

## **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 aliment ou  
d'un ingrédient alimentaire : protéine de graine de colza**

---

*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 12 octobre 2012 par la direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (Dgccrf) pour la réalisation de l'expertise suivante : « demande d'autorisation de mise sur le marché d'un nouvel aliment ou d'un ingrédient alimentaire : protéine de graine de colza. »

#### **1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE**

La demande d'avis concerne l'utilisation de protéines de graine de colza coproduit de fabrication de l'huile de graine de colza, *Brassica napus* et *Brassica rapa*.

Le pétitionnaire propose de mettre sur le marché une fraction protéique issue de graines de colza au sein de l'Union européenne (UE) comme nouvel ingrédient dans les aliments conventionnels, excepté pour les aliments dans lesquels des protéines de soja sont explicitement mentionnées comme les formules pour nouveau-nés et nourrissons. À ce jour, les protéines issues de graines de colza (après extraction de l'huile) n'ont pas été utilisées comme ingrédient au sein des aliments généralement consommés par la population de l'UE.

La demande d'utilisation a été réalisée auprès des autorités irlandaises 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 irlandaises est soumis à l'Anses pour observations ou objections éventuelles.

La Recommandation 97/618 de la Commission européenne définit une classification des nouveaux aliments et ingrédients ainsi que les informations à fournir pour chaque classe dans le cadre d'une demande de mise sur le marché. Le pétitionnaire positionne le NI dans la classe des produits chimiques purs ou mélanges simples issus de sources non génétiquement modifiées, dont la source a déjà été utilisée comme aliment dans la Communauté (classe 2). Les informations requises pour les NI de cette classe, d'après la recommandation 97/618, 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 du NI
- X. Informations fournies par une exposition humaine antérieure 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

## 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 Comité d'experts spécialisé (CES) « Nutrition humaine », NUT, réuni le 15 novembre 2012, et le groupe de travail (GT) pérenne « Evaluation des substances et procédés soumis à autorisation en alimentation humaine (ESPA) » réuni le 22 novembre 2012. En raison du court délai de réponse accordé, les travaux ont été adoptés par correspondance. Cette expertise a été réalisée sur la base de rapports initiaux rédigés indépendamment par quatre rapporteurs.

## 3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES ET DU GT

### 3.1. Spécification du NI (I)

Le nouvel ingrédient est produit à partir du gâteau de pressage (press cake) de graines de colza de variété canola. L'origine du colza, une plante de la famille des Brassicaceae, résulte d'un croisement spontané entre le chou (*Brassica oleracea*) et la navette (*Brassica rapa*) ou entre des espèces apparentées. Le canola est une variété de colza issue d'un croisement entre *Brassica napus* et *Brassica rapa*. Il est à teneur réduite en acide érucique et en glucosinolates. Le pétitionnaire souligne que les graines de colza utilisées pour fabriquer ce produit sont issues d'un colza de variété canola non OGM.

Le nouvel ingrédient est décrit comme une poudre blanche à blanc cassé, avec un léger arôme. Quatre vingt dix pourcent de cette poudre passent à travers un maillage de 80 (US). Les analyses réalisées sur 4 lots de production du NI par un laboratoire extérieur et les moyennes des analyses réalisées sur 10 lots produits entre mars 2009 et août 2010 par le pétitionnaire sont conformes aux spécifications. La teneur en protéines est spécifiée être au moins de 90 % de la matière sèche ; avec une teneur minimale de protéines solubles d'au moins 85 %. Les 10% restant sont composés de glucides (moins de 7%, estimés par différence), de lipides (moins de 2%), de minéraux (moins de 4%) et de fibres (moins de 0,5%). La teneur en eau est inférieure à 7 %. L'acide érucique n'est pas détectable dans le NI tandis que les glucosinolates sont généralement à la limite de détection ou en dessous et les phytates totaux sont présents à moins de 1,5 %. Le pétitionnaire souligne que les spécifications, qui incluent des analyses microbiennes et de levures, sont vérifiées sur 4 lots. Les résultats détaillés de ces analyses, joints en annexe, montrent une certaine reproductibilité : couleur, arôme, flaveur, taux d'acides aminés/peptides/protéines et teneur de 18 acides aminés, teneur en eau, solubilité, granulométrie, glucides par différence<sup>1</sup>, matières grasses, cendres, fibres, glucosinolates totaux, allylisothiocyanate, phytates totaux, Al, As, Cd, Ca, Cr, Fe, Pb, Mg, K, Na, Zn et niveaux de contamination microbien et fongique.

Les glucosinolates dont la spécification est  $\leq 1$  mmole/kg n'ont pas été détectés sur 3 lots avec une méthode dont la limite de détection est de 0,1 mmole/kg. Des teneurs variant entre 0,05 et 0,7 mmole/kg sont indiquées comme étant caractéristiques du NI. L'isothiocyanate d'allyle n'a pas été détecté dans les lots analysés (analyse par chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse,

<sup>1</sup> La teneur en glucides n'est pas obtenue par dosage mais par soustraction des différents nutriments

limite de détection LD = 1 mg/kg). Pour les phytates, les valeurs mesurées sur 4 lots oscillent entre 0,44 et 1,14 g/100g. Ont également été dosés les composés phénoliques totaux (1,12 à 1,53 g/kg pour les 3 lots analysés), la sinapine représentant de 80 à 200 mg/kg (3 lots analysés).

La teneur en acide érucique (acide 13-docosénoïque ; C20 :1 n-9) est inférieure au seuil de détection (0,1 % de la matière grasse totale). Sur la base de cette limite de détection et d'une teneur en lipides du NI de 2 % maximum, le pétitionnaire propose une spécification interne en acide érucique  $\leq$  20 mg/kg de matière grasse dans le NI.

Les mesures de plomb, cadmium, aluminium, arsenic et chrome réalisées sont toutes inférieures aux spécifications.

En ce qui concerne les résidus de pesticides, le pétitionnaire explique que les éventuels résidus lipophiles initialement présents dans les graines auraient été entraînés avec l'huile lors du pressage et les résidus hydrophiles éliminés lors de l'étape d'ultrafiltration qui a lieu lors de la fabrication du NI. Par ailleurs, le pétitionnaire présente le résultat d'analyse sur 307 agents phytosanitaires (*pesticides*) différents, ainsi que des *dioxines*, *HAP* et des *aflatoxines* (*B1*, *B2*, *G1* et *G2*). Aucun n'est détectable au-dessus des limites des méthodes analytiques.

*Les autorités irlandaises ne font pas de commentaires à ce sujet.*

**Le CES « Nutrition humaine » regrette le manque de précisions sur l'analyse des glucides. En effet, l'estimation par différence ne permet pas d'assurer qu'il s'agisse bien de glucides et non pas de substances indésirables. Il regrette également l'absence de profil protéique. Or il est important de savoir si le NI contient les fractions protéiques potentiellement allergènes, notamment les fractions légères (voir paragraphe 3.9.1).**

**Le GT ESPA rejoint le CES « Nutrition Humaine » en ce qui concerne l'absence de profil protéique.**

Concernant les mesures en composés phénoliques, le GT ESPA remarque que selon une étude de Thiyan et al. (2009), la sinapine (sinapylocholine ou choline ester de l'acide sinapique) est le principal composé phénolique dans la graine de colza et les farines de graine de colza, sous forme libre et estérifiée, ainsi que dans un isolat de protéine de colza. Sur la base d'analyses conduites en employant la chromatographie liquide-spectrométrie de masse (LC-MS), il est suggéré que la sinapine peut être dégradée et produire d'autres composés phénoliques non identifiés. Cette dégradation peut donc expliquer l'écart relevé par le GT ESPA entre les teneurs en composés phénoliques totaux et la teneur en sinapine des échantillons de NI analysés.

**Le GT ESPA considère que l'ensemble des données présentées montre que les résultats d'analyse du NI, conduits avec des méthodologies acceptables, sont conformes aux spécifications définies.**

### **3.2. Effet du procédé de production appliqué au NI (II)**

Le procédé de fabrication est rapidement décrit dans le dossier, le pétitionnaire faisant état d'une confidentialité sur les détails de fabrication. En résumé, l'huile est libérée des graines de *canola* par pression mécanique. Le coproduit est moulu et extrait à l'aide de solvants et suspendu dans l'eau pour éliminer les résidus de solvants. La suspension est traitée avec la phytase pour dégrader l'acide phytique. Les derniers résidus de solvant sont éliminés par évaporation sous pression réduite, une centrifugation permettant d'éliminer par décantation les résidus non solubles. Le surnageant est pasteurisé, centrifugé, ultrafiltré et le retentât atomisé.

*Les autorités irlandaises ne font pas de commentaires à ce sujet.*

**Le CES « Nutrition humaine » et le GT ESPA regrettent plusieurs imprécisions dans la description du procédé de production :**

- les délais séparant l'extraction primaire par pression mécanique et le moment où les tourteaux sont ensuite traités ne sont pas précisés. Or, une contamination (y compris fongique avec risque de production de mycotoxines) est possible ; il aurait été bon de préciser ce délai maximum et les conditions de conservation des tourteaux avant retraitement ou bien d'indiquer clairement que le procédé est appliqué en ligne et sans temps mort ;
- le pétitionnaire réalise une ultracentrifugation sans préciser le seuil de coupure, le type d'appareil, les modalités de fractionnement et comment l'efficacité en est contrôlée (débit, surface de membranes...) ;
- le pétitionnaire indique que le retentât est atomisé sans mentionner si des excipients sont utilisés ;
- enfin, le pétitionnaire indique que des glucides sont présents dans le NI à moins de 7 %, alors que l'étape centrifugation est censée les éliminer. Peut-être sont-ils des excipients d'atomisation, il conviendrait dans ce cas de le préciser.

### 3.3. Utilisation antérieure de l'organisme utilisé comme source de NI (III)

La famille des *Brassicaceae* à laquelle appartient le colza, compte également les choux-fleurs, brocolis, choux de Bruxelles, choux, moutarde brune (*Brassica juncea*) et moutarde noire (*Brassica nigra*). Les allergènes de la moutarde font partie des allergènes alimentaires qui doivent être déclarés sur l'étiquetage. Le nouvel ingrédient est produit à partir de *Brassica napus* et *Brassica rapa*. L'huile de colza avait des usages limités en alimentation humaine et animale du fait de son goût acide et désagréable dû à des glucosinolates particuliers et à leurs métabolismes. Le taux élevé d'acide érucique, un acide gras monoinsaturé oméga 9, à effet potentiel délétère, a également contribué à exclure l'huile de colza de l'alimentation humaine et animale.

En 1970, une nouvelle variété de colza (nommée canola) a été développée par sélection. Cette variété contient très peu d'acide érucique et de glucosinolates, rendant ainsi l'huile consommable. Cependant, tandis que l'huile de colza a un historique de consommation antérieur à 1997, les protéines coproduites par l'extraction de l'huile n'ont été exploitées en tant que source alimentaire que relativement récemment.

*Les autorités irlandaises ne font pas de commentaires à ce sujet.*

**Le CES « Nutrition humaine » souligne la proximité d'espèce entre le canola et les moutardes, dont les fractions protéiques sont allergisantes. Ce point sera plus détaillé en 3.9.1.**

### 3.4. Modifications génétiques (IV et VIII)

Le pétitionnaire indique que des ingrédients issus d'un certain nombre de variétés de graines oléagineuses génétiquement modifiées sont autorisés sur le marché commun. De plus, une proportion significative de canola cultivée dans le monde est génétiquement modifiée pour acquérir une tolérance aux herbicides. Le pétitionnaire indique que le nouvel ingrédient peut être produit à partir des graines du cultivar canola, tel que défini dans les standards du codex 210-1999. Cependant il ajoute qu'il fera tous les efforts pour n'utiliser que des graines non génétiquement modifiées.

*Les autorités irlandaises ne font pas de commentaires à ce sujet.*

**Le CES « Nutrition humaine » et le GT ESPA ne font pas de commentaires à ce sujet.**

### 3.5. Consommation/niveau d'utilisation prévu du NI (IX)

Le nouvel ingrédient a le même positionnement marketing que les protéines de soja, en tant que source de protéines végétales dans les produits tels que les substituts de repas, les boissons protéinées (incluant les analogues de produits laitiers), les barres protéinées, les soupes et soupes déshydratées, les céréales de petit déjeuner et les analogues carnés. Le nouvel ingrédient devrait aussi être utilisé comme un moyen d'améliorer la texture de certains produits de cuisson (viennoiseries et pains), produits carnés frais ou surgelés, pâtes et desserts.

Considérant que le nouvel ingrédient remplacera les protéines de soja, le pétitionnaire estime les apports du nouvel ingrédient en se basant sur une étude estimant les apports en isolats de protéines de soja en Europe de l'ouest, diffusée par la société Euromonitor en 2008/2009. Cette étude rapporte une consommation moyenne d'isolat de protéine de soja de 0,2 g/personne/j. Le pétitionnaire fait alors l'hypothèse que 20 % de la population consomme des produits enrichis en protéines de soja. Suivant cette hypothèse, l'apport moyen des consommateurs de produits enrichis serait de 1 g/personne/jour, et celui des plus forts consommateurs (90<sup>ème</sup> percentile) de 2-3 g/personne/jour.

Le pétitionnaire présente également un scénario maximaliste, sur la base d'un avis de l'Efsa de 2012 sur les valeurs nutritionnelles de référence (population reference intake, PRI) pour les protéines, qui définissent notamment le PRI à 0,83 g/kg/jour. Selon ce rapport, environ 75 % des apports protéiques sont représentés par les produits carnés, céréaliers et laitiers. Environ 7 à 8 % sont issues des produits de la mer et des œufs. Les 18 % restant, c'est-à-dire 0,15 g/kg/jour, proviendraient des sources protéiques ajoutées aux produits alimentaires transformés. Selon le pétitionnaire, ce pourcentage correspondrait à un apport de 10 g/jour pour un adulte. Etant donné que les protéines ajoutées ne sont pas exclusivement apportées par le NI, l'apport moyen en NI devrait être inférieur à 10 g/jour pour un adulte.

*Les autorités irlandaises indiquent qu'aucune limite de sécurité (upper tolerable level, UTL) n'a été développée pour les protéines par l'Efsa et que des apports deux fois supérieurs au PRI (1,5 g/kg pc/j) sont considérés comme sans risque.*

**Le CES « Nutrition humaine » souligne que l'estimation des niveaux de consommation à partir de l'étude de l'Euromonitor, repose sur l'hypothèse non justifiée qu'au maximum, 20 % de la population de l'Europe de l'Ouest consomme des produits enrichis en protéines/jour. De même, le scénario maximaliste exposé par le pétitionnaire est basé sur les sources d'apport en protéines décrites dans le rapport de l'Efsa (2012). Le CES « nutrition humaine » considère que cette estimation serait plus représentative des consommations réelles si elle était basée sur les données de consommation plutôt que sur l'apport de référence (PRI). Le CES « Nutrition humaine » considère ainsi que les estimations du pétitionnaire ne sont pas pertinentes pour évaluer le risque nutritionnel. Il s'étonne que le pétitionnaire ne présente pas la liste exhaustive des catégories d'aliments dans lesquels le NI est susceptible d'être incorporé, ni les niveaux d'adjonction correspondants. Cette absence est d'autant plus étonnante que, selon le pétitionnaire, le NI est destiné à remplacer la protéine de soja. En l'absence de ces informations, l'estimation suffisamment précise des niveaux d'apport pour évaluer le risque nutritionnel n'est pas possible.**

**Le CES « Nutrition humaine » signale que deux isolats de protéines de colza (Puratein et Supertein) sont déjà présents sur le marché américain. Dans la notification GRAS de ces isolats (FDA, 2010), sont décrites les catégories d'aliments susceptibles d'être enrichis, ainsi que les niveaux d'adjonction, qui permettent d'estimer les niveaux de consommation. Les estimations de consommation (consommation moyenne) varient de 20,9 chez les adultes à 32,2 g/jour chez les adolescents et les apports au 90<sup>ème</sup> percentile varient de 57,9 chez les adultes à 89,7 g/jour chez les adolescents. Chez les enfants de 3 à 12 ans, la consommation moyenne est estimée à environ 25 g/jour. D'un point de vue nutritionnel, cette valeur paraît élevée sachant que les ANC protéiques définis par l'Afssa pour les enfants de 4 à 10 ans sont de 15 à 27 g/jour (Afssa, 2007). Ces estimations laissent supposer des apports**

protéiques totaux élevés. Cependant, ces valeurs surestiment certainement la consommation de la population européenne. En effet les isolats de protéines de soja sont utilisés en de plus grandes quantités dans les produits manufacturés aux Etats-Unis qu'en Europe. Ces données démontrent néanmoins que le pétitionnaire doit fournir un calcul plus précis des niveaux de consommation prévus en particulier chez l'enfant, en fournissant la liste des aliments au sein desquels le NI sera additionné, accompagnée de son niveau d'inclusion. Ceci afin d'évaluer l'impact de la consommation du NI sur les apports totaux en protéines.

Le CES « Nutrition humaine » estime également qu'une considération particulière doit être apportée aux groupes utilisant des substituts de repas, aux sportifs et aux enfants dont la consommation du NI est susceptible d'être particulièrement élevée.

### 3.6. Informations fournies par une exposition humaine antérieure au NI ou à sa source (X)

Le pétitionnaire indique que l'huile de colza a un historique de consommation alimentaire dans le monde entier. Cependant, les protéines coproduites de l'extraction de l'huile, n'ont été que récemment étudiées comme une source alternative de protéines végétales pour les raisons évoquées dans la section III. Le pétitionnaire indique qu'aux Etats-Unis, deux produits à base de protéines de colza ont été mis sur le marché depuis 2010 sur la base des notices GRAS (FDA, 2010).

*Les autorités irlandaises ne font pas de commentaires à ce sujet.*

**Le CES « Nutrition humaine » ne fait pas de commentaires à ce sujet.**

### 3.7. Informations d'ordre nutritionnel sur le NI (XI)

Le pétitionnaire compare la composition du NI estimée à partir d'analyses de 4 lots différents et celle de trois isolats de protéines de soja disponibles dans le commerce. Conformément à la définition des isolats de protéines de soja du codex<sup>2</sup>, la teneur en protéine du NI dépasse 90 % de la matière sèche. Les 10 % restants sont constitués de minéraux, lipides et traces de glucides. Les fibres brutes ne sont pas présentes en quantité mesurable.

Le pétitionnaire fournit les analyses de 4 lots du NI décrivant le profil en acides aminés de cette protéine. Il est remarquable que la somme des acides aminés soufrés est bien supérieure dans la protéine des graines de colza comparativement à celle des protéines de soja : ~4,4% pour les protéines de colza versus ~2,6% pour les protéines de soja. Les teneurs d'autres acides aminés sont différentes de celles des protéines de soja, en particulier la lysine, acide aminé indispensable, dont la concentration est supérieure de 15% dans les protéines de soja.

Le pétitionnaire, citant la FAO, indique que le NI et les isolats de protéines de soja ont une digestibilité similaire.

La teneur en minéraux, particulièrement celle du sodium, varie entre les lots du NI et d'avantage entre les différents isolats de protéines de soja. Cependant, les isolats de protéines végétales ne sont pas une source significative de minéraux en alimentation humaine, ces variations n'ont donc pas d'impact nutritionnel significatif.

Concernant le métabolisme, défini par le pétitionnaire comme la digestion et l'absorption de la protéine, certaines études sur des modèles d'animaux sont présentées. Une série d'études chez le rat montre que la digestibilité d'isolats de protéines issues de colza et de soja sont identiques ; 92 à 98% de la protéine étant digérés et absorbés (Sarwar 1975, 1987, 1997, Eggum 1989). Une autre étude chez le porc confirme ces résultats (Galibois, 1989). Concernant le NI précisément, une étude récente non publiée (Liebert 2010) montre que la digestibilité du NI est de 91,9% et est significativement plus faible que celle d'une protéine de soja (94,9%) apportée à la même quantité chez le rat.

<sup>2</sup> Codex General Standard for Soy Protein Products (CODEX STAN 175-1989)

Le pétitionnaire présente ensuite les résultats d'études de digestibilité chez l'Homme, à commencer par des études s'intéressant au soja. En résumé, ces études utilisant des traceurs isotopiques montrent que la digestibilité vraie des protéines issues du soja est de 90 à 99% (Mariotti, 1999, 2002, Moughan 2005). En soustrayant la part des acides aminés absorbés mais oxydés, la rétention de l'azote absorbé issu de ces protéines est de plus de 85% (Mariotti 1999).

Le même type d'étude a été réalisé à partir de protéines de graines de colza marquées au <sup>15</sup>N (Bos, 2007). La digestibilité iléale réelle de la protéine était de 84% en moyenne, et l'utilisation protéique nette postprandiale était de 70% (Bos, 2007).

Enfin, le demandeur présente de façon très succincte (sans données chiffrées) le résultat d'un rapport, non publié, montrant que l'ingestion de 30 g de protéines de colza ou de soja chez l'Homme induit la même digestibilité.

Le pétitionnaire conclut que les protéines de soja et de colza présentent la même digestibilité, considérée comme haute.

*Les autorités irlandaises estiment qu'il est peu probable que la substitution des protéines de soja par le NI ait des conséquences négatives en termes nutritionnels. Il pourrait cependant être prudent de s'assurer que le profil d'acides aminés est équilibré dans les populations de forts consommateurs de substituts protéiques, comme les jeunes hommes actifs.*

**En ce qui concerne les données nutritionnelles, le CES « Nutrition humaine » estime que la digestibilité du NI est susceptible de différer de celle des protéines de soja du fait de la différence entre les deux profils d'acides aminés. Cependant, le NI n'est pas destiné à être incorporé dans un aliment complet<sup>3</sup>, aussi sa consommation n'est pas susceptible d'altérer la synthèse des protéines de l'organisme, dans le contexte d'une alimentation variée et équilibrée.**

**En ce qui concerne les études sur le métabolisme, le CES « Nutrition humaine » souligne que les études chez l'homme ont été réalisées avec des isolats de protéines de graines de colza qu'on ne peut comparer au NI du fait de la méconnaissance de son profil protéique.**

### **3.8. Informations d'ordre microbiologique sur le NI (XII)**

Le pétitionnaire estime que la production du NI n'est pas plus à risque de contamination microbienne que la production de protéines de soja ou de protéines d'autres sources. Il ajoute que des analyses microbiennes (flore aérobie totale, *E. coli*, *Salmonella*, coliformes totaux) sont réalisées sur chaque lot et présente des résultats d'analyses.

*Les autorités irlandaises estiment que les spécifications relatives à la qualité microbienne sont satisfaisantes et corroborées par les résultats d'analyses qui rapportent des données supplémentaires clarifiant le statut en levure et moisissure.*

**Le CES « Nutrition humaine » estime également que la qualité microbienne et fongique du NI est satisfaisante.**

### **3.9. Informations d'ordre toxicologique sur le NI (XIII)**

#### **3.9.1. Evaluation toxicologique du NI**

Le pétitionnaire indique qu'il n'a pas présenté d'étude de toxicité chez l'animal spécifique avec le NI car le tourteau de colza dont il est issu est utilisé traditionnellement pour l'alimentation animale. Ces aliments n'auraient pas fait l'objet de rapports suggérant d'effets indésirables autres que ceux liés à la présence des métabolites secondaires. Par ailleurs, le pétitionnaire indique que la composition et les valeurs nutritionnelles du NI sont équivalentes à celles des protéines du soja et qu'en conséquence, le NI ne contient pas de métabolites dans des quantités jugées préoccupantes au plan toxicologique.

<sup>3</sup> Tel que défini dans la Directive 1999-21

Afin de réaliser une évaluation de risque toxicologique, le GT ESPA a consulté un rapport de la FDA sur le statut GRAS accordé en 2011 aux protéines isolées de graine de colza, traitées pour réduire ou éliminer l'acide érucique et les glucosinolates, qui décrit trois études toxicologiques chez l'animal (FDA, 2011). Le GT ESPA a estimé que bien que ces extraits de protéines ne soient pas exactement les mêmes que ceux du NI, les études toxicologiques évaluées par la FDA représenteraient une base suffisante pour conclure sur la toxicité générale des extraits protéiniques des graines de colza.

Une étude subchronique (90 jours) sur le chien et le rat avec des supplémentations en protéine de colza à des doses de 20 % du régime (correspondant chez le rat à environ 10 000 mg/kg poids corporel/jour et 5000 mg/kg poids corporel/jour chez le chien) et de 40 % du régime (correspondant chez le rat à environ 20 000 mg/kg poids corporel/jour et 10 000 mg/kg poids corporel/jour chez le chien), est décrite par Loew et al (1976). Les groupes témoins ont reçu de la caséine aux mêmes doses. Les contenus en glucosinolates et isothiocyanates totaux étaient de 930 mg/kg et 259 mg/kg pour ces protéines de colza. Le seul effet indésirable observé chez le rat était une diminution modérée mais significative du taux de thyroxine plasmatique à partir de 30 jours de traitement dans le groupe à la dose la plus forte testée (40 %). Par ailleurs, sont observées une hypertrophie de la glande thyroïdienne et quelques modifications histologiques (morphologie plus cellulaire et un plus grand nombre de follicules). Cet effet n'est pas retrouvé chez le chien traité dans les mêmes conditions. Une seconde expérience avec des lots de colza contenant 30 ppm de glucosinolates et seulement 6 ppm d'isothiocyanates ne confirme pas les altérations précédemment décrites sur la thyroïde, à l'exception d'un transport d'iode légèrement diminué chez les témoins.

Une autre étude (28 jours) conduite chez le rat avec des supplémentations en protéine de colza à des doses de 2,5 % (correspondant à environ 1250 mg/poids corporel/jour), 5 % (correspondant à environ 2500 mg/kg poids corporel/jour) et 10 % du régime (correspondant à environ 5000 mg/kg poids corporel/jour) est rapportée par Plass et al. (1992). Cette étude rapporte un effet mineur sur la masse absolue hépatique à la dose de 10 %, la plus forte testée.

Deux autres études subchroniques (90 jours) plus récentes conduites chez le rat (n=20/groupe/sexe) avec deux isolats protéiques différents administrés à des doses de 5 % du régime (correspondant approximativement à 2500 mg/kg poids corporel/jour), 10 % (correspondant approximativement à 5000 mg/kg poids corporel/jour) et 20 % (correspondant à 10000 mg/kg poids corporel/jour) sont rapportées par Mejia et al. (2009 a,b) et par le pétitionnaire pour la Supertein. Les isolats de protéines de colza sont identifiés comme « Puratein » (enrichis en cruciférine, 80 %) ou « Supertein » (enrichis en albumine). Les concentrations en composés antinutritionnels sont faibles pour ces deux isolats et sont du même ordre de grandeur que pour le NI. Les groupes témoins sont constitués d'un groupe sans protéine et d'un groupe recevant 20 % de caséine dans le régime. Le seul effet rapporté est une légère hypertrophie de la thyroïde, manifestée par une augmentation statistiquement significative du poids de la thyroïde et de la parathyroïde par rapport au poids corporel, retrouvé à la plus forte dose testée (20 %) dans le groupe « Puratein ». Cet effet est également retrouvé chez des rats du groupe « Supertein » à la dose 5 % et 20 % mais seulement chez les femelles. En l'absence d'anomalie histopathologique de la thyroïde, l'effet pouvant correspondre à un goitre simple cliniquement isolé sans signes d'hypo ou d'hyperthyroïdie et sans indication tumorale, les auteurs ont établi la DSEIO à la plus forte dose testée 20 % (correspondant approximativement à 10 000 mg/kg poids corporel/jour).

Ainsi, le GT ESPA considère que l'effet sur la thyroïde observé dans les études de Mejia et al. reste inexpliqué, car il n'a pas pu être attribué à la présence de glucosinolates dans l'extrait protéique de colza, connu pour affecter la thyroïde. En conséquence, le GT ESPA estime que cet effet doit être pris en compte à ce stade et qu'une DSEIO de 10 % chez le rat, correspondant à environ 5 000 mg/kg poids corporel/jour, peut-être identifiée sur la base de l'effet observé dans l'étude de Mejia et al.

Par ailleurs, étant donné que les calculs d'exposition conduits dans le dossier sont peu précis par rapport aux doses d'enrichissement envisagées et par rapport aux denrées ciblées, le GT ESPA a réalisé un calcul d'exposition maximaliste basé sur la consommation de protéines par des végétariens en France. Cette population est considérée comme celle qui vraisemblablement serait la plus fortement exposée aux protéines végétales dans la mesure où elle ne consomme pas ou très peu de protéines d'origine animale. En France, la consommation totale de protéines par les végétariens adultes a été estimée en moyenne entre 29 et 138 g/jour pour les hommes et entre 25 et 106 g/jour pour les femmes (Leblanc et al., 2000). Cette consommation serait équivalente à environ 483 et 2300 mg/kg poids/jour pour les hommes et à environ 416 et 1770 mg/kg poids corporel/jour pour les femmes (sur la base d'un poids corporel de 60 kg).

Ces apports seraient ainsi 2 à 12 fois inférieurs à la DSEIO de 5 000 mg/kg poids corporel/jour identifiée chez le rat. Le GT ESPA considère ces marges comme suffisantes compte tenu du mode de calcul d'exposition employé (correspondant à une situation extrême) qui suppose que la totalité des protéines consommées par les populations végétariennes, vraisemblablement les plus fortes consommatrices des protéines végétales, est exclusivement constituée du NI.

### 3.9.2. Allergénicité

Les moutardes, qui appartiennent au même genre *Brassica* que le colza, font partie des 14 allergènes alimentaires d'étiquetage obligatoire en Europe (EFSA, 2004). L'allergénicité est principalement due à la présence d'albumine 2S (Sin a 1 de 14 kDa dans la moutarde jaune et Bra j 1 de 16 kDa dans la moutarde orientale) parmi les protéines de stockage de la graine.

Le pétitionnaire citant l'Efsa (2004), indique qu'il n'y a pas de réaction croisée entre les différentes espèces de Brassicaceae. Cependant, il cite également une étude montrant une réaction croisée entre une albumine 2S de *Brassica napus* et Sin a 1 (Monsalve et al., 1997) et deux autres décrivant une réaction croisée entre la moutarde et l'huile de colza chez des enfants souffrant de dermatite atopique (Puumalainen et al., 2006, Poikonen et al., 2009).

Le pétitionnaire conclut qu'il pourrait être prudent d'informer les sujets allergiques à la moutarde que le NI ne serait pas adapté à leur consommation.

*Les autorités irlandaises, s'appuyant sur l'avis de l'Efsa de 2004 et sur le faible nombre de références citant des réactions croisées entre la moutarde et les autres espèces de Brassica, considère qu'un étiquetage sur l'allergénicité de la moutarde n'est pas nécessaire.*

Le CES « Nutrition humaine » considère que le manque de recul de consommation des protéines du colza et la proximité chimiotaxonomique entre les diverses espèces de *Brassica* ne permettent pas d'exclure tout risque de réactions d'allergie, y compris croisées. En effet, la pronapine 2S du colza se lie aux IgE du sérum de patients allergiques à Sin a 1 de la moutarde (Palomares et al., 2002). D'autre part, ces fractions 2S semblent très résistantes à la température et ne pas perdre de leur potentiel allergisant pendant les transformations d'aliments par cuisson (Leanizbarrutia et al., 1988a, 1988b). Ce risque de réaction croisée est d'autant plus élevé que les allergies à la moutarde sont fréquentes : elles représentent en effet 11 % des allergies alimentaires et 3 % des réactions anaphylactiques d'après André et al. (1994).

En l'absence du profil de protéines du NI, en particulier concernant des fractions de type 2S, et de résultats d'analyse de détection des allergènes, le CES « Nutrition humaine » considère qu'il n'est pas possible d'exclure le risque allergique lié à la consommation du NI et recommande ainsi une mention d'étiquetage.

Le GT ESPA estime également que compte tenu du fait que la composition en protéines du NI n'est pas connue, un risque d'allergie croisée ne peut être complètement exclu chez les personnes allergiques à la moutarde. Le GT ESPA rejoint ainsi les recommandations du CES « Nutrition humaine » sur la nécessité d'inclure un étiquetage mentionnant un risque potentiel d'allergie croisée chez les personnes allergiques à la moutarde.

### 3.9.3. Métabolites secondaires

Le pétitionnaire s'est intéressé à la présence possible dans le NI de métabolites secondaires présents dans les graines de colza.

#### Acide érucique

Le pétitionnaire rappelle que le NI est produit à partir d'un cultivar à faible taux d'acide érucique et présente des analyses d'acide érucique montrant un niveau indétectable avec une limite de détection de 0,1%.

#### Glucosinolates

D'après les analyses fournies par le pétitionnaire, le NI renferme une teneur en glucosinolates totaux < 0,2 mmol/kg soit moins de 100 mg/kg. Le pétitionnaire considère ainsi que la consommation de 20 g du NI résulterait en un apport maximal de 4 µmol de glucosinolates, ce qui est équivalent à l'apport de 0,5 g de chou de Bruxelles. Le NI est également en-dessous du seuil de détection pour l'allyl isothiocyanate et son précurseur (1 mg/kg et 0,05 µmol/g respectivement). Ainsi la consommation de 20 g du NI résulterait en un apport maximal de 0,02 mg d'allyl isothiocyanate, équivalent à l'apport de 40-50 mg de moutarde.

#### Acide phytique

L'acide phytique est la forme de stockage majoritaire du phosphore dans les plantes. Il n'est pas digestible chez l'homme. S'il est ingéré en quantité élevée, l'acide phytique peut réduire la biodisponibilité de certains minéraux. Cependant, le NI en contient moins de 1%, un niveau équivalent à celui des isolats de protéines de soja. Le tofu en renferme 1,5 à 2,9% et le pain complet de 0,4 à 1,0%. Le pétitionnaire en conclut que l'acide phytique ne pose pas de problème de sécurité sanitaire.

#### Composés aromatiques :

##### Sinapine

Les principales substances phénoliques de la graine de colza à effet antioxydant sont l'acide sinapique (acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique) libre et estérifié à la choline (sinapine) à des taux de 1,1 à 1,8%, et les acides paracoumarique, férulique et parahydroxybenzoïque.

Le NI contient de 100 à 500 mg/kg de sinapine, ce qui est plus faible que les taux retrouvés dans les pommes, poires, brocolis, et autres végétaux communs.

*Les autorités irlandaises considèrent que les données fournies par le pétitionnaire sont suffisantes et que les métabolites secondaires ne posent pas de risque toxicologique.*

#### **Le CES « Nutrition humaine » rejoint les autorités irlandaises sur ce point.**

Concernant les solvants résiduels, le pétitionnaire indique que les différentes étapes de purification enlèvent toute trace de *n*-butane employé au début du processus.

Concernant la présence de lysinoalanine dans le NI, le pétitionnaire considère qu'il s'agit d'un artefact qui est notamment produit par traitement thermique. Par ailleurs, le pétitionnaire rappelle que le taux retrouvé dans le NI est de l'ordre de 55 ppm alors qu'il est toléré à 500 ppm (décision de la Commission (CE 150/2002).

Concernant les contaminants potentiels des matières premières, le pétitionnaire présente le résultat d'analyse de 307 agents phytosanitaires (*pesticides*) différents, ainsi que des *dioxines*, *HAP* et des *aflatoxines* (*B1*, *B2*, *G1* et *G2*), des *métaux lourds* (totaux, Hg, Pb, Cd) et de l'*Arsenic*. Aucun n'est détectable au-dessus des limites des méthodes analytiques employées.

*Les autorités irlandaises ne font pas de remarque à ce sujet.*

**Le CES « Nutrition humaine » et le GT ESPA rejoignent les considérations des autorités irlandaises concernant les métabolites secondaires potentiels, et concluent que ces derniers ne posent pas de risque sanitaire dans les conditions de consommation du NI.**

**Le GT ESPA estime que sur la base des mesures analytiques présentées dans le dossier, les concentrations en contaminants dans le NI ne posent pas de risque sanitaire dans les conditions de consommation du NI.**

### 3.10. Conclusions

#### Conclusion des autorités Irlandaises

*Les autorités irlandaises n'ont pas identifié de problème de sécurité lié à la consommation de produits alimentaires contenant le NI, qu'il est prévu d'ajouter dans les mêmes types d'aliment (sauf pour les formules infantiles et les formules de suite) et dans les mêmes proportions que les protéines de soja.*

*En ce qui concerne l'allergénicité, les autorités irlandaises considèrent qu'il n'est pas nécessaire que le pétitionnaire déclare la présence de moutarde comme allergène. En effet, les espèces *Brassica napus* et *Brassica rapa* à partir desquelles le NI est produit, ne sont pas associées à la moutarde d'après un avis de l'Efsa sur l'allergie alimentaire. De plus, les références bibliographiques avancées par le pétitionnaire sont jugées suffisantes pour montrer que les réactions croisées entre la moutarde et les espèces de la famille des Brassicaceae, si elles existent sont limitées.*

#### Conclusions du CES « Nutrition humaine » et du GT ESPA

Le CES « Nutrition humaine » considère que des informations supplémentaires sont nécessaires afin d'évaluer la sécurité du NI. Plus précisément, en ce qui concerne la composition du NI et son procédé de production, le CES « Nutrition humaine » :

- s'interroge sur la présence de glucides dans le NI alors que l'étape d'ultracentrifugation est censée les éliminer. Peut-être sont-ils des excipients d'atomisation mais il aurait été préférable de le préciser ;
- demande des précisions sur l'étape d'ultrafiltration, notamment le seuil de coupure (surtout en l'absence de profil protéique) ;
- déplore l'absence de profil protéique du NI et de comparaison à celui du tourteau de colza. Il est notamment important de savoir si le NI contient les fractions protéiques potentiellement allergènes.

En ce qui concerne les données de consommation, le CES « Nutrition humaine » considère que les estimations fournies par le pétitionnaire ne sont pas suffisamment précises. Il est souhaitable que le pétitionnaire fournisse la liste exhaustive des aliments auxquels le NI sera ajouté, ainsi que les niveaux d'enrichissement prévus, afin de vérifier que les apports en NI ne sont pas en mesure d'augmenter de façon significative la consommation totale en protéines du régime alimentaire, surtout dans les populations fortes consommatrices d'aliments hyperprotéinés et chez les enfants.

En ce qui concerne les données nutritionnelles, le CES « Nutrition humaine » estime que la digestibilité du NI est susceptible de différer de celle des protéines de soja du fait de la différence entre les deux profils d'acides aminés. Cependant, le NI n'est pas destiné à être incorporé dans un aliment complet<sup>4</sup>, aussi sa consommation n'est pas susceptible d'altérer la synthèse des protéines de l'organisme, dans le contexte d'une alimentation variée et équilibrée.

Du point de vue toxicologique, le GT ESPA considère que l'exposition au NI est bien inférieure à la DSEIO définie sur la base d'une étude chez le rat. Il rejoint ainsi les considérations des autorités irlandaises concernant la sécurité d'emploi du NI dans les conditions d'utilisation établies.

Enfin, en ce qui concerne le risque allergique, en l'absence du profil de protéines du NI, en particulier concernant des fractions de type 2S responsables des réactions allergiques, et en

<sup>4</sup> Tel que défini dans la Directive 1999-21

l'absence d'analyses de détection des allergènes, le CES « Nutrition humaine » et le GT ESPA considèrent qu'il n'est pas possible d'exclure un risque d'allergie croisée chez les sujets allergiques à la moutarde. Le CES « Nutrition humaine » et le GT ESPA recommandent ainsi une mention d'étiquetage appropriée.

#### **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 du CES « Nutrition Humaine » et du GT ESPA.

**Le directeur général**

Marc Mortureux

## MOTS-CLES

Protéines, colza, novel food, allergie

## BIBLIOGRAPHIE

Afssa (2007) Apport en protéines : consommation, qualité, besoins et recommandations.

Andre F, Andre C, Colin L, Cacaraci F, Cavagna S (1994) Role of new allergens and of allergens consumption in the incidence of food sensitizations in France. *Toxicology* 93: 77-83

Bos C., Airinei G., Mariotti F., Benamouzig R., Bérot S., Evrard J., Fénart E., Tomé D., Gaudichon C. (2007). The poor digestibility of rapeseed protein is balanced by its very high metabolic utilization in humans. *J. Nutr.* 137(3): 594-600.

Efsa (2004) Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission relating to the evaluation of allergenic foods for labeling purposes. Section XVIII: Allergy to mustard. *The EFSA Journal* 32, 1-197.

Efsa (2010), Scientific Opinion on the safety of allyl isothiocyanate for the proposed uses as a food additive. *The EFSA journal* 8 (12) 1943, 1-40

Efsa (2012) Scientific opinion on dietary reference values for protein. Efsa panel on dietary products, nutrition and allergies (NDA). *The EFSA journal* 10, 2557:1-66

Eggum B.O., Hansen I. and Larsen T. (1989). Protein quality and digestible energy of selected foods determined in balance trials with rats. *Plant Foods Hum Nutr.* 39: 13-21.

FDA (2010). Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000327.  
[www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizGenerallyRec/GRASListings/ucm225018.htm](http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizGenerallyRec/GRASListings/ucm225018.htm).

FDA (2011). Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000386.  
[www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizGenerallyRec/GRASListings/ucm287632.htm](http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizGenerallyRec/GRASListings/ucm287632.htm).

Galibois I., Simoes Nunes C., Rérat A. and Savoie L. (1989). Net appearance of amino acids in portal blood during the digestion of casein or rapeseed proteins in the pig. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 67: 1409-1417.

Leanizbarrutia I, Muñoz D, Bernaola G, Fernández E, Audicana M, Fernández de Corres L (1988a). Reacción anafiláctica tras ingesta de salsa de mostaza. *Rev Esp Alergol Immunol Clin* 3: 79-83.

Leanizbarrutia I, Muñoz D, Bernaola G, Fernández E, Audicana M, Fernández de Corres L (1988b). Sensibilizaciones cutáneas a mostaza. Frecuencia e implicación clínica. *Rev Esp Alergol Immunol Clin* 3: 113-119.

Leblanc et al. (2000) Nutritional intakes of vegetarian populations in France. *Eur. J. Clin. Nut.* 54 : 443-449

Liebert F. (2010). Comparative evaluation of protein quality parameters of Canola protein isolates as single protein sources in the laboratory rat. Unpublished draft report.

Loew, FM et al. (1976). Evaluation of a dietary rapeseed protein concentrate flours in rats and dogs. *Toxic. Applied Pharma.* 35: 257-267 (rapporté par la FDA 2010).

- Mariotti F., Mahé S., Benamouzig R., Luengo C., Daré S., Gaudichon C., Tomé D. (1999). Nutritional value of [15N]-soy protein isolate assessed from ileal digestibility and postprandial protein utilization in humans. *J. Nutr.* 129(11): 1992-1997.
- Mariotti F., Pueyo M.E., Tomé D., Mahé S. (2002). The bioavailability and postprandial utilisation of sweet lupin (*Lupinus albus*)-flour protein is similar to that of purified soyabean protein in human subjects: a study using intrinsically 15N-labelled proteins. *Br. J. Nutr.* 87(4): 315-323.
- Mejia LA. et al. (2009a). A 13-week sub-chronic dietary toxicity study of a cruciferin-rich canola protein isolate in rats. *Food Chem Tox.* 47: 2645-2654.
- Mejia LA et al (2009b). A 13-week dietary toxicity study in rats of a napin-rich canola protein isolate. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 55: 394-402.
- Monsalve RI, Gonzales de la Pena MA, Lopez-Otin C, Fiandor A, Fernandez C, Villalba M, Rodriguez R (1997) Detection, isolation and complete amino acid sequence of an aeroallergenic protein from rapeseed flour. *Clin Exp Allergy* 27:833-41.
- Moughan P.J., Butts C.A., van Wijk H., Rowan A.M. and Reynolds G.W. (2005). An acute ileal amino acid digestibility assay is a valid procedure for use in human ileostomates. *J. Nutr.* 135(3): 404-409.
- Palomares O, Monsalve R, Rodriguez R, Villalba M (2002). Recombinant pronapin precursor produced in *Pichia pastoris* displays structural and immunologic equivalent properties to its mature product isolated from rapeseed. *Eur J Biochem* 269:2538-2545.
- Plass R. et al. (1992). Toxicological evaluation of rapeseed products in a sub-acute feeding study in rats. *Die Nahrung* 36: 248-252. (rapporté par la FDA 2010).
- Poikonen S, Rancé F, Puumalainen TJ, Le Manach G, Reunala, Turjanmaa K (2009). Sensitization and allergy to turnip rape : a comparison between the Finnish and French children with atopic dermatitis. *Acta paediatr.* 98:310-315.
- Puumalainen TJ, Poikonen S, Kotovuori A, Vaali K, Kalkkinen N, Reunala T, Turjanmaa K, Palosuo T (2006). Napins, 2S albumins, are major allergens in oilseed rape and turnip rape *Allergy Clin Immunol.* 117:426-36.
- Sarwar G., Shannon D.W.F. and Bowland J.P. (1975). Effects of processing conditions on the availability of amino acids in soybean and rapeseed proteins when fed to rats. *J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment.* 8(3): 137-141.
- Sarwar G. (1987). Digestibility of protein and bioavailability of amino acids in foods. *Wld. Rev. Nutr. Diet.* 54: 26-70. 52/54
- Sarwar G. (1997). The protein digestibility-corrected amino acid score method overestimates quality of proteins containing antinutritional factors and of poorly digestible proteins supplemented with limiting amino acids in rats. *J. Nutr.* 127(5): 758-764.
- Thiyan et al. (2009) De-oiled rapeseed and a protein isolate: characterization of sinapic acid derivatives by HPLC-DAD and LC-MS. *Eur. Food Res. Technol.* 229 :825-831