

Maisons-Alfort, le 6 août 2004

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la demande d'autorisation d'emploi d'une lysophospholipase issue de la souche d'*Aspergillus niger* génétiquement modifiée Lp-1, pour l'hydrolyse des lysophospholipides dans l'industrie de l'alcool et l'amidonnerie

Par courrier reçu le 5 avril 2004, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 26 mars 2004 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) d'une demande d'avis relatif à l'autorisation d'emploi d'une préparation enzymatique de lysophospholipase issue de la souche d'*Aspergillus niger* génétiquement modifiée Lp-1, pour l'hydrolyse des lysophospholipides dans l'industrie de l'alcool et l'amidonnerie, adressée par le bureau C2.

Après consultation du Comité d'experts spécialisé « Biotechnologie », réuni le 17 juin 2004, l'Afssa rend l'avis suivant :

Applications technologiques envisagées – mécanisme d'action

Activité enzymatique principale

Considérant que l'enzyme catalyse l'hydrolyse des lysophospholipides en libérant sélectivement un acide gras et un glycérophosphate par clivage d'une liaison ester ;

Activités enzymatiques secondaires

Considérant que d'une part, une absence d'activité secondaire à des doses significatives est déclarée par le pétitionnaire dans le dossier présenté et que d'autre part, dans la fiche du produit commercialisable, une activité xylanase en quantité suffisante pour être fonctionnelle est notée ;

Applications technologiques

Considérant que la préparation enzymatique est un auxiliaire technologique destiné à l'industrie alimentaire (amidonnerie, alcool) pour améliorer les conditions de filtration lors des procédés de liquéfaction de l'amidon ;

Considérant toutefois qu'aucun avantage de l'utilisation de l'enzyme mutante par rapport à l'enzyme native n'est présenté ;

Considérant qu'aucune cinétique d'activité enzymatique en fonction de la température ne permet d'affirmer l'activité de la lysophospholipase à une température élevée, de 50 à 60 °C (température d'utilisation recommandée par le pétitionnaire) ;

Souche de production

Sécurité du micro-organisme producteur

Considérant qu'*Aspergillus niger* est un micro-organisme reconnu non pathogène et utilisé depuis plusieurs dizaines d'années pour la fabrication de préparations enzymatiques destinées à l'alimentation humaine ;

Obtention de la souche de production

Considérant que la souche de production de la préparation enzymatique est la souche d'*Aspergillus niger* Lp-1 génétiquement modifiée ;

Considérant que la souche de production a été classée dans le Groupe I, classe 1, confinement L1 par la CGG¹ pour la production de lysophospholipase envisagée ;

Considérant que :

- la souche hôte utilisée provient d'une lignée cellulaire sûre et bien caractérisée (souche C-40) ;
- la séquence d'ADN codant l'enzyme est homologue à la séquence native hormis les codons correspondant aux 28 acides aminés C-terminaux ;
- les séquences d'ADN sont intégrées de façon stable dans le génome ;

Procédé de fabrication de la préparation enzymatique

Considérant que la préparation enzymatique est produite selon les Bonnes Pratiques de Fabrication pour l'alimentation et que le système de gestion de la qualité appliqué au processus de production de la préparation enzymatique est conforme aux exigences de la norme ISO 9001 : 2000 ;

Considérant que le procédé de production de la préparation enzymatique est un procédé classique de fermentation immergée, suivie d'étapes de purification, concentration, filtration et standardisation de l'enzyme ;

Considérant que les matières premières et auxiliaires technologiques utilisés sont de qualité alimentaire ;

Préparation enzymatique

Critères de pureté

Considérant que les critères de pureté chimique et biologique répondent aux exigences de l'arrêté du 5 septembre 1989 relatif à l'emploi de préparations enzymatiques dans la fabrication de certaines denrées et boissons destinées à l'alimentation humaine ;

Données de sécurité

Considérant que :

- le test de toxicité orale sub-chronique à 13 semaines chez le rat n'a pas mis en évidence d'effet toxique ;
- les tests d'aberration chromosomique *in vitro* sur cellules de lymphocytes humains n'ont pas mis en évidence d'effet clastogène ;
- la marge de sécurité déterminée est satisfaisante (rapport de la dose sans effet observé établie par l'étude de toxicité à 13 semaines sur l'estimation de la consommation maximale de l'enzyme susceptible de se trouver dans la denrée alimentaire) ;

Considérant toutefois que la variation des données expérimentales obtenues lors des tests de mutagénicité *in vitro* (tests d'Ames sur *Salmonella typhimurium* et *Escherichia coli* auxotrophes) ne permet pas de conclure sur l'absence d'effet mutagène ;

Considérant que l'obtention de ces résultats pourrait laisser supposer différents scénarii tels qu'une activité de l'enzyme conduisant à la libération d'histidine permettant à une souche non révertante de croître ; ou une cytotoxicité de la préparation enzymatique ; ou encore une présence de contaminants toxiques ;

¹ Commission de Génie Génétique

Devenir de la préparation enzymatique dans le produit final

Considérant que les preuves d'inactivation de la préparation enzymatique dans le produit final ne sont pas clairement apportées et qu'elles sont, compte tenu de la nature de l'enzyme potentiellement neurotoxique, essentielles à produire ;

Conclusion :

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments estime que, au vu des éléments manquants et imprécisions du dossier, et notamment en l'absence de :

- précisions quant à la présence d'une activité xylanase dans le produit commercialisable ;
- démonstration des avantages de l'utilisation de l'enzyme mutante par rapport à l'enzyme native ;
- cinétique d'activité enzymatique en fonction de la température permettant d'affirmer l'activité de la lysophospholipase à la température d'utilisation recommandée ;
- garanties apportées par les résultats des tests de mutagénicité réalisés ;
- preuves expérimentales de l'inactivation de la préparation enzymatique dans le produit final,

l'absence de risque sanitaire pour le consommateur lié à l'emploi de cette préparation de lysophospholipase issue de la souche d'*Aspergillus niger* génétiquement modifiée Lp-1, pour l'hydrolyse des lysophospholipides dans l'industrie de l'alcool et l'amidonnerie, ne peut être garantie dans les conditions d'emploi présentées par le pétitionnaire. L'Afssa rend donc un avis défavorable à cette demande.

Martin HIRSCH