

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 23 mars 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 triacylglycérol lipase  
issue d'une souche génétiquement modifiée de *Trichoderma reesei*  
porteuse d'un gène muté codant une triacylglycérol lipase de *Fusarium oxysporum*  
pour la biscuiterie, la viennoiserie, la pâtisserie, la panification (à l'exception du pain  
de tradition française) et la panification spéciale**

---

*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 11 mars 2016 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 triacylglycérol lipase issue d'une souche génétiquement modifiée de *Trichoderma reesei* porteuse d'un gène muté codant une triacylglycérol lipase de *Fusarium oxysporum* pour la biscuiterie, la viennoiserie, la pâtisserie, la panification (à l'exception du pain de tradition française) et la panification spéciale.

#### **1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE**

Ce dossier entre dans le cadre du décret du 10 mai 2011<sup>1</sup> 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 2011<sup>2</sup>, le dossier doit être établi selon le guide<sup>3</sup> de l'European Food Safety Authority (EFSA) pour la soumission d'un dossier sur les enzymes alimentaires.

---

<sup>1</sup> 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.

<sup>2</sup> 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

<sup>3</sup> 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 19 mai 2016, l'Anses a effectué une demande de compléments d'information auprès de la DGCCRF, le 27 mai 2016. Le 21 décembre 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 GT « Biotechnologie » le 19 mai 2016 et les 19 janvier et 16 mars 2017, sur la base de rapports initiaux rédigés par cinq 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 rendues publiques *via* le site internet de l'Anses ([www.anses.fr](http://www.anses.fr)).

## **3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT**

### **3.1 Identité de l'enzyme alimentaire<sup>4</sup>**

L'enzyme alimentaire est une triacylglycérol lipase (E.C. 3.1.1.3). Cette enzyme catalyse l'hydrolyse des liaisons esters des triglycérides et des triacylglycérols en générant des mono et diacylglycérols, des acides gras libres et potentiellement du glycérol.

Une unité d'activité de la triacylglycérol lipase est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer à partir de tributyrine, une micromole d'acide butyrique en une minute, à 30 °C et pH 7,0.

Les caractéristiques de l'enzyme alimentaire sont décrites. La triacylglycérol lipase 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. Une activité endo-1,4 bêta-glucanase est présente en quantité limitée.

Les critères de pureté chimique et biologique de l'enzyme alimentaire répondent aux exigences de l'arrêté du 19 octobre 2006 modifié<sup>5</sup>. 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.

<sup>4</sup> 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.

<sup>5</sup> 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 la triacylglycérol lipase a été synthétisée et optimisée à partir de la séquence codante d'un gène de *Fusarium oxysporum*. De même, 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 de production se fait sur 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 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 documentée par le pétitionnaire. La souche de production de l'enzyme alimentaire est la souche de *Trichoderma reesei* génétiquement modifiée RF 10625. Son certificat de dépôt dans une collection de souches de micro-organismes est fourni.

#### 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 indiqués et leur sécurité documentée.

L'enzyme alimentaire est produite selon les Bonnes Pratiques de Fabrication pour l'alimentation humaine (cGMP) sur une analyse HACCP<sup>6</sup>. 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 la triacylglycérol lipase sont des acides gras, des mono et diglycérides et du glycérol.

Dans les conditions recommandées par le pétitionnaire, la triacylglycérol lipase est inactivée de façon irréversible par les étapes de cuisson des différentes denrées alimentaires revendiquées.

<sup>6</sup> Hazard Analysis and Critical Control Points

### 3.4 Utilité technologique et conditions d'utilisation proposées

L'enzyme alimentaire serait un auxiliaire technologique destiné à la biscuiterie, la viennoiserie, la pâtisserie, la panification (à l'exception du pain de tradition française) et la panification spéciale.

### 3.5 Exposition alimentaire

La marge de sécurité est calculée selon la méthode du Budget<sup>7</sup> 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 25 % 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 rapport de la dose sans effet néfaste observé (NOAEL<sup>8</sup>), 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* les denrées alimentaires permet de calculer une marge de sécurité de 11111.

Les solides organiques totaux (TOS<sup>9</sup>) sont calculés selon la formule  $TOS = 100 \% - \text{humidité} - \text{cendres} - \text{diluants}$ .

### 3.6 Données toxicologiques

Les études de toxicité ont été réalisées selon les lignes directrices internationales de l'OCDE<sup>10</sup> et les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

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

L'étude de mutagenicité *in vitro* sur bactéries (test d'Ames sur cinq souches de *Salmonella* Typhimurium histidine dépendantes) a été réalisée à des concentrations d'enzyme pouvant atteindre jusqu'à 5000 µg/boîte (dose maximale recommandée par la ligne directrice de l'OCDE 471) avec et sans système d'activation métabolique S9. Elle n'a pas révélé d'augmentation du nombre de révertants en présence de l'enzyme alimentaire et donc pas d'effet mutagène.

Le test d'aberrations chromosomiques sur des lymphocytes périphériques humains a été réalisé à des concentrations d'enzyme pouvant atteindre jusqu'à 5000 µg/ml en présence de système d'activation métabolique S9 et sans système d'activation métabolique S9 pour le temps court (4 h), et sans système d'activation métabolique S9 jusqu'à 3300 µg/ml pour le temps long (22 h). Ce test a mis en évidence quelques aberrations chromosomiques de type « échanges de chromatides » en présence de système d'activation métabolique S9, aussi bien chez les témoins que les cellules traitées avec l'enzyme. Toutefois, ces événements restent compatibles avec les données historiques du laboratoire. Ces résultats ne laissent pas supposer une activité clastogène de l'enzyme alimentaire.

<sup>7</sup> 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](http://whqlibdoc.who.int/ehc/WHO_EHC_240_9_eng_chapter6.pdf)

<sup>8</sup> No Observed Adverse Effect Level

<sup>9</sup> Total Organic Solids

<sup>10</sup> Organisation de Coopération et de Développement Economiques

### 3.7 Allergénicité

L'alignement des séquences de la triacylglycérol lipase de *Fusarium oxysporum* et d'une lipase de *Thermomyces lanuginosus* (*Humicola lanuginosa*) montre une identité supérieure à 35 % sur une fenêtre de 80 résidus et une identité locale sur 8 résidus contigus.

La consommation orale de la triacylglycérol lipase de *Fusarium oxysporum* via les denrées traitées n'est pas une voie à risque pour ce potentiel allergénique. Mais sur le site de production et lors de la mise en œuvre de l'enzyme, il conviendra de prévenir chez les opérateurs, le risque de sensibilisation par inhalation et par contact cutané d'aérosols ou de particules de cette enzyme alimentaire. Le port de masque et de vêtements de protection devra être recommandé pour prévenir les sensibilisations des opérateurs.

### 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 triacylglycérol lipase issue d'une souche génétiquement modifiée de *Trichoderma reesei* (RF 10625) porteuse d'un gène muté codant une triacylglycérol lipase de *Fusarium oxysporum* pour la biscuiterie, la viennoiserie, la pâtisserie, la panification (à l'exception du pain de tradition française) et la panification spéciale.

## 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 triacylglycérol lipase issue d'une souche génétiquement modifiée de *Trichoderma reesei* (RF 10625) porteuse d'un gène muté codant une triacylglycérol lipase de *Fusarium oxysporum* pour la biscuiterie, la viennoiserie, la pâtisserie, la panification (à l'exception du pain de tradition française) et la panification spéciale. L'Anses rend donc un avis favorable à cette demande.

Dr Roger Genet

## MOTS-CLES

Enzyme, auxiliaire technologique, triacylglycérol lipase, *Trichoderma reesei*, *Fusarium oxysporum*, panification, biscuiterie, pâtisserie, viennoiserie

Enzyme, processing aid, triacylglycerol lipase, *Trichoderma reesei*, *Fusarium oxysporum*, baking process, bakery, cookie, pastry, viennese pastry