aux fortes concentrations en AGPI n-3. Par ailleurs, ces effets ont également été observés dans le groupe témoin 2 (huile de poisson) et ils sont comparables à ceux du groupe 5 (exposition maximum au NI). Les résultats de toxicocinétique montrent une augmentation dose-dépendante (groupes 3, 4, 5) des concentrations plasmatiques de DHA et d'EPA, également observée au niveau du foie et du cerveau des animaux, notamment chez les femelles.

L'anatomie-pathologique ne montre pas d'effet lié au NI. L'augmentation constatée du poids absolu et relatif du foie chez les mâles et les femelles n'est statistiquement significative que dans les groupes 2 et 5. L'augmentation du poids chez les femelles, mais sans retentissement clinique, est attribuée à la haute teneur lipidique du régime. Il n'est pas rapporté de modifications histologiques corrélées à la teneur du régime en NI dans ces organes.

La conclusion de l'étude est qu'une DSEIO de 3149 mg NI/kg p.c./j peut être attribuée au NI pour les mâles et de 3343 mg NI/kg p.c./j pour les femelles, équivalents à la plus forte exposition au régime contenant 5 % du NI.

Le CES « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques » considère cette étude recevable bien qu'un nombre supérieur d'animaux par groupe eut été préférable eu égard des exigences OCDE. Le CES est d'accord avec la DSEIO identifiée dans cette étude.

Trois études (2 *in vitro*, 1 *in vivo*) de génotoxicité sont rapportées dans le dossier toxicologique.

In vitro : Recherche des mutations géniques par test de mutation inverse sur bactéries

L'étude a été réalisée en 2009 selon les bonnes pratiques de laboratoire, sous assurance qualité et des lignes directrices internationales reconnues (OCDE 471, Guidelines EPA, BPL allemandes) pour rechercher le potentiel mutagène éventuel du NI sur 4 souches de *Salmonella typhimurium* (TA 98 et TA 1537 pour les mutations par « frame shift » et TA 100 et TA 1535 pour les substitutions de paires de bases et la souche *Escherichia coli* WP2 uvra pour la substitution de bases). Deux séries expérimentales distinctes de 6 concentrations différentes ont été testées en triplicate sans et avec activation (fraction microsomale S9 mix). La concentration maximale testée pour les deux séries était 5000 µg/boîte. A cette dose il n'a pas été observé de cytotoxicité. L'essai comportait des témoins négatifs et positifs (2 AA, MMS, NaN3...).

Les résultats sur les 5 souches et pour tous les essais, avec et sans activation, ne montrent pas d'augmentation significative du nombre des colonies de révertants. La validité expérimentale a été démontrée avec les témoins positifs.

Les conclusions de l'étude sont que dans les conditions expérimentales utilisées, le NI testé est considéré comme ne possédant pas d'effet mutagène.

Le CES « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques » considère ce test classique de type Ames, recevable avec un choix judicieux des souches. Le NI testé peut être considéré comme ne possédant pas d'effets mutagènes.

In vitro : Recherche des aberrations chromosomiques sur cultures de cellules de mammifères

L'étude a été réalisée en 2009-2010 selon les bonnes pratiques de laboratoire, sous assurance qualité et de lignes directrices internationales reconnues (OCDE 473, Guidelines EPA, BPL allemandes) pour rechercher le potentiel mutagène éventuel du NI sur lymphocytes humains (sang périphérique) : cultures de cellules diploïdes traitées par un mitogène. Deux séries expérimentales distinctes de 6 concentrations différentes pour chaque série à la concentration maximale testée dans les deux séries (5 µL/mL). Il n'a pas été observé de cytotoxicité. Le traitement a consisté en deux séries d'essais :

- Série I : sans et avec (S9) activation, 4H de traitement, préparation des métaphases (fixation) 24H après le traitement ;
- Série II :
 - o Avec activation, 4H de traitement, préparation des métaphases 24H après le traitement ;
 - o Sans activation, 24H de traitement, préparation des métaphases 24H après le traitement ;

Dans tous les cas, 100 métaphases par culture ont été examinées. L'essai comportait également des témoins négatifs et positifs (éthylméthane sulfonate, cyclophosphamide).

Les résultats pour les deux expérimentations (séries I et II), avec et sans activation métabolique, ne montrent pas d'augmentation significative du taux d'aberrations chromosomiques (brisures de chromosomes), ni de la fréquence des cellules polyploïdes. Les taux d'aberrations chromosomiques observés demeurent dans les limites des témoins négatifs historiques. La validité expérimentale de l'essai a été démontrée avec les témoins positifs.

Les conclusions de l'étude sont que dans les conditions expérimentales utilisées, le NI n'induit pas d'augmentation des aberrations chromosomiques pour les lymphocytes humains et peut être considéré comme ne possédant pas d'effet clastogène.

Le CES « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques » considère ce test recevable. Le NI testé peut être considéré comme ne possédant pas d'effet clastogène.

In vivo : Test du micronucleus sur érythrocytes de souris

L'étude a été réalisée en 2009-2010 selon les bonnes pratiques de laboratoire, sous assurance qualité et selon des lignes directrices internationales reconnues (OCDE 474, BPL allemandes) pour rechercher le potentiel mutagène chromosomique *in vivo* éventuel du NI, c'est-à-dire la capacité d'induction de la formation de micronucléi sur des érythrocytes polychromatophiles (PCE) de la moelle osseuse de souris.

Les auteurs n'ont pas réalisé d'essai préalable de détermination des doses et ont pratiqué directement un « test limite » à 2000 mg/kg p.c. : une seule dose, ici considérée comme la dose maximum tolérable (plus grande dose administrable sans effet toxique). La substance a été administrée par voie orale à une seule dose (gavage, 10 mL/kg p.c.). Du sang périphérique a été prélevé après 44 h et 68 h de traitement. Cinquante souris NMRI, en lots de 5 mâles et 5 femelles réparties entre témoins négatifs, témoins positifs, temps de préparation 44H, temps de préparation 68H ont été testées. A chaque fois, au moins 10000 cellules ont été examinées à la recherche des érythrocytes polychromatophiles micronucléés (PCE). Les témoins ont été traités avec la cyclophosphamide (40 mg/kg p.c. par voie intrapéritonéale). L'étude statistique a été conduite avec le test non paramétrique de Mann-Whitney.

Les résultats montrent que le traitement à 2000 mg/kg p.c. par le NI ne provoque pas d'augmentation du nombre des érythrocytes polychromatophiles micronucléés : le pourcentage des jeunes hématies micro-nucléées (immatures) par rapport au total des PCE est comparable à celui obtenu pour les témoins négatifs.

Les conclusions de l'étude sont que dans les conditions expérimentales utilisées, le NI peut être considéré comme ne possédant pas de propriétés clastogènes.

Le CES « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques » observe que l'essai aurait pu appliquer une méthodologie plus classique (essai d'orientation, plusieurs doses avec éventuellement administration fractionnée). Néanmoins, le test du micronucleus in vivo de recherche des potentialités de mutations chromosomiques, dont le résultat est toujours considéré comme important en toxicologie, est négatif. Le CES « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques » estime donc que le NI peut être considéré comme ne possédant pas de propriétés clastogènes.

Conclusions générales sur les données toxicologiques de la FSA et du CES « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques »

Le Comité sur les nouveaux aliments de la FSA conclut que les études toxicologiques conduites par le pétitionnaire sont suffisantes pour assurer la sécurité du produit aux doses d'utilisation proposées. Il note que les inquiétudes liées aux naissances après terme n'ont pas été abordées dans la réponse du pétitionnaire. Il n'est pas en accord avec la conclusion du pétitionnaire concernant les revues de Makrides et al. de 2006 et 2010, soulignant que l'étude de 2010 montre une

augmentation du nombre de grossesses après terme avec les fortes doses d'AGPI n-3. Cependant, la FSA estime que l'augmentation de la durée de gestation est un problème global qui a déjà été pris en compte par l'Efsa et le Scientific Advisory Committee on Nutrition du Royaume Uni, lorsqu'ils ont établi leurs recommandations en AGPI à longue chaîne pour les femmes enceintes et allaitantes. Elle suggère toutefois qu'une augmentation possible de la durée de gestation doit être prise en compte quand on considère les niveaux auxquels le NI est utilisé, et s'il est possible de les suivre, d'enregistrer les effets délétères suivant l'introduction du NI dans l'alimentation.

Le CES « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques » estime que l'étude par administrations répétées de 90 jours chez le rat ne montre pas d'effet délétères associé à l'administration du NI. Les seules modifications observées peuvent être attribuées à un déséquilibre nutritionnel induit par la forte ingestion de lipides, et ces effets ne sont donc pas spécifiques du NI. Une DSEIO de 3149 mg/kg p.c./jour peut être identifiée de cette étude.

Au plan de la recherche de la génotoxicité éventuelle, un réel effort a été effectué avec deux tests in vitro et un test in vivo, dont les résultats négatifs se rejoignent. Le CES « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques » considère donc que ces tests montrent des résultats négatifs du NI en termes de génotoxicité.

Par ailleurs, le CES « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques » observe que selon les calculs d'exposition conduits par le pétitionnaire, les apports les plus élevés se rapportant aux adolescents « consommateurs » sont de l'ordre de 0,88 g/jour pour les apports moyens d'EPA+DHA provenant de la consommation du NI (18 mg/kg p.c./jour pour un poids moyen de 50 kg) et à 1,72 g/jour (34 mg/kg p.c./jour) pour les apports au 97,5^{ème} percentile. Chez l'homme adulte « consommateur », les apports moyens s'élèvent à 0,77 g/jour (11 mg/kg p.c./jour pour un poids moyen de 70 kg) et les apports au 97,5^{ème} percentile à 1,65 g/jour (23 mg/kg p.c./jour). Ces apports restent de 92 à 286 fois inférieures à la dose la plus élevée n'ayant pas montré d'effets indésirables dans l'étude par administrations répétées de 90 jours chez le rat. Ces marges sont donc considérées comme suffisantes du point de vue toxicologique.

3.9 Allergénicité et étiquetage

Le taux résiduel de protéine dans le NI est inférieur à 0,02 %. Le pétitionnaire indique que sa précédente huile DHA-S, issue de *Schizochytrium*, est produite dans des conditions proches à partir d'une souche de micro-algue voisine, qu'elle contient également des teneurs en protéines faibles (<0,1 %) et que sa consommation n'a été associée à aucun événement sévère. Le pétitionnaire ajoute que des réponses de nature respiratoire et dermatologique, notamment allergiques, aux micro-algues, ont été rapportées chez l'Homme uniquement après exposition aux algues bleu-vertes.

Le pétitionnaire ne propose rien en termes d'étiquetage de son NI. L'autorisation pour l'huile DHA-S stipule qu'elle doit être étiquetée en tant que « huile riche en DHA issue de la micro-algue *Schizochytrium* sp. ».

Le Comité sur les nouveaux aliments de la FSA estime que le NI ne présente pas de risque allergique et qu'un étiquetage similaire à celui de l'huile DHA-S est adapté à la description du NI.

Le CES « Nutrition humaine » est en accord avec la proposition d'étiquetage de la FSA.

3.10 Conclusions

■ Conclusion des autorités britanniques

Le Comité sur les nouveaux aliments de la FSA conclut que le pétitionnaire a apporté les données scientifiques suffisantes pour considérer que les usages supplémentaires du NI ne soulèvent pas d'inquiétude particulière sur sa sécurité lorsque celui-ci est consommé aux niveaux proposés. La FSA souligne que la politique actuelle du Royaume-Uni est d'encourager les apports en AGPI n-3 à longue chaîne et que ce produit peut aider les consommateurs ayant de faibles apports d'AGPI n-3 à les augmenter.

Des inquiétudes ont été soulevées durant l'évaluation précédente d'une huile de micro-algue riche en AGPI n-3 sur l'impact à long terme que peuvent avoir de forts niveaux de consommation sur la santé. La FSA note que ce point doit rester à l'étude et que les apports en DHA devraient être suivis au niveau national et/ou européen. Cependant, le Comité sur les nouveaux aliments de la FSA réitère sa position sur le fait que l'incertitude n'est pas uniquement liée à l'extension d'utilisation du NI et que les études sur l'impact des consommations des aliments enrichis en AGPI n-3 à longue chaîne devraient tenir compte de toutes les sources alimentaires et des différents groupes d'âge, particulièrement des enfants.

Au final, le Comité sur les nouveaux aliments de la FSA est satisfait des éléments fournis par le pétitionnaire et estime que les niveaux d'utilisation du NI sont acceptables.

■ Conclusion des CES « Nutrition humaine » et « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques »

Les CES « Nutrition humaine » et « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques » rejoignent la FSA quant à l'absence d'inquiétude particulière sur la sécurité du NI lorsqu'il est consommé aux niveaux proposés.

Le CES « Nutrition humaine » considère que le niveau maximal d'apport en EPA et DHA estimé, malgré l'absence de prise en compte du niveau d'apport basal en ces acides gras, reste acceptable au regard des niveaux de consommation que peuvent atteindre les forts consommateurs de produits de la mer. Cependant, il partage l'interrogation de la FSA au sujet des effets à long terme de très fortes doses d'AGPI n-3 à longue chaîne et sur la nécessité de suivre les consommations en prenant en compte l'ensemble des sources alimentaires et des différents groupes d'âge, particulièrement des enfants. Il convient également que ce problème n'est pas spécifique au NI mais au cumul d'apport lié à la multiplication des ingrédients riches en EPA et DHA.

Le CES « Nutrition humaine » considère également que la formation de composés issus de l'oxydation des AGPI n-3 lors du stockage du NI et des compléments alimentaires ainsi que lors des procédés de transformation ou de préparation des aliments enrichis avec le NI, (en particulier lorsqu'ils comportent des traitements thermiques comme la cuisson (cookies) ou la friture) devrait être contrôlée régulièrement.

Les CES « Nutrition humaine » et « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques » rappellent qu'en ce qui concerne l'adjonction du NI dans les huiles de cuisson, les

critères en termes de composés polaires et de polymères de triglycérides tels que définis par le décret 2008-184⁵ doivent être respectés.

Le CES « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques » considère que sous l'angle toxicologique la consommation du NI aux niveaux proposés, n'est pas de nature à induire un risque sanitaire.

L'étude par administrations répétées de 90 jours chez le rat ne montre pas d'effet néfaste associé à l'administration du NI. Les seules modifications observées peuvent être attribuées à un déséquilibre nutritionnel induit par la forte ingestion de lipides. Ils ne sont donc pas spécifiques du NI. Une DSEIO de 3149 mg/kg p.c./jour peut être identifiée de cette étude. Les résultats de la recherche de la génotoxicité éventuelle sont négatifs et le NI peut donc être considéré comme dépourvu de potentiel génotoxique.

Par ailleurs, les apports en NI calculés par le pétitionnaire restent de 92 à 286 fois inférieurs à la dose la plus élevée n'ayant pas montré d'effets indésirables dans l'étude par administrations répétées de 90 jours chez le rat. Ces marges sont donc considérées comme suffisantes du point de vue toxicologique.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail adopte les conclusions des CES « Nutrition humaine » et « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques » quant à l'absence d'inquiétude particulière sur la sécurité du NI lorsqu'il est consommé aux niveaux proposés. Elle souligne toutefois le risque lié au cumul d'apport en AGPI n-3 à longue chaîne (EPA et DHA), compte tenu de la multiplicité des vecteurs. Elle estime également nécessaire de surveiller la formation de composés issus de l'oxydation des AGPI n-3, notamment lorsque le NI est incorporé dans des aliments subissant des procédés thermiques.

Le directeur général

Marc Mortureux

⁵ Décret n°2008-184 du 26 février 2008 portant application du code de la consommation en ce qui concerne les graisses et huiles comestibles. JO 28 février 2008.

MOTS-CLES

Acides gras polyinsaturés à longue chaîne, omega 3, novel food, complément alimentaire, enrichissement.

BIBLIOGRAPHIE

- Afssa (2008) Avis du 19 novembre 2008 relatif à la demande d'autorisation de mise sur le marché d'un nouvel aliment ou d'un ingrédient alimentaire : extension d'emploi de l'huile riche en DHA issue de la micro-algue *Schizochytrium* sp.
- Afssa (2010) Avis du 1er mars 2010 relatif à l'actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras.
- Bemrah N., Sirot V., Leblanc J-C. and Volatier J-L (2009). Fish and seafood consumption and omega 3 intake in French coastal populations: CALIPSO survey. *Public Health Nutrition* 12 : 599-608.
- Calzada C, Colas R, Guillot N, Guichardant M, Laville M, Véricel E, Lagarde M (2010). Subgram daily supplementation with docosahexaenoic acid protects low-density lipoproteins from oxidation in healthy men. *Atherosclerosis* 208 467-472.
- Efsa Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) (2010). Scientific opinion on Dietary reference values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids and cholesterol. *Efsa Journal* 8: 1461.
- Halvorsen B.L., Blomhoff R (2011). Determination of lipid oxidation products in vegetable oils and marine omega-3 supplements. *Food & Nutrition Research* 55: 5792.
- Kasai H. and Kawai K (2008). 4-Oxo-2-hexenal, a mutagen formed by ω -3 fat peroxidation: Occurrence, detection and adduct formation. *Mutat Res* , 659 56–59
- Long E.K., Picklo M.J. Sr. (2010). Trans-4-hydroxy-2-hexenal, a product of n-3 fatty acid peroxidation: Make some room HNE. *Free Radical Biology & Medicine*, 49 1–8
- Michalski MC, Calzada C, Makino A, Michaud S, Guichardant M (2008). Oxidation products of polyunsaturated fatty acids in infant formulas compared to human milk – A preliminary study *Mol Nutr Food Res* 52, 1478-85.
- Pillon NJ, Vella RE, Laurent Soulère L, Becchi M, Lagarde M, Soulage CO (2011). Structural and functional changes in human insulin induced by the lipid peroxidation byproducts 4-Hydroxy-2-nonenal and 4-Hydroxy-2-hexenal *Chem Res Toxicol*, 24, 752–762
- Surth J, Lee S, Kwon H (2007). 4-hydroxy-2-alkenals in polyunsaturated fatty acids-fortified infant formulas and other commercial food products. *Food Addit Contam* 24, 1209-18.
- Turner R, McLean CH, Silvers KM (2006). Are the health benefits of fish oils limited by products of oxidation? *Nutr Res Revs* 19, 53–62.