

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 23 juin 2017

AVIS

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

**relatif à une demande d'autorisation d'emploi d'une phospholipase A2
issue d'une souche génétiquement modifiée de *Trichoderma reesei*
porteuse d'un gène codant une phospholipase A2 d'*Aspergillus nishimuræ*
pour le traitement des huiles végétales (dégommage)**

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 à 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 publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 18 décembre 2015 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 d'emploi d'une phospholipase A2 issue d'une souche génétiquement modifiée de *Trichoderma reesei* porteuse d'un gène codant une phospholipase A2 d'*Aspergillus nishimuræ* pour le traitement des huiles végétales (dégommage).

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Ce dossier entre dans le cadre du décret du 10 mai 2011¹ 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 2011², le dossier doit être établi selon le guide³ de l'European Food Safety Authority (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) ».

¹ Décret n° 2011-509 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.

² 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.

³ 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.

Après consultation du Groupe de travail (GT) « Biotechnologie », réuni les 17 mars 2016 et le 16 mars 2017, l'Anses a effectué deux demandes de compléments d'information auprès de la DGCCRF, les 30 mars 2016 et le 20 mars 2017. Elles ont fait l'objet de réponses les 11 avril 2016 ; 27 décembre 2016 et le 20 février 2017 pour la première demande et le 13 juin 2017 pour la seconde demande.

L'expertise collective a été menée par le GT « Biotechnologie » le 17 mars 2016 et les 16 février, 16 mars et 15 juin 2017, sur la base de rapports initiaux rédigés par sept rapporteurs.

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.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT

3.1 Identité de l'enzyme alimentaire⁴

L'enzyme alimentaire est une phospholipase A2 (E.C. 3.1.1.4) qui catalyse l'hydrolyse des liaisons ester en position 2 des phospholipides en libérant des acides gras libres et des lysophospholipides.

Une unité d'activité de la phospholipase A2 (PLU) est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour produire 1 μ mole d'acides gras par minute à partir de phosphatidylcholine de soja, à 40 °C et pH 3,4.

La phospholipase A2 se présente sous forme de poudre et sous forme liquide avec différentes concentrations selon les utilisations. Les additifs indiqués pour la formulation sont autorisés selon le Règlement (CE) n° 1333/2008⁵. Les caractéristiques de l'enzyme alimentaire sont décrites et sa stabilité est documentée.

Le pétitionnaire présente les méthodes d'analyse utilisées pour la recherche des activités enzymatiques secondaires ainsi que les résultats obtenus. Une faible activité cellulase est présente ainsi que des activités enzymatiques négligeables de type xylanase et bêta-glucosidase.

Les critères de pureté chimique et biologique de l'enzyme alimentaire répondent aux exigences de l'arrêté du 19 octobre 2006 modifié⁶. Les recherches des formes mycéliennes et sporulées de la souche de production de l'enzyme alimentaire, d'ADN exogène et d'une activité antibactérienne sont négatives dans l'enzyme alimentaire.

Des mycotoxines ont été dosées et identifiées en-dessous du seuil de quantification des différentes méthodes analytiques. Le pétitionnaire argumente sur le fait que les conditions de fermentation utilisées pour produire l'enzyme ne sont pas suffisamment stressantes pour conduire à la production de peptaibols (métabolites secondaires) et ne les recherche donc pas dans l'enzyme alimentaire.

⁴ Définition dans le Règlement (CE) n° 1332/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 : produit obtenu à partir de plantes, d'animaux ou de micro-organismes ou de produits dérivés, y compris un produit obtenu par un procédé de fermentation à l'aide de micro-organismes qui contient une ou plusieurs enzymes capables de catalyser une réaction biochimique spécifique et qui est ajouté à des denrées alimentaires à des fins technologiques à toute étape de leur fabrication, transformation, préparation, traitement, conditionnement, transport ou entreposage.

⁵ Règlement (CE) n° 1333/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 sur les additifs alimentaires.

⁶ Arrêté du 19 octobre 2006 modifié relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires.

3.2 Organisme de production et procédé de fabrication

3.2.1 Organisme de production

Sécurité du micro-organisme hôte

La souche hôte de *Trichoderma reesei* est issue de la souche QM6a par mutagénèses classiques et transformation génétique. *Trichoderma reesei*, organisme considéré non-pathogène, a un historique d'utilisation pour la production d'enzymes. *Trichoderma reesei* est une espèce potentiellement productrice de mycotoxines et d'autres métabolites secondaires toxiques (peptaibols).

Identité des micro-organismes donneurs

La séquence codante de la phospholipase A2 a été isolée d'une souche d'*Aspergillus nishimurae*, classée initialement comme *Aspergillus fumigatus*. La séquence codant une protéine permettant la sélection de transformants auxotrophes a été synthétisée et optimisée à partir de la séquence codante d'un gène d'*Aspergillus nidulans*.

Obtention de la souche de production

Les transgènes sont intégrés dans le génome fongique. Des informations sont présentées sur différentes étapes de la généalogie et de la transformation de la souche de production. La sélection de la souche transformée se fait sur la base d'une auxotrophie.

Le pétitionnaire présente des données issues du séquençage de la souche de production. Elles permettent d'identifier la région d'insertion de l'ADN transgénique dans le génome de la souche hôte. La localisation de ce site unique d'insertion contenant de multiples copies de la cassette a été fournie. Des analyses bioinformatiques pertinentes conduites sur les données de séquençage obtenues permettent d'estimer le nombre de copies du transgène et d'écarter au niveau de la zone d'intégration multiple, la présence potentielle d'ADN différent de celui issu de la cassette d'expression du transgène. Les informations fournies ne conduisent pas à suspecter un effet de la transformation génétique sur la production de métabolites secondaires toxiques par la souche de production.

La souche de production de l'enzyme alimentaire est la souche de *Trichoderma reesei* génétiquement modifiée RF8793. Son certificat de dépôt dans une collection de souches de micro-organismes est fourni et la stabilité de cette souche est documentée par le pétitionnaire.

3.2.2 Procédé de fabrication

Le procédé de production de l'enzyme alimentaire est un procédé de fermentation submergée aérobie, suivie d'étapes de séparation du micro-organisme, de filtrations et de formulation de l'enzyme. Les additifs et auxiliaires technologiques utilisés sont indiqués de qualité alimentaire.

L'enzyme alimentaire est produite selon les Bonnes Pratiques de Fabrication pour l'alimentation humaine (cGMP) et les principes de l'HACCP. La production de l'enzyme répond aux normes ISO 9001:2008, ISO 14001:2004 et FSSC ISO 22000:2005.

Compte tenu de l'organisme de production, espèce potentiellement productrice de mycotoxines et d'autres métabolites secondaires toxiques, il convient de mettre en place une surveillance de ces substances dans la production de l'enzyme alimentaire en actualisant les contrôles en fonction de la disponibilité des standards.

3.3 Réaction et devenir dans les denrées alimentaires

Les produits de réaction de la phospholipase A2 sont des acides gras et des lysophospholipides. Dans les conditions recommandées par le pétitionnaire, la phospholipase A2 et les activités enzymatiques secondaires sont inactivées de façon irréversible par des étapes de chauffage intervenant dans le traitement des huiles végétales.

3.4 Utilité technologique et conditions d'utilisation proposées

L'enzyme alimentaire serait un auxiliaire technologique destiné au traitement des huiles végétales (dégommage).

3.5 Exposition alimentaire

La marge de sécurité est calculée selon la méthode du Budget⁷ pour la population générale. Les niveaux de consommation alimentaire utilisés sont basés sur la consommation physiologique maximale, c'est-à-dire une consommation quotidienne hors boissons (sauf pour le lait) de 50 g de denrées alimentaires/kg de poids corporel. L'exposition alimentaire est calculée en considérant que 12,5 % des denrées alimentaires consommées quotidiennement par la population générale sont traitées par l'enzyme à la dose maximale recommandée pour les usages revendiqués avec une activité enzymatique conservée intégralement dans les denrées. Le pétitionnaire indique que les produits traités par l'enzyme seront des ingrédients entrant dans la composition de denrées complexes.

Le rapport de la dose sans effet néfaste observé (NOAEL⁸), établie par l'étude de toxicité subchronique pendant 90 jours chez le Rat (1000 mg TOS⁹/kg de poids corporel/jour) avec la consommation maximale de l'enzyme *via* les denrées alimentaires permet de calculer une marge de sécurité de 320 000.

3.6 Données toxicologiques

Toutes les études de toxicité ont été réalisées selon les lignes directrices internationales de l'OCDE¹⁰ et en conformité avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

L'étude de toxicité subchronique par administration orale réitérée pendant 90 jours chez le Rat conclut à une NOAEL de 1000 mg TOS/kg poids corporel/jour, correspondant à la dose la plus forte testée.

L'étude de mutagenicité *in vitro* (test d'Ames sur cinq souches de *Salmonella* Typhimurium histidine dépendante) n'a pas révélé d'augmentation du nombre de révertants en présence de l'enzyme alimentaire jusqu'à 5000 µg TOS/boîte et donc pas d'effet mutagène. Le test d'aberrations chromosomiques sur des fibroblastes pulmonaires de hamster chinois, *in vitro*, n'a pas mis en évidence d'effet clastogène ou aneugène de l'enzyme alimentaire à la dose de 5000 µg TOS/ml en absence ou en présence de système d'activation métabolique S9. Ces deux tests indiquent que l'enzyme alimentaire n'est pas génotoxique dans ces conditions.

⁷ FAO/WHO (2009). Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food: Chapter 6. Dietary exposure assessment of chemicals in food. Environmental health criteria 240, World Health Organization 2009. http://whqlibdoc.who.int/ehc/WHO_EHC_240_9_eng_chapter6.pdf

⁸ No Observed Adverse Effect Level

⁹ Les solides organiques totaux (TOS) sont calculés selon la formule TOS = 100 % - humidité - cendres-diluants.

¹⁰ Organisation de Coopération et de Développement Economiques

3.7 Allergénicité

Une recherche bioinformatique n'a pas mis en évidence d'homologies de séquence avec des allergènes connus et donc ne conduit pas à suspecter un potentiel allergique de l'activité enzymatique principale, la phospholipase A2.

3.8 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 pas mis en évidence de risque sanitaire pour le consommateur vis-à-vis de l'emploi de cette phospholipase A2 issue d'une souche génétiquement modifiée de *Trichoderma reesei* (souche RF8793) porteuse d'un gène codant une phospholipase A2 d'*Aspergillus nishimurae* pour le traitement des huiles végétales (dégommage).

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 pas mis en évidence de risque sanitaire pour le consommateur vis-à-vis de l'emploi de cette phospholipase A2 issue d'une souche génétiquement modifiée de *Trichoderma reesei* (souche RF8793) porteuse d'un gène codant une phospholipase A2 d'*Aspergillus nishimurae* pour le traitement des huiles végétales (dégommage). L'Anses rend donc un avis favorable à cette demande.

Dr Roger Genet

MOTS-CLES

Enzyme, auxiliaire technologique, phospholipase, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus nishimurae*, huiles végétales, dégommage

Enzyme, processing aid, phospholipase, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus nishimurae*, vegetable oils, degumming