

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 23 mars 2017

Extrait de l'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 endo-1,4-bêta-glucanase issue d'une souche génétiquement modifiée de *Trichoderma reesei* porteuse d'un gène codant une endo-1,4-bêta-glucanase de *Trichoderma reesei* pour la brasserie, la production d'alcool potable, l'amidonnerie et le traitement de grains de céréales destinés à la production de farine panifiable (à l'exception du pain de tradition française)

Le présent document est un extrait de l'avis du 23 mars 2017 après suppression des parties confidentielles qui relèvent du secret industriel ou commercial, non publiables.

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 27 novembre 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 endo-1,4-bêta-glucanase issue d'une souche génétiquement modifiée de *Trichoderma reesei* porteuse d'un gène codant une endo-1,4-bêta-glucanase de *Trichoderma reesei* pour la brasserie, la production d'alcool potable, l'amidonnerie et le traitement de grains de céréales destinés à la production de farine panifiable (à l'exception du pain de tradition française).

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, il doit être établi selon le guide³ de l'European Food Safety Authority (EFSA) pour la soumission d'un dossier sur les enzymes alimentaires.

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

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) ».

Après consultation du Groupe de travail (GT) « Biotechnologie », réuni le 18 février 2016, l'Anses a effectué une demande de compléments d'information auprès de la DGCCRF, le 26 février 2016. Le 8 août 2016 et le 14 février 2017, l'Anses a reçu des éléments de réponse permettant de poursuivre l'expertise.

L'expertise collective a été menée par le Groupe de travail (GT) « Biotechnologie » le 18 février 2016, le 19 octobre 2016 et le 16 mars 2017 sur la base de rapports initiaux de huit 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 endo-1,4-bêta glucanase (ou cellulase, E.C. 3.2.1.4). L'enzyme hydrolyse les liaisons endo-(1,4) bêta D glucosidiques des bêta-D-glucanes.

Une unité d'activité de la bêta-glucanase (BU) est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour produire 1 nmole de sucres réducteurs équivalents glucose à partir de bêta-glucane d'orge en 1 seconde, à 50 °C et pH 4,8.

Les caractéristiques de l'enzyme alimentaire sont décrites. La glucanase se présente sous forme de poudre et sous forme liquide avec différentes concentrations selon les utilisations.

Le pétitionnaire présente les méthodes d'analyse utilisées pour la recherche des activités enzymatiques secondaires ainsi que les résultats obtenus. Des activités xylanase et bêta-glucosidase sont présentes en quantité limitée.

Les critères de pureté chimique et biologique de l'enzyme alimentaire répondent aux exigences de l'arrêté du 19 octobre 2006 modifié⁵. 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 les conditions de fermentation pouvant conduire à la production de peptaibols (métabolites secondaires) mais ne les recherche pas dans l'enzyme alimentaire.

⁴ Définition dans le Règlement (CE) 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 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. *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 de transgènes

La séquence génétique codant l'endo-1,4-bêta-glucanase a été isolée d'une autre souche de *Trichoderma reesei*. La séquence codant une protéine permettant la sélection de transformants auxotrophes a été isolée 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 de production se fait sur une auxotrophie et sur une résistance aux antibiotiques.

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 complémentaires sur les données de séquençage obtenues auraient été utiles pour préciser l'organisation de la zone d'insertion du transgène et le nombre exact de copies. Cependant, 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 stabilité de la souche de production est démontrée par le pétitionnaire. La souche de production de la préparation enzymatique est la souche de *Trichoderma reesei* génétiquement modifiée RF 5261.

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 concentrations, de filtrations et de formulation de l'enzyme. Les additifs et auxiliaires technologiques utilisés dans cette production sont de qualité alimentaire.

L'enzyme alimentaire est produite selon les Bonnes Pratiques de Fabrication pour l'alimentation humaine (cGMP) sur une analyse HACCP⁶. L'usine de production est certifiée aux normes ISO 9001 : 2008 et ISO 22000 : 2005. Les matières premières utilisées sont de qualité alimentaire. 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 l'endo-1,4-bêta-glucanase sont des oligomères de glucose.

Dans les conditions recommandées par le pétitionnaire, l'endo-1,4-bêta-glucanase et les activités enzymatiques secondaires sont inactivées de façon irréversible par des étapes de chauffage

⁶ Hazard Analysis and Critical Control Points

présentes en amidonnerie, en brasserie et lors de la production d'alcool potable ainsi qu'au cours de la cuisson du pain fabriqué à partir des farines issues de grains traités.

3.4 Utilité technologique et conditions d'utilisation proposées

L'enzyme alimentaire serait un auxiliaire technologique destiné à la brasserie, la production d'alcool potable, l'amidonnerie et le traitement de grains de céréales destinés à la production de farine panifiable (à l'exception du pain de tradition française).

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 et de 100 ml de boissons/kg de poids corporel. L'exposition alimentaire est calculée en considérant que 25 % des denrées alimentaires et 25 % des boissons 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 et boissons.

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 TOS/kg de poids corporel/jour) divisée par la consommation maximale de l'enzyme *via* l'alimentation permet de calculer une marge de sécurité de 2020.

Les solides organiques totaux (TOS⁹) sont calculés selon la formule TOS = 100 % - humidité - cendres - diluants.

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 mutagénicité *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 d'enzyme/boîte et donc pas d'effet mutagène. Le test d'aberrations chromosomiques sur des cellules V79 de hamster chinois, *in vitro*, n'a pas mis en évidence d'effet clastogène ou aneugène de l'enzyme alimentaire jusqu'à la dose de 5000 µg d'enzyme/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.

3.7 Allergénicité

Une recherche bioinformatique ne met pas 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, l'endo-1,4-bêta-glucanase.

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 Total Organic Solids

¹⁰ Organisation de Coopération et de Développement Economiques

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 endo-1,4-bêta-glucanase issue d'une souche génétiquement modifiée de *Trichoderma reesei* (souche RF 5261) porteuse d'un gène codant une endo-1,4-bêta-glucanase de *Trichoderma reesei* pour la brasserie, la production d'alcool potable, l'amidonnerie et le traitement de grains de céréales destinés à la production de farine panifiable (à l'exception du pain de tradition française).

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 endo-1,4-bêta-glucanase issue d'une souche génétiquement modifiée de *Trichoderma reesei* (souche RF 5261) porteuse d'un gène codant une endo-1,4-bêta-glucanase de *Trichoderma reesei* pour la brasserie, la production d'alcool potable, l'amidonnerie et le traitement de grains de céréales destinés à la production de farine panifiable (à l'exception du pain de tradition française). L'Anses rend donc un avis favorable à cette demande.

MOTS-CLES

Enzyme, auxiliaire technologique, bêta-glucanase, *Trichoderma reesei*, panification, brasserie, alcool potable, amidonnerie

Enzyme, processing aid, beta-glucanase, *Trichoderma reesei*, baking industry, brewing, potable alcohol, starch industry