



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

### **relatif à l'évaluation du rapport d'évaluation initiale des autorités néerlandaises concernant la mise sur le marché d'un nouvel ingrédient alimentaire : huile à concentration élevée en acide arachidonique, issue de *Mortierella alpina*.**

---

*L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.*

*L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.*

*Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.*

*Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique et technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).*

*Ses avis sont rendus publics.*

---

L'Anses a été saisie le 7 juillet 2011 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (Dgccrf) pour la réalisation de l'expertise suivante : évaluation du rapport d'évaluation initiale des autorités néerlandaises concernant la mise sur le marché d'un nouvel ingrédient alimentaire : huile à concentration élevée en acide arachidonique, issue de *Mortierella alpina*.

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

L'huile à concentration élevée en acide arachidonique (RAO, Refined Arachidonic Acid-Rich Oil) est issue de cultures isolées de *Mortierella alpina* et est ainsi référencée comme une « huile fongique ». L'acide arachidonique (ARA), acide gras polyinsaturé de la famille n-6, est le composant majoritaire de cette huile. Le produit ne sera pas directement commercialisé aux consommateurs, mais sera incorporé dans les préparations pour nourrissons prématurés et nés à terme. Dans le cas de nourrissons nourris exclusivement au biberon, le pétitionnaire affirme que l'ajout d'ARA aux préparations pour nourrissons serait bénéfique pour leur statut nutritionnel.

L'huile à concentration élevée en ARA, issue de *M. alpina* a fait l'objet d'une demande de mise sur le marché auprès des autorités néerlandaises au titre du Règlement CE n°258/97 relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients alimentaires (NI). Le rapport d'évaluation initiale établi par les autorités néerlandaises est soumis à l'Anses pour observations ou objections éventuelles.

Le pétitionnaire considère que le NI appartient à la classe 2.1 définie dans le texte de recommandations de la Commission européenne (97/618/CE) regroupant les nouveaux aliments complexes issus de sources non génétiquement modifiées, déjà utilisées comme aliments dans l'Union européenne.

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 prévu
- 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

## 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 les Comités d'experts spécialisés (CES) « Nutrition humaine » (CES pilote) et « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques », consultés par correspondance en raison des courts délais de réponse impartis, sur la base de rapports initiaux rédigés par 3 rapporteurs.

## 3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DES CES

### I. Spécifications du NI

La RAO est de couleur jaune vif et contient peu d'humidité ( $\leq 0,1\%$ ). L'huile est constituée à 95 % (g/g de RAO) de triglycérides et à 1% de diglycérides. La teneur en ARA (C20:4, n-6) atteint au minimum 40% des acides gras totaux (AGT). En effet, le dossier présente des données de composition détaillées obtenues à partir de cinq lots de production (d'octobre 2007 à avril 2009), qui montre que la teneur en ARA de l'huile est comprise entre 41% et 45% AGT.

Sur la base d'analyses réalisées sur 39 lots produits au cours des cinq dernières années, le pétitionnaire a précisé la teneur en autres acides gras, exprimée en pourcentage des AGT :

- acide linoléique (C18:2, n-6) : 3,8 - 15,2% ;
- acide lignocérique (C24:0) : 7,8 - 12,6% ;
- acide oléique (C18:1, n-9) : 3,4 - 9,5% ;
- acide palmitique (C16:0) : 4,3 - 8,1% ;
- acide stéarique (C18:0) : 4,2 - 7,6% ;
- acide dihomo-  $\gamma$ -linoléique (C20:3, n-6) : 3,0 - 5,0% ;
- acide béhénique (C22:0) : 2,5 - 4,1% ;
- acide  $\gamma$ -linoléique (C18:3, n-6) : 1,7 - 2,7%.

D'autres acides gras sont également présents en plus petites quantités ( $\leq 1\%$ ) : acide arachidique (C20:0), acide myristique (C14:0) et acide palmitoléique (C16:1).

Le pétitionnaire fournit également les éléments de composition suivants :

- acides gras libres (% AGT) : 0,02 - 0,31% ;
- acides gras trans (g/g RAO) : 0,03 - 0,09% ;
- lipides insaponifiables (g/g RAO), essentiellement des stérols:  $\leq 1,3\%$ .

L'indice d'iode (mesure du nombre total de liaisons insaturées) est compris entre 178 et 188.

En ce qui concerne la stabilité, deux méthodes ont été retenues : l'indice de peroxyde et l'indice d'acide. Les analyses ont été réalisées sur cinq lots. L'indice de peroxyde est inférieur à 2,0 meq/kg. L'indice d'acide est compris entre 0,06 et 0,17 mg de KOH/g de RAO.

Pour détecter les éventuels résidus de protéines fongiques, le pétitionnaire a utilisé une méthode par chromatographie (HPLC<sup>1</sup>) permettant de fractionner les peptides et quantifier chaque acide aminé. Ainsi, d'après cette méthode, la teneur en protéines des lots analysés varie entre 0,06 et 0,29 mg/kg de RAO.

Le pétitionnaire fournit les résultats d'analyses concernant les substances indésirables suivantes: métaux lourds, pesticides (composés organochlorés et organophosphorés) et autres polluants environnementaux comme les phtalates, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), biphényles polychlorés (BPC), dioxines et les polychlorodibenzofuranes (PCDF). Les résultats d'analyses fournis par le pétitionnaire indiquent que les teneurs en contaminants de l'huile ne sont pas détectables.

*Les autorités néerlandaises estiment que les méthodes utilisées par le pétitionnaire pour déterminer les caractéristiques de la RAO en termes de composition en acides gras et de qualité (indice de peroxyde, indice d'acide et teneur en acides gras libres) sont fiables et notent que les teneurs en acides gras des lots analysés sont relativement constantes dans le temps. Elles remarquent également que la teneur en protéines fongiques résiduelles de la RAO est très basse.*

*Les autorités néerlandaises considèrent que les analyses effectuées pour la recherche de contaminants sont recevables. Le pétitionnaire indique des seuils limites pour divers métaux lourds (0,1 mg/kg de RAO pour le plomb, le cadmium et l'arsenic, et 0,05 mg/kg de RAO pour le mercure) dans la spécification de son produit. Ces seuils limites sont supérieurs de plus de 5 fois le seuil de détection de ces composés.*

*En ce qui concerne les autres contaminants, tels que les dioxines et les PCB, les autorités néerlandaises considèrent que leurs teneurs sont aussi basses que possible techniquement. Elles notent cependant que le seuil de détection est 10 fois supérieur à la limite autorisée dans les formulations infantiles prêtes à l'emploi. Les autorités néerlandaises estiment toutefois que les limites de détection sont suffisamment basses compte tenu, d'une part, des seuils réglementaires et, d'autre part, de la dilution du produit dans la formulation infantile finale (1g de RAO / L de préparation infantile).*

*Les autorités néerlandaises concluent que les données de composition de la RAO sont suffisamment détaillées et conformes à sa spécification. Par ailleurs, elles considèrent que la RAO ne contient pas de contaminants nocifs pour la santé.*

**Le CES NUT considère que la spécification du NI n'appelle pas de remarques particulières.**

## II. Effet du procédé de production appliqué au NI

Le dossier contient une description détaillée du mode de production. Après une culture intensive de champignons *Mortierella alpina* I<sub>49</sub>-N<sub>18</sub><sup>2</sup>, les micro-organismes sont transférés dans un bioréacteur contenant un bouillon spécial de fermentation. Le milieu de culture contient non seulement des substances nutritives essentielles mais aussi des composés permettant de contrôler le processus. La fermentation, en condition d'aérobic, crée une biomasse riche en ARA, qui est ensuite filtrée, séchée et extraite. Dans une seconde étape, l'huile brute riche en ARA est raffinée. Enfin, des antioxydants sont ajoutés. Si nécessaire, le pétitionnaire dilue le produit final avec de l'huile de tournesol raffinée pour obtenir la concentration désirée en ARA.

La RAO est ensuite emballée sous vide dans des poches composées de 2 feuillets en polyéthylène entre lesquels se trouve un feuillet d'aluminium, sous atmosphère azotée, à une température comprise entre -18°C et -13°C.

<sup>1</sup> chromatographie en phase liquide à haute performance

<sup>2</sup> Les autorités néerlandaises signalent que la souche utilisée et désignée comme étant la souche I<sub>49</sub>-N<sub>48</sub>, est en réalité la souche I<sub>49</sub>-N<sub>18</sub>.

Les tests de stabilité effectués sur trois lots de production, à différentes températures négatives, ont montré que la teneur en ARA n'a pas varié pendant une période de stockage de trois ans. Le pétitionnaire fournit des résultats d'analyses ne montrant aucune augmentation des produits d'oxydation.

*Les autorités néerlandaises remarquent que le pétitionnaire exige de ses fournisseurs de suivre les « Bonnes pratiques de fabrication » et de fournir des substances respectant au moins une norme internationalement reconnue (US FDA, Codex Alimentarius, Directive européenne 96/77 sur les critères de pureté pour les additifs alimentaires ou JECFA). Les autorités néerlandaises estiment que la procédure suivie par le pétitionnaire assure la qualité et la sécurité des matières premières utilisées, toutes de qualité alimentaire.*

*Les autorités néerlandaises reconnaissent, à l'instar du pétitionnaire, que les valeurs limites pour les antioxydants recommandées par la « Norme Codex pour les graisses et les huiles comestibles non visées par des normes individuelles » ne peuvent s'appliquer au nouvel ingrédient car il ne peut être considéré comme une huile comestible. Après dilution dans le produit final, les niveaux correspondants sont bien en dessous des niveaux maximaux admissibles pour les vitamines C et E énoncées dans la Directive 2006/141 sur les préparations pour nourrissons.*

*En ce qui concerne les adjuvants de fabrication, l'hexane et le butane sont utilisés à différentes étapes du processus industriel mais, selon les spécifications du produit, leur teneur dans l'huile raffinée reste inférieure à 1 mg/kg. Ces teneurs sont en conformité avec la Directive européenne 2009/32, sur l'utilisation de solvants d'extraction dans la production d'aliments et ingrédients alimentaires. En ce qui concerne l'agent anti-moussant utilisé pendant la culture du champignon, les autorités néerlandaises estiment que le pétitionnaire a clairement montré qu'une quantité non significative est présente après le raffinage de l'huile. La composition de l'eau du robinet utilisée pour certaines étapes du processus est fournie et témoigne d'une qualité suffisante.*

*En ce qui concerne les matériaux d'emballage, les autorités néerlandaises reconnaissent la démarche proposée par le pétitionnaire pour garantir le respect de la législation européenne avant que l'huile ne soit introduite sur le marché européen.*

*Le pétitionnaire fournit des documents indiquant qu'un système de gestion de sécurité alimentaire, internationalement reconnu, est utilisé pour contrôler l'usine de production en Chine (Norme ISO 22000:2005, plan HACCP). Il estime ainsi être en conformité avec les normes de « bonnes pratiques de fabrication » (BPF). Les autorités néerlandaises, même sans documents d'une tierce partie pour confirmer, estime que, avec l'ampleur et le soin avec lequel les étapes critiques du processus sont contrôlées, les risques pour la sécurité alimentaire sont convenablement gérés.*

*En résumé, les autorités néerlandaises considèrent que l'huile riche en ARA est raffinée par des techniques semblables à celles utilisées par les huileries traditionnelles et que la sécurité du processus de production a été clairement démontrée. La production est de bonne qualité et la durée de vie de l'huile semble être garantie.*

**Le CES NUT considère que les effets du procédé de production appliqué au NI n'appelle pas de remarques particulières.**

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

En ce qui concerne la classification des *Mortierella alpina*, le pétitionnaire indique que le champignon appartient au genre *Mortierella*, de l'ordre des *Zygomycota*, de la classe des *Zygomycetes*. *Mortierella alpina* est l'une des espèces les plus communes au sein des micro-organismes du sol appartenant à cette classe.

La souche utilisée par le pétitionnaire, *Mortierella alpina* I<sub>49</sub>-N<sub>18</sub>, a été obtenue à partir d'une souche sauvage présente dans le sol. Il affirme que le champignon n'a pas été génétiquement modifié en faisant référence à la directive européenne 2001/18/CE.

Les caractéristiques de *Mortierella alpina*, en conditions de laboratoire, sont bien documentées. Selon le pétitionnaire, aucune donnée de la littérature n'a mis en évidence d'association entre ce champignon et une pathogénicité ou une toxicité chez l'être humain ou l'animal. Selon le pétitionnaire, les espèces du genre *Mortierella* ne sont pas des espèces productrices de toxines, excepté l'espèce *Mortierella Wolfii* qui sécrète une mycotoxine particulière. A l'appui de cette affirmation, le pétitionnaire fournit les résultats de tests, réalisés sur 5 lots de production, recherchant la présence de 12 mycotoxines. Toutes les recherches de mycotoxines se sont révélées négatives, à l'instar des résultats obtenus sur 2 huiles similaires, à partir de souches différentes de *Mortierella alpina*.

Le pétitionnaire fournit également les résultats d'une étude toxicologique dans laquelle une solution concentrée de *Mortierella alpina* I<sub>49</sub>-N<sub>18</sub> a été administrée directement dans l'estomac de souris. Aucun effet indésirable n'a été observé durant la période d'observation de 14 jours.

*Les autorités néerlandaises estiment que cette étude toxicologique est d'une pertinence limitée, car il n'y a pas de données sur la quantité exacte utilisée, en termes de biomasse de *Mortierella alpina* I<sub>49</sub>-N<sub>18</sub>.*

*Néanmoins, les autorités néerlandaises concluent qu'il a été clairement démontré que l'organisme de production, *Mortierella alpina* I<sub>49</sub>-N<sub>18</sub>, n'est pas génétiquement modifié et qu'il n'est pas nocif pour l'Homme.*

**Le CES NUT considère que l'identification de la souche de *Mortierella alpina* I<sub>49</sub>-N<sub>18</sub> est clairement détaillée sur la base de nombreuses données bibliographiques caractérisant sa culture, ses caractéristiques morphologiques, sa biochimie et sa physiologie.**

**Le CES NUT confirme que cette souche n'est pas pathogène ou potentiellement génotoxique mais que le risque d'une mutation susceptible de rendre la souche nuisible ne peut être totalement exclu. Cela nécessite donc de la part du pétitionnaire d'inclure un contrôle régulier des marqueurs de mycotoxines.**

## IX. Consommation/Niveau d'utilisation prévue

La RAO est destinée à être ajoutée aux préparations pour nourrissons, afin d'obtenir une teneur en ARA, proche de celle du lait maternel qui varie entre 0,34 et 1,22% des AGT. L'objectif de cet enrichissement des préparations infantiles, revendiqué par le pétitionnaire, est de favoriser une croissance et un développement optimal, en particulier au niveau cérébral. Le pétitionnaire fournit un résumé des recommandations relatives à la teneur en ARA des préparations pour nourrissons publiées par divers organismes nationaux et internationaux depuis 1992. Les besoins en ARA estimés par ces différents organismes varient entre 27 et 60 mg / kg poids corporel (pc) / jour, pour les nourrissons prématurés et entre 20 et 40 mg / kg pc / jour pour les nourrissons nés à terme.

Le pétitionnaire base ses calculs d'enrichissement sur les hypothèses suivantes : (1) la British Nutrition Foundation (1992) recommande une supplémentation en ARA de 0,4% AGT ; (2) l'apport énergétique journalier est de 100-120 kcal / kg de poids corporel (pc) ; (3) 50% de cet apport énergétique journalier provient des acides gras ; (4) un gramme de lipides fournit 9 kcal. Ainsi, les apports journaliers prévus en ARA pour les nourrissons prématurés et nés à terme sont de 27 mg et 22 mg par kg de poids corporel, respectivement. Cela correspond respectivement à 68 mg /kg pc/ jour et 55 mg/kg pc/ jour de RAO, en considérant une teneur en ARA de la RAO s'élevant à 40% des AGT.

*Les autorités néerlandaises n'ont pas de remarques particulières à formuler mais notent que la RAO est diluée au moins 2000 fois dans les préparations pour nourrissons. Elles*

*confirment que l'utilisation prévue du NI est la même que celle d'une huile similaire déjà autorisée dans l'UE depuis le 12 Décembre 2008 (Efsa, 2008).*

**Le CES NUT considère que le niveau prévu d'utilisation du NI n'appelle pas de remarques particulières.**

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

Le dossier présente une analyse de plus de 20 études réalisées chez les nourrissons, publiés depuis l'évaluation par l'Efsa (2008) d'une huile similaire. Selon le pétitionnaire, les résultats de ces études confirment le fait que l'utilisation d'huile riche en ARA ne présente pas de risque pour les nouveau-nés.

*Les autorités néerlandaises estiment que cette analyse n'est pas tout à fait pertinente dans un contexte d'évaluation de la sécurité sanitaire. Seules 10 de ces études présentent un intérêt dans ce contexte. En effet, pour ces 10 études, la source d'ARA dans les préparations pour nourrissons est une huile fongique similaire à celle du pétitionnaire. Cependant, les autorités néerlandaises reconnaissent que l'utilisation de ce type d'huile ne présente pas de risque sur la croissance globale et le développement des nouveau-nés.*

**Le CES NUT n'a pas de remarques particulières à formuler sur ce point.**

#### **XI. Informations d'ordre nutritionnel sur le NI**

La RAO incorporée dans les préparations pour nourrissons n'est pas utilisée comme source d'énergie, mais essentiellement pour couvrir les besoins en ARA afin de favoriser la croissance et le développement optimal des nourrissons prématurés et nés à terme. Le pétitionnaire rappelle que l'ARA et l'acide docosahexaénoïque (DHA) sont importants pour le développement du tissu cérébral et de la vision chez les nourrissons. Le tissu neuronal est particulièrement riche en ARA, qui est un composant essentiel de toutes les membranes cellulaires. L'ARA est également un précurseur des eicosanoïdes, qui, en plus d'être les principaux composants structuraux du tissu nerveux, jouent un rôle important dans la signalisation cellulaire.

L'ARA est également nécessaire pour la synthèse d'autres molécules de signalisation, impliquées notamment dans les fonctions immunologiques.

Le dossier comprend un résumé d'études récentes réalisées chez l'animal et les nourrissons relatives aux effets de l'exposition à la RAO. Aucun des ingrédients riches en ARA utilisés dans ces études n'a été fourni par le pétitionnaire.

*Selon les autorités néerlandaises, le pétitionnaire décrit clairement le rôle physiologique de l'ARA. D'après les conclusions de l'étude toxicologique chez le rat (cf. § XIII), le pétitionnaire mentionne que, si le DHA n'est pas présent en quantité suffisante, des doses élevées d'ARA peuvent conduire à une augmentation du nombre de monocytes.*

*Les autorités néerlandaises notent que la législation européenne sur les préparations pour nourrissons ne précise pas d'exigence pour le ratio de ces 2 acides gras. Aucune teneur minimale en DHA n'est recommandée. Malgré cela, le pétitionnaire reconnaît l'importance d'un équilibre entre ces acides gras et propose, qu'il y ait au moins autant d'ARA que de DHA, se référant aux dernières recommandations internationales dans ce domaine.*

**Le CES NUT estime qu'il est nécessaire d'associer l'apport en ARA à un apport en DHA. En effet, sur la base des recommandations fixées par l'Anses sur les Apports Nutritionnels en lipides (2011), le CES NUT considère que le taux de DHA doit représenter au moins 0,2 % des AGT des préparations lactées pour nourrissons et ne devrait pas excéder 0,5 %. Aussi, le CES NUT rappelle qu'un ANC de 0,32 % AGT pour le DHA et un ANC de 0,5 % AGT pour l'ARA ont été ainsi fixés par l'Anses ; les valeurs sont exprimées en pourcentage des AGT pour un lait apportant, pour 100 mL reconstitués, 70 kcal et 3,4 g de lipides totaux. Il est**

essentiel que l'apport en DHA soit équilibré avec celui de l'ARA pour éviter un déficit en ce dernier chez le nourrisson.

## XII. Informations d'ordre microbiologique sur le NI

Le dossier du pétitionnaire présente les résultats de tests réalisés sur cinq lots de production pour différentes catégories de micro-organismes indésirables. Les résultats sont conformes aux valeurs limites présentées dans la spécification du nouvel ingrédient.

*Étant donné les températures élevées utilisées dans le processus de production, les autorités néerlandaises doutent de la présence possible d'autres micro-organismes indésirables. Sur cette base, elles n'envisagent pas de demander d'éléments complémentaires à ceux fournis.*

**Le CES NUT n'a pas de remarques particulières concernant les éléments d'ordre microbiologique.**

## XIII. Informations d'ordre toxicologique sur le NI

En ce qui concerne l'allergénicité potentielle de la RAO, compte tenu de la présence en quantité non significative de protéines fongiques résiduelles et des traitements thermiques appliquée à l'huile pendant le processus de raffinage, les problèmes d'allergie liés à la RAO sont peu probables d'après le pétitionnaire.

Selon le pétitionnaire, la RAO est comparable, en termes de composition, à huile riche en ARA, déjà autorisée et commercialisée en Europe depuis 2008. Le pétitionnaire a réalisé des études toxicologiques, afin de montrer que la RAO est tout aussi sûre que l'huile déjà autorisée.

Des informations supplémentaires et de nouveaux résultats d'analyses réalisées sur la RAO produite en mars 2006, sont donc fournis par le pétitionnaire.

*Les autorités néerlandaises estiment ces éléments sont recevables car réalisés avec la RAO destinée à être commercialisée.*

La teneur en stérols de la RAO est trois fois supérieure à celle de l'huile déjà autorisée. Leur profil en stérols est également différent.

*Les autorités néerlandaises reconnaissent que l'innocuité des stérols présents a bien été démontrée.*

### a. Étude de 90 j chez le rat avec exposition *in utero*

Des rats Wistar des deux sexes (n=10/groupe), génération F0, ont été traités par l'aliment supplémenté avec la RAO à des concentrations de 0,5 %, 1,5 % et 5,0 % dans le régime (g /g d'aliment). Pour les deux sexes, la dose d'exposition était en moyenne de 0,3 g, 0,9 g et 3,2 g de RAO/kg pc/jour, respectivement pour chacun des trois groupes. La quantité de lipides a été ajustée pour tous les groupes, témoins et traités, par un ajout d'huile de maïs afin qu'ils aient la même quantité de matières grasses ajoutées, soit 5 %. Deux groupes témoins ont été constitués (basse – BTL et haute concentration en lipides – HTL). Les animaux ont été traités comme décrit plus haut pendant toute la durée de la mise en accouplement, de la gestation, de la mise bas et jusqu'au sevrage. Des nouveau-nés des deux sexes (génération F1) ont été accouplés après sevrage, à maturation sexuelle, puis traités par les mêmes doses pendant 90 jours.

### Observations sur la génération F0 :

Les quelques variations de consommation alimentaire observées chez le groupe témoin BTL peuvent être attribuées à un apport calorique insuffisant avec conséquences sur le nombre réduit de nouveau-nés à jour 4. Une baisse modérée du nombre d'implantations est rapportée dans le groupe traité avec la plus forte dose (3 g/kg pc/jour). Chez les nouveau-nés des tous les groupes traités aucune variation significative n'a été observée sur l'ensemble des paramètres étudiés.

*Les autorités néerlandaises remarquent que pour la dose la plus élevée, le nombre de petits dans la portée est anormalement plus bas pour la moitié des femelles F0, par rapport au nombre de petits dans les deux groupes témoin. Le pétitionnaire affirme que cet effet peut être en partie expliqué par la qualité médiocre du sperme de l'un des mâles F0. Ainsi, le pétitionnaire considère que cette observation n'est pas liée à la consommation de la RAO. Bien que cette affirmation semble plausible, les autorités néerlandaises regrettent le manque de données pour l'étayer. Elles estiment que, si un tel effet de la RAO existe, alors il ne serait pas pertinent d'utiliser la RAO dans l'alimentation du nourrisson, même si aucun problème de stérilité chez la descendance F1 n'a été identifié.*

**Le CES AAAT regrette que l'étude F0 ne renseigne pas sur le degré d'exposition des nouveau-nés (génération F1) pendant la phase de lactation. Ainsi, la période critique correspondant aux premiers jours de la vie n'est pas suffisamment évaluée. Bien que des tests réalisés sur le système nerveux central et des examens histologiques aient été conduits en fin d'étude, la période de lactation n'a pas été prise en compte dans l'analyse. Cependant, cette observation mineure ne remet pas en cause les résultats globaux de l'étude.**

#### **Observations sur la génération F1 :**

Une baisse de consommation alimentaire a été notée chez tous les animaux traités ainsi que le groupe témoin HTL. Au niveau hématologique, un certain nombre de variations à la hausse sont observées chez les animaux traités : chez les mâles, cette différence n'est significative que par rapport au groupe témoin recevant une alimentation contenant 5 % d'huile de maïs. Des modifications, en valeurs absolue et relative, de la numération des cellules sanguines sont également observées. Pour les mâles comme les femelles dans le groupe traité avec la plus forte dose, le nombre de monocytes, en valeur absolue comme relative, par rapport aux valeurs chez les 2 groupes témoin a doublé de façon statistiquement significative.

Le pétitionnaire explique que ces modifications pourraient être dues aux doses élevées de RAO, en l'absence de DHA en quantité suffisante. Un déséquilibre entre ces deux acides gras pourrait entraîner des modifications de concentration en molécules de signalisation dérivées (ex. eicosanoïdes et prostaglandines) qui influenceraient les populations de cellules du système immunitaire. Ces modifications seraient liées à un déséquilibre lipidique plutôt qu'au RAO.

Au plan biochimique, des baisses du cholestérol, des phospholipides et une élévation de l'urée sanguine ont été notés chez les animaux traités avec la plus forte dose. Le poids de quelques organes est augmenté (glandes surrénales, foie, rate) mais sans conséquences histologiques notables, à l'exception de la présence de gouttelettes lipidiques au niveau rénal des animaux traités avec la forte dose. Cet effet a également été signalé pour le groupe témoin BTL.

*Les autorités néerlandaises reconnaissent que la dose moyenne de RAO n'a produit aucun effet indésirable. Néanmoins, à la dose la plus élevée testée, quelques paramètres anormaux (pour les deux sexes) par rapport à l'un et/ou l'autre groupe témoin ont été signalés. Selon le pétitionnaire, la diminution des concentrations plasmatiques de cholestérol, de phospholipides et de triglycérides (chez les mâles seulement) étaient prévisibles : en effet, les acides gras polyinsaturés sont connus pour provoquer une diminution des concentrations plasmatiques de lipides. De même, l'augmentation du poids du foie et de la rate a été justifiée par la forte consommation de ce type d'acides gras. Ces effets n'ont pas été observés dans le groupe témoin recevant une alimentation contenant 5% d'huile de maïs. A l'instar du pétitionnaire, les autorités néerlandaises considèrent que ces modifications peuvent être effectivement le résultat d'une réponse physiologique à l'apport élevé en acides gras polyinsaturés. Elles estiment donc que des effets toxiques ne sont pas impliqués étant donné que l'exposition à l'huile fongique n'a entraîné aucune modification histopathologique.*

*Les autorités néerlandaises considèrent que les arguments avancés dans le dossier sont insuffisants pour déterminer la cause des effets observés. Ainsi, après avoir consulté des experts externes dans les domaines de l'hématologie et de l'immunotoxicologie, les autorités néerlandaises estiment que l'augmentation du nombre de monocytes chez les rats se situe dans les limites physiologiques. En conséquence, comme pour les autres résultats observés chez les animaux recevant la plus forte dose de RAO, les autorités néerlandaises considèrent que ces modifications ne sont pas significatives sur le plan toxicologique.*

**Les résultats de l'étude de toxicité répétée chez les rats Wistar montrent quelques modifications, d'ampleur modérée, chez les animaux recevant la plus forte dose (3 g/kg pc/jour) : élévation des monocytes sanguins, élévation de l'urémie et la présence de gouttelettes lipidiques au niveau rénal chez les deux sexes. Toutefois, le CES AAAT est d'accord avec l'interprétation avancée par le pétitionnaire : ces effets peuvent provenir d'un déséquilibre de la surcharge lipidique apportée par le traitement ainsi que des modifications sur les apports caloriques. Ces effets sont à mettre en regard des données de la littérature obtenues avec l'ARA d'origine végétale déjà utilisée et bénéficiant d'un important recul nutritionnel. Par ailleurs, selon l'analyse des autorités néerlandaises, l'augmentation du nombre de monocytes se situerait dans les limites physiologiques normales chez le rat.**

#### **b. Tests de génotoxicité**

Trois tests de mutation géniques *in vitro* ont été réalisés, en présence et en absence d'activations S9 : un test d'AMES, un test de mutations géniques sur des lymphomes de souris et un test d'aberrations chromosomiques sur cellules de hamster chinois (CHO). Ces tests pratiqués selon les protocoles en vigueur donnent des résultats négatifs permettant d'écarter un risque mutagène et clastogène du NI.

*Les autorités néerlandaises considèrent que la RAO n'est pas génotoxique.*

**En ce qui concerne les études de toxicité, le CES AAAT considère que les tests de génotoxicité réalisés avec la RAO sont satisfaisants du point de vue méthodologique : ils prennent en compte les concentrations maximales utilisées et notent l'absence de cytotoxicité à ces concentrations. Les résultats de ces études montrent une absence de potentiel génotoxique *in vitro* de la RAO.**

Le pétitionnaire présente également une autre étude toxicologique de 90 jours chez les rats: les auteurs n'ont pas observé d'effets liés à l'exposition à une biomasse composée de *Mortierella alpina* riche en ARA.

*Les autorités néerlandaises estiment que ces données ne sont pas pertinentes pour l'évaluation de la RAO. En effet, la souche fongique était différente de celle du pétitionnaire et le protocole ne faisait référence à aucune norme internationale.*

Le pétitionnaire considère que la plus forte dose testée représente la NOAEL<sup>3</sup> (dose sans effet indésirable observé), soit 3200 mg de RAO / kg pc / jour. Cela correspond à environ 1300 mg d'ARA /kg pc/jour. Ainsi, la NOAEL de la RAO est supérieure d'environ 45 fois à l'apport prévu pour les nourrissons, estimé à 68 mg de RAO / kg pc / jour (équivalent à environ 27 mg d'ARA / kg pc / jour).

*Les autorités néerlandaises valident la NOAEL retenue par le pétitionnaire. Par ailleurs, comme il est peu probable que les bébés consomment plus que la quantité proposée de produit, elles estiment que, en tant que source d'ARA, la RAO peut être utilisée sans danger comme ingrédient alimentaire pour les nourrissons.*

<sup>3</sup> Non Observed Adverse Effect Level

Le CES AAAT considère que la marge de sécurité est satisfaisante par rapport aux calculs d'exposition de la RAO chez le nourrisson.

*Au final, les autorités néerlandaises considèrent qu'il n'y a pas d'argument scientifique montrant que la RAO produise des effets nocifs chez le nouveau-né.*

Le CES AAAT considère que dans les conditions d'emploi définies, la RAO, en tant qu'ingrédient, ne présente pas de risque sanitaire pour le consommateur visé, à savoir les nourrissons prématurés ou nés à terme.

Le CES NUT souligne le risque d'une mutation susceptible de rendre la souche de *Mortierella alpina* pathogène ne peut être totalement exclu ; cela nécessite donc de la part du pétitionnaire qu'il s'assure régulièrement de l'absence de production de mycotoxines. Par ailleurs, il apparaît souhaitable que le pétitionnaire s'assure de l'absence de contamination liée à l'utilisation d'un emballage en polyéthylène compte tenu de l'âge de la population cible visée par ce NI, à savoir les nourrissons prématurés ou nés à terme.

Dans les conditions de contrôle citées précédemment, le CES NUT considère que le NI peut être utilisé sans risque dans les préparations pour nourrissons prématurés et nés à terme, dans la mesure où le pétitionnaire s'assure que le produit final dans lequel est introduit le NI présente une teneur en DHA suffisante pour ne pas déséquilibrer les apports en acides gras.

#### 4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Anses adopte les conclusions des CES AAAT et NUT.

Le directeur général

Marc MORTUREUX

#### MOTS-CLES

Novel food ; huile ; acide arachidonique ; acide gras ; *Mortierella alpina* ; préparation infantile.

## BIBLIOGRAPHIE

British Nutrition Foundation Task Force (1992). Recommendations for intakes of unsaturated fatty acids. In: British Nutrition foundation, ed. Unsaturated fatty acids: nutritional and physiological significance. London: Chapman & Hall. Pp 152-63.

Efsa (2008). Safety of 'fungal oil from *Mortierella alpina*'. Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/770.pdf>

Anses (2011). Actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras. Edition scientifique. <http://www.anses.fr/Documents/NUT2006sa0359Ra.pdf>