

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 24 octobre 2013

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 : préparation enzymatique contenant une activité
prolyl-oligopeptidase pour une utilisation dans les compléments alimentaires**

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 19 juin 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 demande d'autorisation de mise sur le marché d'un nouvel aliment ou d'un ingrédient alimentaire : préparation enzymatique contenant une activité prolyl-oligopeptidase pour une utilisation dans les compléments alimentaires.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Le nouvel ingrédient (NI) est une préparation enzymatique produite par la souche autoclonée d'*Aspergillus niger* GEP44 contenant une activité enzymatique principale prolyl-oligopeptidase. Une préparation enzymatique semblable est autorisée en tant qu'auxiliaire technologique en brasserie et pour la production d'hydrolysats de protéines par l'arrêté du 27 août 2009 publié au JORF le 16 octobre 2009. Elle a fait l'objet d'un avis de l'Afssa du 26 avril 2005.

La prolyl-oligopeptidase est une enzyme qui clive la liaison peptidique au niveau du groupe carboxyl des résidus proline. Le pétitionnaire souhaite que le NI soit autorisé comme ingrédient dans des compléments alimentaires destinés aux personnes intolérantes au gluten, afin de favoriser la dégradation du gluten, ses protéines étant particulièrement riches en proline.

L'Anses a adopté les conclusions des comités d'experts spécialisés (CES) « Biotechnologie » et « Nutrition humaine » et a émis un avis défavorable sur cette demande le 31 août 2012. Les conclusions des deux CES sont rapportées ci-dessous :

Conclusion du CES « Biotechnologie »

« Au vu des résultats fournis par le pétitionnaire, le CES « Biotechnologie » n'identifie pas de risque au niveau toxicologique du nouvel ingrédient dans les conditions de production présentées. Il rappelle qu'en raison de l'identité de la souche de production, espèce potentiellement productrice de mycotoxines et d'autres métabolites secondaires, il convient de mettre en place une surveillance de ces substances dans la production du NI. Le CES « Biotechnologie » souligne l'importance que l'efficacité de l'enzyme soit démontrée dans les conditions d'emploi envisagées.

Le CES « Biotechnologie » souligne que l'apport maximal de 132 PPU/personne ne s'applique qu'aux adultes et non pas aux enfants dans le cas où ils seraient concernés par l'emploi de ce NI ».

Conclusion du CES « Nutrition humaine »

« Le CES « Nutrition humaine » émet un avis défavorable quant à la mise sur le marché du nouvel ingrédient. Il estime en effet qu'il existe un risque lié à la diminution de l'observance du régime sans gluten chez les patients atteints de maladie cœliaque pouvant conduire, en l'absence de démonstration de l'efficacité du produit, à une augmentation de l'exposition aux peptides immunotoxiques. Le CES souligne qu'un suivi strict d'un régime sans gluten constitue à ce jour le seul traitement de la maladie cœliaque, indispensable pour la prévention des complications liées à la maladie. Le CES s'interroge en outre sur l'action possible de l'enzyme sur les autres enzymes et hormones digestives. »

Le pétitionnaire renouvelle sa demande sur le classement du NI en classe 5.1 définie dans la recommandation 97/618/CE de la Commission européenne regroupant les NI constitués de « micro-organismes génétiquement modifiés (MGM) ou produits à partir de tels micro-organismes » et « le micro-organisme hôte dans lequel est introduite une modification génétique a déjà été utilisé comme aliment ou comme source d'aliment dans la Communauté, dans des conditions de préparation et de consommation comparables » sur la base de l'utilisation de l'enzyme comme auxiliaire technologique depuis quelques années.

L'utilisation d'une enzyme en tant qu'auxiliaire technologique ne lui donne pas un historique de consommation en tant qu'aliment et de plus, l'espèce *Aspergillus niger* ne peut être considérée comme un aliment ou comme une source d'aliment dans la Communauté. L'Anses confirme que la classe 5.2 lui semble plus adéquate pour ce NI : NI constitué de « micro-organismes génétiquement modifiés (MGM) ou produits à partir de tels micro-organismes » et « le micro-organisme hôte dans lequel est introduite une modification génétique n'a jamais été utilisé comme aliment ou comme source d'aliment dans la Communauté, dans des conditions de préparation et de consommation comparables ».

Les informations requises pour les NI de classe 5.2 sont :

- I. Spécification du NI
- II. Effet du procédé de production appliqué au NI
- III. Utilisation antérieure de l'organisme utilisé comme source de NI
- IV. Effet de la modification génétique sur les propriétés de l'organisme hôte
- V. Stabilité génétique de l'OGM utilisé comme source de NI
- VI. Spécificité de l'expression du nouveau matériel génétique
- VII. Transfert de matériel génétique à partir de MGM
- VIII. Aptitude du micro-organisme génétiquement modifié à survivre dans l'intestin humain et à le coloniser

- IX. Consommation/Niveau d'utilisation prévus du NI
- X. Informations d'ordre nutritionnel sur le NI
- XI. Informations d'ordre microbiologique sur le NI
- XII. Informations d'ordre toxicologique sur le NI.

L'ensemble de ces chapitres figure dans l'avis du 31 août 2012 (saisine liée n° 2012-SA-0120). Seuls, les chapitres renseignés par le pétitionnaire dans ce nouveau dossier font l'objet de cet avis de l'Anses : chapitres II, III, VII, IX, X, XI.

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 Groupe de travail (GT) « Biotechnologie » (GT pilote) et le comité d'experts spécialisé (CES) « Nutrition humaine » entre le 20 juin et le 17 octobre 2013 sur la base de rapports initiaux rédigés indépendamment par 6 rapporteurs.

Ce dossier entre dans le cadre du Règlement (CE) n° 258/97 du Parlement européen et du Conseil du 27 janvier 1997 relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients alimentaires. Le dossier de demande d'autorisation d'un nouvel aliment ou nouvel ingrédient alimentaire doit être établi selon la recommandation de la Commission du 29 juillet 1997¹.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT ET DU CES

Cette expertise porte sur une préparation enzymatique contenant une activité principale prolyl-oligopeptidase (NI) et non pas sur les compléments alimentaires contenant ce NI. Les éventuelles interactions entre différents ingrédients qui seraient utilisés pour formuler des compléments alimentaires ne peuvent donc pas être analysées dans le cadre de cette expertise.

II. Effet du procédé de production appliqué au NI

Selon le pétitionnaire, le NI est produit à partir de la souche d'*Aspergillus niger* génétiquement modifiée GEP 44 porteuse du gène *gpaA* d'*Aspergillus niger* G306. Le pétitionnaire présente la généalogie de la souche de production, les constructions génétiques, la transformation, le nombre de copies du transgène intégrées dans le génome.

Le NI est produit sous les bonnes pratiques de production pour l'alimentation humaine. Le pétitionnaire déclare que l'organisme hôte est non pathogène, ne produit aucune toxine connue et possède un historique d'utilisation industrielle sûre. La souche parentale et par conséquent, la souche de production ont une durée de vie limitée en dehors des

¹ Recommandation de la Commission du 29 juillet 1997 (97/618/CE) concernant les aspects scientifiques relatifs à la présentation des informations requises pour étayer des demandes d'autorisation de mise sur le marché de nouveaux aliments et de nouveaux ingrédients alimentaires et l'établissement de rapports d'évaluation initiale au titre du règlement (CE) n° 258/97 du Parlement européen et du Conseil.

conditions optimales du fermenteur. La souche de production ne contient pas de gène de résistance à un antibiotique.

Le NI est produit par fermentation submergée contrôlée de la souche d'*Aspergillus niger* GEP 44. Le procédé de production comprend la fermentation, la purification et la formulation du produit. Tous les ingrédients et auxiliaires technologiques utilisés sont de qualité alimentaire. Aucun conservateur n'est ajouté. Les résultats d'analyse du milieu de fermentation et de l'ultra-filtrat enzymatique présentés ne révèlent aucune des toxines recherchées.

Le NI serait commercialisé sous forme granulée contenant au maximum 30 % de maltodextrine de maïs. Le NI ne contiendrait pas de gluten. Concernant sa stabilité, l'analyse de la forme commerciale de l'enzyme indique une perte de moins de 5 % pour une conservation de 12 mois à une température inférieure à 15 °C.

Dans l'avis du 31 août 2012, le CES « Biotechnologie » soulignait que les modifications génétiques, la généalogie des souches jusqu'à la souche de production GEP44 sont décrites précisément par le pétitionnaire. Toutefois, il aurait été pertinent de vérifier l'intégrité des séquences intégrées par le séquençage moléculaire de la région modifiée. Le CES « Biotechnologie » n'avait pas de remarque sur le procédé de production du NI.

Le pétitionnaire répond que son utilisation d'un système d'intégration multiple dans *Aspergillus niger* de façon standardisée n'ayant pas révélé de délétions de copies de transgènes sur différentes souches produites, le conduit à ne pas réaliser de séquençage de routine pour les nouvelles souches.

Le GT « Biotechnologie » souligne qu'aucun élément nouveau ne permet de vérifier l'intégrité des séquences intégrées dans la souche hôte.

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

Selon le pétitionnaire, *Aspergillus niger* est utilisé depuis de nombreuses années pour la production d'acides organiques et d'enzymes destinées à l'alimentation humaine. La contamination des denrées par *Aspergillus niger* et l'historique d'utilisation industrielle ont confirmé la non-pathogénicité du microorganisme proposé dans les conditions d'utilisation (Schuster *et al.*, 2002). Les études de toxicologie et les analyses réalisées pour les autorisations d'emploi des enzymes alimentaires antérieures n'ont pas mis en évidence la présence de toxines connues.

Le pétitionnaire indique que la souche parentale et la souche intermédiaire d'*Aspergillus niger* ont été utilisées pour plusieurs productions. La souche de production GEP44 a été classée le 23 octobre 2003 par la CGG² dans le groupe I, classe 1, confinement L1 pour la production de la prolyl-oligopeptidase.

La souche de production est éliminée lors des étapes de purification du NI. Des analyses du Centraal bureau voor Schimmelcultures (CBS) (2003) n'ont pas détecté de mycotoxines dans les conditions de la fermentation réalisée pour la production du NI dans le milieu de fermentation et dans l'ultra-filtrat enzymatique. Dans des conditions de culture permettant une expression maximale de métabolites secondaires, la souche de production GEP44 synthétise plusieurs métabolites inconnus et aucune mycotoxine connue usuellement analysée.

*Dans l'avis du 31 août 2012, le CES « Biotechnologie » rappelait que la production de mycotoxines et d'autres métabolites secondaires (nigragilline, nigerazine B, malformines, naphtho-gamma-pyrones, acide oxalique) par une souche d'*Aspergillus niger* est souche*

² Commission de Génie Génétique

dépendante et conditions de fermentation dépendantes (Van Dijck et al., 2003 ; Blumenthal, 2004 ; Olempska-Beer et al., 2006 ; Frisvad et al., 2011). Il attirait l'attention sur une évolution des conditions de production de l'enzyme et sur la nécessité de mise en place d'analyses fréquentes des mycotoxines et autres métabolites secondaires au cours de la production du NI.

Le pétitionnaire apporte des éléments de revue sur la production de mycotoxines par *Aspergillus niger*. Les analyses réalisées sont très complètes mais les bulletins ne permettent pas de savoir si les 30 analyses sont conduites sur un ou plusieurs lots de production et sont sans indication sur la période de temps couverte.

Le GT « Biotechnologie » maintient ses remarques et préconise la mise en place d'une surveillance régulière des mycotoxines et autres métabolites secondaires au cours de la production du NI.

VII. Transfert de matériel génétique à partir de l'OGM

Plusieurs copies du gène *gepA* sont intégrées de façon stable dans le génome de la souche de production GEP44 et ne sont pas sous forme mobilisable. Le pétitionnaire souligne que la souche parentale et la souche de production (le NI produit ne lui conférant pas d'avantage pour sa survie) ont une durée de vie limitée en dehors des conditions optimales du fermenteur.

Dans l'avis du 31 août 2012, le CES « Biotechnologie » note que la description de la purification du NI ne permet pas d'identifier l'étape permettant l'élimination de l'ADN de la souche de production du NI. L'absence de cet ADN dans le NI devrait être documentée.

Le pétitionnaire rappelle que la souche de production est issue d'un autoclonage (gène d'une souche d'*Aspergillus niger* intégré dans une autre souche d'*Aspergillus niger*).

Le GT « Biotechnologie » conclut que l'absence d'ADN de la souche de production n'est pas documentée par les nouveaux arguments présentés.

IX. Consommation/Niveau d'utilisation prévu du NI

Dans le dossier initial, le pétitionnaire indique que le produit est destiné à être utilisé comme ingrédient dans les compléments alimentaires comme aide à la digestion du gluten. Il indique que « ces compléments alimentaires seraient plus particulièrement destinés aux personnes intolérantes au gluten ».

Le pétitionnaire estime que 20 PPU³ du produit sont nécessaires pour digérer 1 g de gluten. Il indique que les personnes suivant un régime sans gluten (RSG) consomment environ entre 50 mg et 2 g de gluten de façon involontaire. Afin de digérer le gluten résiduel, le pétitionnaire estime ainsi qu'une dose de 40 PPU/j du produit est suffisante.

Dans la suite du dossier, il propose une utilisation de 40 PPU/repas, soit 120 PPU/j. Le pétitionnaire indique que cette dose est inférieure à la dose journalière acceptable (DJA) pour l'Homme, qu'il estime à 2,2 PPU/kg poids corporel/jour équivalent à 132 PPU/j chez l'adulte de 60 kg.

Dans l'avis du 31 août 2012, le CES « Nutrition humaine » notait que la population ciblée inclut des populations très variables, allant de personnes atteintes de la maladie cœliaque à des personnes évitant les aliments contenant du gluten sans aucune indication

³ Prolyl peptidase unit : une « PPU » est définie comme la quantité d'enzyme libérant le p-nitroanilide à une vitesse de 1 µmol par minute à partir du substrat synthétique z-gly-Pro-pNA (carbobenzoxy-glycine-p-nitroanilide) à pH 4,6 et à 37°C

médicale. Le pétitionnaire ne traite pas du cas des enfants et ne propose pas d'âge minimal pour l'utilisation du produit. L'apport maximal de 132 PPU/j calculé par le pétitionnaire correspond à une personne adulte et ne peut être retenu pour les enfants.

Dans les éléments de réponse transmis, le pétitionnaire indique que l'enzyme est destinée à être utilisée « dans des compléments alimentaires destinés aux personnes non atteintes de la maladie cœliaque sensibles au gluten ». Pour clarifier ce positionnement, le pétitionnaire propose de recommander aux opérateurs utilisant son ingrédient d'apposer sur l'étiquetage une mention du type : « *Ce complément alimentaire est destiné aux consommateurs non cœliaques sensibles au gluten et n'est pas destiné à remplacer un régime d'éviction du gluten* ».

Le pétitionnaire affirme que les personnes atteintes de la maladie cœliaque et les personnes non atteintes de la maladie cœliaque intolérantes au gluten peuvent être clairement différenciées sur le plan clinique. Notamment les personnes atteintes de la maladie cœliaque sont porteuses des groupes HLA⁴-DQ2 ou HLA – DQ8, produisent des anticorps en réponse au gluten et présentent des lésions de l'intestin grêle. Par opposition, chez les individus « sensibles au gluten non atteints de la maladie cœliaque », des lésions du grêle et la production d'anticorps en réponse au gluten ne sont pas clairement identifiées (Biesiekierski *et al.*, 2011 ; Ludvigsson *et al.*, 2012 ; Verdu *et al.*, 2009 ; Verdu, 2011 ; Sapone *et al.*, 2012 ; Troncone et Jabri, 2011).

Le pétitionnaire indique que l'enzyme n'est pas destinée à être consommée par des enfants de moins de 3 ans et que les documents associés au produit mentionneront et recommanderont d'apposer cette restriction d'emploi. Sur la base de la DSEIO (dose sans effet indésirable observée)⁵ obtenue dans l'étude de toxicité, et en considérant un facteur de sécurité de 100 et un poids corporel de 15 kg, le pétitionnaire propose une dose maximale de consommation de 33 PPU/j chez l'enfant.

Le CES « Nutrition humaine » note que l'existence même d'une « sensibilité au gluten » hors maladie cœliaque est discutée. Une revue récente de la littérature conclut à la réalité de cette pathologie (Lundin et Alaedini, 2012). Dans les cas de suspicion d'une « sensibilité au gluten » (chez les sujets non atteints de la maladie cœliaque), le rôle propre du gluten n'est pas établi, car l'amélioration des symptômes lors du traitement diététique pourrait également provenir de la diminution de la consommation de glucides à courtes chaînes peu absorbés et fermentescibles (oligo-, di-, et monosaccharides fermentescibles et polyols) (Biesiekierski *et al.*, 2013).

Le CES estime ainsi que la révision de la population cible par le pétitionnaire pose le problème de l'identité de cette nouvelle population, qui exclut les sujets atteints de la maladie cœliaque mais inclut des personnes présentant des maladies apparentées (Biesiekierski *et al.*, 2011 ; Sapone *et al.*, 2012 ; Troncone et Jabri, 2011 ; Carroccio *et al.*, 2012).

Le CES « Nutrition humaine » soulève plusieurs remarques relatives à la mention d'étiquetage proposée par le pétitionnaire :

- **Le CES émet des doutes sur l'efficacité d'une telle mention pour prévenir le risque de relâchement du régime sans gluten, prescrit en particulier pour la maladie cœliaque ;**
- **Néanmoins, dans le cas d'une éventuelle autorisation du produit par décision de la Commission, le CES estime que la mention devrait attirer l'attention du consommateur sur le fait que la consommation du produit ne doit pas affecter**

⁴ Antigènes des leucocytes humains

⁵ Ou NOAEL, no observed adverse effect level

l'observance d'un régime sans gluten strict, prescrit en particulier pour la maladie cœliaque.

Le CES « Nutrition humaine » prend acte de l'exclusion des enfants de moins de 3 ans de la population cible et estime qu'un avertissement relatif à cette restriction d'usage devrait également constituer une condition à l'autorisation du produit.

Dans l'avis du 31 août 2012, le CES « Nutrition humaine » relevait par ailleurs que l'utilisation du produit dans un complément alimentaire est discutable dans la mesure où le complément alimentaire ne viendrait pas compléter un régime normal (comme prévu dans la définition réglementaire du complément alimentaire) mais un régime sans gluten ou à faible teneur en gluten.

Dans les éléments de réponse transmis, le pétitionnaire réalise un parallèle avec d'autres enzymes comme les lactases, mises sur le marché depuis de nombreuses années dans des compléments alimentaires ciblant les personnes intolérantes au lactose.

Le CES « Nutrition humaine » note que le régime qui serait complété par le complément alimentaire, s'il est habituel pour la population cible, ne peut pas être considéré comme « normal », s'agissant d'un régime d'éviction des aliments contenant du gluten.

Dans l'avis du 31 août 2012, le CES « Nutrition humaine » notait que ni l'estimation de la dose de gluten résiduel dans l'alimentation consommée par des sujets intolérants au gluten (entre 0,5 et 2 g/j d'après le pétitionnaire), ni la dose d'enzyme nécessaire à la digestion d'une quantité déterminée de gluten (20 PPU d'enzyme pour 1 g de gluten) ne sont étayées par des publications scientifiques référencées. La quantité de gluten résiduel dans l'alimentation retenue pour l'évaluation (2 g) semble élevée pour des régimes d'éviction, dans lesquels l'exposition au gluten devrait être inférieure à 50 mg/j, voire à 10 mg/j, sur la base des lésions histologiques qui peuvent être observées au niveau de la muqueuse intestinale (Collin et al., 2004 ; Catassi et al., 2007 ; Akobeng et Thomas, 2008 ; Troncone et al., 2008). Ainsi, le calcul de la dose journalière préconisée par le pétitionnaire semble davantage fondé sur le non-dépassement de la DJA que sur les propriétés du produit.

Dans les éléments de réponse transmis, le pétitionnaire souligne la grande difficulté à suivre un régime sans gluten strict. Il rapporte des données publiées estimant l'exposition au gluten chez des adultes et adolescents cœliaques suivant un régime d'éviction, allant de 17 mg à plus de 5 g de gluten par jour (Hopman et al., 2006 et 2008 ; Errichiello et al., 2010), alors que les préconisations visent un apport en dessous de 50 mg/j, voire 10 mg/j (Gibert et al., 2013).

Concernant la dose d'enzyme nécessaire à la digestion du gluten, le pétitionnaire indique que la dose de 20 PPU/g de gluten a été établie sur la base de données expérimentales *in vitro* (qui font l'objet d'un projet de publication), montrant qu'une telle dose était plus efficace que des doses de 2 ou 4 ou 10 PPU/g.

Concernant ce dernier point, le CES « Nutrition humaine » estime que les données *in vitro* présentées sont insuffisantes pour déterminer la dose d'enzyme nécessaire à la digestion efficace d'une quantité précise de gluten dans des conditions d'utilisation de l'enzyme.

En ce qui concerne l'estimation de la dose de gluten résiduel dans l'alimentation, le CES « Nutrition humaine » note que la difficulté d'obtenir un régime sans gluten strict chez des sujets atteints de la maladie cœliaque est effectivement rapportée dans la littérature, notamment chez les adolescents, entraînant souvent des apports supérieurs aux préconisations (Gilbert *et al.*, 2006 ; Errichiello *et al.*, 2010 ; Greco *et al.*, 1997).

Cependant, le CES relève une ambiguïté dans l'argumentation puisque le pétitionnaire repositionne son produit pour des sujets non cœliaques. Dans la population ciblée à présent (c'est-à-dire les sujets non atteints de la maladie cœliaque « sensibles au gluten »), la gamme de consommation de gluten est susceptible d'être très étendue, dépassant les consommations observées au maximum chez des sujets suivant un régime sans gluten atteints de la maladie cœliaque. En effet, chez les sujets non atteints de la maladie cœliaque « sensibles au gluten », les bénéfices du régime sans gluten ne sont pas bien établis, l'accompagnement médical est bien moindre et il n'existe pas de prise en charge pour l'achat de produits sans gluten.

Dans le dossier initial, la dose de 40 PPU/j était proposée pour hydrolyser les 2 g de gluten résiduels dans l'alimentation, alors estimés comme un maximum d'apport. Plus loin dans le dossier, le pétitionnaire proposait ensuite une dose de 40 PPU/repas, soit 120 PPU/j, soulignant que cette dose ne dépassait pas la dose journalière admissible de 132 PPU/j.

Le CES « Nutrition humaine » note ainsi :

- que les données disponibles ne permettent pas de déterminer les doses d'enzyme nécessaires à la digestion efficace de différentes quantités de gluten chez l'Homme dans les conditions d'utilisation de l'enzyme,
- que la quantité de gluten présente dans l'alimentation de la population ciblée n'est pas bien définie,
- que la dose quotidienne d'enzyme préconisée *in fine* par le pétitionnaire pour les consommateurs n'est pas clairement précisée,
- que dans tous les cas, cette dose ne devrait pas dépasser la dose journalière admissible calculée à partir de la DSEIO et d'un facteur d'incertitude de 100, soit 132 PPU/j pour un adulte de 60 kg et 33 PPU/j pour un enfant de 15 kg.

X. Informations d'ordre nutritionnel sur le NI

Dans le dossier initial, le pétitionnaire indique que la valeur nutritionnelle de l'enzyme ne diffère pas de celle des autres protéines ingérées. La consommation préconisée de 40 PPU/repas équivaldrait à environ 916 mg d'enzyme ingérés à chaque repas.

Les résultats de deux études expérimentales réalisées avec l'enzyme *in vitro* (Stepniak *et al.*, 2006 ; Mitea *et al.*, 2008)⁶ sont présentés. Une étude clinique à la dose de 160 PPU/j (ClinicalTrials.gov. 2011) non publiée, est mentionnée.

Dans l'avis du 31 août 2012, le CES « Nutrition humaine » estimait que les données disponibles étaient insuffisantes pour évaluer l'action et le devenir de l'enzyme dans les conditions d'emploi envisagées.

Le CES « Nutrition humaine » s'interrogeait sur l'action possible de l'enzyme sur les autres enzymes et hormones digestives.

Dans les éléments de réponse transmis, le pétitionnaire rappelle que l'objectif de son dossier est de démontrer la sécurité d'emploi du produit, et non pas son efficacité. Il envisage de déposer un dossier de demande d'allégation auprès de l'EFSA. Afin de

⁶ Les données rapportées dans ces deux études ne permettent toutefois pas d'établir la correspondance exacte avec le produit du pétitionnaire.

fournir quelques éléments, il rapporte des données non publiées⁷ issus de deux essais cliniques (NCT00810654 et NCT01335503).

Le pétitionnaire note par ailleurs que des enzymes protéolytiques sont consommées sous forme de compléments alimentaires depuis de nombreuses années notamment aux Etats-Unis. Elles ont une activité protéolytique générale plus élevée que la présente enzyme, car elles ne sont pas spécifiques d'un type d'acide aminé. Aucun effet indésirable n'a été rapporté avec ces enzymes.

Aucun effet indésirable n'a été observé avec la présente enzyme, ni dans l'étude de toxicité chez le rat, ni dans les essais cliniques réalisés.

Le pétitionnaire rappelle que la présente enzyme est active dans l'estomac, à pH bas⁸, et qu'elle résiste à l'action de la pepsine. Le pétitionnaire estime peu probable qu'elle puisse agir de façon notable sur la pepsine, cette dernière étant présente en quantités bien plus élevées. En quittant l'estomac, l'enzyme sera inactivée en raison de l'élévation du pH et dégradée par la trypsine et d'autres enzymes intestinales.

Le CES « Nutrition humaine » prend acte des informations fournies pour répondre aux préoccupations relatives au devenir de l'enzyme et à son action sur d'autres enzymes digestives, qu'il juge recevables. Le CES relève néanmoins que l'étude de toxicité chez le rat et au moins un des deux essais cliniques ont été réalisés dans des conditions expérimentales qui ne correspondent pas aux conditions d'utilisation préconisées (le gluten et l'enzyme étant administrés en dehors des repas).

Dans l'avis du 31 août 2012, les CES « Nutrition humaine » et « Biotechnologie » notaient que le principe de l'hydrolyse enzymatique du gluten afin de diminuer ses propriétés immunotoxiques constitue un domaine de recherche d'actualité qui engendre des pistes intéressantes pour les sujets atteints de maladie cœliaque. Toutefois, dans l'état actuel des connaissances, les CES estimaient que l'efficacité de l'enzyme n'était pas démontrée dans les conditions d'emploi envisagées. Il existe un consensus sur le fait que les propriétés des enzymes doivent être explorées sur des modèles ex vivo ou in vivo, avec les limites inhérentes à ces modèles expérimentaux, et que l'efficacité ne peut être assurée que sur la base de résultats d'études cliniques (Khosla et al., 2005 ; Matysiak-Budnik et al., 2005 ; Stepniak et Koning, 2006).

Le CES « Nutrition humaine » estimait ainsi qu'il existe un risque potentiel lié à la diminution de l'observance du régime sans gluten chez les patients atteints de maladie cœliaque. La consommation du produit pourrait en effet inciter à une augmentation de la consommation d'aliments contenant du gluten chez les patients, et, en l'absence de démonstration de l'efficacité du produit, à une augmentation de l'exposition aux peptides immunotoxiques.

Le CES « Nutrition humaine » soulignait qu'un suivi strict d'un régime sans gluten constitue à ce jour le seul traitement de la maladie cœliaque. Au-delà des manifestations cliniques de type douleurs abdominales, diarrhée ou inconfort intestinal – qui ne sont pas nécessairement observées dans les formes atypiques de la maladie cœliaque – la non-observance du régime est à l'origine de déficiences nutritionnelles, notamment en fer, calcium et en certaines vitamines, résultant d'une malabsorption intestinale (Vilppula et

⁷ Le pétitionnaire indique que ces données n'ont pas fait l'objet de publication car seules les données non publiées peuvent être considérées comme confidentielles dans les dossiers de demande d'allégations.

⁸ Pour rappel, l'activité de l'enzyme est maximale pour un pH compris entre 4 et 5.

al., 2011). Elle est également associée à une augmentation du risque de survenue de nombreuses complications (Malamut et Cellier, 2010 ; Cosnes et Nion-Larmurier, 2011)⁹, notamment à une déminéralisation osseuse pouvant conduire à une ostéopénie ou à une ostéoporose (McFarlane et al., 1996 ; Valdimarsson et al., 1996 ; Bai et al., 1997 ; Mora et al., 2001), et pourrait être associée à une augmentation du risque de maladies auto-immunes (Ventura et al., 1999 ; Cosnes et al., 2008), de troubles de la fertilité (Bast et al., 2009 ; Freeman, 2010)¹⁰, et de complications malignes, en particulier de lymphome (Holmes et al., 1989 ; Askling et al., 2002).

Par ailleurs, le CES « Nutrition humaine » notait que le produit est susceptible d'être consommé par des personnes qui ne présentent pas de troubles associés à la consommation de gluten mais qui choisissent de suivre un régime pauvre en gluten, sans indication médicale, parce qu'elles perçoivent le gluten comme nocif. Pour ces personnes, le bénéfice attendu du produit serait donc nul, alors que le risque d'effet indésirable ne peut pas être entièrement écarté, en raison notamment des incertitudes sur l'action possible de l'enzyme sur les autres enzymes et hormones digestives.

Dans les éléments de réponse transmis, le pétitionnaire rappelle que l'enzyme est destinée aux « personnes non cœliaques sensibles au gluten », et qu'elle n'est pas destinée à augmenter la quantité de gluten consommé. Elle est destinée à détruire le gluten consommé de façon involontaire dans le cadre d'un régime d'éviction. Le pétitionnaire estime que les sujets « non cœliaques sensibles au gluten » souffrent de troubles gastro-intestinaux causés par le gluten, et qu'ils bénéficieront ainsi de la consommation de l'enzyme.

Le CES « Nutrition humaine » renvoie aux remarques formulées précédemment concernant le repositionnement de la population cible.

Bien que l'objet de la présente évaluation ne porte pas sur l'efficacité de l'enzyme, dans le cas très particulier du présent dossier, le CES « Nutrition humaine » souligne que la sécurité d'emploi du produit est liée à son efficacité, qui n'est pas démontrée dans le dossier du pétitionnaire. En effet, l'utilisation du produit pourrait inciter à un relâchement de l'observance du régime sans gluten et entraîner une augmentation de la consommation de gluten ; en cas d'inefficacité ou d'efficacité insuffisante de l'enzyme, il existerait alors un risque d'augmentation de l'exposition aux peptides immunotoxiques.

Le GT « Biotechnologie » demande que le pétitionnaire spécifie l'identité de l'enzyme. Son activité revendiquée sur le gluten et les 2 études expérimentales *in vitro* (Stepniak et al., 2006 ; Mitea et al., 2008) citées dans le dossier laissent supposer que l'enzyme est une carboxypeptidase lysosomale Pro-X (E.C. 3.4.16.2) de la famille des peptidases S28 et non pas une prolyl oligopeptidase (E.C. 3.4.21.26) comme indiquée par le pétitionnaire. Cette enzyme semble être proche de celle décrite par Edens et al. (2005) qui la nomme prolyl endoprotéase, enzyme susceptible d'accepter des substrats avec une chaîne de plus de 30 acides aminés.

Le GT « Biotechnologie » estime que l'efficacité de l'enzyme n'est pas démontrée dans les conditions d'emploi envisagées.

⁹ pour revue

¹⁰ pour revue

XI. Informations d'ordre microbiologique sur le NI

Le pétitionnaire indique que le NI respecte les limites de contamination microbiologique appliquées aux enzymes¹¹ utilisées comme auxiliaires technologiques¹² ou additifs¹³.

Dans l'avis du 31 août 2012, en raison de la production du NI par une souche d'Aspergillus niger et du niveau de consommation de NI recommandé par le pétitionnaire, le CES « Biotechnologie » préconisait la mise en place de surveillance régulière des mycotoxines et autres métabolites secondaires au cours de la production du NI.

Les réponses du pétitionnaire et du GT « Biotechnologie » sur ce point figure en chapitre III.

Conclusion du GT « Biotechnologie »

Au vu des résultats fournis par le pétitionnaire, le GT « Biotechnologie » n'identifie pas de risque au niveau toxicologique du nouvel ingrédient dans les conditions de production présentées. Il rappelle qu'en raison de l'identité de la souche de production, espèce potentiellement productrice de mycotoxines et d'autres métabolites secondaires, il convient de mettre en place une surveillance de ces substances dans la production du NI.

Le GT « Biotechnologie » demande que l'identité de l'enzyme soit spécifiée et souligne l'importance que l'efficacité de l'enzyme soit démontrée dans les conditions d'emploi envisagées.

Conclusion du CES « Nutrition humaine »

Si le pétitionnaire a répondu de manière claire et détaillée aux commentaires formulés dans l'avis du 31 août 2012, modifiant la population cible (qui ne concerne plus des sujets atteints de la maladie cœliaque mais les individus « sensibles au gluten » non atteints de la maladie cœliaque), il subsiste un certain nombre de problèmes :

- **L'existence même d'une « sensibilité au gluten » hors maladie cœliaque est discutée et ne repose pas sur des critères précis et admis par l'ensemble de la communauté médicale,**
- **Le CES émet des doutes sur l'efficacité d'une mention d'étiquetage pour prévenir le risque de relâchement du régime sans gluten, prescrit en particulier pour la maladie cœliaque,**
- **Néanmoins, dans le cas d'une éventuelle autorisation du produit par décision de la Commission, le CES estime qu'une mention devrait attirer l'attention du consommateur sur le fait que la consommation du produit ne doit pas affecter l'observance d'un régime sans gluten strict, prescrit en particulier pour la maladie cœliaque ; l'apposition d'une telle mention ainsi que l'apposition d'une mention indiquant que le produit n'est pas destiné aux enfants de moins de 3 ans devraient constituer des conditions d'autorisation du produit,**
- **La dose quotidienne d'enzyme préconisée *in fine* par le pétitionnaire n'est pas clairement précisée et les justifications à l'appui sont insuffisantes.**

¹¹ General enzyme specifications of the food chemical codex (FCC, 7th ed, 2010-2011)

¹² Arrêté du 19 octobre 2006 modifié relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires

¹³ Joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA) (FAO JECFA Monographs 3, compendium of food additive specifications, 2006).

Dans tous les cas, la dose d'enzyme ne devrait pas dépasser la dose journalière admissible établie à partir des résultats de l'étude de toxicité.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) adopte les conclusions des CES « Biotechnologie » et « Nutrition humaine ».

Sur la base du dossier fourni, l'Anses n'a pas mis en évidence de toxicité propre au produit sous réserves :

- 1) d'une surveillance régulière des mycotoxines et autres métabolites secondaires dans la production du NI,
- 2) d'une clarification de la dose quotidienne d'enzyme préconisée *in fine* qui, dans tous les cas, ne doit pas dépasser la dose journalière admissible établie à partir de l'étude de toxicité,
- 3) d'une information claire du consommateur sur le fait que la consommation du produit ne doit pas affecter l'observance d'un régime sans gluten strict, prescrit en particulier pour la maladie cœliaque, et que le produit n'est pas destiné aux enfants de moins de 3 ans.

Par ailleurs, l'Anses souhaite attirer l'attention :

- sur les effets sanitaires indirects que pourrait occasionner l'usage des produits utilisant cette enzyme, s'il s'accompagne d'un relâchement de l'observance du régime sans gluten strict prescrit sur avis médical ; des enquêtes s'intéressant aux pratiques des consommateurs des compléments alimentaires contenant l'enzyme permettraient de documenter plus précisément ces possibles effets sanitaires indirects,
- sur la difficulté à définir avec précision la nouvelle population cible, compte tenu de l'absence de consensus de la communauté médicale sur l'existence même de la « sensibilité au gluten » hors maladie cœliaque, en l'état actuel des connaissances.

L'Agence souligne enfin que des évaluations concomitantes de la sécurité et de l'efficacité des nouveaux aliments et ingrédients permettraient d'optimiser les expertises des dossiers soumis.

Le directeur général

Marc Mortureux

MOTS-CLES

Novel food, prolyl oligopeptidase, prolyl endopeptidase, protéase, *Aspergillus niger*, maladie coéliquaue, gluten.

BIBLIOGRAPHIE

- Akobeng AK and Thomas AG (2008). Systematic review: tolerable amount of gluten for people with coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther* 27: 1044-52.
- Askling J, Linet M, Gridley G, Halstensen TS, Ekstrom K and Ekbohm A (2002). Cancer incidence in a population-based cohort of individuals hospitalized with celiac disease or dermatitis herpetiformis. *Gastroenterology* 123: 1428-35.
- Bai JC, Gonzalez D, Mautalen C, Mazure R, Pedreira S, Vazquez H, Smecuol E, Siccardi A, Cataldi M, Niveloni S, Boerr LA and Maurino E (1997). Long-term effect of gluten restriction on bone mineral density of patients with coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther* 11: 157-64.
- Bast A, O'Bryan T and Bast E (2009). Celiac disease: a comprehensive review and update, series # 5 - Celiac disease and reproductive health. *Pract Gastroenterol* 13: 10-21.
- Biesiekierski JR, Newnham ED, Irving PM, Barrett JS, Haines M, Doecke JD, Shepherd SJ, Muir JG, Gibson PR (2011). Gluten causes gastrointestinal symptoms in subjects without celiac disease: a double-blind randomized placebo-controlled trial. *Am J Gastroenterol*. 106:508-14
- Biesiekierski JR, Peters SL, Newnham ED, Rosella O, Muir JG, Gibson PR (2013). No effects of gluten in patients with self-reported non-celiac gluten sensitivity after dietary reduction of fermentable, poorly absorbed, short-chain carbohydrates. *Gastroenterology*. 145:320-8
- Blumenthal CZ (2004). Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Regul Toxicol and Pharmacol* 39: 214-228.
- Carroccio A, Mansueto P, Iacono G, Soresi M, D'Alcamo A, Cavataio F, Brusca I, Florena AM, Ambrosiano G, Seidita A, Pirrone G, Rini GB (2012). Non-celiac wheat sensitivity diagnosed by double-blind placebo-controlled challenge: exploring a new clinical entity. *Am J Gastroenterol*. 107:1898-906
- Catassi C, Fabiani E, Iacono G, D'Agate C, Francavilla R, Biagi F, Volta U, Accomando S, Picarelli A, De Vitis I, Pianelli G, Gesuita R, Carle F, Mandolesi A, Bearzi I, Fasano A (2007). A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *Am J Clin Nutr*. 85:160-6
- ClinicalTrials.gov. (2011). Registered study NCT00810654 : Effect of *Aspergillus niger* prolyl endoprotease (AN-PEP) enzyme on the effects of gluten ingestion in patients with coeliac disease. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00810654>
- Collin P, Thorell L, Kaukinen K, Mäki M (2004). The safe threshold for gluten contamination in gluten-free products. Can trace amounts be accepted in the treatment of coeliac disease? *Aliment Pharmacol Ther*. 19:1277-83. Review
- Cosnes J, Cellier C, Viola S, Colombel JF, Michaud L, Sarles J, Hugot JP, Ginies JL, Dabadie A, Mouterde O, Allez M and Nion-Larmurier I (2008). Incidence of autoimmune diseases in celiac disease: protective effect of the gluten-free diet. *Clin Gastroenterol Hepatol* 6: 753-8.
- Cosnes J and Nion-Larmurier I (2011). [Complications of celiac disease]. *Pathol Biol (Paris)*. May 26. [Epub ahead of print]
- Edens L, Dekker P, Van der Hoeven R, Deen F, De Roos A and Floris R (2005). Extracellular prolyl endoprotease from *Aspergillus niger* and its use in the debittering of protein hydrolysates. *J Agric Food Chem*. 53: 7950-7957.

- Errichiello S, Esposito O, Di Mase R, Camarca ME, Natale C, Limongelli MG, Marano C, Coruzzo A, Lombardo M, Strisciuglio P, Greco L (2010). Celiac disease: predictors of compliance with a gluten-free diet in adolescents and young adults. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 50:54-60
- Freeman HJ (2010). Reproductive changes associated with celiac disease. *World J Gastroenterol* 16: 5810-4.
- Frisvad J.C., Larsen T.O, Thrane U, Meijer M, Varga J, Samson R.A and Nielsen K.F. (2011) Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. *PLoS One* 6(8):e23496.doi:10.1371/journal.pone.0023496.
- Gibert A, Espadaler M, Angel Canela M, Sánchez A, Vaqué C, Rafecas M (2006). Consumption of gluten-free products: should the threshold value for trace amounts of gluten be at 20, 100 or 200 p.p.m.? *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 18:1187-95
- Gibert A, Kruizinga AG, Neuhold S, Houben GF, Canela MA, Fasano A, Catassi C (2013). Might gluten traces in wheat substitutes pose a risk in patients with celiac disease? A population-based probabilistic approach to risk estimation. *Am J Clin Nutr.* 97:109-16. Erratum in: *Am J Clin Nutr.* 98:511
- Greco L, Mayer M, Ciccarelli G, Troncone R, Auricchio S (1997). Compliance to a gluten-free diet in adolescents, or "what do 300 coeliac adolescents eat every day?". *Ital J Gastroenterol hepatol.* 29:305-10
- Holmes GK, Prior P, Lane MR, Pope D and Allan RN (1989). Malignancy in coeliac disease--effect of a gluten free diet. *Gut* 30: 333-8.
- Hopman EG, le Cessie S, von Blomberg BM, Mearin ML (2006). Nutritional management of the gluten-free diet in young people with celiac disease in The Netherlands. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 43:102-8
- Hopman EG, von Blomberg ME, Batstra MR, Morreau H, Dekker FW, Koning F, Lamers CB, Mearin ML (2008). Gluten tolerance in adult patients with celiac disease 20 years after diagnosis? *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 20:423-9
- Khosla C, Gray GM and Sollid LM (2005). Putative efficacy and dosage of prolyl endopeptidase for digesting and detoxifying gliadin peptides. *Gastroenterology* 129: 1362-3; author reply 1363.
- Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PH, Hadjivassiliou M, Kaukinen K, Kelly CP, Leonard JN, Lundin KE, Murray JA, Sanders DS, Walker MM, Zingone F, Ciacci C (2013). The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut.* 62:43-52
- Lundin KE, Alaedini A (2012). Non-celiac gluten sensitivity. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 22:723-34. Review.
- Malamut G and Cellier C (2010). Maladie cœliaque de l'adulte. *Rev Fr Allergol* 50: 254-9.
- Matysiak-Budnik T, Candalh C, Cellier C, Dugave C, Namane A, Vidal-Martinez T, Cerf-Bensussan N and Heyman M (2005). Limited efficiency of prolyl-endopeptidase in the detoxification of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology* 129: 786-96.
- McFarlane XA, Bhalla AK and Robertson DA (1996). Effect of a gluten free diet on osteopenia in adults with newly diagnosed coeliac disease. *Gut* 39: 180-4.
- Mitea C, Havenaar R, Drijfhout JW, Edens L, Dekking L and Koning F (2008). Efficient degradation of gluten by a prolyl endoprotease in a gastrointestinal model: implications for coeliac disease. *Gut* 57: 25-32.
- Mora S, Barera G, Beccio S, Menni L, Proverbio MC, Bianchi C and Chiumello G (2001). A prospective, longitudinal study of the long-term effect of treatment on bone density in children with celiac disease. *J Pediatr* 139: 516-21.
- Olempska-Beer Z.S, Merker R.I, Ditto M.D and DiNovi M.J. (2006) Food-processing enzymes from recombinant microorganisms- a review. *Regul Toxicol and Pharmacol* 45: 144-158.
- Sapone A, Bai JC, Ciacci C, Dolinsek J, Green PH, Hadjivassiliou M, Kaukinen K, Rostami K, Sanders DS, Schumann M, Ullrich R, Villalta D, Volta U, Catassi C, Fasano A (2012). Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med.* 10:13. Review
- Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad J. C and van Dijk P. W. M (2002) On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:426–435.
- Stepniak D and Koning F (2006). Enzymatic gluten detoxification: the proof of the pudding is in the eating! *Trends Biotechnol* 24: 433-4.
- Stepniak D, Spaenij-Dekking L, Mitea C, Moester M, de Ru A, Baak-Pablo R, van Veelen P, Edens L and Koning F (2006). Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291: G621-9.

- Troncone R, Auricchio R, Granata V (2008). Issues related to gluten-free diet in coeliac disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 11:329-33. Review
- Troncone R, Jabri B (2011). Coeliac disease and gluten sensitivity. *J Intern Med*. 269:582-90. Review
- Valdimarsson T, Lofman O, Toss G and Strom M (1996). Reversal of osteopenia with diet in adult coeliac disease. *Gut* 38: 322-7.
- Van Dijck PWM, Selten GCM and Hempenius RA (2003). On the safety of a new generation of DSM *Aspergillus niger* enzyme production strains. *Regul Toxicol and Pharmacol* 38: 27-35.
- Ventura A, Magazzu G and Greco L (1999). Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. SIGEP Study Group for Autoimmune Disorders in Celiac Disease. *Gastroenterology* 117: 297-303.
- Verdu EF, Armstrong D, Murray JA (2009). Between celiac disease and irritable bowel syndrome: the "no man's land" of gluten sensitivity. *Am J Gastroenterol*. 104:1587-94. Review
- Verdu EF (2011). Editorial: Can gluten contribute to irritable bowel syndrome? *Am J Gastroenterol*. 106:516-8
- Vilppula A, Kaukinen K, Luostarinen L, Krekelä I, Patrikainen H, Valve R, Luostarinen M, Laurila K, Mäki M and Collin P (2011). Clinical benefit of gluten-free diet in screen-detected older celiac disease patients. *BMC Gastroenterol* 11: 136.