

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 8 décembre 2014

AVIS¹

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

**relatif à une extension d'autorisation d'emploi d'une asparaginase
d'*Aspergillus niger* autoclonée pour la production de denrées à base de céréales destinées
à des nourrissons et des enfants en bas âge : céréales infantiles, biscottes et biscuits**

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 11 avril 2013 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'avis relatif à une extension d'autorisation d'emploi d'une asparaginase d'*Aspergillus niger* autoclonée pour la production de denrées à base de céréales destinées à des nourrissons et des enfants en bas âge : céréales infantiles, biscottes et biscuits.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

L'enzyme principale est une L-asparaginase amidohydrolase (ou asparaginase, EC 3.5.1.1.).

L'emploi de cette enzyme est autorisé par l'arrêté du 19 octobre 2006 modifié, pour les produits céréaliers (à l'exclusion du pain de tradition française) y compris les céréales pour petit déjeuner, les produits frits à base de pommes de terre et les extraits de levures avec la mention d'une utilisation pour la préparation d'aliments contenant de la L-asparagine et des hydrates de carbone, cuits à des températures supérieures à 120 °C. Préalablement à cette inscription, la demande d'autorisation d'emploi de l'enzyme avait reçu un avis favorable de l'Afssa le 31 mai 2007 (saisine 2007-SA-0040).

L'objet de cette nouvelle demande est une extension d'autorisation d'emploi de cette asparaginase à des denrées destinées aux nourrissons (enfants âgés de moins de douze mois) et aux enfants en bas âge (enfants âgés de un à trois ans). Une autorisation d'emploi comme auxiliaire technologique doit en effet être donnée pour l'utilisation d'une enzyme alimentaire pour des

¹ Cet avis annule et remplace les avis de l'Anses du 30 octobre 2013 et du 5 juin 2014.

denrées destinées spécifiquement à ces populations cibles au sens du décret du 29 août 1991². Cette autorisation figure alors dans l'annexe ID de l'arrêté du 19 octobre 2006 modifié³.

Ce dossier entre dans le cadre du décret du 10 mai 2011⁴ fixant les conditions d'autorisation et d'utilisation des auxiliaires technologiques pouvant être employés dans la fabrication des denrées destinées à l'alimentation humaine. Selon l'article 1 de l'arrêté du 7 mars 2011⁵, il doit être établi selon le guide⁶ de l'EFSA pour la soumission d'un dossier sur les enzymes alimentaires.

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) ».

Afin de compléter les données initiales présentes dans le dossier, l'Anses a effectué auprès de la DGCCRF, trois demandes de compléments d'information, les 30 mai, 3 et 15 juillet 2013 qui ont fait l'objet de réponses respectivement les 19 juin, 10 et 25 juillet 2013 permettant de poursuivre l'expertise sans apporter les données suffisantes pour documenter le potentiel risque allergique et conduisant l'Anses à émettre un avis défavorable. Avant la publication de cet avis, plusieurs séries d'informations complémentaires ont été reçues le 25 mars, le 1^{er} août et enfin le 30 octobre 2014 conduisant à des expertises complémentaires et à la modification de cet avis initial.

Une expertise a été réalisée en interne par le Département d'évaluation des risques liés aux aliments (DERA) sur l'exposition potentielle à l'asparaginase en utilisant des données de consommation françaises pour les denrées revendiquées par le pétitionnaire et sur la contribution des produits céréaliers à l'exposition à l'acrylamide des populations cibles de la demande d'extension d'autorisation.

L'expertise collective a été menée les 20 juin, 18 juillet, 19 septembre et 17 octobre 2013 ainsi que les 17 avril, 15 mai, 18 septembre et 20 novembre 2014 par le Groupe de travail (GT) « Biotechnologie » sur la base de rapports initiaux rédigés par cinq rapporteurs dont deux rapporteurs apportant des compétences complémentaires, membres d'autres collectifs d'experts de l'Anses.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise. Dans ce contexte, un expert n'a pas pris part aux travaux et délibérations sur cette saisine pour risque de conflit d'intérêt.

Les déclarations d'intérêts des experts sont rendues publiques *via* le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

² Décret n° 91-827 du 29 août 1991 modifié relatif aux aliments destinés à une alimentation particulière

³ Arrêté du 19 octobre 2006 modifié relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires

⁴ Décret n° 2011-529 du 10 mai 2011 fixant les conditions d'autorisation et d'utilisation des auxiliaires technologiques pouvant être employés dans la fabrication des denrées destinées à l'alimentation humaine

⁵ Arrêté du 7 mars 2011 relatif aux lignes directrices pour la constitution des dossiers de demande d'autorisation d'emploi d'auxiliaires technologiques en alimentation humaine

⁶ Guidance of EFSA prepared by the Scientific Panel of Food Contact Material, Enzymes, Flavourings and Processing Aids on the Submission of a Dossier on Food Enzymes. *The EFSA Journal* (2009) 1305, 1-26

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT

Les caractéristiques de l'enzyme alimentaire, le procédé de production et la souche de production (souche ASP-72) ne sont pas modifiés dans cette nouvelle demande, par rapport à la demande initiale.

3.1 Applications technologiques envisagées

L'extension d'autorisation d'emploi de l'enzyme alimentaire est en tant qu'auxiliaire technologique pour la production de céréales infantiles, de biscottes et de biscuits destinés aux nourrissons et aux enfants en bas âge.

Par réaction de Maillard, à une température supérieure à 120 °C et en présence de sucres réducteurs libres, la L-asparagine présente dans les aliments se transforme en acrylamide. L'acrylamide est classée « cancérogène probable chez l'Homme » : Groupe 2A (IARC, 1994)⁷ et l'Anses dans son avis du 21 juin 2011 (Saisine 2006-SA-0361) a considéré qu'il était nécessaire de poursuivre les efforts afin de réduire l'exposition alimentaire à cette substance.

Les produits à base de céréales indiqués dans la demande contiennent de la L-asparagine et des hydrates de carbone et sont cuits à des températures supérieures à 120 °C. En présence d'eau, l'asparaginase hydrolyse la L-asparagine en L-aspartate et en ammonium et conduit ainsi à la diminution de la concentration de L-asparagine.

Expérimentalement, une réduction de la formation d'acrylamide liée à l'utilisation de cette asparaginase avant l'étape de chauffage des denrées alimentaires a été mise en évidence dans des biscuits pour bébés (45 % dans un essai pilote et 31 % dans un essai industriel) et dans des céréales infantiles (92 % dans un essai pilote).

3.2 Critères de pureté

Les critères de pureté chimique et biologique répondent aux exigences de l'arrêté du 19 octobre 2006 modifié. Les matières premières et auxiliaires technologiques utilisés dans la production de l'enzyme alimentaire sont de qualité alimentaire.

Concernant les additifs présents dans l'enzyme alimentaire, l'enzyme serait commercialisée sous deux formes : une forme liquide stabilisée avec du glycérol et une forme granulée sur maltodextrine.

Pour la forme liquide, le glycérol n'est pas autorisé dans les denrées pour nourrissons et enfants en bas âge mais cependant est autorisé comme support d'enzymes sans conditions restrictives pour les enzymes utilisées dans les denrées pour ces populations en se fondant sur un calcul d'exposition montrant une concentration négligeable de glycérol issu de l'utilisation de l'asparaginase.

Pour la forme granulée, la maltodextrine ne conduit pas à un risque particulier pour ces populations cibles.

⁷ International Agency for Research on Cancer (IARC). (1994). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Industrial Chemicals. IARC, Lyon, France

3.3 Données de sécurité

Compte tenu de l'organisme de production *Aspergillus niger*, espèce potentiellement productrice de mycotoxines et d'autres métabolites secondaires, et des populations cibles, il convient de mettre en place une surveillance de ces substances dans la production de l'enzyme alimentaire.

Les études de toxicité chez le Rat, présentes dans le dossier initial de demande d'autorisation d'emploi de l'enzyme alimentaire, permettent de fixer des NOEL⁸ aux doses les plus fortes testées, soit 1157 mg/kg de poids corporel/jour pour les mâles et 1331 mg/kg de poids corporel/jour pour les femelles. La NOEL la plus faible de 1157 mg/kg de poids corporel/jour sera utilisée pour les calculs de marge de sécurité.

Le guide⁹ de l'EFSA pour la soumission d'un dossier sur les enzymes alimentaires indique « *In case the use of the food enzyme is proposed for products specifically designed for infants (0-12 months) or young children (12-36 months) as defined in the Commission Directive 2006/141/EC¹⁰, ad hoc conservative exposure estimates must be produced taking specifically into account these population groups* ».

Les calculs réalisés se basent sur les données de consommation de l'enquête bébés-SFAE¹¹. La nomenclature de cette enquête de consommation comprend 32 catégories alimentaires principales. Ont été pris en compte dans les calculs, les céréales infantiles et les biscuits destinés aux nourrissons et enfants en bas âge.

L'apport journalier individuel total en asparaginase *via* les denrées alimentaires revendiquées est maximisé en utilisant la dose maximale d'enzyme recommandée par le pétitionnaire et la consommation par les individus mangeant ces denrées (51 % de la population des nourrissons et 39 % de la population des enfants en bas âge). Le rapport de la dose sans effet observé, établie par l'étude de toxicité subchronique pendant 90 jours chez le Rat (1157 mg /kg de poids corporel/jour) divisée par l'apport journalier individuel total en asparaginase *via* les denrées alimentaires revendiquées, permet de calculer des marges de sécurité :

- En considérant la consommation moyenne, les marges de sécurité calculées sont de 3816 pour les nourrissons et de 6570 pour les enfants en bas âge,
- En considérant une consommation au 97,5^{ème} percentile, les marges de sécurité calculées sont de 1059 pour les nourrissons et de 2012 pour les enfants en bas âge.

⁸ No Observed Effect Level

⁹ Guidance of EFSA prepared by the Scientific Panel of Food Contact Material, Enzymes, Flavourings and Processing Aids on the Submission of a Dossier on Food Enzymes. *The EFSA Journal* (2009) 1305, 1-26

¹⁰ Directive 2006/141/CE de la Commission du 22 décembre 2006 concernant les préparations pour nourrissons et les préparations de suite et modifiant la directive 1999/21/CE

¹¹ Fantino M. et Gourmet E., 2008. Apports nutritionnels en France en 2005 chez les enfants non allaités âgés de moins de 36 mois. *Archives de pédiatrie*, 15, 446-455.

Cette enquête a été réalisée sur le terrain du 12 janvier au 10 mars 2005 par la TNS-SOFRES pour le compte du *Syndicat Français des Aliments de l'Enfance*, membre de *l'Alliance 7*. Le recueil des données de consommation a été effectué au domicile de 713 enfants (âgés de 15 jours à 36 mois et 15 jours), selon la technique du carnet alimentaire sur trois jours consécutifs, repas par repas, noté par les personnes prenant soin des enfants (le plus souvent la maman, et/ou la nourrice, avec la participation des papas).

Ont été inclus dans cette enquête, des nourrissons ou jeunes enfants non allaités au sein (ni exclusivement, ni partiellement) et ne fréquentant pas une crèche collective ou une école durant les trois jours suivant le recrutement. En effet, la quantité de lait consommée par un bébé allaité au sein étant difficile à évaluer, elle aurait nécessité un protocole spécifique et une analyse du lait maternel pour chaque nourrice, voir à chaque prise, compte tenu des variations de la teneur du lait de femme. Les enfants nourris au sein ont donc été exclus par la TNS-SOFRES.

L'exposition à l'acrylamide des nourrissons et enfants en bas âge a été estimée en utilisant les données de consommation françaises⁹ des produits céréaliers revendus par le pétitionnaire, et des données de contamination des denrées européennes (EFSA, 2012)¹² :

- En considérant la consommation moyenne des individus (ensemble de la population), les apports en acrylamide issus de la consommation de céréales infantiles et de biscuits dédiés sont de 0,06 µg/kg de poids corporel/jour pour les nourrissons et de 0,03 µg/kg de poids corporel/jour pour les enfants en bas âge. Chez les individus seuls consommateurs de ces denrées (51 % de la population des nourrissons et 39 % de la population des enfants en bas âge), les apports en acrylamide issus de la consommation de céréales infantiles et de biscuits dédiés sont de 0,114 µg/kg de poids corporel/jour pour les nourrissons et de 0,069 µg/kg de poids corporel/jour pour les enfants en bas âge.
- En considérant une consommation au 97,5^{ème} percentile des individus (ensemble de la population), les apports en acrylamide issus de la consommation de céréales infantiles et de biscuits infantiles sont de 0,3 µg/kg de poids corporel/jour pour les nourrissons et de 0,2 µg/kg de poids corporel/jour pour les enfants en bas âge. Chez les individus seuls consommateurs de ces denrées (51 % de la population des nourrissons et 39 % de la population des enfants en bas âge), les apports en acrylamide issus de la consommation de céréales infantiles et de biscuits dédiés sont de 0,389 µg/kg de poids corporel/jour pour les nourrissons et de 0,204 µg/kg de poids corporel/jour pour les enfants en bas âge.

En considérant une réduction de la teneur en acrylamide de 92 % dans les céréales infantiles et de 45 % dans les biscuits destinés aux nourrissons et aux enfants en bas âge, pourcentages maximaux obtenus dans les essais expérimentaux du pétitionnaire, et les moyennes de consommation de ces denrées par les seuls consommateurs, on obtiendrait avec l'emploi de l'asparaginase, une diminution de l'apport en acrylamide de 0,102 µg/kg de poids corporel/jour pour les nourrissons et de 0,06 µg/kg de poids corporel/jour pour les enfants en bas âge.

3.4 Devenir de l'enzyme alimentaire dans le produit final

L'asparaginase est inactivée de façon irréversible par la cuisson des aliments à des températures de plus de 120 °C. Une recherche *in silico* d'hydrolyse par une pepsine présente les différents sites potentiels de coupure de l'asparaginase par cette enzyme.

L'asparaginase est sous forme glycosylée dans les denrées. Le pétitionnaire présente une étude *in vitro* de simulation de digestion qui montre une hydrolyse de l'asparaginase glycosylée mais cette étude ne permet pas d'apprécier l'effet protecteur de la matrice alimentaire.

L'alignement des séquences des L-asparaginases d'*A. niger*, d'*E. coli* et d'*Erwinia chrysanthemi*, montre une homologie importante entre l'asparaginase d'*A. niger* et celle d'*Erwinia chrysanthemi*, avec un pourcentage d'identité de 47 %. Or, un des principaux inconvénients du traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL), des méningites leucémiques et des lymphomes non hodgkiniens par la L-asparaginase d'*E. coli* ou d'*Erwinia chrysanthemi* par voie injectable, consiste dans l'apparition de réactions allergiques (urticaires, plus rarement bronchospasmes, œdèmes laryngés ou chocs anaphylactiques) qui exigent souvent un arrêt immédiat et définitif du traitement. Selon les recommandations de la FAO/WHO (2001), l'existence d'une identité de séquence ≥ 35 % avec un allergène avéré sur une fenêtre de 80 résidus, signe une possibilité d'allergénicité : ce pourcentage est supérieur entre la L-asparaginase d'*A. niger* et celle d'*Erwinia chrysanthemi*, dont l'allergénicité a été démontrée par voie injectable.

¹² EFSA, 2012. Update on acrylamide levels in food from monitoring years 2007 to 2010. EFSA journal, 10 (10), 2938.

De plus, l'imprégnation allergique, étape très importante dans le développement, se produit entre les âges de 6 mois à un an. Les nourrissons et les enfants en bas âge sont des populations particulièrement sensibles à l'allergie alimentaire.

Bien que les voies d'exposition à la protéine soient différentes (voie alimentaire dans cette demande et voie injectable pour *Erwinia chrysanthemi*), en raison d'une plus grande sensibilité à l'allergie alimentaire des populations cibles par rapport à la population générale, une recherche de l'asparaginase sous formes native ou partiellement dénaturée dans les denrées traitées a été demandée par l'Anses. Des IgG polyclonales de lapin ont été produits contre l'asparaginase, objet de la demande pour réaliser un dosage ELISA (méthode sandwich) de la protéine dans des céréales infantiles traitées avec cette enzyme. Les quantités négligeables d'asparaginase résiduelle mesurées par ce test permettent d'écarter le risque d'allergénicité potentielle de l'asparaginase pour les populations cibles par voie alimentaire.

3.5 Conclusion du GT

Au vu des résultats fournis et dans les conditions d'emploi présentées par le pétitionnaire, le Groupe de travail (GT) « Biotechnologie » n'a mis en évidence aucun facteur de risque sanitaire pour le consommateur vis-à-vis de l'emploi de cette asparaginase d'*Aspergillus niger* autoclonée (souche ASP-72) pour la production de denrées à base de céréales destinées à des nourrissons et des enfants en bas âge : céréales infantiles, biscottes et biscuits.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

Au vu des résultats fournis et dans les conditions d'emploi présentées par le pétitionnaire, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) n'a mis en évidence aucun facteur de risque sanitaire pour le consommateur vis-à-vis de l'emploi de cette asparaginase d'*Aspergillus niger* autoclonée (souche ASP-72) pour la production de denrées à base de céréales destinées à des nourrissons et des enfants en bas âge : céréales infantiles, biscottes et biscuits. L'Anses rend donc un avis favorable à cette demande.

Marc Mortureux

MOTS-CLES

Enzyme, extension d'autorisation, auxiliaire technologique, asparaginase, *Aspergillus niger*, produits céréaliers, céréales infantiles, biscottes, biscuits, nourrissons, enfants en bas âge, allergie, acrylamide

BIBLIOGRAPHIE

FAO/WHO (2001). FAO/WHO expert consultation on foods derived from biotechnology. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. FAO/WHO, January 2001, Rome
http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/en/ec_jan2001.pdf, last visited on 31/07/2009.